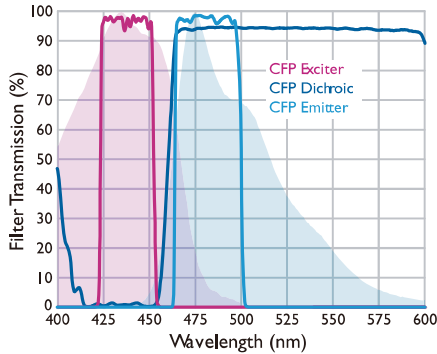


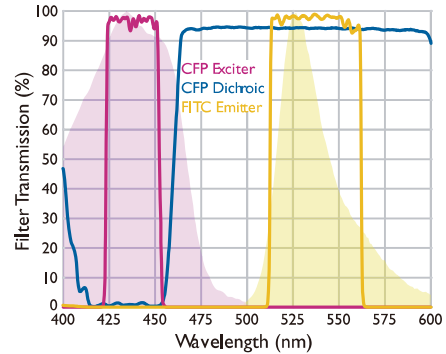
BrightLine® FRETセット

FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer ~蛍光共鳴エネルギー移動~)用のフィルターです。

Donor励起用の励起フィルターとDonor用とAcceptor用の2枚の蛍光フィルター、ダイクロイックビームスプリッターで構成されるフィルターセットになります。



CFP励起・蛍光スペクトルとCFP用励起・蛍光フィルターの透過波長との関係(ドナー側蛍光観測時)



CFP励起スペクトル・YFP蛍光スペクトルとCFP用励起フィルター・YFP蛍光フィルターの透過波長との関係(アクセプター側蛍光観測時*)

*グラフ上のフィルターは受光側に検知器を使用した時に使用を推奨するFF01-536/40-25のスペクトルです)

Technical Note

FRETのための光学フィルター構成

一般に、FRET計測はフィルターキューブを交換することで行います。例えばCFP-YFPペアの場合、ドナー観察用(CFP励起/CFP蛍光)、アクセプター観察用(CFP励起/YFP蛍光)のフィルターキューブを順次交換することでドナーとアクセプターの蛍光強度を測定します。ブリーチング専用キューブ(YFP励起/YFP蛍光)を用いてアクセプター特異的なフォトブリーチングを行い、その前後でのドナーの蛍光強度の変化を測定すればFRET効率を決定することも可能です。

透過の立ち上がり・立下がり急峻なバンドパスフィルターを用いることで確実にアクセプターのみをブリーチングさせることや、クロストークを軽減した蛍光イメージングを行うことが出来ます。キューブ法は非常に簡便なFRET計測手法ではあるものの、いくつか短所があります。例えば、スピードが遅いこと(フィルターキューブの交換は通常1秒程度)、画像の乱れ(フィルター・ターレットのブレやその他の機械的振動に由来)が生じることなどです。

これらの技術的問題を解決するには図(b)に示すようにフィルターホイールを利用します。これは、顕微鏡ターレットのキューブ固定されたドナー励起用のエキサイターとダイクロイックビームスプリッターと、ドナーもしくはアクセプターに特異的な蛍光フィルターを装着したフィルターホイールから構成されます。ドナーまたはアクセプターいずれかの蛍光はフィルターホイールを回転させることで検出します。フィルターホイールは振動を最小化する構造となっており、フィルターターレットと比較すると交換時間もかなり短縮されています(約100ミリ秒)。よって、フィルターキューブの交換では追従できない速い現象をFRET測定することに適しています。

さらに高速でのイメージングが必要とされる場合(生細胞や単分子のイメージング)では、ドナーおよびアクセプターの蛍光信号を「同時に」イメージングすることが求められます。図(c)は、同時イメージング用の構成例を示しています。ここでは、顕微鏡の蛍光チャンネル内に配置されたイメージ・スプリットング・ダイクロイックビームスプリッターが、ドナーとアクセプターからの信号の分離を行い、それぞれの信号を異なる二つのCCDや、同一CCDの異なる二つの領域に投影します。可動パーツがないため、振動由来の画像の乱れも排除されています。

