



Spark™ 10M マルチ検出モードリーダー TRF 感度

Fusion Optics の採用により、TRF 検出限界を最適化

緒言

特定の測定モードにおけるマイクロプレートリーダーの感度（または検出限界 (DL)）は、さまざまな因子によって左右される。まず装置の設定は、感度測定結果に重大な影響を与える。蛍光強度 (FI) 測定（時間分解蛍光 (TRF) 測定を含む）の場合、特定の装置および蛍光色素に対して励起波長および蛍光波長を最適化しなければならない。特定のアッセイ/用途に最適な励起波長および蛍光波長は装置の構造によって変化し、蛍光色素の最大励起波長および最大蛍光波長とは若干異なる可能性がある。したがってモノクロメーターベースであれフィルターベースであれ、いずれのマイクロプレートリーダーでも励起波長および蛍光波長を最適化する必要がある。

TRF 測定の場合には遅滞時間および積分時間も非常に重要なパラメータであり、最適化しなければならない。遅滞時間とは、励起からシグナル積分開始までの時間を指す。積分時間とは、その名前が示す通り、シグナルを収集する時間を指す。一般的な蛍光強度測定の場合、遅滞時間は 0、積分時間は 20~60 μs の範囲となる。TRF 測定の場合、遅滞時間は 50~300 μs 、積分時間は 100~600 μs の範囲となり、その値は蛍光色素分子（ユーロピウム、テルビウムもしくはルテニウム）および使用するマイクロプレートリーダーによって変化する。

感度の最適化におけるもう一つの重要な因子として、フラッシュ数が増えられる。フラッシュ数とは、装置のフラッシュランプが発するフラッシュの数、すなわち、標準的な結果を得るために蛍光色素分子を励起させる回数を指す。フラッシュ数が増加すると、アッセイブランク測定結果のばらつきが小さくなり、測定精度が高くなる。検出限界はアッセイブランク測定結果の標準偏差に正比例するため、検出限界が向上する（式 1 を参照）。フラッシュ数が減少すると測定時間は短くなる一方、感度は低下する。したがってユーザーは、各々の用途と個々の要件に合わせて感度/速度比を最適化しなければならない。

待機時間とは、プレートを移動してから測定を開始するまでの時間を指す。特にマルチウェルマイクロプレートフォーマットでは、待機時間を利用することにより、ウェル間のばらつきを最小限に抑えることができる。ほとんどの場合、ウェル内の液体が無用に揺動することを防止するには、待機時間として 150 ms を設定すれば十分である。液体の揺動は測定値の精度に悪影響を及ぼす可能性がある。さらに Z フォーカス機能の最適化やダイクロイックミラーの使用など、装置の設定も測定値に重大な影響を及ぼす。したがって、測定の実施に際しては装置の設定についても考慮しなければならない。測定を成功させるには、装置の設定の最適化に加え、いくつかのアッセイパラメータも重要となる。測定能力を最大限に高めるには、プレートタイプ、フォーマットおよび充填体積の最適化が必要となる。

TRF 測定の場合には、その全てで白色マイクロプレートを使用することが極めて重要となる。状況によっては、アッセイプロトコールに特定の濃度が記載されている場合であっても、色素濃度を最適化する必要も生じる。

また確実な結果を得るためには、科学的に正しいデータ整理も必要である。グラブス外れ値検定を使用すれば、ピペット操作またはプレート誤差による無用な外れ値を除外することができる(1)。アッセイブランク試料を含むウェルでは、この作業が特に重要となる。

新型 Spark 10M リーダーは、Tecan 独自の Fusion Optics を搭載しており、1 台のマルチ検出モードリーダーがフィルターとモノクロメーター (MCR) 双方の長所を併せ持っている。この独創的な Fusion Optics を利用すれば、Spark 10M にフィルター、Quad4 Monochromators™、またはその双方を搭載することができる。そのためユーザーは、励起と蛍光の双方に対してフィルターとモノクロメーターを別々に選択することも、フィルターとモノクロメーターを 1 台の装置に搭載して使用し、さらには 1 回の測定に使用することもできる(3)。SparkControl™ソフトウェアを利用すれば、フィルターもしくはモノクロメーター波長を簡単に選択することができる。

本テクニカルノートでは、時間分解蛍光強度測定において、ユーロピウムに対して実現しうる最も優れた検出限界の測定に使用した最適な試験方法、装置の設定および統計式について説明する。

材料及び方法

装置

- Spark 10M マルチ検出モードリーダー (Tecan, オーストリア)

マイクロプレート

- 384 ウェル平底白色ポリスチロール (Greiner® Bio-One, ドイツ)

試薬

- ユーロピウム (1 nM) (Perkin Elmer, 米国)
- Delfia® Enhancement Solution (Perkin Elmer, 米国)

ピペット操作手順

表 1 のプレートレイアウトに基づき、384 ウェルプレートに充填する (充填体積: ウェル 1 個あたり 100 µl)。気泡を除去するため、プレートを 500~2000 rpm で素早く遠心沈殿させた (Heraeus Labofuge 400e)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
B	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
C	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
D	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
E	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
F	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
G	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1
H	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1	B1	F1

