

## 蛍光検出の基礎知識

Keyword： 蛍光検出の利点、励起光、蛍光、多重蛍光、直線性、定量化

### はじめに

蛍光標識や蛍光染色の検出は分子生物学や生化学研究におけるさまざまな実験や分析、品質管理などの分野で高感度検出や定量を行うために用いられています。核酸やタンパク質の定量、ウェスタン・ノーザン・サザンプロット、PCR産物の解析、DNAシーケンシング、アッセイ、顕微鏡観察など一般的に用いられている技術では蛍光検出を有効に活用することができます。

### 蛍光検出の利点

ここでは蛍光検出が他の検出法とくらべ、どのような利点や有効性があるのかをご紹介します。

### 感度

一般的に、蛍光染色や蛍光色素はDNAやRNA、タンパク質の検出において従来のNon-RI系の検出法より高感度に検出できます。また、多くの蛍光検出法は放射性同位体（RI）の感度に近づいています。

### 多重蛍光ラベルの可能性

検出機器の光学フィルターと解析用ソフトウェアを用いることで、2色以上の蛍光を別々に検出することができます。このシステムを用いると特異的に標識した同一サンプルやゲル中の同一レーンサンプルを確実に分離し、確認することができます（図1）。

### 安定性

蛍光標識を行った分子はRI標識を行った分子より安定です。蛍光標識した抗体やPCRプライマーは6ヶ月以上保存することができますが、<sup>32</sup>P標識の核酸やオリゴヌクレオチドは約2週間で半減してしまいます。長期間安定して使用できる蛍光標識試薬は用事調製の必要がないのであらかじめ大量に準備することができます。DNAやタンパク質の分子量決定や定量、酵素アッセイ、イムノアッセイ、PCRを用いたゲノムタイピング、DNAシーケンシングのようなアプリケーションに使用する場合、キット化されたさまざまな試薬を用いることができます。

### 安全性

ほとんどの蛍光色素は取り扱いが簡便で、通常は手袋を着用するだけで危険を防ぐことができます。一方放射性物質は核種によっては強い放射線を放出するため鉛やアクリルの防護を必要とします。また、蛍光物質は焼却により分解するため貯蔵や廃棄上の問題はほとんどありませんが、放射性廃棄物は長期間にわたって遮蔽保存や規定された処理が必要になります。

### 化学有効性

モノクローナル抗体やポリクローナル抗体をなど種々の生物学的に重要な分子は架橋反応により蛍光色素で標識することが可能です。Chloramphenicol acetyl transferase（CAT）アッセイのようなクロラムフェニコール蛍光や、galactosidase アッセイ（*lacZ* gene）のような  $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛍光などに用い

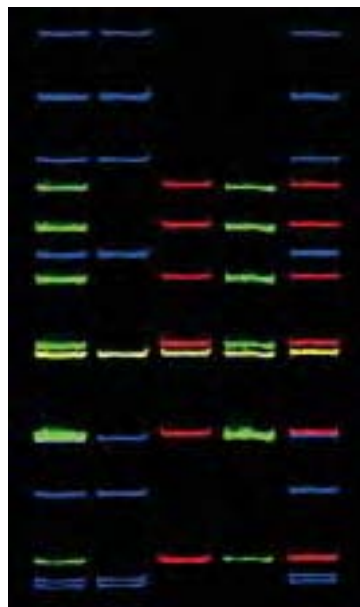


図1. 蛍光標識されたDNAマーカーとPCR産物を同一レーンに添加し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果

検出にはTyphoon8600を用いました。Fluorescein(green), Cy3(yellow), ROX(blue), Cy5(red) 標識したサンプルはそれぞれ0.25 ~5 fmol/bandです。

