

Spark™ 10M マルチ検出モードリーダーの 遠赤色蛍光における性能評価

他のマルチ検出モードリーダーとの比較から、遠赤色蛍光色素 Alexa Fluor® 647 の検出に関する優れた性能が判明

緒言

マルチ検出モードリーダーの蛍光検出限界を測定する場合、通常はフルオレセインなどの緑色蛍光色素を使用する。一方、顧客の多くは、多色検出や蛍光バックグラウンドの低減などを目的として、赤色領域の蛍光を発する色素を使用している。標準的な光電子増倍管(PMT)の多くは、赤色および遠赤色波長に対する感度が低くなっている。したがって、緑色色素を用いて測定した検出限界は、必ずしも遠赤色領域(600 nm 超)の色素に対する検出限界を反映しているとは限らない。

Tecan の新型マルチ検出モードリーダー Spark 10M は、緑色フルオロフォアに対する優れた感度を示している(1)。同製品は独自の Fusion Optics を採用している。そのため、ユーザーは 1 台の装置の励起側と蛍光側にフィルターとモノクロメーター(MCR)を組み合わせ使用することが可能であり、さらには 1 回の測定でも同様に使用することが可能となっている。

本テクニカルノートでは、他の業者が販売している 2 種類のマルチ検出モードリーダーとの比較から、Spark 10M リーダーの優れた性能を実証する。各装置をモノクロメーターモードで作動させ、(Cy5 に近い蛍光スペクトルを有する)遠赤色蛍光色素 Alexa Fluor 647 に対する検出限界を測定する。

装置 A および装置 B では、ともに赤色に対して最適化した PMT を使用することができる。ただし、これらの PMT では、緑色蛍光色素に対する最適性能は保証されていない。本研究では、緑色蛍光

に対して最適化した標準的な PMT を両装置に搭載した。一方、Spark 10M の PMT は可視光全域のスペクトルに対して最適化されている。そのためユーザーは赤色に対して最適化した PMT と緑色に対して最適化した PMT を選択する必要がない。

材料及び方法

- Spark 10M マルチ検出モードリーダー (Tecan, オーストリア)
- 装置 A(直線可変ショートパス/ロングパスフィルター搭載マイクロメーター使用)
- 装置 B(モノクロメーターベースのシステム)
- 黒色 384 ウェルプレート(FLUOTRAC™) (Greiner® Bio-One, ドイツ)
- フルオレセイン(NaOH(10 mM)に 1 nM 含有)
- NaOH(10 mM)
- Alexa Fluor 647(1 nM 水溶液、Life Technologies、米国)

Spark 10M の検出限界と装置 A および装置 B の検出限界とを比較するため、NaOH(10 mM)を用いてフルオレセインを希釈し、最終濃度を 1 nM とした。同様に H₂O を用いて Alexa Fluor 647 を希釈し、最終濃度を 1 nM とした。表 1 に示すプレートレイアウトに従い、黒色 384 ウェルマイクロプレートに、フルオロフォアもしくはブランク試料のいずれかをウェル 1 個あたり 100 μl 充填した。

◇	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
A	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
C	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
E	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
G	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
I	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
K	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
M	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
O	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F

表 1: 上方蛍光強度測定用プレートレイアウト。B(ブランク) = NaOH(10mM) (フルオレセイン)または H₂O(Alexa Fluor 647)。F(フルオロフォア) = フルオレセイン(1 nM)または Alexa Fluor 647(1 nM)。

測定パラメータ

表 2 に示す設定を用いて、Spark 10M、ならびに装置 A および装置 B を使用して各プレートを 3 回測定した。測定は、全てモノクロメーターモードの装置を用いて実施した。最適な結果を得るため、全ての装置のフラッシュ数を 100 に設定した。

パラメータ	設定
Spark 10M	
測定モード	上方蛍光強度
フルオレセイン	
励起	485 nm
蛍光	535 nm
Alexa Fluor 647	
励起	635 nm
蛍光	680 nm
フラッシュ数	100
ゲイン	Optimal(最適値)
ダイクロイックミラー	Auto(自動)
Z-最適化	ウェルから計算
待機時間	100 ミリ秒
装置 A	
測定モード	上方蛍光強度
フルオレセイン	
励起	483 nm
蛍光	530 nm
Alexa Fluor 647	
励起	635 nm
蛍光	680 nm
フラッシュ数	100
ゲイン	Optimal(最適値)
ダイクロイックミラー	なし
Z-最適化	ウェルから計算
待機時間	100 ミリ秒

装置 B

測定モード	蛍光エンドポイント
フルオレセイン	
励起	485 nm
蛍光	535 nm
Alexa Fluor 647	
励起	635 nm
蛍光	680 nm
フラッシュ数	100
ゲイン	ウェルから計算
ダイクロイックミラー	なし
Z-最適化	ウェルから計算
待機時間	100 ミリ秒

表 2: Spark 10M リーダーならびに装置 A および装置 B による蛍光測定に使用した測定パラメータ

式 1 に示すように、各測定に対する検出限界(DL)を計算した。3 回測定した検出限界の平均値を用いて、各蛍光色素に対する装置の感度を測定した。

$$\text{検出限界} = \frac{\text{濃度}[F]}{(\text{平均値}[F] - \text{平均値}[B])} \times 3 \times \text{標準偏差}[B]$$

