

薄膜干渉基板を用いた偏光技術に基づく 高コントラスト蛍光顕微鏡の開発とタンパク質分析への応用

High-Contrast Fluorescence Microscopy for a Protein Analysis Based on Polarization Techniques Using an Optical Interference Mirror Slide

○安田 充*, 秋元 卓央 (東京工科大応用生物)

○Mitsuru Yasuda*, Takuo Akimoto (Tokyo Univ. of Tech.)

E-mail: m.yasuda@kwansei.ac.jp

1. 諸言

Ag 基板上に Al_2O_3 薄膜が形成された薄膜干渉基板では、一般的なガラス基板に比べ、蛍光分子 Rhodamine B の蛍光シグナルが 100 倍以上増強する [1]。また蛍光標識タンパク質の検出では 50 倍以上の蛍光増強をもたらす [2]。しかし、薄膜干渉基板では基板上での励起光の強い反射による高い背景光ノイズが原因で、蛍光画像のコントラストが低いという問題があった [3]。コントラストを改善するために、薄膜干渉基板の 2 つの光学特性に着目した。(i) 蛍光増強は励起光の偏光に依存する [1]。(ii) 偏光した励起光を入射したとき、基板から反射した励起光は反射する前の元の偏光を維持するが、蛍光は偏光していない。これらの光学特性を利用することで、偏光技術を用いないガラス基板に比べ、コントラストを 100 倍以上向上することに成功した。

本研究では、この開発した高コントラスト蛍光イメージング技術を市販の蛍光顕微鏡へ応用し、その蛍光顕微鏡を用いて、タンパク質の高感度蛍光分析を目的とする。

2. 実験

ガラス基板上に $1\ \mu\text{m}$ の Ag、その上に $90\ \text{nm}$ の Al_2O_3 を形成した薄膜干渉基板を作製し、基板表面にアミノ基を修飾した。この基板上に NHS-activated Biotin をスポットして、Biotin を固定化後、Cy3 標識 Streptavidin を結合させた。Cy3 からの蛍光を検出するために、市販の蛍光顕微鏡の光源側に偏光フィルタを挿入し、薄膜干渉基板上に直線偏光した励起光を入射した。一方、検出器側にも偏光フィルタを挿入した。このフィルタが通す偏光は、励起光の偏光と直行している。この装置を用いて Cy3 の蛍光を検出した。比較のために光源側と検出器側の両方に偏光フィルタを挿入していない通常の方法で、ガラス基板上での Cy3 標識 Streptavidin からの蛍光を検出した。

3. 結果と考察

最初に、図 1 に示すように基板上にスポットした Rhodamine B の蛍光を検出した。偏光技術を用いる薄膜干渉基板では、偏光技術を用いないガラス基板に比べ、蛍光シグナルが 13 倍増強し、背景光ノイズが 1/8 倍にまで減少することで、蛍光画像コントラストが 100 倍以上向上することがわかった [4]。Cy3 標識 Streptavidin の検出結果については当日、報告する。

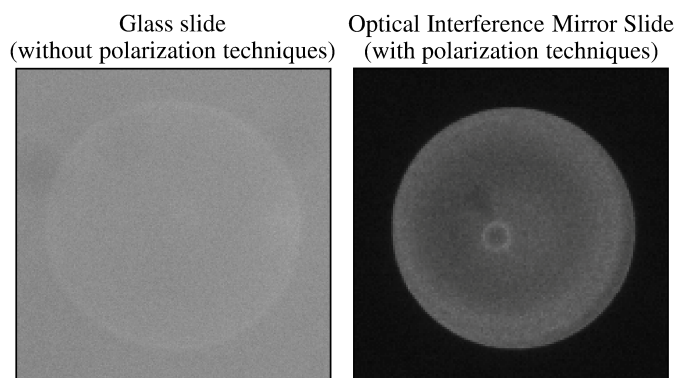


Fig. 1. Fluorescence images of Rhodamine B

[1] T. Akimoto *et al.*, *Appl. Opt.* 47, 3789 (2008).

[2] M. Yasuda and T. Akimoto, *Anal. Sci.* 28, 947 (2012).

[3] T. Akimoto and M. Yasuda, *Appl. Opt.* 49, 80 (2010).

[4] M. Yasuda and T. Akimoto, *Biosensors* 4, 513 (2014).

*Present address : Kwansei Gakuin Univ.