

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

# Application Note

No. 1

基礎編：蛍光についての基本的知識

FLA-2000

## はじめに

このたび、レーザー技術・スキャナー技術を盛り込み、蛍光測定とIP法によるラジオアイソトープ測定の両方に対応した新型フルオロ・イメージアナライザー FLA-2000を発売いたしました。今後、FLA-2000を使いこなすための情報を集めたApplication Noteを発行いたします。

FLA-2000には、2種類のレーザー光源が搭載されています。1つは新開発のSHGレーザーによる473nm、もう一つはHe-Neレーザーによる633nmの波長を持っています。

測定可能な例を挙げると、ゲル中のDNAの直接染色にはEtBrやSYBR® Greenが励起可能です。タンパク質の直接染色には、SYPRO® Orangeが最適です。サザンブロットイング後、ALPIによる酵素増幅法の系には、AttoPhos™ が使用可能です。

今回、蛍光法についての基礎的な内容と検出法についても少しご紹介いたしますが、今後さらに詳しい情報をお届けする予定です。

日々進歩を続けるのがこの分野かと存じます。よりよい情報をご提供するためにも皆様のご意見・ご感想を頂きたく、宜しくお申し上げます。

SHG

=Secondary Harmonic Generation  
レーザー光を特殊な波長変換結晶により、その波長を1/2にする技術。大きな装置を使わない、コンパクトなボディが特長。

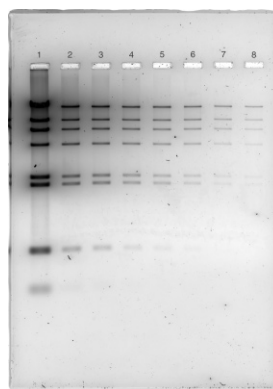
ALP

=Alkaline Phosphatase  
アルカリ性フォスファターゼ。  
アルカリ性でリン酸エステルを切る酵素。

FLA

## Contents

1. 蛍光の原理
2. 蛍光スペクトルの読み方
3. ゲル中DNAの蛍光検出
4. ゲル中タンパク質の蛍光検出
5. 酵素増幅蛍光法
6. 参考文献



SYBR® Green 染色ゲル (詳細は巻末)

## Summary

- ・蛍光波長は励起波長に比べて長波長側にずれます。
- ・DNA検出は直接蛍光法を用いると、SYBR® Greenが最適です。
- ・タンパク質検出は、SYPRO® Orangeが最適です。
- ・サザンブロットイング後のDNA検出はALP標識の場合AttoPhos™が使えます。

# 1 蛍光の原理

## ■ 光の波長と種類

光は波長によって表現され、赤外線・可視光線・紫外線に分類されます。

波長は、紫外線 1 ~ 400nm、可視光線 380 ~ 800nm、赤外線 800nm ~ 1000nm の範囲となります。

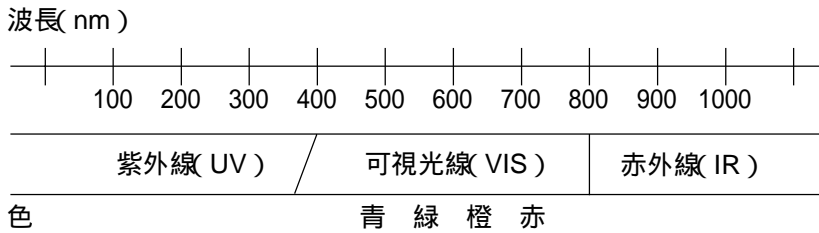


Fig.1-1

波長

光は波長として表現できます。振動数と波長の積は光の速度になります。光の速度は一定なので波長の短い方が振動数が大きく、エネルギーが強くなります。

$$\text{波長} \times \text{振動数} = \text{光の速度}$$

Fig.1-1 光の波長と色  
人間の目に見える光は400nmから800nmの1オクターブと言われています。

## ■ 蛍光の定義

物質が可視・紫外光を吸収して励起状態となった後、もとの基底状態にもどる過程で放射される光のことを蛍光といいます。

励起状態

定常である分子のエネルギーの低い状態からエネルギーの高い状態へ遷移することを励起といい、エネルギーの高い状態のことを励起状態といいます。

## ■ 蛍光放射の原理

- (1) 可視・紫外光を吸収(励起スペクトル又は吸収スペクトル)して分子が励起状態になります。分子は高いエネルギーを持った不安定な状態となります。(励起一重項状態  $S_1$ )
- (2) 過剰のエネルギーを振動エネルギーとして失います。励起一重項状態  $S_1$  の最も低位の準位に達します。
- (3) 励起一重項状態  $S_1$  からエネルギーを失活し、基底状態にもどります。このとき、蛍光(蛍光スペクトル)が放射されます。