式 1: 検出限界の計算

濃度[F]:

フルオレセインもしくは Alexa Fluor 647 の最終濃度(単位 pM)

平均値[F]: フルオロフォアを充填したウェルの平均 RFU 値

平均値[B]: ブランク試料を充填したウェルの平均 RFU 値

標準偏差[B]: ブランク試料を充填したウェルの標準偏差

結果

表 3 に Spark 10M、ならびに装置 A および装置 B を用いて測定したフルオレセインおよび Alexa Fluor 647 の検出限界を示す。検出限界が低いほど、装置の感度が高いことを示している。

フルオレセインについては、装置 A の検出限界は Spark 10M と同等であった。一方、Alexa Fluor 647 については、装置 A の検出限界は Spark 10M と比較して 4 倍以上高い値となった。装置 B の検出限界は、Spark 10M と比較してフルオレセインについては若干高い値(2 倍未満)となり、Alexa Fluor 647 については大幅に高い値(約 3.6 倍)となった(図 1)。

	Spark 10M	装置 A	装置 B
フルオレセイン	DL(pM)	0.416	0.440
	標準偏差	0.033	0.044
Alexa Fluor 647	DL(pM)	1.140	5.144
	標準偏差	0.059	0.853

表 3: フルオレセインおよび Alexa Fluor 647 に対する平均検出限界

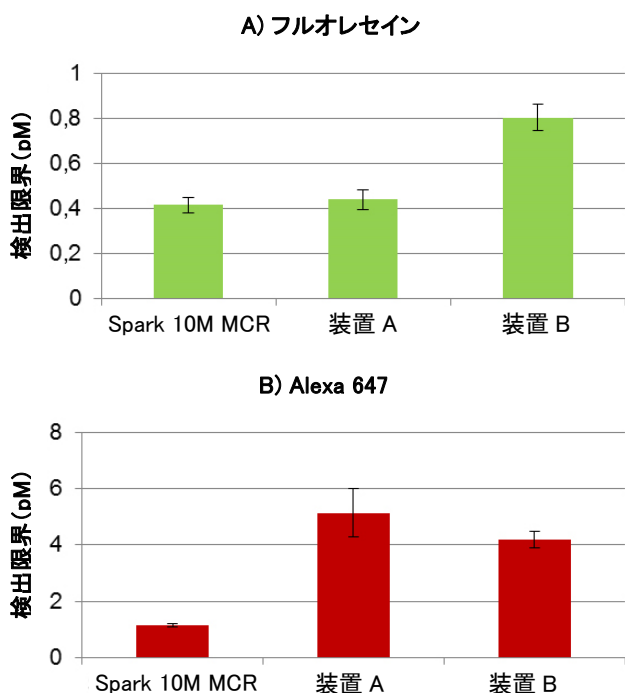


図 1: Spark 10M および他の 2 種類のマルチ検出モードリーダーを用いて測定したフルオレセイン(A)および Alexa Fluor 647(B)の検出限界。エラーバーは標準偏差を示す。

結論

PMT の多くは、赤色および遠赤色蛍光に対する感度が緑色波長範囲と比較して低くなっている。したがって、緑色色素に対して求めた検出限界は、必ずしも他の色素に対する検出限界を反映しているとは限らない。本テクニカルノートに示した結果は、遠赤色フルオロフォア Alexa Fluor 647 に対する Spark 10M の性能が、他の 2 種類のマルチ検出モードリーダー競合製品と比較して優れていることを示している。モノクロメーターを使用した場合、Spark 10M の Alexa Fluor 647 に対する検出限界は他の 2 種類の装置よりも低く、したがって感度が高いことが判る。フルオレセインに対する検出限界は、3 種類の装置とも同程度であった。この結果は、独自の Fusion Optics を採用した Spark 10M リーダーが緑色フルオロフォアのみならず、赤色および遠赤色蛍光スペクトルに対しても優れた性能を有する製品であることを示している。

略語

- DL 検出限界
- MCR モノクロメーター
- PMT 光電子増倍管

参考文献

- (1) Technical Note: The ingenious Fusion Optics in the Spark™ 10M multimode reader. 398568 V1.0. 12-2014

※このアプリケーションノートは Tecan (本社 スイス) が発行(原文 英語)し、テカンジャパンが日本語翻訳したものです。
 翻訳文の表現等に疑義が生じた場合は、原文をご参照ください。

Australia +61 3 9647 4100 Austria +43 62 46 89 33 Belgium +32 15 42 13 19 China +86 21 2206 3206 Denmark +45 70 23 44 50 France +33 4 72 76 04 80
 Germany +49 79 51 94 170 Italy +39 02 92 44 790 Japan +81 44 556 73 11 Netherlands +31 18 34 48 174 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 595 95 25 31
 Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 81 11 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +43 62 46 89 33

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された商標とデザインは、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の商標または登録商標です。完全なリストは www.tecan.com/trademarks で参照できます。リストには含まれませんが、ここに記載されている製品名および会社名はそれぞれの所有者の商標である場合があります。

Tecan は、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の登録商標です。Spark、SparkControl、Fusion Optics および Quad4 Monochromators は同商標です。

Spark 10M は研究用途向けです。診断用途ではご使用いただけません。

© 2015 Tecan Trading AG スイス 著作権所有 免責事項と商標については、www.tecan.com をご覧ください。

www.tecan.com www.tecan.co.jp/spark