

蛍光色素修飾ペプチド テクニカルインフォメーション

| <i>Contents</i> | <i>ページ</i> |
|-------------------------|------------|
| 1. 蛍光色素の特性値 | 1 |
| 2. pH 変動による吸収スペクトルの変動 | 1 |
| 3. 有機溶媒濃度と吸収強度の関係 | 2 |
| 4. pH・トリプトファンによる蛍光強度の変化 | 2 |
| 5. 蛍光色素の FCS カーブ | 3 |
| 6. 定量性の検証 | 3 |

1. 蛍光色素の特性値

蛍光色素の特性値は、以下のパラメータで示されます。

- Excitation Maximum (最大励起波長)
励起光源の波長に近いほど、効率的な励起が可能となります。
- Emission Maximum (最大蛍光波長)
検出側の干渉フィルター選択基準となります
- Extinction Coefficient (分子吸光係数)
大きいほど高い蛍光強度が得られます。
- Quantum Yield (量子収量)
励起光を蛍光に変換する効率を示し、1.0 のとき、100%の効率を意味します。
- Half Life (蛍光半減期)
蛍光色素分子の励起状態の半減期を示します。大きいほど、長時間蛍光を発します。

| | Fluorescein | Rhodamine Green | Atto488 | Tetramethyl rhodamine | Atto550 | Cy3 | Atto655 | Cy5 |
|---|-------------|-----------------|---------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|
| Excitation Maximum (nm) | 490 | 504 | 501 | 540 | 555 | 550 | 664 | 649 |
| Emission Maximum (nm) | 514 | 532 | 523 | 565 | 576 | 570 | 684 | 670 |
| Extinction Coefficient (M ⁻¹ ·cm ⁻¹) | 87,000 | 78,000 | 105,000 | 95,000 | 120,000 | 150,000 | 125,000 | 250,000 |
| Quantum Yield | 0.93 | 未公開 | 0.82 | 0.20 | 0.80 | 0.04 | 0.30 | 0.28 |
| Half Life (nsec.) | 4.5 | 未公開 | 3.2 | 未公開 | 3.2 | ~0.3 | 1.9 | 1.0 |

(表に示した値は、測定条件により変動する可能性があります)

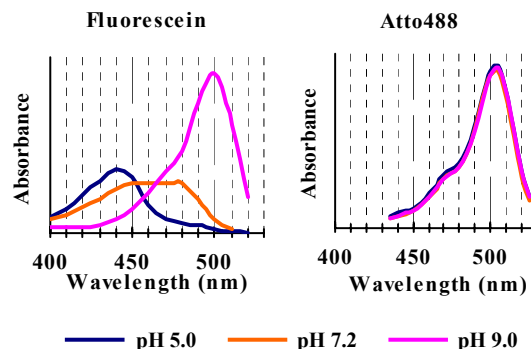
2. pH 変動による吸収スペクトルの変動

Fluorescein と Atto488 について、酸・アルカリ条件下での吸収スペクトル変動を示しました。

Fluorescein(左図)は中性以下の pH で吸収強度が低下するばかりでなく、最大吸収波長も変化しました。これは pH 変動による荷電状態の変化に起因しています。

これとは対照的に、Atto488(右図)では pH が変動しても、ほぼ同じ吸収スペクトルを示しています。「1. 蛍光色素の特性値」で示した Fluorescein 以外の蛍光色素は、いずれも同様の傾向を確認しています。