基底状態

分子のエネルギーの低い定常状態です。ここにも色々なエネルギーレベルがあり、スペクトルが生じる原因となります。

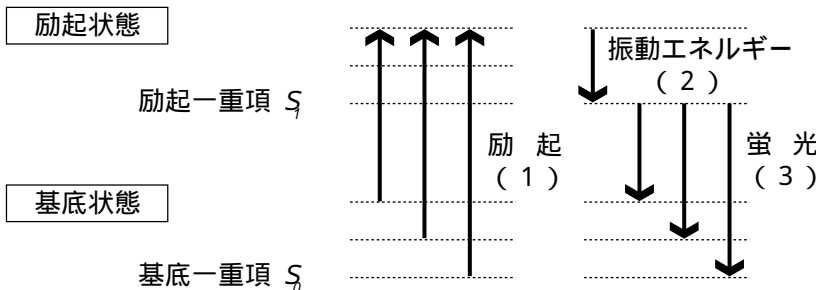


Fig.1-2

Fig.1-2 蛍光の原理

基底状態から励起光により励起状態になった蛍光物質は、一部のエネルギーを失った後、蛍光を出しながら基底状態に戻ります。

## ■ 励起スペクトルと蛍光スペクトルの関係

蛍光スペクトルの波長は、励起スペクトルよりも長波長側に移ります(ストークスの法則)。蛍光スペクトルが長波長側に移るということは、エネルギーのレベルが励起状態よりも低くなることを意味しています。

これは励起状態から基底状態にもどる際に、振動エネルギーが熱エネルギーに変換され、放出されるためです。この励起スペクトルと蛍光スペクトルの波長がずれる現象を利用すると、スペクトルの分離が可能になります。

振動エネルギー  
分子振動に起因するエネルギー。  
 $E=h \{v_v + (1/2)\}$  で表される。  
( $v_v$ : 振動数、 $v_v$ : 振動量子数、 $h$ : プランク定数)

## ■ 蛍光の強度

蛍光の強度は、次の5つの要素で決定されます。

- (1) サンプルにあたる光(励起光)の強さ  $I_0$   
 ・ ・ ・ 励起光の強度が大きいほど、蛍光の強度も大きくなります。
- (2) サンプル中の蛍光物質の蛍光量子収率 (ファイ)  
 ・ ・ ・ 蛍光量子収率は、吸収された光子数と放出された光子数の割合で求められます。

$$\text{蛍光量子収率} = \text{放出された光子数} / \text{吸収された光子数}$$

蛍光物質では、蛍光量子収率は ~ 1.0 までの値をとります。  
 蛍光量子収率が1.0に近づくほど、蛍光として発光される効率がいいこととなります。

- (3) サンプル中の蛍光物質の分子吸光効率 (イプシロン)  
 ・ ・ ・ 一定波長の光に対する蛍光物質の吸収の強さを表わします。
- (4) サンプル中の蛍光物質のモル濃度  $C$   
 ・ ・ ・ 蛍光の強度と濃度は、低濃度範囲において比例します。  
 この直線範囲が定量可能な範囲となります。高濃度になると、濃度消光・蛍光の再吸収などにより、比例関係が成り立たなくなります。

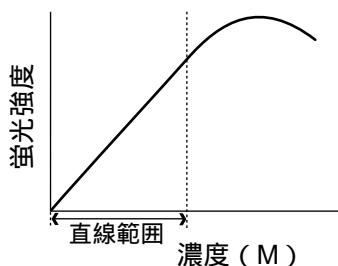


Fig.1-3

濃度消光  
 サンプルの濃度が高い場合に蛍光強度が逆に減少する現象。

Fig.1-3 蛍光の濃度比例性  
 蛍光物質の濃度が高いと、蛍光強度は落ちます。  
 これは、濃度が高いために入射光がすぐに吸収されてしまったり、分子同士の衝突や異種または同種の励起 - 未励起分子間の非衝突エネルギーの移動などによるものです。定量性があるのは低濃度領域になります。

