

LAS-1000 / LAS-1000plus / LAS-1000C

## はじめに

化学発光とは、化合物の化学反応により放出される光です。従来、化学発光の寿命は、非常に短いものでした。そのため、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などにしか利用することができませんでした。（文献 1）～ 4）参照）

近年、短寿命だった化学発光が技術改良され長寿命化し、プロットング検出などに応用することが可能となりました。プロットング後の検出方法としては、メンブレンをX線フィルムに密着させ、数十秒～数時間露光し画像化する方法がとられてきました。

この度、富士写真フィルム株式会社は、冷却CCDカメラにより微弱光を検出しデジタル画像化するシステムを提案します。画像をデジタル化することにより、定量解析、画像のプレゼンテーションが容易となります。LASシリーズは、高感度、高精細を特徴とする、化学発光検出システムです。

今回は、化学発光法についての基本原理と、最近普及しつつある種々の試薬を紹介します。

## Contents

1. 代表的な化学発光系と発光原理
  - (1)ルミノール系
  - (2)ジオキセタン系
2. 化学発光試薬紹介
3. 参考文献

## Summary

- ・ルミノール系の化学発光基質は、ウェスタンプロットングの検出によく利用されています。
- ・ジオキセタン系の化学発光基質は、サザンプロットングやウェスタンプロットングの検出によく利用されています。
- ・ウェスタンプロットング、サザンプロットングにそれぞれ適用できるキット化された試薬が販売されています。

# 1 代表的な化学発光系と発光原理

化学発光とは、下図のように化学反応により分子が励起されて励起状態になり、そこから基底状態に戻る時放出される光です。

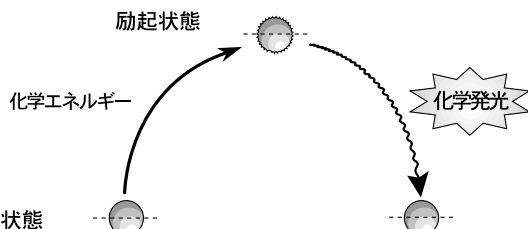


Fig. 1-1

基底状態

**励起状態**  
分子のエネルギーの低い定常状態から、エネルギーの高い状態へ遷移させ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。

**基底状態**  
分子のエネルギーの低い定常状態です。

Fig. 1-1 化学発光の原理

代表的な発光系として、ルミノール系と、ジオキセタン系の2種類があります。

## (1) ルミノール系

ルミノールが、血液中の鉄分により触媒されて発光する事は古くから知られており種々の研究が行われてきました。ルミノールは、過酸化水素の存在下で中間体を経て分解し、光を放出します。またこの反応は、ペルオキシダーゼに触媒されて強く発光することが知られています。1985年にKrickら、ルミノールの化学発光がエンハンサーであるヨードフェノール化合物を加える事によって、約1000倍にも増強され、発光時間が延長されることを発見し、この方法を Enhanced Chemiluminescenceと呼びます。(文献5)~(7)参照 近年さらに改良研究が行われています。

### ■ 反応式

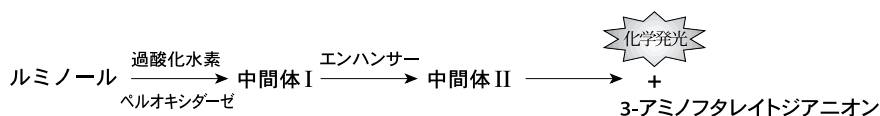


Fig. 1-2

ルミノールは、ペルオキシダーゼを触媒とし、過酸化水素と反応し中間体Iを生成します。中間体IIに対してエンハンサーが反応すると、中間体IIを経て3-アミノフタレイトジアニオンが生成され、同時に化学発光が起きます。

### ■ 発光スペクトル

ルミノールの化学発光スペクトルは下図の通りです。

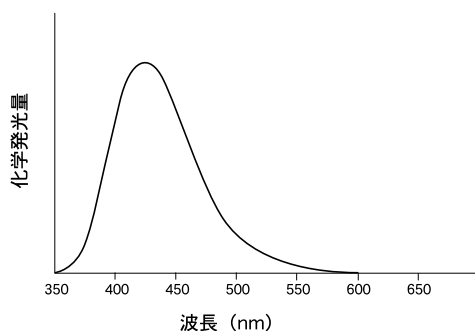
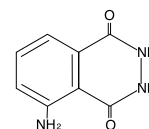


