

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No. 22

基礎編： LAS-3000 の基本性能

LAS-3000

はじめに

1997年のLAS-1000システムの発売以来、化学発光によるサザンブロットティング、ウェスタンブロットティング、ノーザンブロットティングの高性能冷却CCDシステムによる検出法がますます多くの人に利用されるようになってきました。冷却CCDシステムは化学発光の定量的検出のために最適であることが、認められつつあります。このたび、Super CCD技術を用いて、さらに性能を向上させた冷却CCDカメラシステムLAS-3000を開発しました。このスーパーCCDは、各画素の形状が八角形でそれらが互い違いにレイアウトされるユニークな構造を持ち、高感度、高解像度、多段階ビニングが可能などの特性を持っています。本アプリケーションノートでは、これらのユニークな特性が実際のサンプル測定にどのように反映されるかを解説しました。

Contents

1. LAS-3000 と従来機 (LAS-1000plus) との比較
2. スーパー CCD と CCD イメージングの基本原理
3. LAS-3000 による化学発光イメージング
4. ビニングによる高感度化
5. 化学発光、蛍光、デジタイズ検出のテクニック
6. 参考文献

LAS

1 LAS-3000 と従来機 (LAS-1000plus) との比較

今回ご紹介するLAS-3000には最近注目を集めている富士写真フィルムが開発したスーパー CCD 技術^{1,2)}を導入し、高感度な化学発光検出システムとして有効な新機能を盛り込みました。LAS-3000の優れた特性を説明するために、すでに定評のあるLAS-1000plusとの比較をTable.1に示しました。画素数、CCDの大きさ、ピニング設定の多様性、露出時間設定、棚の位置やフィルタ設定のリモートコントロールなどに進展が見られます³⁻⁵⁾。

Table.1 LAS-3000 とLAS-1000plus の比較

	LAS-3000	LAS-1000plus
CCD	320万画素 Super CCD APS- サイズ 対角長 28mm	130万画素 インターライン型 CCD オーバー 1 インチ 対角長 19mm
画素サイズ	10.75 μ m 八ニカム	11 μ m 正方画素
冷却温度	~ -35 (通常 -30)	~ -30 (通常 -25)
高感度レンズ	F0.85 Fujinon レンズ、焦点距離 43mm リモート焦点・絞り機構内蔵	F0.85Fujinon レンズ、焦点距離 20mm
冷却方式	ペルチェ素子 + 強制空冷	ペルチェ素子 + 強制空冷
交換レンズ用アダプタ	F マウントアダプタ	C マウントアダプタ
棚段数	4 段(オプションレンズへの交換で、LAS-1000plus の 7 段目サイズ相当まで撮影可能)	7 段
棚設定	リモートコントロール	マニュアル
フィルタ枚数	最大 5 枚	最大 2 枚
フィルタ設定	リモートコントロール	マニュアル
フィルタ直径	77mm	62mm
光源	落射：白色光、青色 LED (460nm) 透過：白色 LED, UV	落射：白色光、青色 LED(460nm) 透過：白色 LED
ピニング設定	Standard High Binning, High Super Binning, Super Ultra Binning, Ultra	2 x 2 (High モード)
高精細モード	630万画素 高精細モードあり	なし
ダークフレーム 補正	あり (CCD キャリブレーション機能)	あり
フラットフレーム 補正	あり	あり
露出モード	Precision, Increment, Repetition	Precision, Increment, Repetition
露出時間設定	Auto 機能 プリセット 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/15, 1/30, 1/60, 1/100 sec. 1, 2, 5, 10, 30, 60 min., 2, 15 hr. 手入力 sec. (~ 1999) min. (~ 1800) hr. (~ 30)	Auto 機能 プリセット 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/15, 1/30, 1/60, 1/100 sec., 1, 2, 5, 10, 30, 60 min. 手入力 sec. (~ 3600) min. (~ 60) Bulb 機能 (長時間露出)

