

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note

No. 9

基礎編：青色LEDを用いた蛍光検出の基本的知識

LAS-1000 / LAS-1000plus

はじめに

ルミノ・イメージアナライザーLAS-1000 / LAS-1000plusは、化学発光検出および蛍光検出が可能なシステムです。

LAS1000 / LAS-1000plusにおける蛍光検出には、従来のUVイルミネーターに代わり、安価で小型で安全な青色発光ダイオードを励起光源として採用しています。

EtBrやSYBR® Greenによるゲル中のDNA/RNAのポストステイン、SYPRO® Orangeによるタンパク質のポストステイン、およびAttoPhos™を用いたサザン / ウェスタンブロットティング後のアルカリ性フォスファターゼによるケミフローレッセンス法などの検出が可能です。

今回は、青色発光ダイオードの発光メカニズムから、LAS-1000 / LAS-1000plusの応用例まで、幅広く紹介します。

Contents

1. 青色発光ダイオードの研究動向
2. LAS-1000 / LAS-1000plusにおける励起光源の検討
3. Blue-SQW-LEDの発光原理
4. Blue-SQW-LEDを用いた蛍光イメージング
5. LAS-1000 / LAS-1000plusによる蛍光検出システムの特長
6. 参考文献

Summary

- ・ 蛍光の励起光源として、従来のUVイルミネーターと比べ、小型、安価で、安全な青色LEDを用いました。
- ・ 採用したBlue-SQW-LEDは、UVイルミネーターよりも50～100倍寿命が長い特長があります。
- ・ 採用したBlue-SQW-LEDは、中心波長が470nmです。
- ・ EtBr, SYBR® Green, SYPRO® Orangeなどでポストステインされたゲル中DNAやタンパク質の蛍光検出が可能です。また、AttoPhos™を基質とするケミフローレッセンス法での検出が可能です。

1 青色発光ダイオードの歴史的背景

高輝度赤色、黄緑色発光ダイオード(Light Emitting Diode : LED)は1960年代からあったものの、明るい青色LEDの実用化は極めて困難でした。大型フルカラーLEDディスプレイの実現は、高輝度「青」が必要であり、長い間待ち望まれてきました。

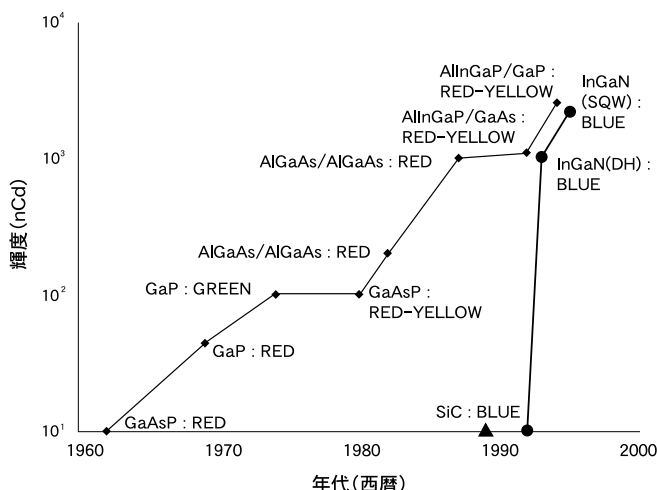


Fig.1-1

Fig.1-1 発光ダイオードの年代別推移

Fig.1-1に示すように、赤 / 黄色と比較し青色発光ダイオードの実用化はかなり遅れていました。しかし、GaN系化合物半導体において1985~1990年の画期的な研究成果により、高品質なGaN結晶膜を得ることができるようになりました。1993年12月に日亜化学工業からGaN系化合物半導体の二重接合(Double Hetero : DH)構造を用いた高輝度青色LEDの開発に成功したとの報告がありました。この日亜化学の青色LEDは青色領域の450nmにピークを持つ出力1mWの発光を示し、従来のSiCを用いたLEDに比べ約100倍明るいものでした。(文献 1) 参照) また、1994年になって同社は、InGaNを活性層として単一量子井戸(Single Quantum Well : SQW)を用いた青 / 緑LEDを開発し、青色LEDで出力5mWという値を達成しました。(文献 2) 参照) また、1995年に多重量子井戸(Multi Quantum Well : MQW)構造を用いた高輝度LEDが、豊田合成のグループからも報告されました。(文献 3) 参照)