Fig. 1-3

### ルミノールの構造式



**ペルオキシダーゼ (Peroxidase, POD)**  
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$  の反応を触媒する酵素で、西洋ワサビからとれるホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) が有名です。

Fig. 1-2 ルミノール系化学発光の反応式

### 3-アミノフタレイトジアニオンの構造式

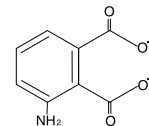


Fig. 1-3 ルミノール系化学発光スペクトル

## ■ 発光の経時変化

発光強度は、約5～20分で最大の発光を示し、1時間後には半分以下になります。

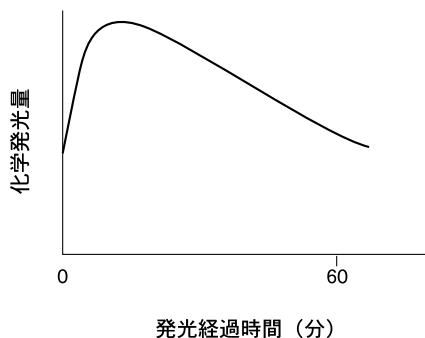


Fig. 1-4

Fig.1-4 ECL™の化学発光経時変化

## ■ 応用例 ウェスタンブロッティングの検出

ウェスタンブロッティングは、タンパク質をSDS-PAGEなどで電気泳動後、電圧をかけながら、PVDFなどのメンブレンフィルタにタンパク質を転写する方法です。転写後のタンパク質の特異的な検出は、抗原抗体反応や、アビジン-ビオチン反応を利用して行います。

下の画像は、ラット脳の粗膜タンパク質をブロッティング後、目的タンパク質を抗原抗体反応により特異的に酵素標識し、ECL™を用いて検出した画像です。また、メンブレンフィルタ上の反応を模式図で示すと下図のようになります。

PVDF(polyvinylidene fluoride) 高い疎水性を持ち、プレウエットティング後、タンパク質のブロッティングに用いられます。

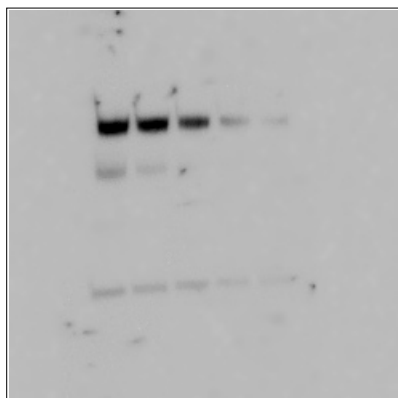


Fig. 1-5

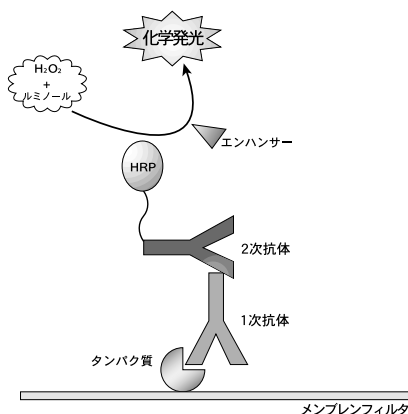


Fig. 1-6

Fig.1-5 ウェスタンブロッティングの検出例

サンプル：ラット脳の粗膜タンパク質

\* サンプルは、三菱化学生命科学研究所にご提供頂きました。

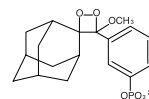
Fig.1-6 ウェスタンブロッティングの検出模式図

## (2) ジオキセタン系

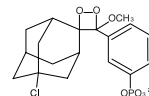
1989年にBronsteinらが発表したアルカリ性フォスファターゼの基質 (AMPPD<sup>®</sup>) は、高感度な化学発光基質として注目を集めました。AMPPD<sup>®</sup>自身は水溶液中で安定ですが、アルカリ性フォスファターゼで加水分解されると不安定な中間体を経て発光します。

近年、ジオキセタン系の基質は、分子生物学分野のサザンハイブリダイゼーションの検出に使われるようになりました。AMPPD<sup>®</sup>、CSPD<sup>®</sup>より先さらに発光が強い、CDP-Star<sup>™</sup>が開発され、急速に普及しています。(文献 8)~(11) 参照)