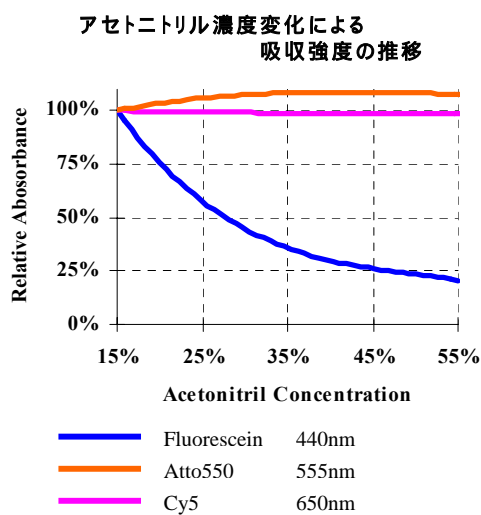
環境要因は量子収量にも影響を与え、蛍光強度が変化します。従って、吸収スペクトルが変動しなかったとしても、蛍光強度に変化が見られないとは限りません。しかし、Atto488 は明らかに Fluorescein よりも pH に対して安定であると言えます。



3. 有機溶媒濃度と吸収強度の関係

Fluorescein・Atto550・Cy5 について、酸性条件下でアセトニトリル濃度変化が最大吸収波長の吸光度に及ぼす影響を検証しました。データはアセトニトリル濃度 15%のときの吸光度を 100%とした相対値で示しています。

Fluorescein では、アセトニトリル濃度の上昇により、著しい吸光度低下が見られました。ペプチドの HPLC 分析において、0.1%TFA-アセトニトリル濃度勾配による分離は一般的であり、弊社でもこの条件にて純度検定・純度保証を行っています。



グラフの結果から、Fluorescein 修飾ペプチドの 440nm 可視検出 HPLC では、保持時間が長い（溶出時のアセトニトリル濃度が高い）ピークほど実際の組成比（全 Fluorescein 分子に対する存在比）よりも小さいピークとして検出されるため、ピーク面積比は純度を反映しません。このことから、弊社では Fluorescein については 2 波長純度検定はサービス対象外とさせていただいております。

これに対して、Cy5・Atto550 では、アセトニトリル濃度に関わらず、ほぼ一定の吸光度が得られています。これらの蛍光色素の場合は、可視検出 HPLC の純度検定に信憑性があると評価できます。

4. pH・トリプトファンによる蛍光強度の変化

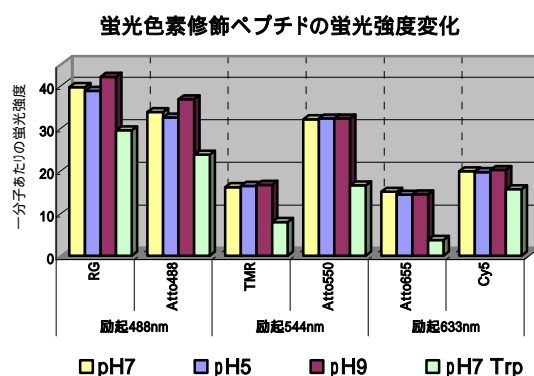
蛍光色素標識ペプチドの一分子あたりの蛍光強度について、FCS（オリンパス社製MF20 レーザーパワー 100uW）を用いて検証しました。

グラフは各蛍光色素にて修飾したペプチド（BSA591-600AA：AVEGPKLVV）を pH の異なる三種類のバッファーに溶解した場合（グラフ pH7・5・9）と、pH7 でペプチドの色素最近傍にトリプトファンを導入した場合（グラフ pH7 Trp）の測定値を示しています。

いずれの色素でも、pH に対して安定な蛍光強度を示しました。

各励起波長における色素間の蛍光強度比較では、Rhodamine Green (RG) と Atto488 は同程度、Atto550 は Tetramethylrhodamine (TMR) の 2 倍程度の値を示しました。また、Atto655 は Cy5 より若干低い蛍光強度を示し、これは励起光源の波長（633nm）と蛍光色素の最大励起波長の差に起因します（Atto655：664nm / Cy5：649nm 「1. 蛍光色素の特性値」参照）。

Trp により、Atto655 の蛍光強度に顕著な低下が見られ、TMR・Atto550 では 50% 程度、RG・Atto488・Cy5 では 25% 程度の蛍光強度低下が見られました。Atto655 の Trp による蛍光強度低下については、*Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 1133-1139 にて詳細に述べられており、Fluorescein は Trp により蛍光強度が 75% 低下すると述べられています。