*APS: アドバンスドフォトシステム

2 スーパー CCD と CCD イメージングの基本原理

■ スーパー CCD

従来の CCD は四角形の画素が縦・横に並んでいます。(Fig.1-a) 今回使われたスーパー CCD では八角形の画素が右下図のように並んでいます。(Fig.1-b) このような形状をとることで単位面積あたりに占める画素面積を大きく取ることが可能となり高精細かつ高感度なシステムを実現することができました。さらに、複数画素をまとめて1画素として読み出す機能(ピニング読み出し機能)は、従来の CCD では4画素をまとめて1つの画素にするだけでしたが、スーパー CCD では8画素、32画素および128画素をまとめて1画素とすることで、さらに高感度な読み取りを実現しています。

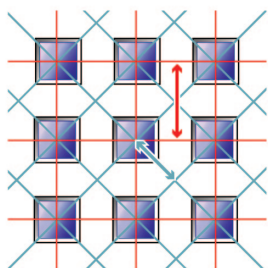


Fig.1-a 従来の CCD 画素

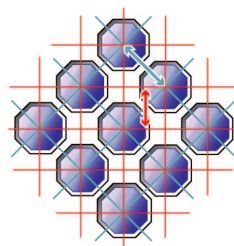


Fig.1-b スーパー CCD の画素

■ CCD キャリブレーション

LAS-3000ではCCD素子固有のノイズを抑制するため、素子を-30℃に冷却して使用しています。さらにノイズ分布を補正するために、CCD キャリブレーション(ダークフレーム補正)を行っています。CCD キャリブレーションデータはLAS-3000カメラ部のシャッターを閉じ、種々の露出時間で画像取得したものです。

■ フラットフレーム補正

CCDカメラとレンズとを組み合わせたシステムの場合、得られた画像の中心は明るく、周辺が暗くなる性質があります。そのため、フラットフレーム補正を行う必要があります。化学発光画像の補正データはレンズの種類、柵の位置に応じたメーカーの提供するデータが自動的に適用されます。蛍光画像の補正データは一樣な蛍光を発する蛍光板を用いてそれぞれの光源、それぞれの柵の位置で取得します。フラットフレーム補正により、得られた画像の定量解析が可能となります。

■ Precision モード*1

指定した設定条件で1枚の画像を取得するのがPrecisionモードです。Auto露出機能(Liteモードのみ)は未知のサンプルを露出するとき有効です。

*1 通常はこのモードで画像を取得します。

■ Increment モード*2

一定時間の露出を一定間隔で実施して得られた画像を加算演算した画像が得られます。化学発光強度が変化しやすい短寿命の化学発光サンプルおよび未知のサンプルの画像取得、条件を見つける実験に有効です。

*2 各画素のシグナル(S)とノイズ(N)を共に加算するために得られる画像のS/Nは長時間の露出でも一定です。

■ Repetition モード

一定時間の露出を一定間隔で実施したときのそれぞれの区間画像が得られます。化学発光が最大となるまでの時間が一定ではないサンプル検出の実験に有効です。

3 LAS-3000 による化学発光イメージング

■ 化学発光検出に使用するトレイ

化学発光検出に使用するEPIトレイは黒色でテフロン処理を施してあります。化学発光検出はもちろん青色LEDによる落射蛍光の検出に用います。テフロン処理を施してあるので、トレイに汚れが吸着せず、簡単にふき取ることができます。

NPトレイはタイタープレートによる化学発光検出に用います。フレネルレンズにより視差を解消し、各ウェルを真上からイメージングした画像が得られます。

■ 露出時間 (Exposure Time)

ImageReader (読み取りソフトウェア) の Lite モードには Auto 機能があります。これを用いると露出時間を LAS-3000 が自動的に決定して実施します。Manual 機能では Fig.2 に示すように予め用意された露出時間を選択可能であり、また露出時間を手入力することも可能です。LAS-1000plusと比較するとLAS-3000では露出時間のメニューが増え、手入力の単位に秒(sec)、分(min)以外に時間(hr)が加わりました。きわめて弱いノーザンブロットティングのサンプルなどはオーバーナイト露出として予め用意した15hrを用いることが可能であり、さらに手入力では30時間まで入力可能です。短い露出時間として用意した1秒以下の時間設定は蛍光検出やデジタイズ検出に用います。