られる酵素基質や核酸を含む分子が市販されています。

## 低コスト

蛍光色素は長期間安定であり、特別な輸送費用や廃棄費用はない。安価であるので一般的には、放射性物質よりも経済的です。

## 蛍光色素特性 - 励起光と蛍光

蛍光分子は励起光 (excitation) と蛍光 (emission) によって特徴づけられます。

## 励起光

蛍光色素を励起させる光の波長分布は励起スペクトルで表します。励起スペクトルは、各励起波長を照射したときに放出される一定波長の発光強度をプロットして作成されます。励起スペクトルは吸収スペクトルと同一または極めて近似しているため、蛍光色素メーカーなどが公表している吸収スペクトル値 (図 2a) をそのまま利用できます。

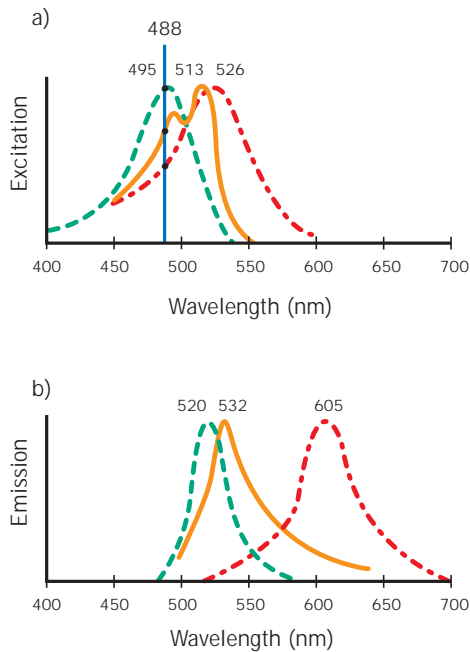


図2. 吸収スペクトル (a) と蛍光スペクトル (b)

フルオレセイン (---), DNA結合TOTO (—), DNA結合 エチジウムプロマイド (·-·-) を示します。各スペクトルのピークは同一になるよう標準化されています。それぞれのピークには最大吸収あるいは最大蛍光を示す波長が記載されています。488nmレーザーのスペクトルが3つの吸収スペクトルと重なる位置を示しました。(これらのスペクトルパターンは弊社の収集データや参考文献1,2に基づいて作成しました。)

励起スペクトルのピーク波長に相当する光のエネルギーは、蛍光色素の基底状態 ( $S_0$ ) と一次励起状態 ( $S_1$ ) のエネルギー準位の差に等しくなります (Fig3a 励起)。より短波長側 (高エネルギー側) に第二ピークを持つ励起スペクトルもありますが、基底状態 ( $S_0$ ) から二次励起状態 ( $S_2$ ) に電子が遷移していることを意味しています。

励起スペクトルのもっとも発光強度が高くなる波長 (ピーク波長) が蛍光色素の最大励起波長になります。図2aに示される3種類の蛍光色素は、488 nmのレーザー光により異なった効率で励起されます。励起スペクトルのピーク波長の高さや488 nmの高さの相対比率が励起効率を示します。

## 蛍光

蛍光色素の放出光の波長分布を蛍光スペクトルといいます。蛍光スペクトルは蛍光の波長に対し相対的な蛍光強度をプロットして作成されます。(実際の蛍光スペクトル測定では、波長と強度が一定に維持された励起光を光源として用います。また、蛍光物質を取り扱う場合は、放出スペクトルのことを蛍光スペ

