

蛍光寿命を追い求めて 蛍光寿命測定とライフサイエンスへの応用

Finding the Time for Fluorescence
Its Measurement and Applications in Life Science

本稿では、分光の専門家の領分であった蛍光寿命測定が、技術の進歩に伴い科学やエンジニアリング分野において主要な研究ツールとして使用されるまでに至った過程をまとめた。研究分野にとどまらず、現実社会での課題の解決に役立つ応用を通じて蛍光寿命測定がもたらす有益性に光を当てる。具体的には、癌やアルツハイマー病等の疾患の診断や治療の技術向上を目的とする最近のアプリケーション事例をご紹介します。

We summarise how developments in technology have brought fluorescence lifetime spectroscopy from being the preserve of the specialist to becoming a major tool for research across many science and engineering disciplines. We highlight the advantages which fluorescence lifetime measurements can bring, not only to underpin research, but also through application in helping to solve real-world problems. We illustrate this with recent examples in cancer and Alzheimer's research, which are aimed at improving disease understanding, diagnosis and therapeutics.

はじめに

蛍光(Fluorescence)は主要な研究ツールとして使用可能な発光現象であり、多くの分野において利用されている。ライフサイエンス、医学、ナノテクノロジー、マテリアル、環境、エネルギー分野などを例として挙げることができるが、これらはほんの一部に過ぎない。重要なことは1分子レベルを扱うような技術においても蛍光の利用は極めて重要な科学的ブレークスルーを支え続けていることである。それが最も顕著なのはヘルスケア分野ではないかと思われる。蛍光は疾病の診断にもヒトゲノムの塩基配列解読の基礎技術にも利用されている。蛍光アッセイの把握、操作および設計は、蛍光特性の正確でかつ精密な測定が可能か否かに左右される。その特性は多次元の蛍光の各要素からなるフィンガープリントを形成するが、これは便宜上次式のように表すことができる。

$$\text{Fluorescence} = f(I, l_{exc}, l_{em}, \rho, r, t) \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 I は蛍光強度、 l_{exc} 、 l_{em} はそれぞれ励起波長、蛍光波長、 ρ は蛍光異方性測定に必要な偏光度、 r は顕微鏡使用時の位置、 t は蛍光寿命 τ で記述される時間を示す。このフィンガープリント(蛍光の各要素)の測定技術は分析装置の設計や機能に落とし込むことができる。当社、ホリバ・ジョバンイボンIBH社は、蛍光寿命測定システム、その関連機器および解析ソフトウェアの設計開発および製造を専門とし、1977年に創業し今年40周年を迎える。当社はスコットランド最初の大学ベンチャー企業のひとつであり、2003年にHORIBAグループに加わることで、蛍光分光装置のリーディングサプライヤーとなっている。蛍光寿命測定は蛍光分光市場において最も急速に成長している領域であるが、その理由と

David J S Birch

David McLoskey

しては次のような点が挙げられる。

1. 時間分解によって動的情報や運動速度パラメーターを明らかにすることができる。
2. 時間的弁別によってノイズとなるバックグラウンドや望まない蛍光の影響を回避でき強い選択性を有する。
3. フォトブリーチング等により引き起こされる蛍光色素濃度の変化に影響を受けない。
4. 蛍光強度や量子収量測定に比べて校正やサンプル間の比較が容易である。

堀場製作所の原博士が本号掲載の先の総説にて蛍光寿命測定の基本理論とその技術について詳しく解説をしているので、ここでは同じ内容を繰り返さないが、要するに蛍光分光測定にもたらす蛍光寿命測定の付加的なメリットは、情報量で例えると写真に対する映画のようなものと言えよう。

