

微弱な蛍光シグナルを捉えるための最適な感度調整方法

背景

フローサイトメーターによる解析において、“より微弱な蛍光シグナルを捉えたい”、という研究者のニーズは潜在的にあるもので、抗体と蛍光色素の組み合わせの再構築などが必要になることもしばしばある。今回は一般的なフローサイトメーターの感度調整のテクニックのみで微弱なシグナルを捉えることが可能である方法について紹介する。



サンプル、装置

- ・ 8 Peak beads (Sony Biotechnology社製)
- ・ セルソーターSH800S (ソニー社製)

方法

8段階の輝度を有する蛍光粒子の混合物である8 Peak beadsを用いて、FITCのパラメーターのPMTVを段階的に設定し、そのヒストグラムの結果や、それぞれのピークの平均蛍光強度から相関係数R2を算出し、PMTV最適化について示した。

結果

図1はFITCのPMTVを20%～45%まで段階的に調整し、レコードしたものを示した。PMTVが低値の20%では、3段階のピークしか検出できず、PMTVを段階的に上げることによってピークの本数が増加していることが示めされた。また、PMTV35%では、ピークの本数が8本検出できているものの、微弱な段階のシグナル分離が完全にはできておらず、PMTVを更に上げることにより、視覚的に改善されていることが示唆される。

