

時間反転対称性を利用した蛍光相関分光における偽信号の除去

(理研・田原分子分光) 石井邦彦, 田原太平

Reduction of the afterpulsing effect in fluorescence correlation curves using symmetry analysis

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN) Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

蛍光相関分光法 (FCS) は生体分子のマイクロ秒オーダーの自発的な揺らぎを観測する有力な手段である[1-3]。ところが、FCS で検出器として通常用いられる光子計数型アバランシェフォトダイオードは光子検出による信号パルスの発生後数マイクロ秒以内にアフターパルスと呼ばれる偽の信号を確率的に発生させるため、この影響で蛍光相関関数が速い時間領域で大きく歪むことが知られている。本講演では、パルス励起と時間相関光子計数法 (TCSPC) を用いて相関信号の時間反転対称性を解析し、アフターパルスによる偽の信号を除去する方法を報告する。これを利用することで従来法に比べ簡略化された光学配置でサブマイクロ秒領域までの正確な相関測定を行えるようになり、速いダイナミクスの解明に向けた FCS の多様な応用が促進されると期待できる。

【原理】パルス励起 FCS では TCSPC 検出により図 1 a のような信号光子列が得られる[1-3]。観測された光強度の変化を時刻 T と励起 - 発光遅延時間 t の関数 $I(T; t)$ として表す。ここで t は n 個の値に離散化されているとする。ある時刻 T の全蛍光強度 $I(T)$ とそこから ΔT 経過した時点での t に依存する蛍光強度 $I(T + \Delta T; t)$ の間の相関関数を $C(\Delta T; t)$ と書く。

$$C(\Delta T; t) = \langle I(T)I(T + \Delta T; t) \rangle = \sum_{t'=1}^n \langle I(T; t')I(T + \Delta T; t) \rangle. \quad (1)$$

アフターパルスの影響を含まない真の蛍光相関関数 $C_0(\Delta T; t)$ は、系が平衡状態にある場合、時間反転 $\Delta T \rightarrow -\Delta T$ に対して対称になる。

$$C_0(\Delta T; t) - C_0(-\Delta T; t) = 0. \quad (2)$$

次に、確率 $p(\Delta T)$ で発生するアフターパルスに由来する偽の相関信号について考える。任意の時刻に観測されるある信号パルスの t の分布は、アンサンブル平均の蛍光減衰曲線 $\bar{I}(t)$ に一致する。一方、これに付随して ΔT 後に発生するアフターパルスの t の分布 $p(\Delta T; t)$ は、 $\Delta T \gg t$ であるとき t に依存しない値 $p(\Delta T)/n$ になるとみなせる (図 1 b)。言い換えると、 $\bar{I}(t)$ = 定数でない限り、アフターパルス由来の相関信号 $C'(\Delta T; t)$ は $\Delta T \rightarrow -\Delta T$ の反転に対して非対称な t 依存性を示す。

$$C'(\Delta T; t) - C'(-\Delta T; t) = \sum_{t'=1}^n \bar{I}(t')p(\Delta T; t) - \bar{I}(t) \sum_{t'=1}^n p(\Delta T; t') = p(\Delta T) \left\{ \sum_{t'=1}^n \bar{I}(t')/n - \bar{I}(t) \right\}. \quad (3)$$

$C(\Delta T; t)$ の非対称性 $\Delta C(\Delta T; t) \equiv C(\Delta T; t) - C(-\Delta T; t)$ は(2), (3)の和であり、観測された相関信号に対するアフターパルスによる偽信号の寄与の大きさを表す。

$$\Delta C(\Delta T; t) = p(\Delta T) \left\{ \sum_{t'=1}^n \bar{I}(t')/n - \bar{I}(t) \right\}. \quad (4)$$

右辺の括弧内の量 ($\Delta \bar{I}(t)$ とする) は平均の蛍光減衰曲線から正確に求められる。そこで実験

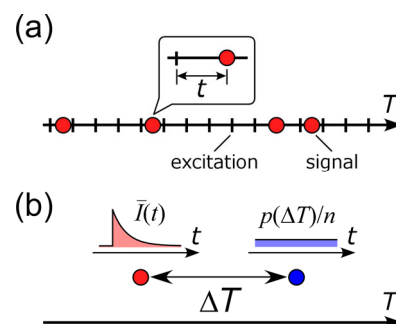


図 1 (a)パルス励起 FCS 測定の信号光子列データ。(b)任意の信号パルス (左) とアフターパルス (右) の t の分布。

で得られた $\Delta C(\Delta T; t)$ と $\Delta \bar{I}(t)$ を用い、 $p(\Delta T)$ を以下のように最小二乗解として決定する。

$$p(\Delta T) = \frac{\sum_{t=1}^n \Delta C(\Delta T; t) \Delta \bar{I}(t) / \sigma^2(t)}{\sum_{t=1}^n \{\Delta \bar{I}(t)\}^2 / \sigma^2(t)}. \quad (5)$$