現在の蛍光寿命測定機能の実現に至る道のり

分光計器を扱う他の企業と同様に、当社のルーツは大学での研究に遡る。本稿の著者であるDavid Birchは、英国マンチェスター大学シュスター研究所で、その後グラスゴーにあるストラスクライド大学の物理学科で研究を行っていたが、1977年にBob Imhof氏、Tony Hallam氏と3名で、現在のホリバ・ジョバンイボン IBH社の基盤となるベンチャービジネスをスタートさせた。もう一人の著者であるDavid McLoskeyが1997年にBob Imhof氏から技術責任者の業務を引継いで、現在では18名の社員を抱えるまでになった。この事業を成功へと導いた理念は、今でもなお当社に息づいており、根ざすところは先端的な研究技術を一般の顧客にも広く利用できるものにするのである。またビジネス創業当初から、我々は時間相関単一光子計数法(TCSPC)のデジタル技術こそが最良のアプローチであると考えていた。

初期の装置開発において主力となったのは、Figure 1aで示す金メッキされた同軸型フラッシュランプ(型式: 5000F)だった。繰返周波数30 kHzで発振するこの光源はナノ秒フラッシュランプとしては初めてスパーク放電による高周波振動に起因する減衰曲線の歪みを確実に克服できるものだった。パルスエネルギーは標準で1 pJ程度、平均出力も1 μ W以下ではあったが、単一光子タイミング検出が可能な感度を有していたため、このフラッシュランプを使用できた。モードロックレーザーと比較して安価で価格競争力があったことから、このフラッシュランプ^[1, 2]は蛍光寿命測定用パルス光源として20年間の長きわたり用いられてきたが、その後出現した半導体パルス光源にその座を譲ることになる。半導体パルス光源としては、当社からはNanoLEDシリーズ^[3]、さらに最大繰返周波数100 MHzを実現できるDeltaDiodeシリーズ^[4](Figure 1bに示す)を発売している。特にタンパク質の蛍光寿命測定に対応できる紫外領域で発振する発光ダイオード(LED)は励起光源として重宝されている。また、半導体パルス光源は約1000倍以上の高速データ取込速度、高繰返パルス、メンテナンスフリー特性、高安定性、単色性の高いレーザーなどの長所を同時に兼ね備えていたことから、フラッシュランプに取って代わるのに時間はかからなかった。

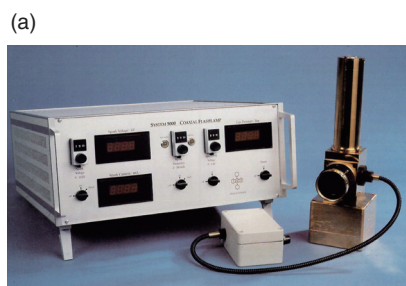


Figure 1 Model 5000F coaxial nanosecond flashlamp (a) and DeltaDiode picosecond LED/LD (b).

当社の極めて初期の開発段階から、たった1度の測定でいかに多くの蛍光に関する要素の情報(式1)を入手できるかに顧客ニーズとビジネスチャンスがあることをよく認識していたため、1980年代にはこの課題に着手した。すなわち

TCSPC信号の多重化およびルーティング技術の開発に乗り出したのである。我々は当初2チャンネルのアプローチに取り組み、蛍光と励起光の同時測定(SAFE: Simultaneous Acquisition of Fluorescence and Excitation)により励起パルスの経時変化を克服しようとしたが^[5]、偶然にも、日本の堀場製作所では原博士も、ほぼ同時期に、同じ目標に向かって蛍光寿命測定装置NAESの開発に取り組んでいた。両者のアプローチの違いは、原博士が開発した装置NAESでは時間電圧変換器(TAC)をマルチで用いたのに対して、我々の装置ではTACをシングルで用いたことである。我々が2チャンネルを実装したことは蛍光異方性減衰測定に必要とされる直交する2偏光面の同時測定に適していた^[6]。ほどなく我々は光ファイバーを分光器にカップリングすることで4チャンネルを実装しようとするアプローチを行った。これは複数の発光波長における蛍光の同時減衰測定を初めて実証するものとなった^[7]。これによってこれまでの順次的に波長を駆動するタイプのアプローチに比べて超高速な時間分解発光スペクトル測定を実現できることが示された。とはいえ蛍光寿命計測にはこの時点ではまだ1時間単位の測定時間が必要であった。このため高い繰返周波数を持つ半導体パルス光源が世の中に広く普及しはじめても、TCSPC法を用いた蛍光寿命測定には長時間かかるという過去の思いこみはなかなか払拭されなかった。