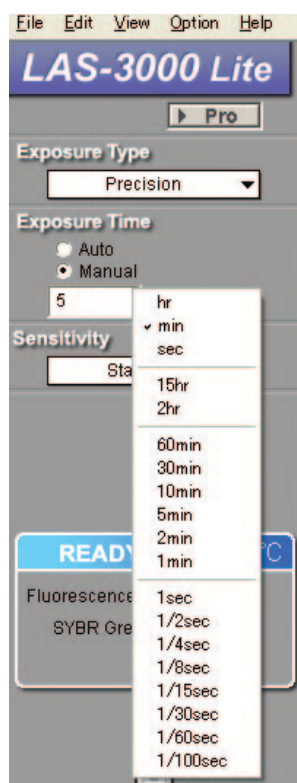


Fig. 2

Fig.2
露光時間の Manual 設定

■ 階調調整

冷却CCDカメラシステムでは画像を取得すると、多くの場合、データが狭いレンジに分布しています。LAS-3000では、オートレンジスコープ機能により、画像として見やすい範囲にレンジが自動設定されます。さらに画像表示濃度を変更できるグラデーションバーが用意されています。コントラスト調整についての詳細はアプリケーションノートNo.13に記載されています⁶⁾。

ワンポイント アドバイス

LAS-3000において発光のデモンストレーション用に発光定規を用意しました。この発光定規に使われている発光顔料は光エネルギーを吸収して数時間にわたって発光を続けます^{7, 8)}。 黒色顔料の添加により4段階の発光レベルを作っています(Fig.3)。

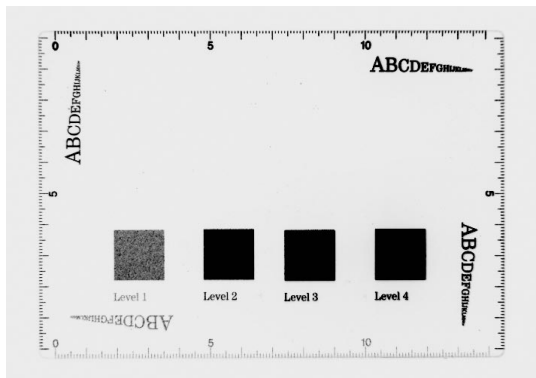


Fig.3

Fig.3 発光定規の画像
 レンジスコープは512 - 7680
 に絞り込まれ、階調調整は
 Linear変換で行われています。

4 ビニングによる高感度化

■ ビニングの種類

ビニングは複数の画素のデータを合わせて一つの大きな画素として取り扱う手法です。露出した後に各画素に蓄積した電荷を合わせて読み出すので、画素を大きくする効果があり感度が向上します。LAS-3000においてはStandard (2画素)、High Binning(8画素)、Super Binning(32画素)、Ultra Binning (128画素)の4段階のビニングがあります。ビニングによって画素数が減少すると得られた画像が粗くなります。そこでLAS-3000では画像処理によって画像を滑らかにする機能を設けました。High Binning、Super Binning、Ultra Binningの画素数をStandardと同じ画素数に変換してHigh、Super、Ultraの画像を作ります。画像読み取りソフトウェアのProモードはすべてのビニングを装備し、LiteモードではStandardと同じ画素数に変換した4つのビニングを装備しています。