表 1: TRF 測定用プレートレイアウト。B1(ブランク) = Delfia Enhancement Solution, F1(蛍光色素分子) = ユーロピウム (1 nM)

測定パラメータ

表 2 に示す装置の設定を用いて、プレートを 3 回測定した。最適な結果を得るため、フラッシュ数を 150 に設定した。

パラメータ	設定
測定モード	時間分解蛍光測定
励起	フィルター: 340 (35) nm モノクロメーター: 340 nm
蛍光	フィルター: 612 (10) nm モノクロメーター: 617 nm
フラッシュ数	150
遅滞時間	100 µs
積分時間	400 µs
ゲイン	Optimal (最適値)
ミラー	ダイクロイック (510 nm)

表 2: Fusion Optics の各種組み合わせによる時間分解蛍光測定 (ユーロピウム) に使用した試験パラメータ

データ整理

グラブス外れ値検定 (最大ノルム残差検定ともいう) を使用し、有意な外れ値となったウェルの測定結果を除外した。この統計的検定を使用し、正規分布母集団由来を仮定した上で、単変量データセットの外れ値を検出した(1)。GraphPad オンライン計算機を使用し、有意水準 0.05 で検定を実施した(2)。外れ値を除外した後、式 1 に示すように検出限界を計算した。

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

式 1: 検出限界の計算

濃度[F]: フルオレセインの最終濃度 (単位 pM)
平均値[F]: 蛍光色素分子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

各測定について、グラブス検定および検出限界の計算を実施した。3 回測定した検出限界の値の平均値を計算し、それを使用して装置の感度を測定した。

結果

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。Spark 10M の Fusion Optics の全ての組み合わせにおいて、検出限界は非常に低い値を示した。したがって、装置の感度は非常に高い。このことは、Spark 10M の Fusion Optics のどの組み合わせを使用しても、性能を低下させることなく、標準的な時間分解蛍光強度測定を実施することが可能であることを示唆している(表 3)。

測定 番号	モード			
	FF	FM	MF	MM
1	26.6 fM	41 fM	36.2 fM	69.8 fM
	2.66 amol/ウエル	4.1 amol/ウエル	3.62 amol/ウエル	6.98 amol/ウエル
2	36.2 fM	43.8 fM	35.6 fM	59.9 fM
	3.62 amol/ウエル	4.38 amol/ウエル	3.56 amol/ウエル	5.99 amol/ウエル
3	17.3 fM	41.4 fM	35.4 fM	65.0 fM
	1.73 amol/ウエル	4.14 amol/ウエル	3.54 amol/ウエル	6.50 amol/ウエル
平均値	26.7 fM	42.1 fM	35.7 fM	64.9 fM
	2.67 amol/ウエル	4.21 amol/ウエル	3.57 amol/ウエル	6.49 amol/ウエル
標準偏差	9.5 fM	1.5 fM	0.4 fM	5.0 fM
	0.95 amol/ウエル	0.15 amol/ウエル	0.04 amol/ウエル	0.5 amol/ウエル

表 3: 最適条件において Spark 10M リーダーを使用した場合の標準的なユーロピウム検出限界。Fusion Optics の組み合わせごとにプレートを 3 回測定した。FF = 両側にフィルター。FM = 励起側にフィルター、蛍光側にモノクロメーター。MF = 励起側にモノクロメーター、蛍光側にフィルター。MM = 両側にモノクロメーター。

※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。

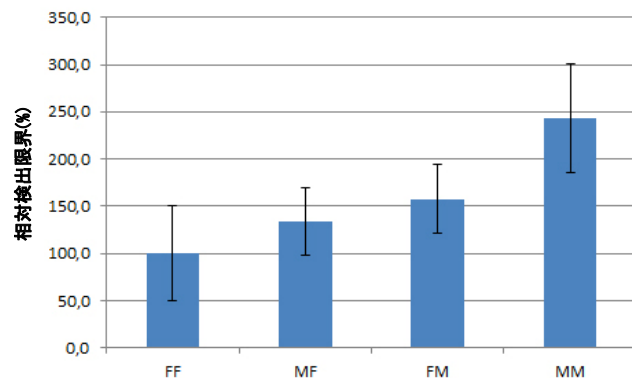


図 1: Fusion Optics で可能な各種組み合わせで比較したフルオレセイン相対検出限界。エラーバーは標準偏差を示す。FF = 両側にフィルター。FM = 励起側にフィルター、蛍光側にモノクロメーター。MF = 励起側にモノクロメーター、蛍光側にフィルター。MM = 両側にモノクロメーター。

要約

以上の結果は、TRF 測定において Spark 10M マルチ検出モードリーダーが優れた性能を備えていることを明確に示すものである。上記の感度試験および装置の設定を利用すれば、検出限界を向上させ、装置の感度を最大限に高めることができる。本テクニカルノートで論じた原理は、時間分解蛍光を利用した全ての用途に適用することができる。ただし、システムの最適な設定は、アッセイおよびユーザーの個々の要件(感度/速度比など)によって変化する。

参考文献

- (1) Frank E Grubbs. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. Technometrics, 1969, 11(1), 1-21.
- (2) <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>
- (3) TN: The ingenious Fusion Optics in the Spark 10M multimode reader; 398568

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