我々の多重化に関する研究開発により、モデル5000W SAFE (Figure 2)においてSAFEとデュアルチャンネルによる蛍光測定機能が実現した。この測定装置は3チャンネルを内蔵しているだけでなく、同時に最大16までTCSPCチャンネルを多重化することができ、これまでの製品の中では最も汎用性の高い蛍光寿命測定装置となった^[8]。これを可能にしたのが、蛍光寿命測定用に作られた初のASIC(特定用途向け集積回路)である。CMOS技術に基づき、この集積回路はFigure 2に示す当時広く用いていたNIMモジュール内に組み込まれた。その後マルチアノードマイクロチャンネルプレート光電子増倍管と組み合わせることでさまざまな形式の多重イメージングの実現につながった。

こうした数々の開発は、同時測定による蛍光の多元的要素のさらなる利用に向け、将来に対するベンチマーク(基準)を提供するものとなった。ゴールはいまだ完全には達成されたとは言えないが、現在でも多くの成果が生み出される研究領域となっている。従来の光電子増倍管(PMT)に比べると検出面積はかなり小さいにも関わらず、単一光子アバランシェダイオードアレイ検出器はある特定用途(寿命マッピング測定)でさらなる展開が有望視されている。

今日、われわれの製品は、初期の装置に比べるとずっとユーザフレンドリーになり取り扱いも容易なものとなったが、今でも我々の顧客が求める最先端の研究に対応できる能力を保持している。例えば、近年リリースした、最適化したタッチスクリーンインターフェースを有するソフトウェア「EzTime」は、この分野では画期的なもので、スクリプトによる自動化に加えて、ワンクリックで自動フィッティングを行い、さらにその結果を表示できる等、蛍光寿命測定のプロセスを劇的に簡略化した。さらにF-Linkバス技術によって装置の自動識別や構成の把握ができるので、励起光源やサンプル室のアクセサリ類の載替えやアップグレードを簡単に行うことができるようになった。最新の蛍光寿命測定装置DeltaFlexではTACやADCに代わって時間デジタル変換器(TDC)が採用されている。TDCはTACのような極めて高い時間分解能は持たないものの(TACでは現在、数百フェムト秒を容易に時間分解できるが)、全てがデジタル化されているTDCを用いた場合、繰返周波数100 MHzの半導体パルス光源との組合せで、かつて想像もできなかった1ミリ秒を切る短時間で寿命測定が可能となった。装置開発を始めた頃に我々が耐え忍んだ数時間もかかる測定時間のこ

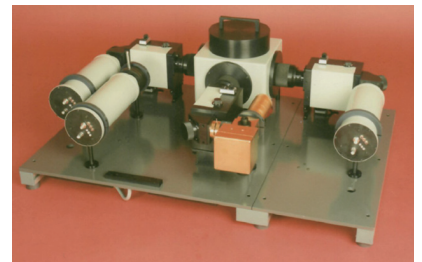


Figure 2 Model 5000W SAFE and its 16 channel TCSPC multiplexing module.