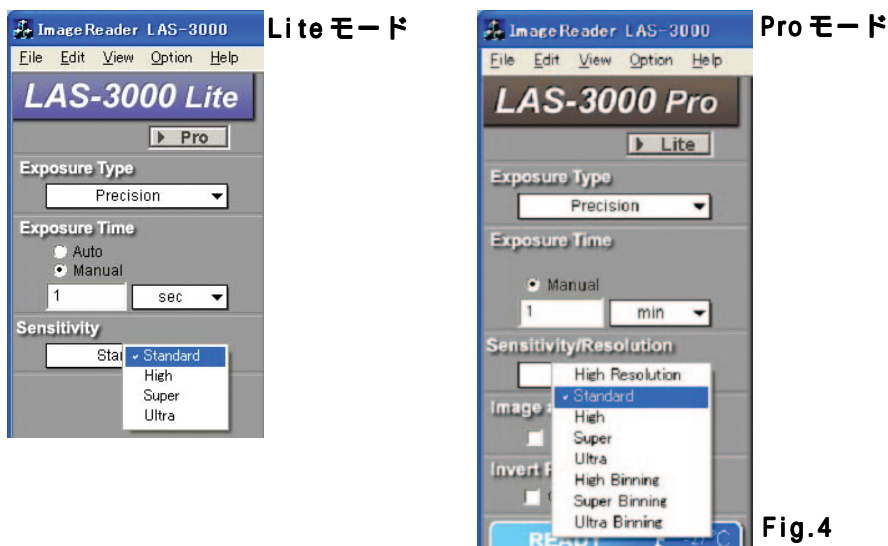


Fig.4 画像読み取りソフトのProモードとLiteモードでのビニング機能表示

Fig.5 に Super Binning 画像と滑らか変換後の Super の画像を示します。

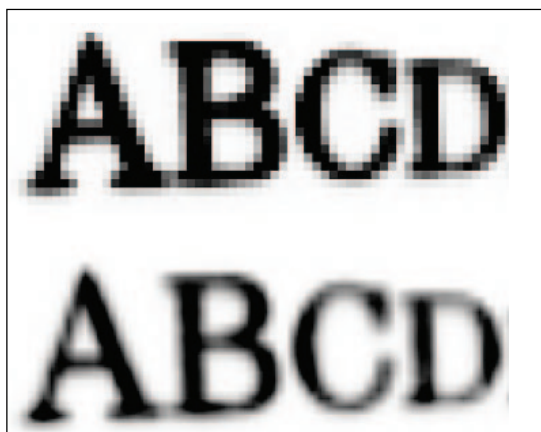


Fig. 5

Fig.5 Super Binning画像(上)と Super 画像(下)の比較

■ 露出時間の短縮

長寿命型の化学発光である CDP-Star を、Auto 機能によって各 Sensitivity でイメージングしたときの露出時間を比較しました。Standard では 120 秒だった露出時間が Ultra では 2 秒でした。(Fig.6-a ~ 6-d)このように、ビニングによって露出時間を短縮することが可能となります。