- (5) サンプルの厚みまたは励起光の入射の長さ

上記の要素を関係式にすると、蛍光強度( $F$ )は

$$F = I_0 \cdot \dots \cdot C \cdot$$

となります。

## 2 蛍光スペクトルの読み方

蛍光が出るには励起光が必要です。

励起光のエネルギーを蛍光物質が吸収し、そのエネルギーの一部を光として放出します。この現象は蛍光物質の電子状態を反映したもので、多数の電子の様々な状態がそれぞれエネルギー(=光の波長)を吸収しますので、波長と吸光度の関係はなだらかな曲線グラフとなります。

これが吸収スペクトルで、最大の吸光度を示す波長を吸収極大波長といいます。

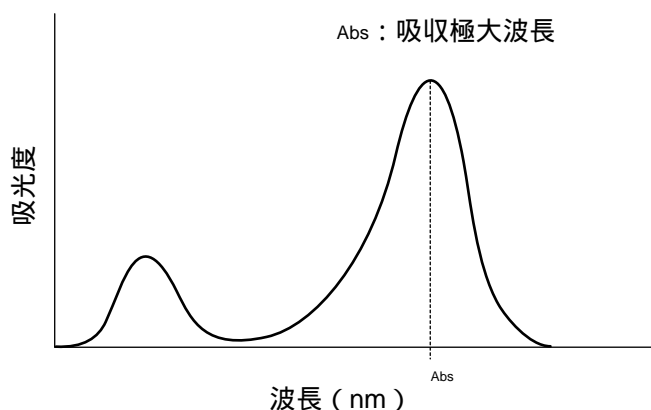


Fig.2-1

蛍光強度が最も強くなるのは、励起光を最も多く吸収したときです。

そこで、理論的には 励起極大波長 = 吸収極大波長 となります。

様々なカタログに、蛍光物質の最適な励起波長や蛍光波長が掲載されています。励起波長は、Abs<sub>Abs</sub> Ex などと表わされます。

蛍光波長は、Em で表わされます。

蛍光分光光度計を用いて励起光・蛍光の波長を各々連続的に変化させて得られる曲線を励起蛍光スペクトルと呼びます。

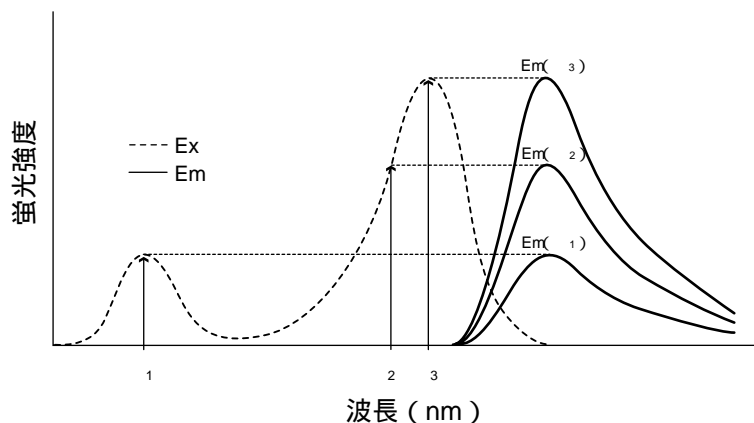


Fig.2-2

励起スペクトルは、吸収スペクトルとほとんど同じ形をしています。励起波長を変えると蛍光スペクトルのピーク高さは変わりますが、極大波長は同じです。

Fig.2-1 吸収スペクトルの例  
 蛍光物質の吸収スペクトルは、DNAやタンパクの存在の有無・pH・溶媒などによって影響を受けます。

Abs( Absorbance )  
 吸光度

(ラムダ)  
 波長

Ex( Excitation )  
 励起

Em( Emission )  
 蛍光

Fig.2-2 励起蛍光スペクトルの例  
 励起スペクトル：  
 蛍光波長を固定して、励起波長を連続的に変化させ、得られる蛍光強度を波長ごとにプロットしたものです。短波長側(左側)にあります。  
 蛍光スペクトル：  
 励起波長を固定して、蛍光波長を連続的に変化させ、得られる蛍光強度を波長ごとにプロットしたものです。長波長側(右側)にあります。