とを思えば格段の技術進歩である。このように短時間測定によって、毎秒20,000ヒストグラムという高速レートでTCSPC測定データのディスクストリーミングが連続的に行えるようになった。これによって単に蛍光寿命を測定するというのではなく3DイメージングやLIDARといったTCSPCの新規アプリケーションも出てきている。今やパソコンは非常に有能なツールであり、光子を計数して固定されたサイズのヒストグラムに記録する必要がなくなり、光子検出の瞬間の状態に関する情報が「タグ付け」され、その後ソートや操作のためにディスクに転送される際には、テラバイトサイズのファイル中でそれぞれ個別に分類され保持される。

現在、当社の蛍光寿命測定装置のラインナップには蛍光寿命測定専用機 (Figure 3a) と、蛍光分光光度計に蛍光寿命測定機能が付与されたハイブリッドシステム (Figure 3b) がある。

蛍光寿命測定装置DeltaFlexは、モジュールタイプのシステムで、当社の初期型の蛍光寿命測定装置 (Figure 2) にその起源があることがはっきりと見て取れる。モジュール故に装置の構成を自由に変更したり機能を拡張することができる。検出器を複数台搭載することや、マイクロチャンネルプレート光電子増倍管 (MCP-PMT) や近赤外対応光電子増倍管 (NIR-PMT) を搭載することもできる。さらに連続発振タイプのレーザや超低温冷却ユニット (クライオスタット) などのオプションの追加にも柔軟に対応できる。このように使い勝手の良さに加えて装置の高性能化により、さまざまな分野において蛍光寿命を測定ツールとして活用する機会が広がり続けている。

ヘルスケアに関連するライフサイエンスの 蛍光寿命アプリケーション

前述のとおり、蛍光を利用できることになったことでヘルスケアの質を改善するのに多いに役に立っているものと思われる。ここでは多様性に富む3つのアプリケーション例を挙げて、分子に関する新たな知見を提供する蛍光寿命測定の能力について説明する。これらはいずれもDeltaFlexを用いた実施例である。

メラニンの構造：時間を認識する

皮膚の色素であるメラニンは人体を紫外線 (UV光) から保護する役目があるが、脳や目にも存在しており、さらには菌類、海洋生物、果実など種々の形で自然界にも存在している。読者の方は驚かれるかもしれないが、実はメラニンの構造は未だよく解っていない。その主成分はジヒドロキシインドールであることは知られており、これが黒鉛に類似したシート状の構造を形作るものと考えられている。これはモジュール蛍光分光測定装置Fluorologを用いた、シートセンシングプローブ「チオフラビンT (ThT)」を用いた近年の蛍光プローブ研究によって確認されている^[9]が、この基本成分が分子レベルでどのように配置されているかはいまだ謎の残る部分がある。メラニンの構造を知ることが重要である理由はいくつかある。メラニンは人体を有害な紫外線から保護しているが、それと同時に皮膚癌の最も攻撃的な形態であるメラノーマにおいてもある役割を果たしていると考えられている。加えて非常に特異な物性の組合せを有していることから、メラニンはバイオミメティクス (生物模倣) への応用も期待されている。メラニンは紫外線から近赤外域までの非常にブロードな吸収スペクトルを持ち、常磁性もある上、その導電性は水和率によって大きさが8桁にわたって変化する。

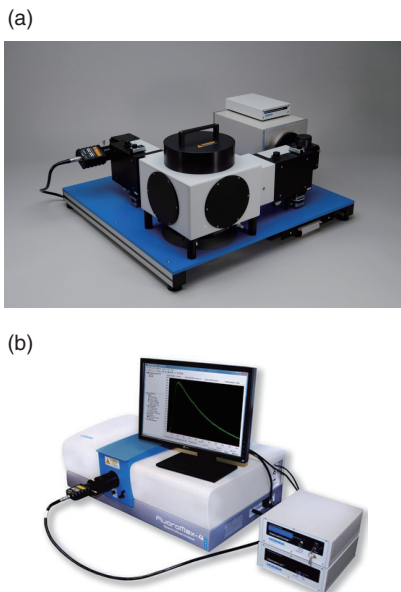


Figure 3 DeltaFlex dedicated lifetime system (a) and a hybrid FluoroMax-TCSPC lifetime system (b).