Fig.6 各種 Sensitivity での Auto 露出画像

サンプル: DNA のスロットプロット
基質: CDP Star

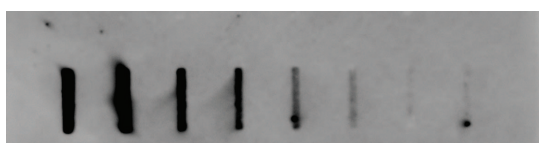


Fig.6-a

Fig.6-a Standard; 120 秒露出

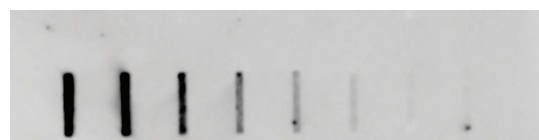


Fig.6-b

Fig.6-b High; 30 秒露出

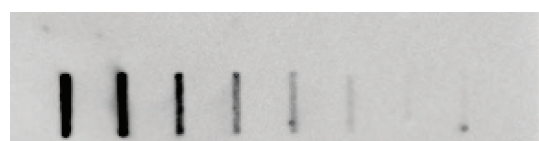


Fig.6-c

Fig.6-c Super; 8 秒露出

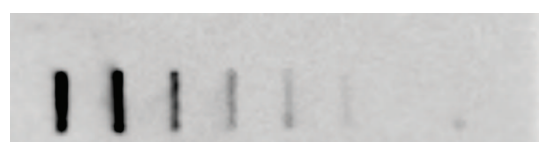


Fig.6-d

Fig.6-d Ultra; 2 秒露出

露出時間を比較してFig.7に示します。

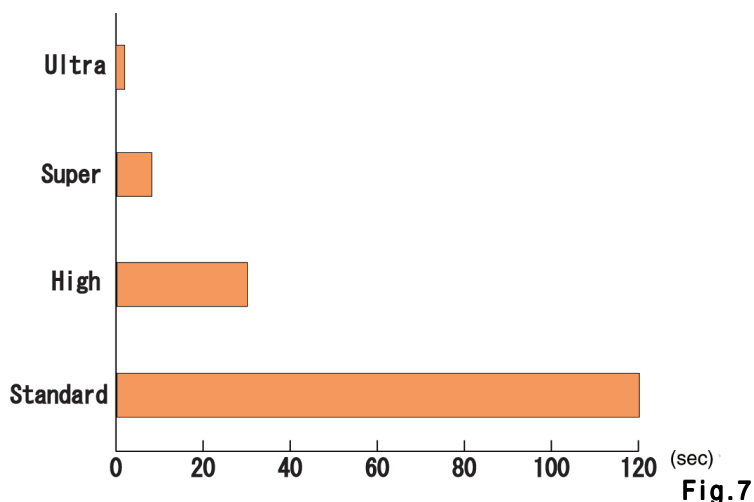


Fig.7 各種ビニングにおけるAuto機能による露出時間

■ ビニングによる定量結果

ビニングを実施する目的は感度の向上です。ビニングを利用すると、高感度検出が可能になりますが、解像度は低下します。Fig.6のようなサンプル例では、SuperやUltraでも実用上十分な解像度だと思われます。ビニングは用途に応じて使い分けができます。各種のビニング設定で一定の露出時間で発光定規をイメージングしたとき、4段階の濃度標準を定量した結果をTable.2に示します。同じ露出時間ではビニングによってより大きな測定値が得られるようになります。

Table.2 発光定規を各種ビニングでイメージングしたときの定量結果例

		バックグラウンド	レベル1	レベル2	レベル3	レベル4
Standard	AU/mm ²	1,026	1,226	1,750	2,017	2,492
	A-B/mm ²	--	199	724	991	1,466
High	AU/mm ²	1,030	1,694	3,420	4,295	5,767
	A-B/mm ²	--	664	2,390	3,265	4,737
Super	AU/mm ²	1,042	3,578	10,140	13,330	18,670
	A-B/mm ²	--	2,536	9,098	12,290	17,620
Ultra	AU/mm ²	1,088	10,630	35,510	47,110	64,710
	A-B/mm ²	--	9,541	34,420	46,030	63,620

単位: AU/mm²

A-B/mm²: シグナルからバックグラウンドを減算した結果

露出時間: すべて10秒

注意: 得られる数値は発光定規ごとの蓄光状態によって異なります

5 化学発光、蛍光、デジタル検出のテクニック

■ 発光強度が未知の化学発光サンプルの AUTO 検出

初めてのサンプルで露出時間が分からないときに Lite モードの Ultra や Super で Auto 機能を用いて露出することで早く発光強度が分かります。その後 Standard でよりきれいな画像を取り直すことも可能です (Fig.7 参照)。例えば発光定規を AUTO 機能で 2 秒露出したときの画像 (Fig.8-a) とそのときの 4 段階の濃度レベル部のデータ分布を示すレンジスコープ (Fig.8-b) をみると、画像データは 512 ~ 4607 の狭い範囲に分布しているものの、画像は適度な階調に調整されています。