### 3 ゲル中 DNA の蛍光検出

DNAの塩基対の間に入り込む(インターカレーション)と蛍光を発する物質を利用して、ゲル中のDNAを直接検出する方法があります。この方法は、全てのDNAを検出することが出来る特長があります。

#### ■ EtBr

DNA研究の初期の頃からEtBrがDNAと共存して赤い蛍光を発することが知られていました。

この現象は、EtBrがDNAとインターカレーションすることによると言われており、ダブルストランド、シングルストランドさらにRNAで蛍光を発します。

しかし、DNA・RNA以外にも種々の物質と親和して蛍光を出すため、バックグラウンドが高くなるといった欠点があります。

また人体に対する影響として、変異原性の可能性が指摘されています。取り扱いには手袋などを着用し、使用後のゲルや廃液は次亜塩素酸ソーダなどで分解処理したり、活性炭に吸着させてから焼却することが望ましいとされています。

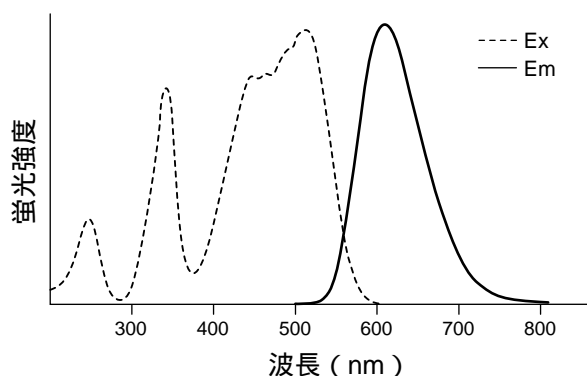


Fig.3-1

#### ■ SYBR® Green

EtBrと比較して蛍光強度が10倍高いSYBR® Greenが誕生しています。

この試薬は変異原性が低いといわれ、非特異的な吸着によるバックグラウンドも低いといった優れた特長をもっています。

FLA-2000では473nmのレーザー光源を搭載しているため、効率よくSYBR® Greenを励起させることが可能です。

さらにFLUORステージに直接ゲルをのせて検出することにより、数分で画像を得ることができます。

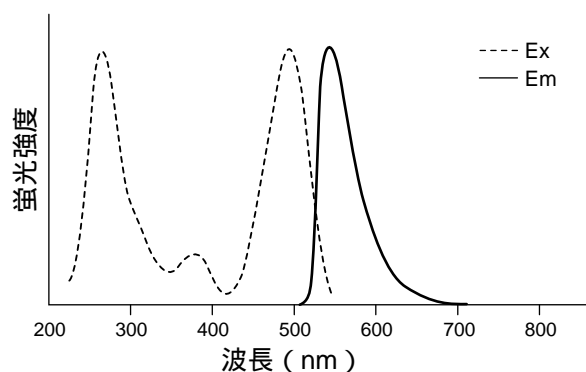


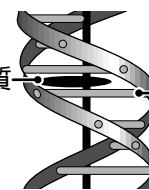
Fig.3-2

#### インターカレーション

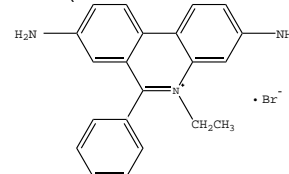
DNA

蛍光物質

塩基対



EtBr (エチジウムブロマイド)



EtBrはアガロースゲル電気泳動後の泳動パターンの確認などに使われ、0.01%EtBr溶液(pH8.0 / TBEバッファー等)中で10~60分振とうし、254nmまたは312nmのUVトランスイルミネーターで観察することが一般的です。

ダブルストランド

二本鎖DNA

シングルストランド

二本鎖DNAを強アルカリ性にした後、加熱すると二本鎖がほどけて一本鎖になります。

Fig.3-1 EtBr-DNAの励起蛍光スペクトル(未補正\*)