メラニンから発する蛍光は微弱で、その測定は困難であると長年考えられてきた。しかしDeltaDiodeのような強力安定した半導体パルス光源の進歩によりメラニンの研究には新たな道が開けつつある。メラニンの蛍光減衰は複合的で、複数の指数関数をとることから、その構造が複雑であることが推察される。銅イオンは通常蛍光を消光させる特性があるが、Figure 4に示すように、銅イオン存在下の水中でL-3,4-ジヒドロキシルフェニルアラニン(L-DOPA)の酸化を用いた(メラノソーム中の天然合成を模した形の)メラニンの合成実験では、発光波長480 nmにおける蛍光減衰曲線は蛍光寿命が約6ナノ秒の単一指数型へと変化している^[10]。単一指数関数の蛍光減衰は単一励起状態によるもので、メラニンの構造において特異な構成成分が存在することを示唆している。他の構造も存在する可能性は高いが、この蛍光寿命6ナノ秒の減衰時間という起点を認識できたことはメラニンの構造を解明する上で非常に有用なステップとなりうる。

ベータアミロイドの凝集：アルツハイマー病の初期病変

タンパク質は誤った構造に折り畳まれるミスフォールディングが起こると凝集しやすくなりアミロイド症と称されるさまざまな疾患の原因となる。この疾患群には、アルツハイマー病(AD)、2型糖尿病、クロイツフェルト・ヤコブ病、さらにはパーキンソン病といった現代社会では難病といわれている疾患が含まれている。ADは全ての神経変性疾患の中でも広く一般的なものであるが、治療法や簡便な臨床診断が確立していない。アミロイド症の特徴は、疾患ごとに特定のタンパク質が凝集して安定的かつ不溶性のアミロイド線維を形成し、沈着物として体内に滞留することである。ADの場合には、アミロイド線維はベータアミロイド(Aβ)タンパク質の凝集によって形成される。Aβはアミノ酸長38~42程度のアミノ酸ペプチドで、前駆タンパク質であるAmyloid-β precursor protein (APP)の部分断片である。当初は、アミロイド斑として脳に沈着したAβ線維が神経細胞の死をもたらす主要な病原因子であると考えられていたが、神経細胞の機能不全や細胞死は、より短い可溶性のAβオリゴマーにより引き起こされるということ、Aβオリゴマーは凝集の初期段階に形成され細胞膜を破壊することなどが最近明らかになってきた。それゆえAβの凝集を初期のステージで検出することは、ADの発生原因を完全に理解し、より良い治療法を開発するために不可欠である。

蛍光分光測定は一般的に凝集プロセスの研究に適しており、ThT等の外因性蛍光プローブがAβ線維の形成の研究に広く使われている。しかしながら、ThTによって検出できるのは線維を誘導する後期のベータシート形成のみであり、初期のオリゴマー形成は検出できないとされているが、むしろThTが初期段階の凝集を妨害してしまっている可能性がある。しかしながら自然の気まぐれがもたらす幸運とでもいふべきか、Aβは、単一のチロシン残基を含み、励起したチロシン残基からエネルギーを受け取ってしまうトリプトファン残基は含まない。これは光物理学的に見れば、通常のタンパク質の研究よりもずっとシンプルな系であることを意味し、半導体パルス光源NanoLEDやDeltaDiodeを用いて波長285 nmで励起すればチロシン残基のみの蛍光を発光させることができる。すなわち、