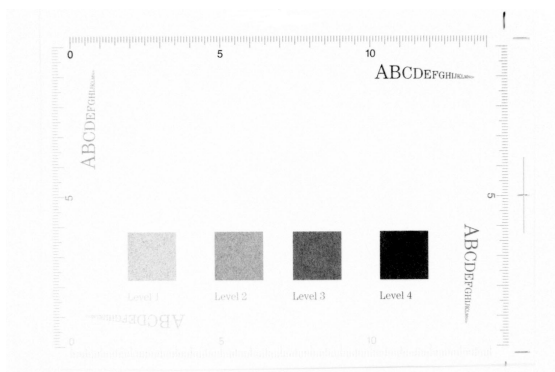


Fig.8-a

Fig.8-a 発光定規の Auto 機能による 2 秒露出画像

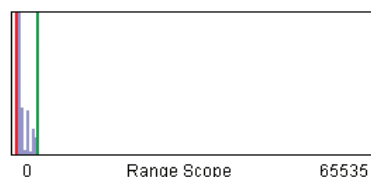


Fig.8-b

Fig.8-b Fig.8-a の 4 段階濃度レベル部におけるレンジスコープウィンドウ

■ 定量精度が重要な化学発光サンプルの Manual 検出

同じ発光定規を引き続き手入力設定で 20 秒露出したときの画像と 4 段階の濃度レベル部のレンジスコープを示します。(Fig.9-a, Fig.9-b) 画像の見え方はほとんど変わりませんが、データの分布は 512 ~ 33279 に広がっていました。4 段階の濃度測定結果を表 4 に示します。定量測定は 2 秒露出あるいは 20 秒露出のいずれの画像でも実施可能ですが、20 秒露出の画像のデータはよりレンジが広がっているため定量精度が高くなります。

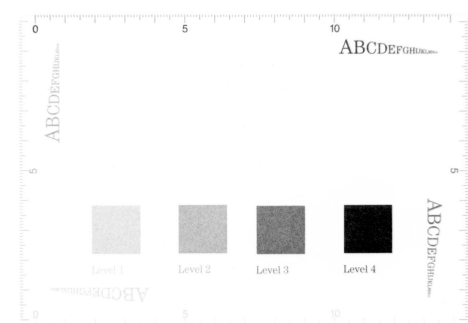


Fig.9-a

Fig.9-a マニュアル設定で 20 秒露出した発光定規画像

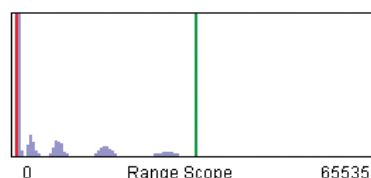


Fig.9-b

Fig.9-b Fig.9-a の 4 段階濃度レベル部におけるレンジスコープウィンドウ

Table.3 発光定規について Standard モードでの Auto 露出画像およびその 10 倍の露出時間を用いて得られた画像の定量結果例

		バックグラウンド	レベル1	レベル2	レベル3	レベル4
Auto 2秒	AU/mm ²	70,340	89,920	127,000	192,000	277,500
	A-B/mm ²	--	19,580	56,640	12,240	207,200
Manual 120秒	AU/mm ²	71,210	245,400	577,300	1,164,000	1,909,000
	A-B/mm ²	--	174,200	506,000	1,093,000	1,838,000

単位: AU/mm², A-B/mm²: シグナルからバックグラウンドを減算した結果

注意: 得られる数値は発光定規ごとの蓄光状態によって異なります

■ 蛍光検出における Auto と Manual 機能

SYPRO Ruby 染色ゲルを EPI トレイにセットし落射青色 LED による蛍光検出を行ないました。Auto 機能を用いると 1/15 秒露出で画像が得られました。(Fig.10-a) オートレンジスコープ機能によって 512 ~ 8703 の範囲に絞り込んで画像が表示されています。(Fig.10-b) 露出時間を手入力で 1 秒に設定するとレンジスコープは 0 ~ 65535 のフルレンジに広がりました。同一バンドの定量結果を Table.4 に示します。露出時間を伸ばすことでデータの範囲は 14 倍に広がり、より正確な定量ができるようになりました。