ここで $\sigma(t)$ は $\Delta C(\Delta T; t)$ の誤差を表す。この $p(\Delta T)$ を用いて相関関数からアフターパルスの寄与を差し引くことができる。

【実験】 FCS 測定は自作の蛍光相関分光計[1-3]を用いて行った。励起光源としてフェムト秒光パラメトリック発振器 (Coherent Mira-OPO) の出力 (532 nm, 76 MHz) を用いた。蛍光光子は光子計数型アバランシェフォトダイオード (id Quantique id100-20-ULN) で電気信号パルスに変換し、各パルスについて TCSPC ボード (Becker & Hickl SPC-140) で T, t の情報を記録した。相関関数の計算と(5)式による $p(\Delta T)$ の評価は Igor Pro (Wavemetrics) を用いて行った。

【結果と考察】 図 2 はテトラメチルローダミン (TMR) の $\Delta \bar{I}(t)$ と蛍光相関信号である。図 2 b の点線は蛍光をビームスプリッターで二分して 2 台の検出器で観測し、それらの相互相関をとったものである。1 台の検出器の出力のみから計算した自己相関信号 (実線) でサブマイクロ秒領域に顕著にみられる減衰成分は、相互相関信号には現れていない。これは相互相関信号が原理的にアフターパルスの影響を受けないためであり、これらの差がアフターパルスによる偽の相関信号である。 $\Delta T \sim 100$ ns の自己相関信号の消失は TCSPC の不感時間によるものである。一方自己相関信号から上記の方法でアフターパルスの寄与を差し引いたもの (破線) は $\Delta T \geq 150$ ns でほぼ完全に相互相関信号の形を再現しており、アフターパルスの影響を取り除けることが確認できる。講演ではさらに、同様の目的でこれまでに報告されている他の方法[4,5]の問題点を検討し、本手法の特長について述べる。

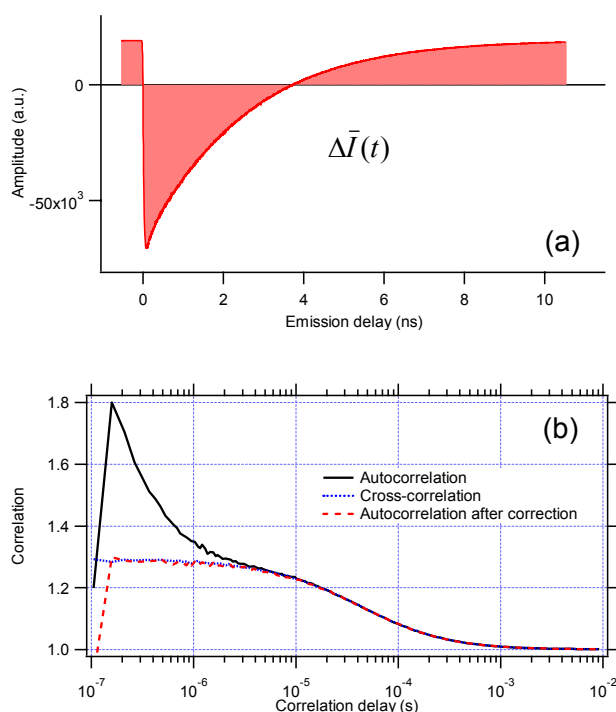


図 2 TMR の(a) $\Delta \bar{I}(t)$ と(b) 蛍光相関信号。

以上のように、本手法によりサブマイクロ秒までの時間領域において単一の検出器のみを用いて正確な蛍光相関関数を計測することが可能となった。これにより例えば FCS 測定の多色化・多点化などの拡張を行う際、各チャンネルについて個別に相互相関測定を行うことに伴うコストや調整の煩雑さの問題が避けられ、FCS を用いてマイクロ秒領域の自発揺らぎをより精度良く調べるのが容易になると期待される。

【参考文献】

1. K. Ishii, T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **114**, 12383 (2010).
2. K. Ishii, T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **519-520**, 130 (2012).
3. 石井邦彦・田原太平, 第 5 回分子科学討論会, 1B09 (2011).
4. M. Zhao, L. Jin, B. Chen, Y. Ding, H. Ma, D. Chen, *Appl. Opt.* **42**, 4031 (2003).
5. J. Enderlein, I. Gregor, *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 033102 (2005).