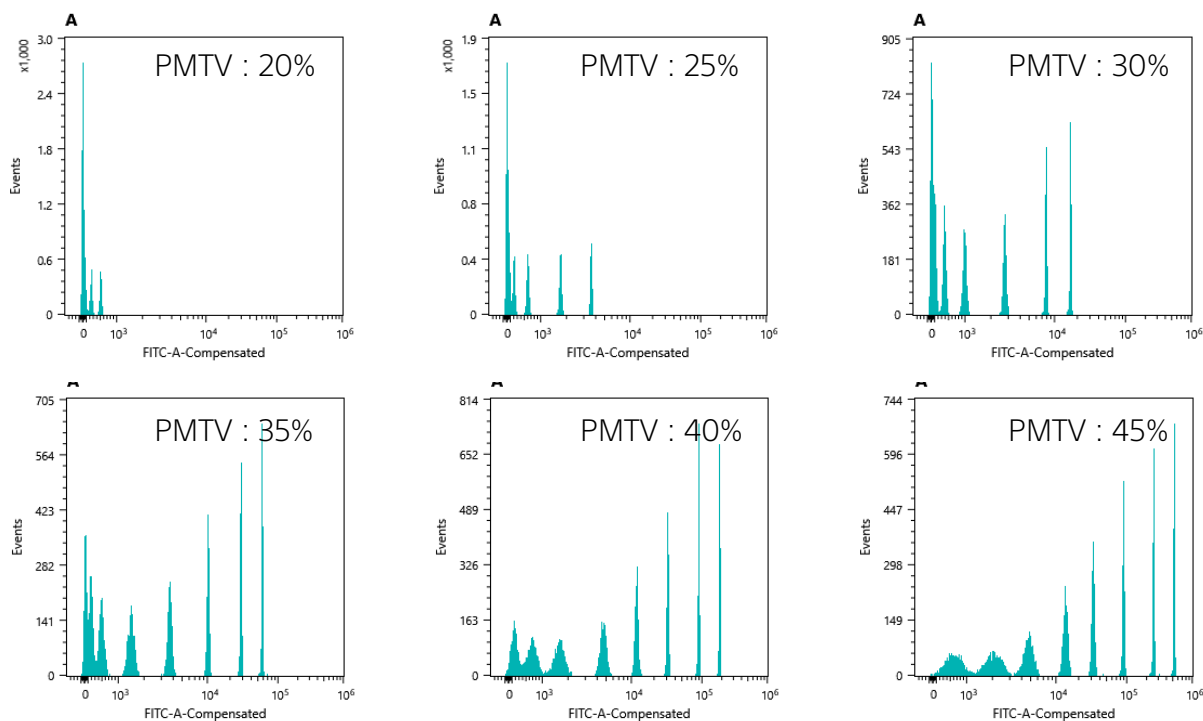


図1 8 Peak Beadsを測定した時のPMTV別FITCのヒストグラム

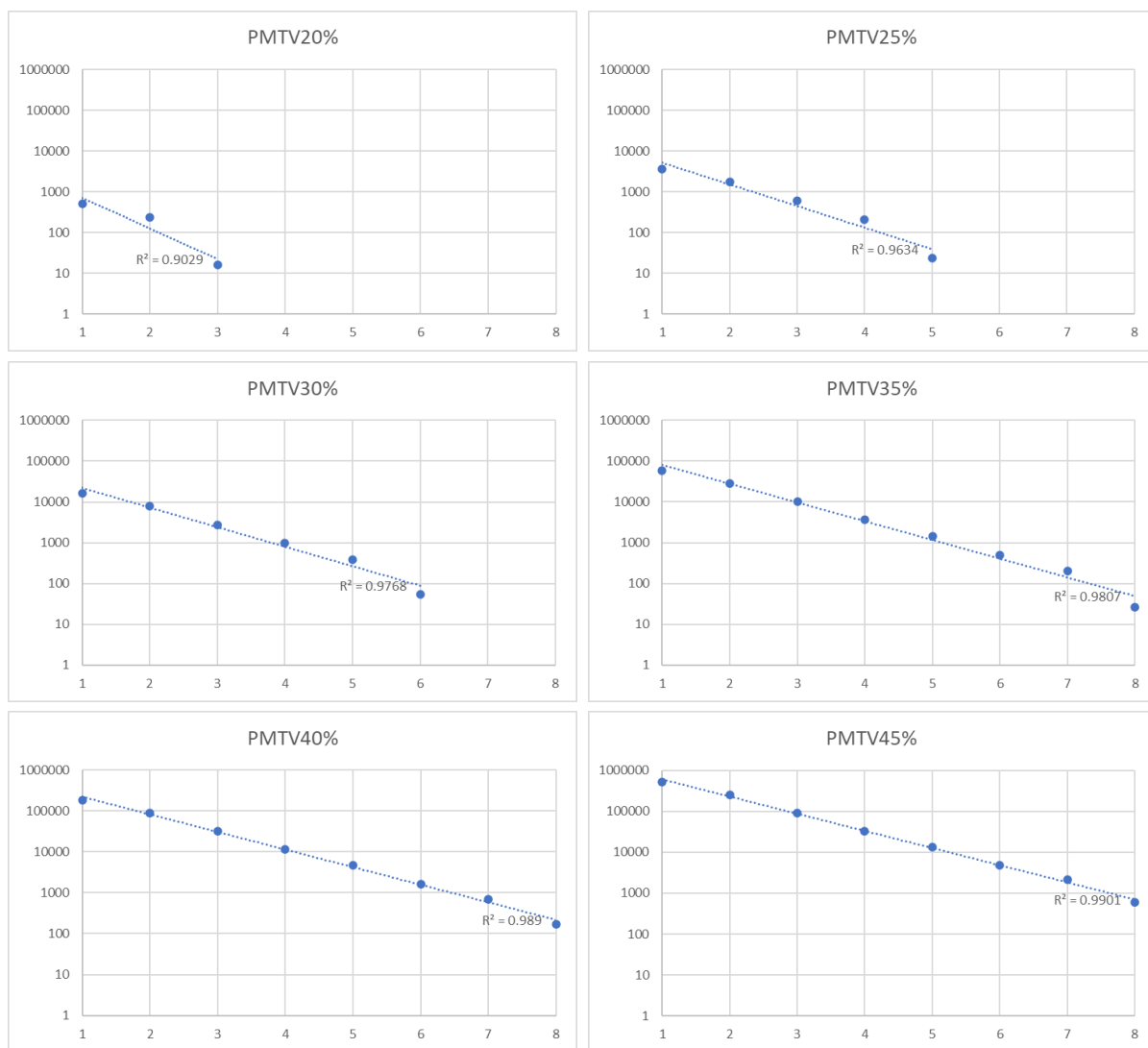


図2 8つのピーク各々の平均蛍光強度および決定係数R²

さらに、図2に、8つのピークそれぞれの平均蛍光強度とその決定係数R²を検量線上に示した。PMTVを上げるほど、R²の値が高くなっていることが分かり、特に微弱な蛍光信号を含む8つのピークすべてが検出されたPMTV35%~45%においてもそれが認められた。以上のことから、微弱な蛍光信号を捉えるには、PMTVをできるだけ高めの設定にすることが推奨される。

考察

本紙では、微弱な蛍光を検出するためのノウハウのひとつとして、PMTVをできるだけ高める方法について紹介した。特に、8つのピークが検出できている35%、40%、45%の条件下でもPMTVを上げた方が、S/Nが改善し、R²の値が改善したことが示せた。ただし、PMTVを上げすぎることによって、最も強い信号が飽和状態にならないように、注意する必要がある。

発行元

ソニー株式会社
ライフサイエンス事業部 ライフサイエンス営業部

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

Fax: 0120-388-060

E-mail: cytometry@sony.com

URL: <https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

