

Application News

No. A490

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

高速 3次元スペクトル測定機能を用いた DNA 検出用蛍光プローブの蛍光測定

Three Dimensional Spectrum Measurement of Fluorescent Probe Used for DNA Detection

ライフサイエンス分野では、特定の DNA を検出・識別することができる、蛍光色素で標識された DNA プローブ（以下蛍光プローブとします）が盛んに用いられています。蛍光プローブは特定の DNA と選択的に結合します。蛍光プローブを用いると特定の DNA を蛍光を使って検出することができます。蛍光色素には様々な種類があるため、どの波長に蛍光を持つかを把握することは DNA の検出を行う上でたいへん重要です。

今回、分光蛍光光度計 RF-6000 の 3 次元スペクトル測定機能を用いて、2 種類の蛍光プローブの蛍光測定を行いましたのでご紹介します。

M. Sugioka

■ 装置、測定方法と結果

Instrument, Measurement and Result

Fig. 1 に RF-6000 の外観を示します。RF-6000 は、3 次元スペクトル測定機能と自動スペクトル補正機能を有し、広い波長範囲を短時間に測定することができます。自動スペクトル補正機能は、装置特性の影響を受けない（装置関数が除かれた）補正スペクトルを自動で得ることができる機能で、正確な蛍光スペクトルや励起スペクトルを測定時に自動で得ることができます。

今回、種類の異なる蛍光色素で標識された蛍光プローブ A、蛍光プローブ B を試料として用いました。それぞれの蛍光プローブに対し、3 次元スペクトル測定を行いました。3 次元スペクトル測定は、励起波長を順次変えながら、蛍光スペクトルを測定し、マッピング画像としてデータを取得するものです。横軸が蛍光スペクトル (Em) に、縦軸が励起スペクトル (Ex) に対応します。

蛍光プローブ A の測定結果を Fig. 2 に、蛍光プローブ B の測定結果を Fig. 3 に示します。これらは補正スペクトルから成る 3 次元スペクトルです。1 サンプルの測定時間は約 3 分でした。矢印で示したように、蛍光プローブ A では主に①と②の蛍光ピークが出ており、蛍光プローブ B では主に①の蛍光ピークが出ています。

蛍光プローブ A (Fig. 2) のピーク①は 550 nm 励起の約 600 nm の蛍光を示し、ピーク②は 510 nm 励起での約 530 nm の蛍光を示しています。蛍光プローブ B (Fig. 3) のピーク①は 550 nm 励起の約 600 nm の蛍光を示します。



Fig. 1 分光蛍光光度計 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

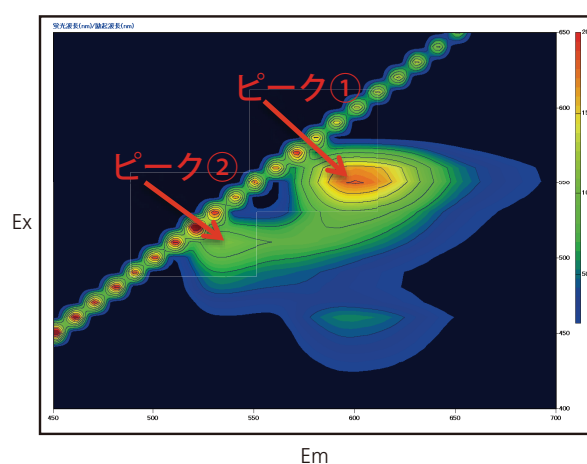


Fig. 2 蛍光プローブ A の 3 次元スペクトル
Three Dimensional Spectrum for Fluorescent Probe A

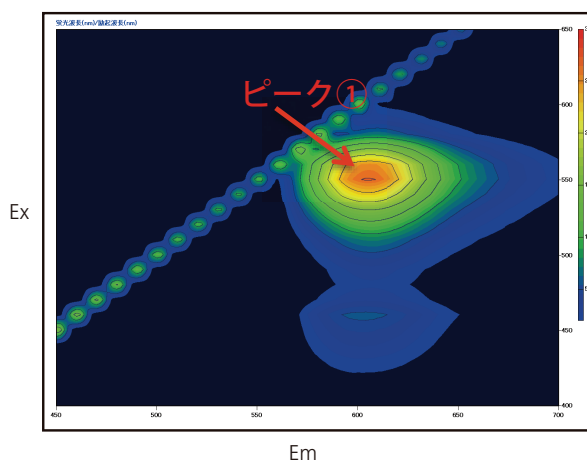


Fig. 3 蛍光プローブ B の 3 次元スペクトル
Three Dimensional Spectrum for Fluorescent Probe B

Table 1 測定条件
Analytical Conditions

使用装置	: 分光蛍光光度計 RF-6000
スペクトルの種類	: 3 次元スペクトル
測定波長範囲	: Ex 400 nm ~ 650 nm, Em 450 nm ~ 700 nm
スキャン速度	: 2000 nm/min
波長間隔	: Ex 10 nm, Em 2 nm
バンド幅	: Ex 5 nm, Em 5 nm
感度	: High