二重接合(Double Hetero : DH) 活性層をバンドギャップの少し大きい材料で挟みこむ構造です。

単一量子井戸 (Single Quantum Well : SQW)

多重量子井戸 (Multi Quantum Well : MQW) 単一量子井戸を多層に重ねたもの。通常、レーザーの活性層によく使われています。

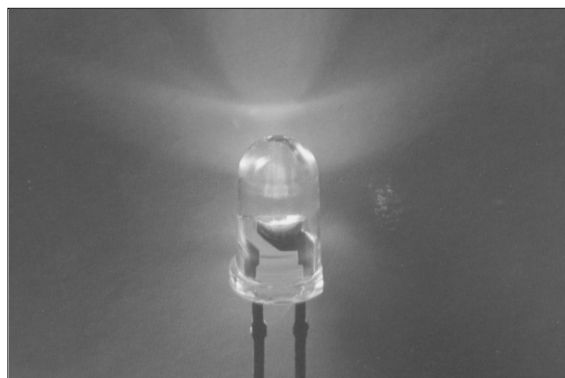


Fig.1-2

Fig.1-2 青色LED

2 LAS-1000 における励起光源の検討

現在、市販されている青色LEDの材料としてGaN系、SiC、ZnSe系が挙げられます。

その中でもGaN系化合物半導体は外部量子効率が高く(下表) 現在最も色純度、輝度共に高性能のLEDが得られています。富士写真フイルムはこのGaN系化合物半導体に着目し、青色励起光源として用いるための検討を行いました。市販されているGaN系化合物半導体を用いた青色LEDの構造は主に単一量子井戸(Single Quantum Well : SQW)、多重量子井戸(Multi Quantum Well : MQW)、二重接合(Double Hetero : DH)の3タイプです。中でも日亜化学工業製のSQW構造のLEDは、輝度、寿命共にかなりのレベルではありますが、特筆すべき点はFig2-1に示すように他社製品と比較して色純度が圧倒的に良いため励起光源として最適であることです。LAS-1000は、日亜化学工業製のBlue-SQW-LEDを励起光源に採用しました。

外部量子効率
注入した電流量に対する外部に発した光量の比。

色純度
LEDを蛍光色素の励起光源に用いる場合には、中心波長、スペクトルの半値幅、不純物等による発光が問題となってきます。我々の用いたLEDはこれらの点において他の構造のLEDより優れています。

LED材料	中心波長	外部量子効率(%)	発光出力(mW)
ZnCdSe	489nm	1.7	0.43
SiC	470nm	0.03	0.036
InGaN	470nm	9.1	3.0

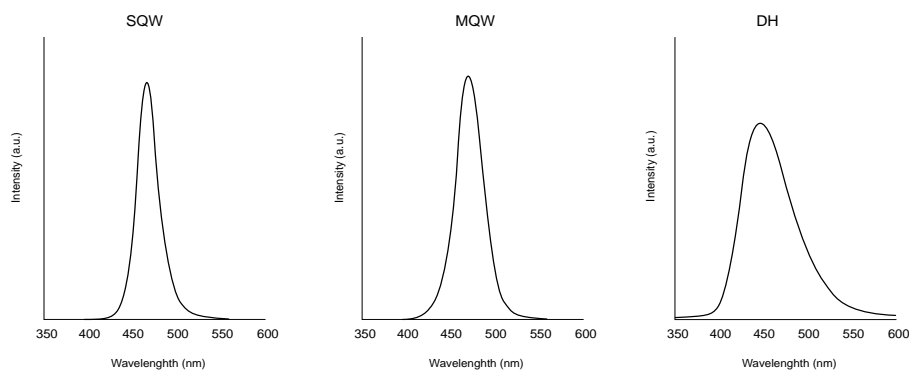


Fig.2-1

Fig.2-1 各種GaN系化合物LEDの発光スペクトル

3 Blue-SQW-LEDの発光原理

■ Blue-SQW-LEDの基本構成

Blue-SQW-LEDの基本構成をFig.3-1に示します。(文献9) 参照)