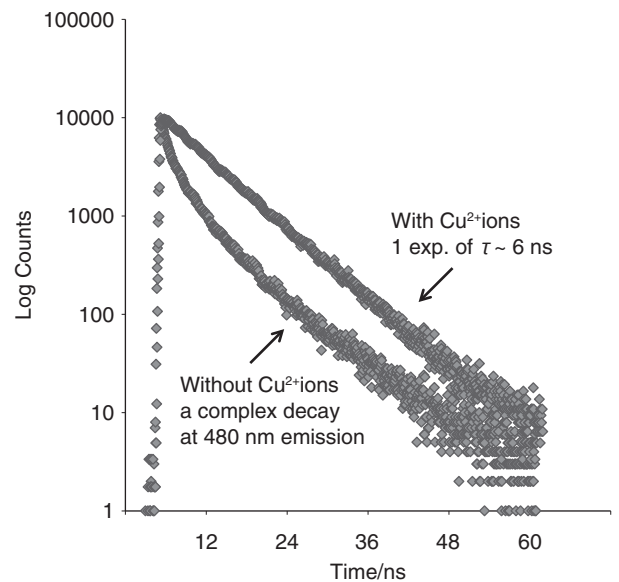


Figure 4 Fluorescence decay of melanin. In the presence of 4 μM Cu²⁺ ions the decay becomes a single exponential of τ ~ 6 ns at 480 nm emission, suggesting a simplified structure.

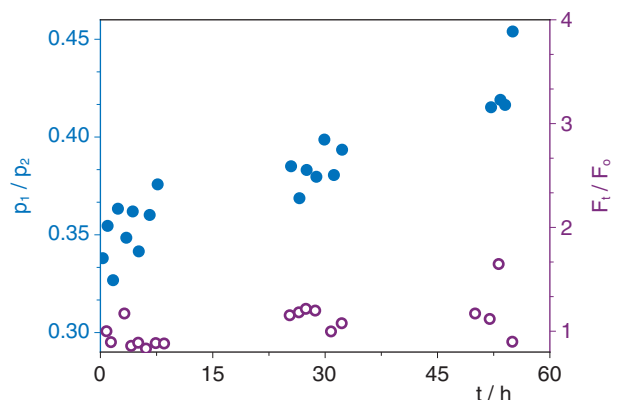


Figure 5 Relative amplitude of two decay parameters (p_1/p_2) when a 3-exponential decay model $i(t) = \sum p_n \exp(-t/\tau_n)$, for $n=3$, is used to describes the tyrosine fluorescence decay of Aβ during the early stages of aggregation. F_1/F_0 describes the fluorescence intensity of the sheet-sensing probe ThT during this time and it can be seen to provide little information on the cytotoxic oligomer formation which occurs as a precursor to Alzheimer's disease.

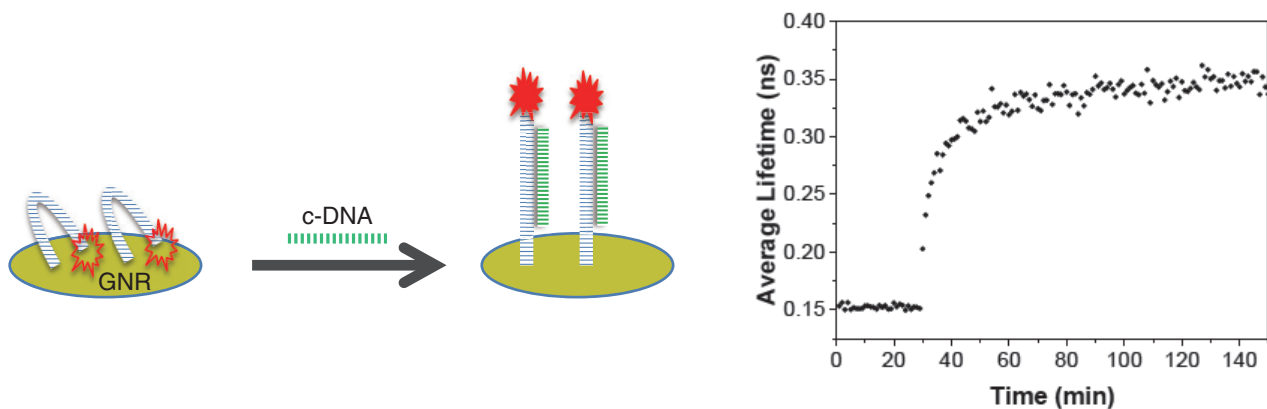


Figure 6 GNR hairpin sensor sprung by binding to c-DNA and the consequential increase in the average fluorescence lifetime of oligonucleotide labelled with 6-carboxyfluorescein as hybridization occurs. Excitation was at 474 nm using the NanoLED laser diode.