SYBR® Green

Molecular Probes Inc.の製品。SYBR® Greenには2種類あり、二本鎖DNA染色用にはSYBR® Green Iを、一本鎖DNA・RNA用にはSYBR® Green IIを用いることが好ましいようです。最適励起波長は497nm、蛍光波長は520nmです。

Fig.3-2 SYBR® Green-DNAの励起蛍光スペクトル(未補正\*)

\* 励起蛍光スペクトルは、機器装置の光源特性などで形が変化します。標準物質で補正する場合もありますが、ここでは日立分光蛍光光度計F-4500で測定した未補正のスペクトルを掲載する場合もあることをご了承下さい。

## 4 ゲル中タンパク質の蛍光検出

電気泳動後のタンパク質を検出する方法は、ゲル中DNAの蛍光検出と同様、タンパク質を直接染色して検出します。CBB染色のような発色法が一般的ですがゲルに適切な蛍光法が最近開発されました。

### ■ CBB 染色

クーマシーブリリアントブルーによる青色染色で最も一般的な方法です。

### ■ 銀染色

CBB染色法に比較して感度が高い染色方法です。しかし、手間がかかる欠点があります。

### ■ フルオレスカミン法

反応速度が速いという特長があります。しかしこの試薬は水で分解されるため、ゲル電気泳動後の検出に適用するには不適當です。

### ■ SYPRO® Orange

感度の高い蛍光法として近年登場しました。(文献1) 参照)

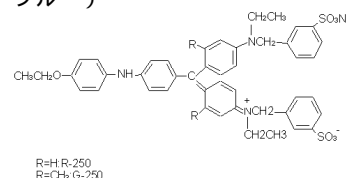
この試薬はタンパク質の種類による蛍光強度の差があまりなく、長時間安定した発色を示すので取扱いが容易です。染色後のゲル洗浄操作もバックグラウンドが低いため短時間で処理でき、ゲル電気泳動に適切な蛍光法です。

さらに、SYPRO® Orangeを用いることにより、染色後のゲルをウェスタンブロットティングし、免疫試薬による検出も可能となります。

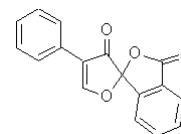
(この為には、タンパク質を変性させないようにSYPRO® Orangeを通常の7.5%酢酸溶液ではなく、ブロットティング用バッファー溶液として用います。文献2)参照)

FLA-2000に搭載されているレーザー光源の473nmは、SYPRO® Orangeに最適な励起波長です。

CBB(クーマシーブリリアントブルー)



フルオレスカミン



フルオレスカミン自体は蛍光物質ではありませんが、アミンと反応し、蛍光性の誘導体になります。

SYPRO® Orange

Molecular Probes Inc. の製品。  
最適励起波長は472nm、蛍光波長は570nmです。

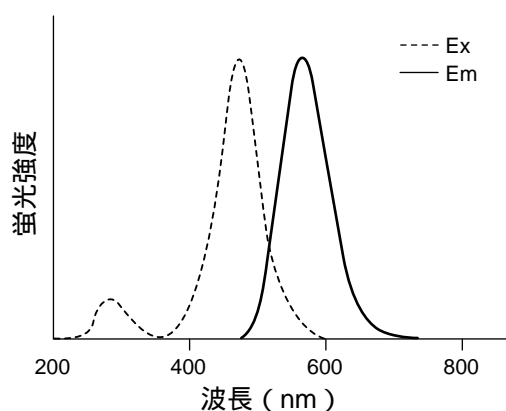


Fig.4-1

Fig.4-1 SYPRO® Orange-タンパク質による励起蛍光スペクトル



## 5 酵素増幅蛍光法

酵素に基質を反応させ、蛍光物質を生成させる方法です。

サザンブロットングにより、メンブレンに移されたDNAを特異的に検出する為に用いられます。下記のような試薬構成により、最終段階で酵素増幅を行いますので直接ラベルによるRI(ラジオアイソトープ)法に匹敵する感度を持つことが期待されます。