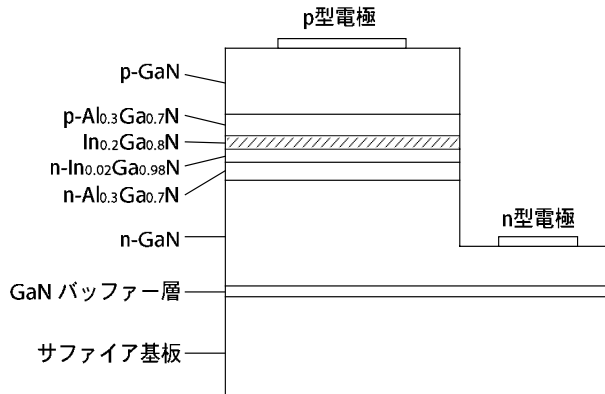


Fig.3-1

基板結晶のサファイアC面上に有機金属気相成長法(Metal Organic Vapor Phase Epitaxy : MOVPE)にて、GaNバッファ層、n-GaN、n-AlGa_{0.3}N、n-InGa_{0.2}N、In_{0.2}Ga_{0.8}N、p-AlGa_{0.3}N、p-GaNを順次成長させた構造となっています。ここでIn_{0.2}Ga_{0.8}Nは活性層であり、発光スペクトルはこの組成で決定されることとなります。InとGaの組成を変化させることでGa_{0.8}N(360nm)からIn_{0.2}N(650nm)までの波長のスペクトルを得ることができ、Inが0.2、Gaが0.8の割合で約470nmの光を発します。この組成を有するInGa_{0.2}N活性層とAlGa_{0.3}Nの組み合わせで単一量子井戸構造を形成します。

■ 発光機構

ここでBlue-SQW-LEDの発光機構を簡単に説明します。

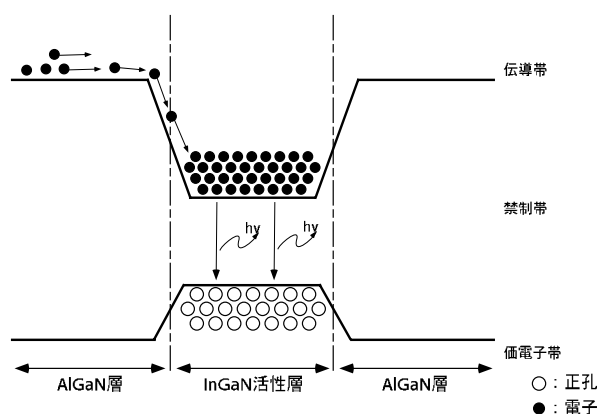


Fig.3-2

Fig.3-2はBlue-SQW-LEDのバンドの概略図です。この図からわかるように、バンド構造が井戸の形になって電子が閉じ込められるので量子井戸構造と呼んでいます。これが一層のものが単一量子井戸構造です。ここで、この量子井戸構造によりInGa_{0.2}N活性層に電子が閉じ込められ、電子-正孔の再結合が起こり、この活性層のバンドギャップ(禁制帯幅)に相当する約470nmの光を発することになります。

Fig.3-1 Blue-SQW-LEDの基本構成

InとGaの組成を変化させることで理論上Ga_{0.8}N(360nm)から、In_{0.2}N(650nm)までの波長のスペクトルを得ることが可能ですが、製品レベルではGreen(530nm)までしか存在していません。Inのモル分率が高くなると、膜の結晶性が低下し、発光層として使用するのは困難です。