5. 蛍光色素のFCSカーブ

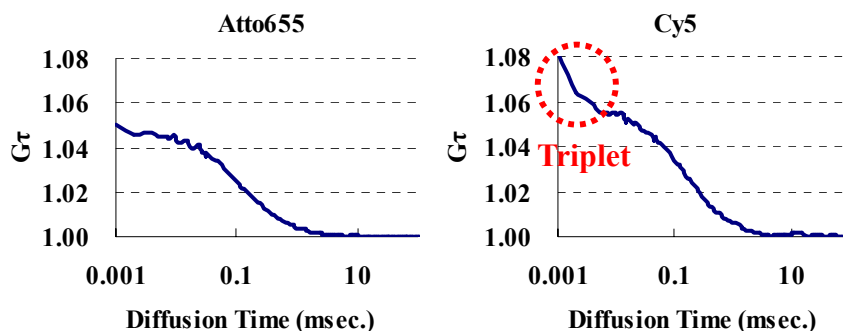
Atto655 とCy5 フリー蛍光色素のFCSカーブ（一成分分析）を示しました。

それぞれのフリー蛍光色素について、0.02%Tween-PBS溶液を調整し、「4. pH・トリプトファンによる蛍光強度の変化」と同様の条件にて測定を行いました。

グラフY軸は分子の数（蛍光強度）を反映し、X軸は分子の大きさ（移動の速さ）を示します。

Cy5 では、Y軸切片付近（破線で囲んだ部分）に不自然な立ち上がりが見られます。これは、Triplet（三重項励起状態）による影響です。Tripletは分子構造に起因し、シアニン骨格を持つ蛍光色素では、Tripletが大きく影響することが知られています。

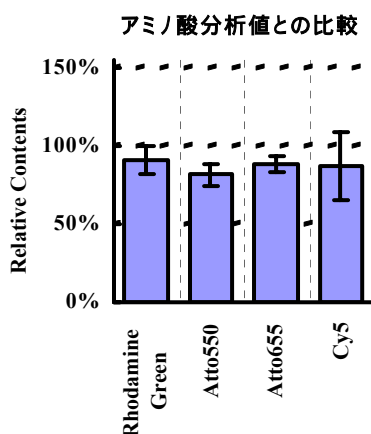
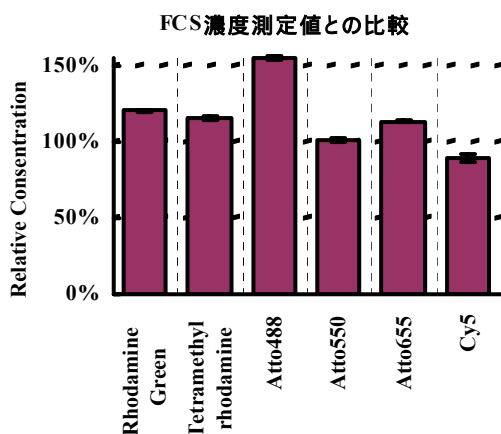
FCS測定では、Atto655の方がCy Dyeよりも高精度な測定が可能であると判断できます。



6. 定量性の検証

弊社でのnmolオーダー定量法の信憑性を評価しました。

ペプチド（BSA591-600AA: AVEGPKLVV）を各蛍光色素修飾し、弊社定量値をもとにした理論値を100%としたときのFCS濃度測定値（左図）およびアミノ酸分析定量値（右図）を示しました。



FCS測定は、0.02%Tween20-PBS溶液を調整し、「4. pH・トリプトファンによる蛍光強度の変化」と同様の条件にて測定を行いました。アミノ酸分析はニンヒドリン法にて検出しました。

いずれの測定方法でも弊社定量値との再現性が認められ、高い信憑性が確保されていることが確認できました。

北海道大学 電子科学研究所 超分子分光研究分野 金城政孝助教授
研究成果活用プラザ北海道 生体一分子計測研究室 研究員 坂田啓司様
のご協力により掲載しております。