初期の凝集を自家蛍光減衰によってモニターできるという仮説が成り立つ。これはまさにその好例であることがわかるが^[11]、興味深いことに、蛍光減衰パラメーターの(ほんのわずかな)変化ではなく、Figure 5のように相対値によって示される。この挙動は、3種のチロシン回転異性体の相対量の変化を表していると考えられている。

したがって、 $A\beta$ の内在的な蛍光減衰を測定することにより、ADを引き起こす根本的な凝集動態が把握できるだけでなく、さらにはADの新しい治療法の開発にも活用できるであろう。

カスタム設計の癌バイオマーカー：検出のための時間

前述の事例では自家蛍光プロセスをモニターする対象だったが、ここでは、細胞中のバイオマーカーとしての「メッセンジャーRNA (mRNA)」を検出することができるカスタム設計のナノプローブの研究を通じて、蛍光寿命測定がどのように活用されるかについて説明する。mRNAは細胞によるタンパク質の産生において主要な役割を負っている。高い選択性と高感度でmRNAの検出を行うことは、疾患の早期診断を可能にし、治療の経過をモニターし評価するのにも役立つ。また、mRNAの検出によって細胞内での基本的なメカニズムを理解する上で価値のある情報を得ることができる。

近年の蛍光分野における最も劇的な発展としては、表面プラズモンを利用したアプリケーションがある^[12]。最近、mRNAを使った癌バイオマーカー向けのプラズモンセンサーの研究と最適化に蛍光寿命測定装置DeltaFlexが用いられている。このセンサーは、蛍光色素で標識したオリゴヌクレオチドがヘアピン形状で金ナノロッド(GNR)に結合した状態になっている。最初、近接するGNRによって色素の蛍光は消光されるが、オリゴヌクレオチドを対象のmRNAにマッチさせることで、mRNAにおける相補配列を用いたハイブリダイゼーションによってヘアピンが開き、蛍光が増強する^[13]。相補的(c-)DNAによる癌mRNAバイオマーカーを用いたセンサーの模型をFigure 6に示す。ヘアピンが開きさらにc-DNAがGNRに結合するにつれて、6-カルボキシフルオレセイン標識の平均蛍光寿命が変化していることがわかる。細胞からの内因性の蛍光の影響を取り除くため、このアプリケーションでは紫外域でなく可視域の波長で励起できるという利点がある。

金ナノロッドは容易に細胞内に入りこむことができ、導入剤も不要である。このアプリケーションでは、蛍光色素濃度に影響を受けないなど、前述した蛍光寿命測定のメリットのすべてが重視され始めている。

おわりに

蛍光寿命技術とその応用は、蛍光色素の基礎的な光物理が明らかになり、ほとんどその応用が化学分野に集中していた当初から長い道のりを歩んできた。堀場製作所とホリバ・ジョバンイボンIBH社はともに蛍光寿命測定装置に対して継続的に装置の改良を行い、使いやすさの追求を通じた性能強化と用途拡大を実現してきた。