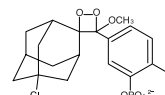
AMPPD<sup>®</sup>の構造式



CSPD<sup>®</sup>の構造式



CDP-Star<sup>™</sup>の構造式



### ■ 反応式

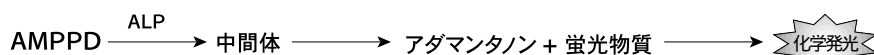


Fig. 1-7

Fig.1-7 ジオキセタン系化学発光の反応式

化学発光基質 (AMPPD<sup>®</sup>) がアルカリ性フォスファターゼと反応し、中間体を生成します。この中間体は自然に開裂し、アダマンタンと蛍光物質が生成されます。この蛍光物質は、化学的に励起されており、光を発しながら基底状態に戻ります。

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

### ■ 発光スペクトル

CDP-Star<sup>™</sup>の化学発光スペクトルは下図の通りです。

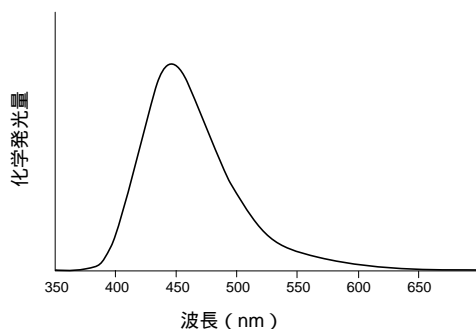


Fig. 1-8

Fig.1-8 CDP-Star<sup>™</sup>のナイロンメンブレン上の化学発光スペクトル

## ■ 発光の経時変化

CDP-Star™による化学発光は24時間以上持続します。発光強度の経時変化は下図の様でした。CDP-Star™は、AMPPD®、CSPD®と比較して立ち上がり先早く、発光強度が強いので、大変使いやすい基質です。

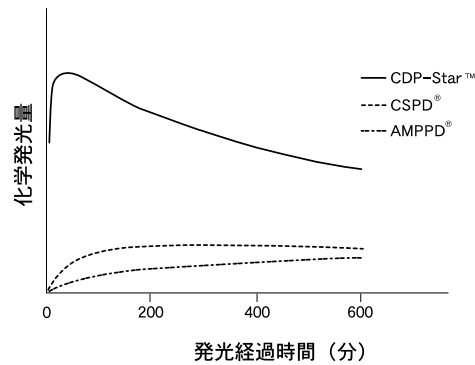


Fig. 1-9

Fig. 1-9 ジオキセタン系の化学発光経時変化

## ■ 応用例 サザンブロッティングの検出

サザンブロッティングは、DNAを電気泳動後、メンブレンフィルタに転写する方法です。転写後のDNAの特異的な反応は、プローブを用いて行います。

下の画像は、ノックアウトマウス由来のゲノムDNAをナイロンメンブレンにブロッティング後、CDP-Star™を用いて検出した画像です。また、メンブレンフィルタ上の反応を模式図で示すと下図のようになります。