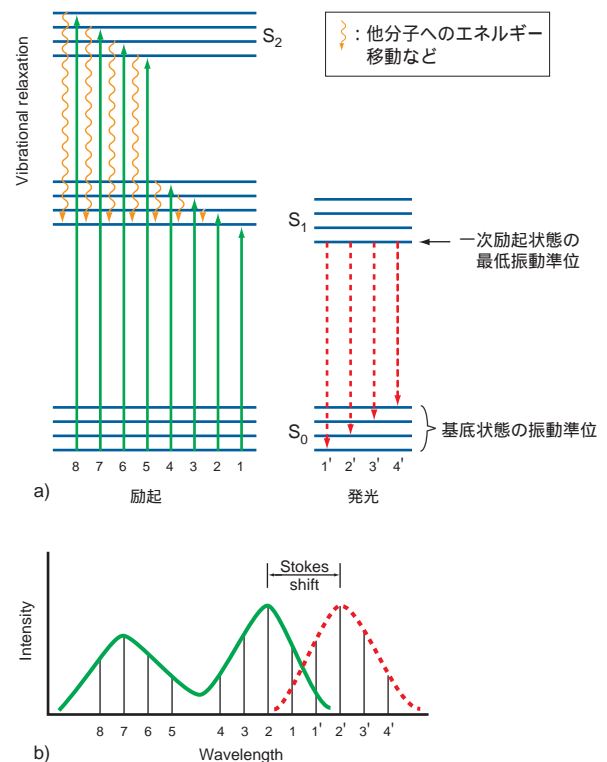


図3. 励起光蛍光を説明するエネルギー準位の模式図 (a) と励起スペクトルと蛍光スペクトルの模式図 (b)

参考文献3より抜粋。© W. H. Freeman and Company の許可を得て転載。

クトルと呼びます。) 蛍光スペクトルに示される波長(エネルギー)は一次励起状態( $S_1$ )の最低振動エネルギー準位から基底状態の優先的な振動エネルギー準位までのエネルギー差と等しくなります(図3a 発光)

蛍光の振幅が励起状態と基底状態の振幅構造と類似しているなら(図3b)、最も長波長側の励起の振幅と鏡像関係となります。理論上、蛍光色素が吸収した光エネルギーの波長と蛍光として放出する波長は同じになります。しかし実際には図2bの3種類の蛍光物質のスペクトルが示すようにほとんどの蛍光色素の蛍光スペクトルは常に長波長(低エネルギー)側にシフトします。励起スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長間の差はストークシフト(Stokes shift)と呼ばれています。この波長差は、蛍光放出以前の励起状態の際に放出されたエネルギーが熱エネルギーに変換されたために生じます。

ストークシフトは蛍光の感度を考える場合において非常に重要になります。蛍光を検出する際、励起光の影響を受けないためバックグラウンドを低くすることができるからです。

### 蛍光シグナルの直線性

入射光の波長と強度を一定にした場合(例えば、光源として制御されたレーザー光を使用した場合)、放出される蛍光は蛍光物質の量と正比例します。例えばfluoresceinで標識したオリゴヌクレオチドは100 amol ~ 44 fmolまで直線性を保つことが可能です(図4)。しかし、蛍光物質の濃度が高い場合にはサチレーションをおこし直線性が失われます。

### 蛍光強度

蛍光物質によって、放出される蛍光強度(輝度)が異なります。蛍光強度はそのまま感度に影響を与えるため蛍光物質にとって非常に重要なポイントです。蛍光強度は蛍光物質の2つの特性に依存します。:

光の吸収効率(吸光係数)

励起光と蛍光の変換効率(量子収率)

蛍光強度は蛍光物質の吸光係数( )と量子収率( )に比例します。:

輝度 = 吸光係数( ) × 量子収率( )

蛍光物質の吸光係数とは蛍光物質に吸収される特定波長の光量を意味します。モル吸光係数は光路1 cmあたりの1 M蛍光色素溶液の光学濃度として定義されます。有用な蛍光物質では、このモル吸光係数が10,000以上を示します。

励起光と蛍光の変換効率(量子収率)は以下の公式から得ることができます。

= 放出された光子数 / 吸収された光子数

量子収率( )は0(非蛍光性物質)から1(効率100%)までの値をとります。蛍光物質の量子収率を示す例として、フルオレセイン( = 0.9)およびCy5( = 0.3)があります。通常の量子収率( )の測定には、吸収スペクトルのピーク波長が用いられます。

フルオレセイン( =70,000, =0.9)と Cy5( =200,000, =0.3)は極めて高い輝度を持っています。これらの蛍光物質は量子収率と吸光係数は非常に異なっていますが、蛍光強度は同等です。

したがって、新しい蛍光物質を評価する場合は、吸光係数と量子収率をあわせて考慮する必要があります。蛍光強度は入射光の強さにも影響を受けます。理論上、サンプルへの入射光量を上げていくと励起される蛍光物質が増加していきます。しかし実際には、入射光量を上げすぎると全ての蛍光物質が常時励起状態となり、蛍光破壊が起こり蛍光強度が減衰あるいは消失します。