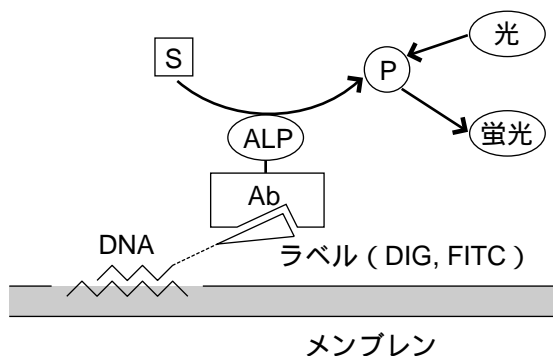


Fig.5-1

Fig.5-1 酵素増幅蛍光法の概念図

- DIG: ジゴキシゲニン
- FITC: フルオレッセイン
- イソチオシアネート
- Ab: 抗体
- ALP: 酵素(アルカリ性フォスファターゼ)
- S: 基質
- P: 生成物(蛍光物質)
- 光: FLA-2000のレーザー光源
- 蛍光: 蛍光物質から発生する蛍光

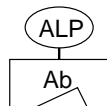
ここで基質を化学発光性のものにする事で、化学発光法となります。

これには、下記の試薬を用います。

- (1) 検出したいDNAと結合しうるDNA断片に小型の分子(DIGやFITCなど)をラベルしたもの。



- (2) DIGやFITCを認識する抗体にALPをラベルした抗体。



- (3) ALPと反応する蛍光性基質。(AttoPhos™など)



FLA-2000では473nmのレーザー光源で励起することで感度よく検出することができます。

AttoPhos™  
ALPと反応する蛍光基質。  
AttoPhos™はpH9.5の溶液中でEx = 420nm、Em = 560nmに弱い蛍光を發しますが、ALPによる酵素反応の結果、Ex = 482nm、Em = 560nmに強い蛍光を發するようになります。

## 6 参考文献

- 1) Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P., and Singer, V.L. (1996) *Anal. Biochem.* 239,223-237.
- 2) Steinberg, T.H., Haugland, R.P., and Singer V.L. (1996) *Anal. Biochem.* 239, 238-245.
- 3) Waring M.J. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 269-282.
- 4) 木下一彦・御橋廣眞 編:日本分光学会測定法シリーズ  
「蛍光測定 - 生物科学への応用 - 」【学会出版センター】
- 5) 西川泰治・平木敬三 著:機器分析・実技シリーズ(日本分析化学会 編)  
「蛍光・りん光分析法」【共立出版株式会社】
- 6) 今井一洋 著「生物発光と化学発光 - 基礎と実験 - 」【廣川出版】
- 7) 小川 雅彌 監修代表「機器分析の手引き」【化学同人】
- 8) ヤコフ 著 「おもしろい生物学」【東京図書株式会社】
- 9) 「化学辞典 普及版」【森北出版株式会社】
- 10) 「理化学辞典」【岩波書店】
- 11) 「生化学辞典」【東京化学同人】

### 表紙写真の実験内容

- (1) ゲル : 1% Agarose, 1 × TAE
- (2) サンプル :
 

Lane-1 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 1mg	Lane-5 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 10ng
Lane-2 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 100ng	Lane-6 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 5ng
Lane-3 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 50ng	Lane-7 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 2ng
Lane-4 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 20ng	Lane-8 : DNA/ <i>Hind</i> III ; 1ng
- (3) 電気泳動  
上記サンプルをアプライし、50V 定圧で泳動。泳動 buffer は、1 × TAE。
- (4) 染色  
電気泳動終了後、下記の染色液に2時間浸した。  
0.01%SYBR® Green I solution in 1 × TAE
- (5) 読み取り装置 : FLA-2000
- (6) 読み取り条件 : Gradation : 65536 (16bit)  
Resolution : 50mm  
Sensitivity : F10  
Latitude : 5  
Sample Mode : Fluor. 473nm : Y520 Filter

著者・編集

三浦 研二

長島 真喜子

今井 千織

(富士写真フィルム)

SYBR, SYPRO は米国 Molecular Probes社の登録商標です。  
AttoPhos は米国JBL Scientific Inc. の商標です。

1998年3月発行



富士写真フィルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■機器事業部 サイエンス・システム

〒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