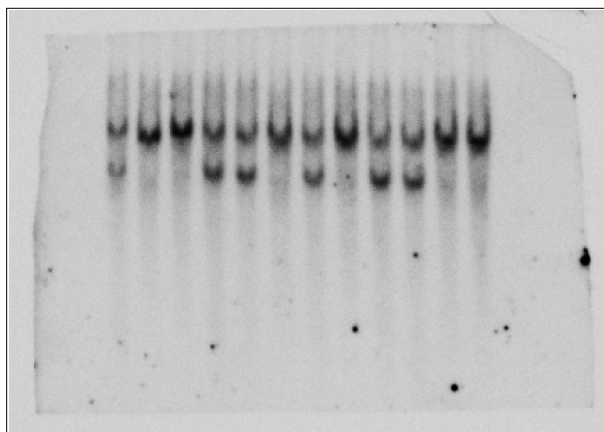


Fig. 1-10

Fig. 1-10 サザンブロッティングの検出例

サンプル：DIG標識プローブを用いたノックアウトマウス由来のゲノムDNA

\*サンプルは、三菱化学生命科学研究所にご提供頂きました。

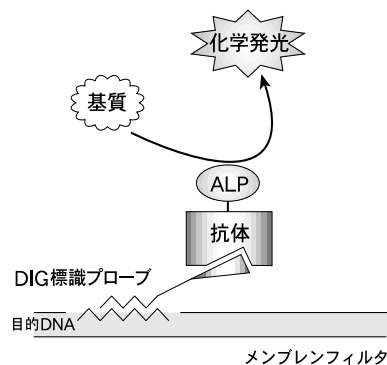


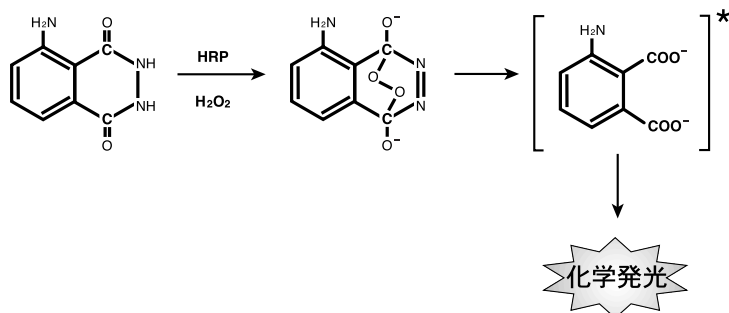
Fig. 1-11

Fig. 1-11 サザンブロッティングの検出模式図

## 2 化学発光試薬紹介

### ■ ペルオキシダーゼ用

#### ルミノール

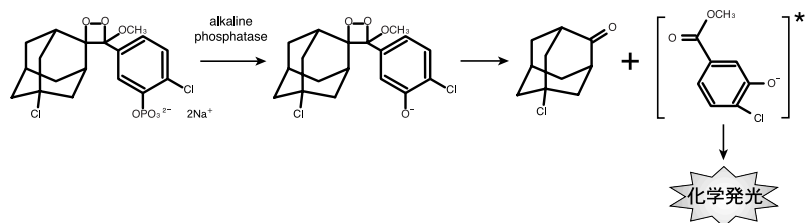


#### 試薬キット

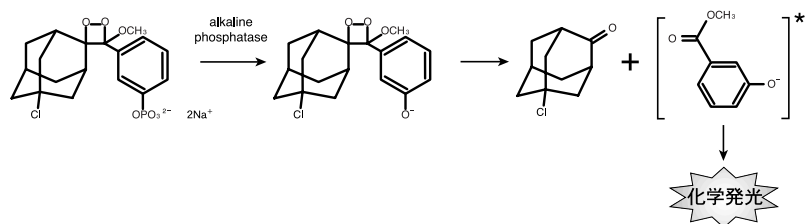
製品名	検出サンプル	販売元
ImmunoStar Kit	タンパク	和光純薬工業社
ECL Plus ウェスタンブロットイング 検出試薬	タンパク	アマシャム ファルマシア バイオテク社
BM ケミルミネッセンスウェスタン ブロットイング リエージェント	タンパク	ロシュ・ダイアグノスティック ス社
ECL™ ウェスタンブロットイング 検出システム	タンパク	アマシャム ファルマシア バイオテク社
スーパーシグナル® ULTRA Chemiluminescent Substrate for Western Blotting	タンパク	ピアスケミカル社
ルネッサンス™ ルミノールウェスタン ブロット化学発光検出試薬プラス	タンパク	第一化学薬品社
ECL™ ダイレクトDNA/RNA ラベリング・検出システム	DNA, RNA	アマシャム ファルマシア バイオテク社
スーパーシグナル®Nucleic Acid Chemiluminescent Substrate Kit	DNA	ピアスケミカル社
ルネッサンス™ 核酸化学発光検出試薬	DNA	第一化学薬品社

## ■ アルカリフォスファターゼ用

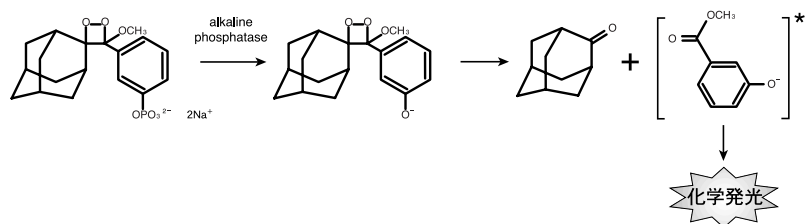
CDP-Star™ (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub>)