■スペクトル

Spectrum

3次元スペクトルグラフの任意の座標で蛍光スペクトルや励起スペクトルを自由に切り取ることができます。その場合、横軸方向に切り取ったものが蛍光スペクトルに、縦軸方向に切り取ったものが励起スペクトルに対応します。

蛍光プローブ A (Fig. 2) におけるピーク①とピーク②の蛍光スペクトルを取得しました。その結果を Fig. 4, Fig. 5 に示します。ピーク①の蛍光ピーク波長は 598 nm であり、ピーク②の蛍光ピーク波長は 532 nm であることがわかります。

蛍光プローブ B (Fig. 3) では、ピーク①での蛍光スペクトルと励起スペクトルを取得しました。蛍光スペクトルを Fig. 6 に、励起スペクトルを Fig. 7 に示します。蛍光ピーク波長は 604 nm、最適励起波長は 550 nm であることがわかります。

3次元スペクトルから、装置特性の影響を受けない補正スペクトルを得ることができ、正しい蛍光ピーク波長位置を特定することができました。

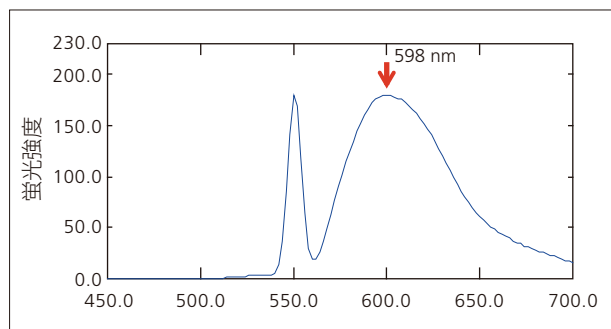


Fig. 4 蛍光プローブ A の蛍光スペクトル (550 nm 励起, Fig. 2 ピーク①)
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe A (Ex 550 nm, Fig. 2 Peak ①)

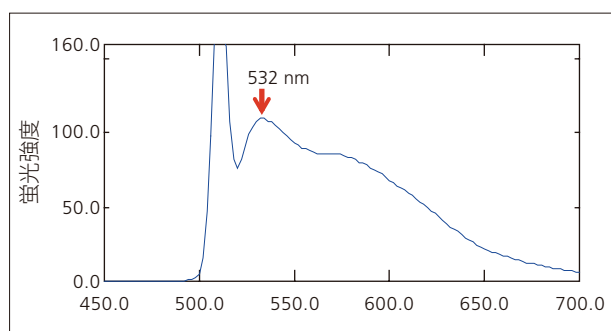


Fig. 5 蛍光プローブ A の蛍光スペクトル (510 nm 励起, Fig. 2 ピーク②)
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe A (Ex 510 nm, Fig. 2 Peak ②)

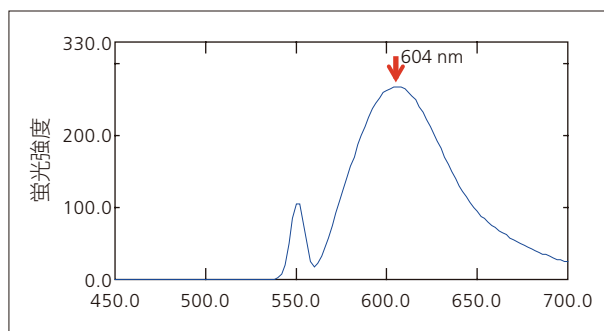


Fig. 6 蛍光プローブ B の蛍光スペクトル (550 nm 励起, Fig. 3 ピーク①)
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe B (Ex 550 nm, Fig. 3 Peak ①)

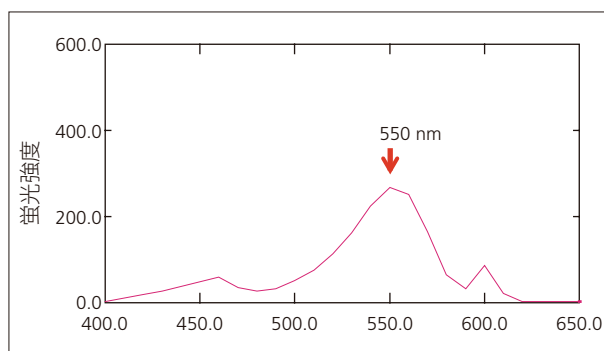


Fig. 7 蛍光プローブ B の励起スペクトル (604 nm 蛍光, Fig. 3 ピーク①)
Excitation Spectrum of Fluorescent Probe B (Em 604 nm, Fig. 3 Peak ①)

■まとめ

Conclusion

今回、蛍光プローブの3次元スペクトル測定を行い、補正スペクトルを自動で求めることができました。補正スペクトルを従来装置で求める場合、マニュアルでのデータ処理が必要でしたが、RF-6000 ではその手間が不要となります。RF-6000 を用いることで、正確かつ効率的な蛍光測定が可能となります。