

Grad. School of the Univ. of Tokushima, [°]Takahiko Mizuno, Yasuhiro Mizutani, Tetsuo Iwata

E-mail: c501342005@tokushima-u.ac.jp

1. はじめに

我々が既に報告している光子計数型位相変調方式蛍光寿命 計 (PC-PMF; photon-counting phase-modulation fluorometer)¹⁾ を改良し,最大測定変調周波数が 1.0 GHz で動作する装置を 製作した. PC-PMF は,位相変調法と単一光子計数法を組み 合わせた手法であり,位相変調法では対応できない微弱光の 測定を可能とする. さらに,今回,光電子増倍管(PMT; photomultiplier tube)の帯域を超えた 1.0 GHz の高周波変調光 の測定に本手法が有効であることを実験的に確認した.本報 告では,実際に,1mg/L DAPI – Tris/EDTA 溶液の蛍光寿命測 定を行った結果を示す.DAPI は DNA 染色に用いられている 蛍光色素であり,その蛍光寿命はサブナノ秒オーダ²⁾である ため,蛍光寿命が短い蛍光色素として一般的に用いられてい る.

2. 光子計数型位相変調方式蛍光寿命計

図1に、本測定法の概要を示す.(a)に示すように、周波数 f の正弦波で変調された励起光を試料に照射する.蛍光が十分 強ければ、PMTの出力波形は(b)のようになる.蛍光が微弱な 場合(c)のようになり、アナログ測光ができなくなるが、単 一光子計数法を適用すると蛍光寿命値の推定が可能となる. (c)および、励起波形と同期したクロック信号(d)で時間振幅変 換器(TAC; time to amplitude converter)を動作させ、その出力 信号(e)をマルチチャネルアナライザ(MCA; multichannel analyzer)に導入することで、(f)に示すように、MCA から (b)と相似なヒストグラムが取得できる.このとき、従来の TC-SPC 法の場合と同様に、PMTの周波数帯域を超えた分解 時間が達成できる.実質的には、分解時間を制限する要因は、 光源、もしくは使用するPMTの電子走行時間ゆらぎに起因す るジッターのみとなる.



Fig. 1 Illustration of operation of the PC-PMF..

図2に、システムのブロック図を示す.光源は,発振波長405 nmの青紫色レーザーダイオード(NDV4313, Nichia)とした.こ れを,自作の駆動回路により1.0 GHzで正弦波変調させた.レ ーザーダイオードを用いることで,簡単な構成でGHzオーダ の周波数で変調ができる.試料の蛍光は,PMT(R7400U, Hamamatsu Photonics)で検出し、TAC-MCAペアで構成される 光子計数システムで測定した.測定に際し、TAC (566, Ortec) の測定時間幅は50 nsとし,MCA (568, Ortec) のチャネル数は 8192とした.このとき、形式的な分解時間は6.1 psとなるが、 実質的には主にPMTの電子走行時間ゆらぎに依存し、本シス テムではおよそ0.1 nsとなる.

3. 1 mg/L DAPI-Tris/EDTA溶液の蛍光寿命測定

サブナノ秒オーダの蛍光寿命を持つ試料として、1 mg/L DAPI-Tris/EDTA 溶液 (吸収ピーク波長; 360 nm, 蛍光ピーク 波長; 460 nm) の蛍光寿命測定を行った. 図 3 に, 取得した励 起光および蛍光のヒストグラム波形を示す. 両者の位相差は 50±2 deg.となり, 蛍光寿命 τ = 0.2±0.01 ns が得られた. 文献 値³⁾と同等の値が得られた.



Fig. 2 Schematic block diagram of a 1.0 GHz photon-counting phase-modulation fluorometer.



Fig. 3 Excitation and fluorescence histogram waveforms of DAPI–Tris/EDTA solution.

文献

1) T. Iwata, et. al., Optical review **8** (2001) 326.

2) M. Barcellona, et. al., Eur. Biophys. J., 17 (1990) 315.