CSPD® (C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClO<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub>)



Lumigen® PPD (C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub>)



## 試薬キット

製品名	検出サンプル	発光基質	販売元
Phototope™-Star Western Blot Detection kit	タンパク	CDP-Star™	第一化学薬品社
イムンスターキット	タンパク	CDP-Star™	日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ社
DIG 発光検出キット	DNA, RNA	CSPD®	ロシュ・ダイアグノス ティックス社
Gene Images™ 化学発光核酸検出システム	DNA, RNA	CDP-Star™	アマシャム ファルマ シア バイオテック社
Illuminator™ Chemiluminescent Detection System	DNA, RNA	CSPD®	東洋紡績社
PHOTOGENE™ Nucleic Acid Detection System Version 2.0	DNA, RNA	Lumi-Phos®530	ライフテック オリエンタル社
Phototope™-Star Detection Kit	DNA, RNA	CDP-Star™	第一化学薬品社

### 3 参考文献

- 1) 今井一洋, 化学発光 -試薬、測定法-, *ぶんせき*, 1991年, 11月号, 892-897
- 2) 石井幹太, 山田正昭, 化学発光分析法, *ぶんせき*, 1994年, 6月号, 452-459
- 3) 上館民夫, 化学発光分析法, *ぶんせき*, 1995年, 9月号, 706-713
- 4) Ian Weeks, Chemiluminescence Immunoassay, *Wilson and Wilsons Comprehensive Analytical Chemistry*, ed. by G. Svehla, Vol. 29, 1992, Elsevier
- 5) Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, J. N., Thorpe, G. H. G., Analytical Luminescence: Its Potential in the Clinical Laboratory, *Clinical Chemistry*; 25, 1531-1546 (1979).
- 6) Thorpe, G. H. G., Kricka, L. J., Moseley, S. B., Whitehead, T. P., Phenols as Enhancers of the Chemiluminescent Horseradish Peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction: Application in Luminescence-Monitored Enzyme Immunoassays, *Clinical Chemistry*; 31, 1335-1341 (1985).
- 7) Thorpe, G. H. G., Kricka, L. J., Enhanced Chemiluminescent Reactions Catalyzed by Horseradish Peroxidase, *Methods in Enzymology*; 133, 331-353 (1986)
- 8) Bronstein, I., Edwards, B., Voyta, J. C., 1,2-Dioxetanes: Novel Chemiluminescent Enzyme Substrates. Applications to Immunoassays, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*; 4, 99-111 (1989).
- 9) Beck, S., Koster, H., Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology, *Analytical Chemistry*; 62, 2258-2270 (1990).
- 10) Tizard, R., Cate, R. L., Ramachandran, K. L., Wysk, M., Voyta, J. C., Murphy, O. J., Bronstein, I., Imaging of DNA Sequences with Chemiluminescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 87, 4514-4518 (1990).
- 11) Bronstein, I., Voyta, J.C., Lazzari, K.G., Murphy, O., Edwards, B., Kricka, L.J., Rapid and Sensitive Detection of DNA in Southern Blots with Chemiluminescence, *BioTechniques*; 8, 310-314 (1990).

本文中のサンプルをご提供いただきました、三菱化学生命科学研究所の皆様、厚く御礼申し上げます。

AMPPD、CSPD、CDP-Star は、Tropix社の登録商標もしくは商標です。  
 Lumigen、Lumi-Phos は、Lumigen社の登録商標です。  
 スーパーシグナル は、Pierce Chemical社の商標です。  
*Gene Images*、ECLはAmersham Pharmacia Biotech社の商標です。  
 Gene-Lite は、Bio-Rad Laboratories社の登録商標です。  
 Illuminator は、Stratagene Cloning Systems社の商標です。  
 PHOTOGENE は、Life Technologies社の商標です。  
 Phototope は、New England Biolabs社の商標です。  
 Western Exposure は、CLONTECH社の商標です。

著者・編集

三浦 研二

土谷 徹

長島 真喜子

今井 千織

(富士写真フイルム)

1997年9月発行

1998年12月改訂2版第1刷発行

 **FUJIFILM**

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 ■ 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