その間市場はどのような変化を遂げてきただろうか。蛍光寿命測定装置は価格が安くなり、その一方で装置性能は向上してきた。今やオンラインでのデータ分析や操作が日常的なものとなり、使いやすさやソフトウェアが装置仕様として重要視され、装置のコンパクト化がさらに進み、メリットを享受するためには製品のユーザーになるだけでよく、分光分野のエキスパートである必要もなくなった。対象分野の幅も大きく広がり、サプライヤーと顧客との間での研究協力も盛んになっている。その優れた一例が、HORIBAが開催する国際ワークショップFluoroFestである。FluoroFestではHORIBAグループのスペシャリストらと科学分野コミュニティが一堂に会して「蛍光」という共通言語でアイデアや経験を伝え合う。12回目となった直近のワークショップは2017年4月に英国グラスゴーで開催され大好評を得た。未来へのイノベーションの探求は今も続いている。我々の大きなチャンスは微細化にあると考えられる。その多くは、光源、光子検出、データ取得および処理という観点から半導体技術にリンクしているが、これらはすべて1回の測定で蛍光特性をより短時間で解明できるものであり、将来の新しいセンサーシステムの開発につながるものである。ヘルスケア分野だけではなく、食品、エネルギー、化学、環境などの分野においても同様である。微細化によって蛍光寿命の技術が独創的なものに進化しユーザーの手に委ねられる未来を想像している。時間に余裕をもって蛍光寿命測定がいつも簡単に実現できるようになってきたと言えるかもしれない。もちろん、DeltaFlexのような卓上型蛍光寿命測定装置は今後も新しい装置開発のためのベンチマーク(基準機)としてはなくてはならないものであるし、研究分野においては柔軟性と性能の両方を提供してくれる究極の装置である続けるであろう。

参考文献

- [1] *A single-photon counting fluorescence decay-time spectrometer*. D J S Birch and R E Imhof. J. Phys. E, **10**, 1044-9, 1977.
- [2] *Coaxial nanosecond flashlamp*. D J S Birch and RE Imhof, Rev. Sci. Instrum. **52**, 1206-12, 1981.
- [3] *A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence*. C D McGuinness, K Sagoo, D McLoskey and D J S Birch. Meas. Sci. Technol. **15**, L19-22, 2004.
- [4] *Fast time-correlated single-photon counting fluorescence lifetime acquisition using a 100 MHz semiconductor excitation source*. D. McLoskey, D. Campbell, A. Allison and G. Hungerford. Meas. Sci. Technol. **22**, 067001, 2011.
- [5] *Pulse fluorometry using simultaneous acquisition of fluorescence and excitation*. D J S Birch, R E Imhof and A Dutch, Rev. Sci. Instrum. **55**, 1255-64, 1984.
- [6] *A Multiplexed single photon instrument for routine measurement of time-resolved fluorescence anisotropy*. D J S Birch, A S Holmes, J R Gilchrist, R E Imhof, S M Al-Alawi and B Nadolski, J. Phys. E. Sci. Instrum. **20**, 471-3, 1987.
- [7] *Multiplexed array fluorometry*. D J S Birch, A S Holmes, R E Imhof, B Z Nadolski and K Suhling, J. Phys. E.: Sci. Instrum. **21** 415-7, 1988.
- [8] *Multiplexed single-photon counting 1: A time-correlated fluorescence lifetime camera*. D McLoskey, D J S Birch, A Sanderson, K Suhling, E Welch and P J Hicks, Rev. Sci. Instrum. **67**, 2228-37, 1996.
- [9] *Eumelanin Kinetics and Sheet Structure*. J Sutter, T Bidláková, J Karolin and D J S Birch. App. Phys. Letts., **100**, 113701 (4 pages), 2012.
- [10] *Metal ion influence on eumelanin fluorescence and structure*. J-U Sutter and D J S Birch. Methods Appl. Fluoresc. **2**, 024005, 2014.
- [11] *Early detection of amyloid aggregation using intrinsic fluorescence*. O J Rolinski, M Amaro and D J S Birch. Biosensors and Bioelectronics. **25** (10), 2249-52, 2010.
- [12] *Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications*. J. R. Lakowicz, Anal. Biochem. **298**(1), 1-24, 2001.
- [13] *Hairpin DNA-functionalized gold nanorods for mRNA detection in homogenous solution*. W Guoke, Y Jun, W Jinliang, G Peng, D J S Birch and Yu Chen. J. Biomed. Opt. **21** (9), 097001, 2016.

**David J S Birch**

President
HORIBA JOBIN YVON IBH Ltd.
Professor of the University of Strathclyde
Ph.D.

**David McLoskey**

Managing Director
HORIBA JOBIN YVON IBH Ltd.
Ph.D.