### 環境効果

蛍光物質の量子収率や励起スペクトルおよび蛍光スペクトルは環境から影響を受ける場合があります。環境条件としては温度、イオン濃度、pH、励起光の強度、リガンドとの共有結合、非共有結合性の相互作用(例. 二本鎖DNAとのインターカレーション)などがあります。様々な条件下での蛍光物質の特性はメーカーから情報が公開されています。

もう一つの環境効果として光によるフォトブリーチングがあります。励起状態にある蛍光物質は基底状態に比べて化学的に活性化されているため、破壊されやすくなります。低頻度ではありますが、励起蛍光色素分子は化学反応を進行し、最終的に低蛍光性の構造になります。この化学反応の進行は個々の蛍光物質のフォトブリーチングに対する感受性や化学的な環境、励起光の強度、励起光の照射時間、スキャンの繰り返し数に依存します。

### 蛍光の定量化

蛍光強度は励起光の関数としても表現され、励起光の波長や強度、蛍光物質の存在量に依存します。サンプルへの励起光量を上げていくと、励起される蛍光色素が増加していきます。同時に放出される光量(光子数、あるいは基底状態まで落ちていく

電子数)が増加し、蛍光強度の上昇として観察されます。入射光量を上げすぎると、全ての蛍光物質が常時励起状態になり(飽和してしまい)、蛍光強度との相関性は失われます。光源として制御可能なレーザー光を使用するなど、入射光の波長と強度を一定にした場合、放出される蛍光(光子数)は蛍光物質の量と正比例します(図4)。蛍光物質が極めて高濃度である場合は、シグナル応答が非線形になります。蛍光色素分子間の距離が極めて接近し、表面付近だけが励起され、放出蛍光が吸収されてしまうためです。

一定量の蛍光物質から放出される光子数は、励起/放出サイクルを繰り返せば増幅できます。励起光強度と蛍光物質濃度が一定の場合は、放出光の総量は照射時間(蛍光色素に励起光を照射している期間)に比例します。励起/放出サイクルの時間よりも照射時間が長ければ、蛍光物質は励起/放出サイクルを何回も繰り返します。蛍光強度(放出光子数)の測定は、どのような受光素子でも測定可能です。低強度光を測定する場合は、増幅機構を持つ光電子増幅管(Photo multiplier tube: PMT)が有効です。PMTに十分なエネルギーを持つ光が入射すると、陰極から電子が放出され、電子は電流として増幅されます。これら受光素子の電流は、入射光の強度に比例します。蛍光強度は通常、任意単位で表示されます(例 rfu: relative fluorescence units: 相対蛍光単位)。

#### 参考文献

1. Haugland, R. P., Introduction to Fluorescence Techniques, in *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, pp.1-4 (1996)
2. Rye, H. S. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20, 2803-2812 (1992)
3. Cantor, C. R. and Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry Part 2*, W. H. Freeman, pp. 433-465 (1980).

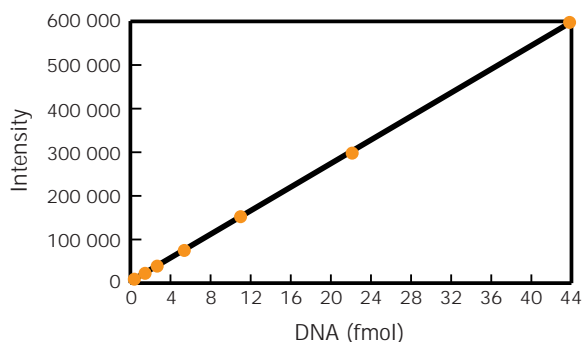


図4. 蛍光物質の直線性

5'末端をfluorescein標識した24 merのアデニン(1/2段階希釈)をポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いました。Typhoonを用い1532 nmで励起を行い、526SPの蛍光フィルターを使用してゲルイメージを検出しました。プロットは100 amol~44 fmolまでのシグナル直線性を示しています。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073  
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ: バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。