有機金属気相成長法
有機金属ガスを原料として、基板結晶に単結晶薄膜を堆積させる結晶成長方法。

Fig.3-2 Blue-SQW-LEDのバンドの概略図

バンド構造が井戸の形になって電子が閉じ込められるので量子井戸構造と呼んでいます。これが一層のものが単一量子井戸構造です。

伝導帯

伝導に寄与するエネルギー帯。

禁制帯

電子が存在しえないエネルギー帯。

価電子帯

電子によって完全に満たされている最上位のエネルギー帯。

正孔(hole)

絶縁体や半導体の価電子帯が電子によって完全に満たされていない場合に空いている電子状態を粒子とみなしたものです。

4 Blue-SQW-LEDを用いた蛍光イメージング

LAS-1000 / LAS-1000plusにおいては、サンプルに均一な励起光が照射されるようにLEDを配置しています。Blue-SQW-LEDを用いた蛍光検出の概念図をFig.4-1に示します。励起光源であるLEDの前面には選択的に蛍光色素を励起するために必要な青色光のみを取り出すフィルタを配置し、受光側には励起光を遮断し且つ目的のサンプルからの蛍光を選択的に検出するための専用フィルタを配置しました。

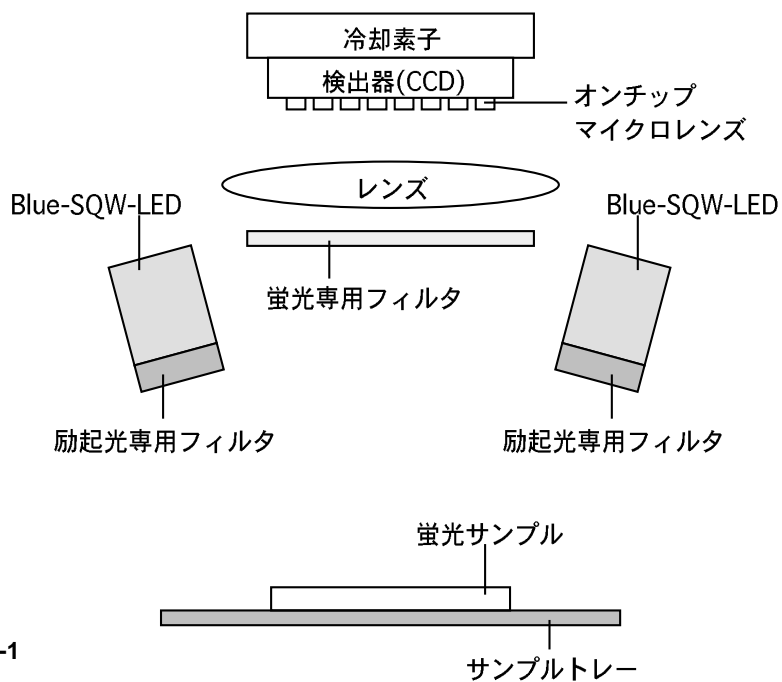


Fig.4-1

Fig.4-1 蛍光検出概念図

5 蛍光検出における LAS-1000 / LAS-1000plus システムの特長

■ 高感度蛍光試薬に最適な励起光源

近年、試薬の性能が向上し、従来使用されているEtBrより高感度なSYBR® Green等の蛍光試薬が普及してきています。(文献 5), 6), 7), 8), 9) 参照)