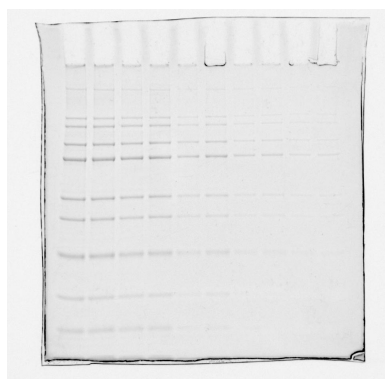


Fig.10-a

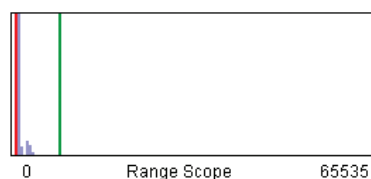


Fig.10-b

Fig.10-a SYPRO Ruby 染色ゲルの Auto 機能による 1/15 秒露出画像

Fig.10-b Fig.10-a画像のレンジスコープ

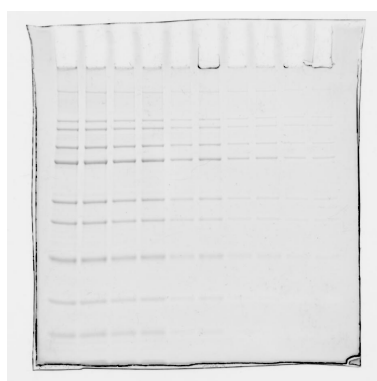


Fig.11-a

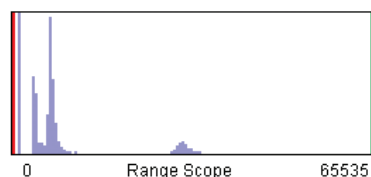


Fig.11-b

Fig.11-a SYPRO Ruby 染色ゲルの手入力機能による 1 秒露出画像

Fig.11-b Fig.11-a画像のレンジスコープ

Table.4 SYPRO Ruby 染色された乾燥ゲルの定量

露出時間	バックグラウンド	バンド	A-B/mm ²
1/15 sec	152,000	237,300	85,300
1 sec	753,200	1,957,000	1,203,000

単位 = AU/mm²

■ 長時間露出

長寿命の化学発光である Super Signal[®] や CDP Star[®] を用いて微量のサンプルを検出するためには長時間露出が有効です。LAS-3000では30時間までの露出時間を手入力で設定でき、また予め用意されたメニュー画面には2時間と15時間の露出時間を用意しました。CCDの冷却や、ノイズを低減させる種々の技術を用いてこのような長時間の露出が可能になりました。

■ デジタイズにおける AUTO 機能

CBB 染色ゲルサンプルを DIA イルミネータを用いてデジタイズしました。Auto 機能による露出時間は1秒でした。 Fig.12-a に得られた画像を、Fig.12-b にレンジスコープを示します。データの範囲は0 ~ 65535のフルレンジで画像も十分な濃度階調をもつ画像が得られました。

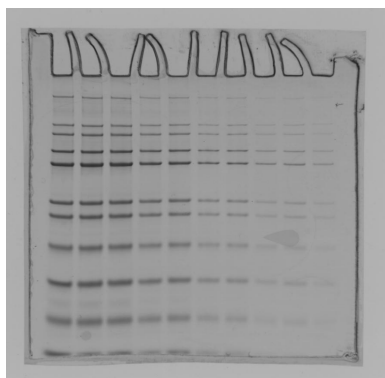


Fig.12-a

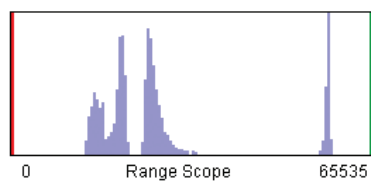


Fig.12-b

Fig.12-a CBB染色ゲルのLAS-3000のAuto機能による1秒露出画像

Fig.12-b Fig.12-a画像のレンジスコープ

銀染色ゲルサンプルについても同様にデジタイズを実施し、Fig.13-a、およびFig.13-bに示しました。この場合にも1秒の露出時間となりレンジスコープもフルレンジでした。