LAS-1000 / LAS-1000plusは、励起光の中心波長が470nmであるため、これらの試薬の最適励起波長に近い波長で励起させることが出来ます。

Blue-SQW-LEDを用いたサンプルの検出例

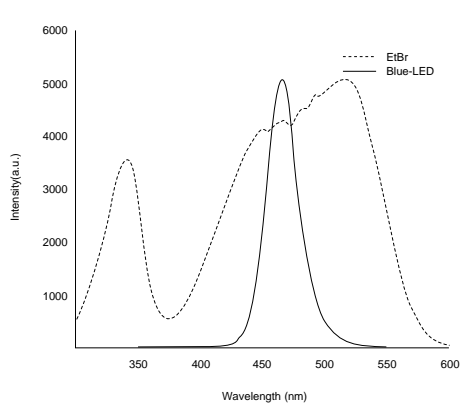


Fig.5-1

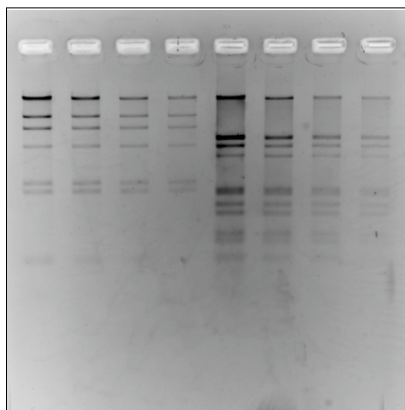


Fig.5-1 EtBr染色λDNA / Hind III (ポストステイン) の検出
左図: EtBrの励起とBlue-LEDの発光スペクトル
右図: 検出画像例

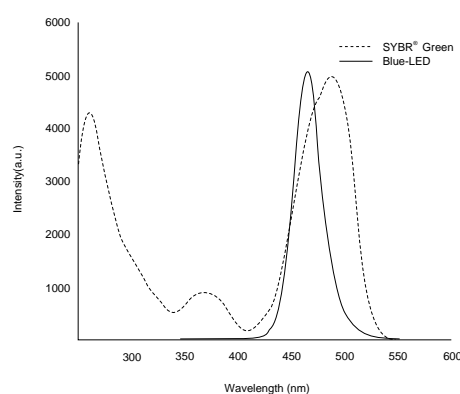


Fig.5-2

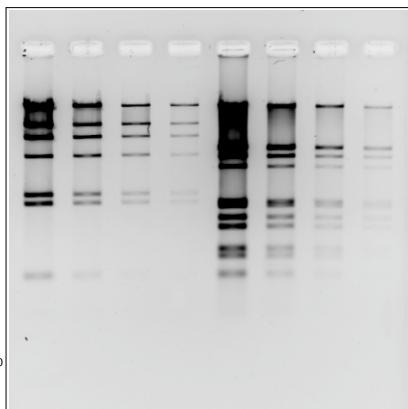


Fig.5-2 SYBR® Green I染色λDNA / Hind III (ポストステイン) の検出
左図: SYBR®Green Iの励起とBlue-LEDの発光スペクトル
右図: 検出画像例

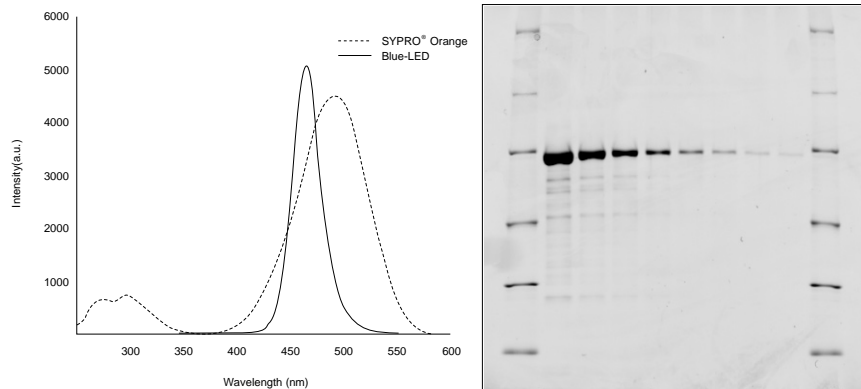


Fig.5-3

Fig.5-3 SYPRO® Orange染色ウシ血清アルブミン(ポストステイン)の検出
左図: SYPRO® Orangeの励起とBlue-LEDの発光スペクトル
右図: 検出画像例