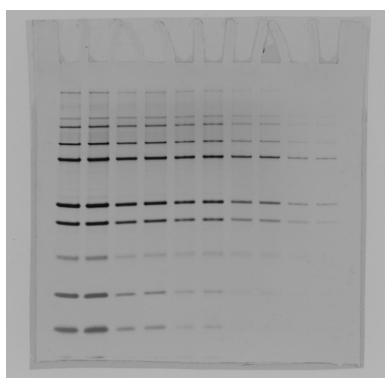


Fig.13-a

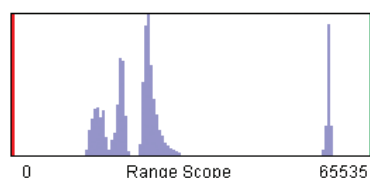


Fig.13-b

Fig.13-a 銀染色ゲルのLAS-3000のAuto機能による1秒露出画像

Fig.13-b Fig.13-a画像のレンジスコープ

■ Image acquire & Digitize 機能

ウェスタンブロットティングのメンブレンにはしばしば有色マーカーとしての分子量標準たんぱく質をバンドの両側または片側に置きます。このマーカーの画像はデジタイズによって取得します。化学発光画像とデジタイズ画像の両方を得て、重ね合わせることで、1枚の画像にすることもできます。画像読み取りソフトウェアのLiteモードにはワンタッチでこのような2種類のイメージングを実施するためのImage acquire & Digitizeボタンが用意されています。化学発光画像を取得後、自動的にデジタイズ画像を取得します。

■ LiteモードとProモード

ImageReaderソフトウェアには、LiteモードとProモードがあります。決まった条件で簡単に検出する場合はLiteモード、組み合わせをアレンジした検出を行う場合はProモードのように、目的に応じた選択ができます。これまで説明してきたAuto機能はLiteモードにのみ含まれた機能です。LiteモードとProモードの機能の違いをTable.5、Table.6にまとめました。

Table.5 LAS-3000のLiteモードとProモード

	Lite	Pro
露出時間	オート + マニュアル	マニュアル
感度	Standard, High, Super, Ultra	Standard, High, Super, Ultra, High Resolution High binning, Super binning, Ultra binning
解像度	1536x1024 画素	3072x2048 ~ 192x128 画素
手法 / トレイ	メニュー機能	組み合わせ機能

Table.6 各種ビニングにおける画像ファイル

感度	画素数 (横 x 縦)	画像ファイルサイズ
High Resolution	3072 x 2048	12.6 MB
Standard	1536 x 1024	3.15 MB
High	1536 x 1024	3.15 MB
Super	1536 x 1024	3.15 MB
Ultra	1536 x 1024	3.15 MB
High Binning	768 x 512	786 KB
Super Binning	384 x 256	197 KB
Ultra Binning	192 x 128	49.2 KB

6 参考文献

- 1) Yamada, T., Kim, Y-G., Wakoh, H., Toma, T., Sakamoto, T., et. al., IEEE Journal of Solid-State Circuit, 2000, 35, No.12, pp. 110-111.
- 2) Matsuzawa, T., Aoki, Y., Takeuchi, N., Murayama, Y., Journal of the Electrochemical Society, 1996, 143, No. 8, pp. 2670-2673.
- 3) Fujifilm Science System Application Note No.6, 1997, Fundamentals of Chemiluminescence Detection
- 4) Fujifilm Science System Application Note No.7, 1998, Film Method and CCD Method for Chemiluminescence Detection
- 5) Fujifilm Science System Application Note No.8, 1998, LAS-1000 Features in Chemiluminescence Detection
- 6) Fujifilm Science System Application Note No.13, 2000, Controlling the contrast of SCIENCE IMAGING SYSTEM images
- 7) Yoshihiko Murayama, Other Phosphors, Phosphor Handbook, Ed, Shigeo Shionoya, William M. Yen, 1999, CRC Preess LLC., pp.651-658
- 8) Matsuzawa T., Aoki Y., Takeuchi N., and Murayama Y., A New Long Phosphorescent Phosphore with High Brightness, $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$, Journal of the Electrochemical Society, vol. 143, No.8, 2670-2673, 1996

著者・編集

三浦 研二
長島 眞喜子
林 真由美
(富士写真フイルム)

2003年10月発行
2004年5月改訂2版第1刷発行
2004年8月改訂3版第1刷発行

CDP StarはTropix Inc.の登録商標です
本文中のすべてのブランド名または製品名は各社の商標もしくは登録商標です



富士写真フイルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■ イメージング&インフォメーション事業本部 ライフサイエンスグループ

〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201
FAX (03)3406-2158

E-mail : sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp
ホームページ : <http://fujifilm.co.jp/bio>