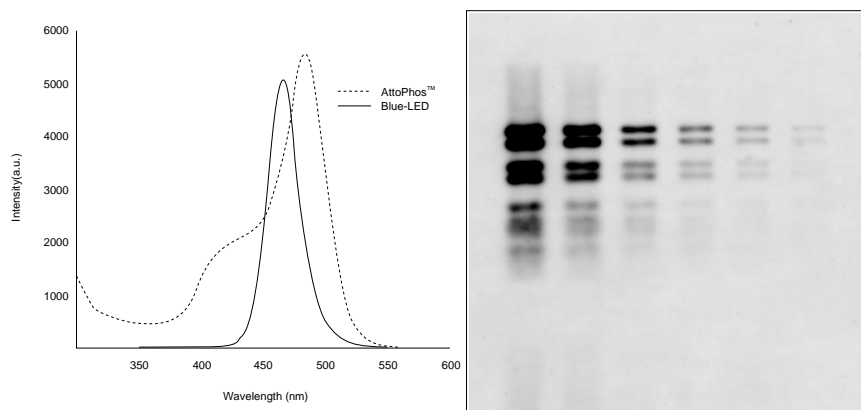


Fig.5-4

Fig.5-4 AttoPhos™標識pBR328/*Bgl* I + *Hinf* I検出
左図: AttoPhos™の励起とBlue-LEDの発光スペクトル
右図: 検出画像例

■ 蛍光色素、核酸、タンパク質へのダメージが少なく、安全

従来、EtBrポストステインゲル等の電気泳動計測の励起光源として、紫外光を発するUVトランスイルミネーターが用いられてきました。(文献 10) 参照) しかし、紫外光は、蛍光色素、核酸、タンパク質に対してダメージを与えることが知られています。また、人体に対する安全性も高くありません。

LAS-1000 / LAS-1000plusでは、励起光源が中心波長470nmの可視光であるため、サンプルにダメージを与えず、人体への安全性を確保することが出来ます。

■ 耐久性があり、安価で小型

LAS-1000 / LAS-1000plusに搭載されているBlue-SQW-LEDは、UVトランスイルミネーターと比較して耐久性に優れ、小型である特長を持っています。

また、LEDを二次元的に配列することにより、均一光を得ることが比較的容易であるため、価格を抑えたシステムが実現されています。

6 参考文献

- 1) Nakamura, S., Mukai, T., Senoh, M., Candela-class high-brightness InGaN/AlGaIn double-heterostructure blue-light-emitting diodes, *Appl. Phys. Lett* ; 64, 1687-1689(1994)
- 2) Nakamura, S., Topical Workshop on - Nitrides, Nagoya, Japan(1995)
- 3) Koike, N., Shibata, N., Kato, H., Yamasaki, S., Koide, N., Amano, H., Akasaki, I., Topical Workshop on - Nitrides, Nagoya, Japan(1995)
- 4) Nakamura, S., Senoh, M., Iwasa, N., Nagahara, S., High-power InGaIn single-quantum-well-structure blue and violet light-emitting diodes, *Appl. Phys. Lett*; 67(13), 1868-1870(1995)
- 5) Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., Quantitative Detection of Reverse Transcriptase-PCR Products by Means of a Novel and Sensitive DNA Stain, *PCR Methods and Applications* ; 4, 234-238(1995)
- 6) Piatyszek, M.A., Kim, N.W., Weinrich, S.L., Hiyama, K., Hiyama, E., Wright, W.E., Shay, J.W., Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP), *Methods in Cell Science*; 17, 1-15(1995)
- 7) Karlsen, F., Steen, H.B., Nesland, J.M., SYBR Green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods* ;55 : 153-156(1995)
- 8) Steinberg, T.H., Haugland, R.P., Singer, V.L., Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains, *Analytical Biochemistry* ; 239, 238-245 (1996)
- 9) Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P., SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains: One-Step Fluorescent Staining of Denaturing Gels for Detection of Nanogram Levels of Protein, *Analytical Biochemistry* ; 239, 223-237(1996)

著者・編集

三浦 研二

土谷 徹

長島 眞喜子

今井 千織

(富士写真フイルム)

1997年9月発行

1999年1月改訂2版第1刷発行

SYBR, SYPRO は、Molecular Probe社の登録商標です。
AttoPhos は、JBL Scientific社の商標です。

 **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