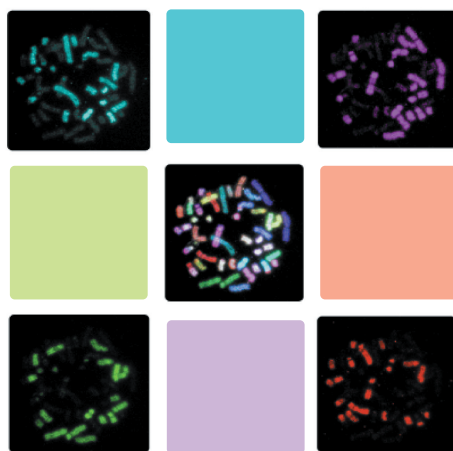


# 実験がうまくいく 蛍光・ 発光試薬の 選び方と使い方



序 ..... 三輪佳宏 3

## 第I部 基本編

### ① 蛍光の基本 ..... 浦野泰照 12

- はじめに ..... 12
- 蛍光のメカニズム ..... 12
- 分子の吸収波長を決める要因 ..... 13
  - 1. HOMO—LUMOギャップと $\pi$ 電子
  - 2. さまざまな分子構造と吸収波長
- 長波長励起が求められる3つの理由 ..... 14
- 蛍光の明るさと波長の関係 ..... 15
- 蛍光を発する分子と発しない分子の違い ..... 15

### ② 有機系蛍光色素の基本 ..... 浦野泰照 18

- 蛍光色素の明るさ ..... 18
- 励起・蛍光波長の分離 ..... 19
- 蛍光色素の光褪色耐性 ..... 19
- 蛍光色素の脂溶性・水溶性，細胞膜透過性，細胞内局在性 ..... 19
- 蛍光特性の環境依存性 ..... 20
  - 1. pH依存性
  - 2. 脂溶性・水溶性環境の影響

### ③ 蛍光タンパク質の基本 ..... 三輪佳宏 22

- 蛍光タンパク質の基本的「き」 ..... 22
- 蛍光タンパク質を選ぶときのポイント ..... 22
  - 1. 波長特性
  - 2. 光応答性
  - 3. タンパク質としての特性
  - 4. 細胞内局在
  - 5. 産業応用

### ④ 発光プローブの基本 ..... 呉 純，近江谷克裕 29

- はじめに ..... 29
- 蛍光と発光の違い ..... 29
- 生物発光プローブの基本 ..... 30
  - 1. ホタルなど発光昆虫の発光の特徴
  - 2. イクリオンやウミシイタケの発光の特徴
  - 3. ウミホタルやコベポーダの発光の特徴
- 化学発光プローブの基本 ..... 32
- 光測定法および発光イメージング法の基本 ..... 32
  - 1. PMT，CCDによる発光測定
  - 2. 蛍光分光光度計による発光スペクトル分析
  - 3. 発光イメージング用の主な装置

■ おわりに	33
<b>⑤ 検出の基本</b>	三輪佳宏 34
■ はじめに	34
■ 検出の基本の「き」	34
1. PMTのしくみ 2. CCDのしくみ	
■ 検出装置について	36
1. 顕微鏡 2. フローサイトメーター 3. 蛍光・発光プレートリーダー	
4. 新しい測定装置	
■ 注目の測定法	38
1. スペクトル撮影 2. 蛍光偏光 3. 蛍光寿命	
■ おわりに	40

## 第Ⅱ部 実践編

### 1章 核酸・タンパク質検出のためのプローブ

<b>① 核酸定量—電気泳動とdifferential displayによる検出</b>	栗田ひろ子 42
■ はじめに	42
■ differential displayの概要	42
■ 核酸の電気泳動	42
■ differential display	43
■ 実験例：ゲルによる分離能の違い	48
■ おわりに	48

**試薬** EtBr（エチジウムブロマイド） / SYBR® Gold / SYBR® Green I / SYBR® Green II

<b>② FISH法</b>	田辺秀之 50
■ はじめに	50
■ 染色体研究の歴史	50
1. FISH法の登場以前の研究 2. FISH法の登場	
■ FISH法の応用とその特徴	51
1. マルチカラーFISH法 2. M-FISH法とSKY法 3. mBAND-FISH	
(multicolor banding-FISH) 法 4. CGH法とarray-CGH法 5. 3D-FISH法	
■ よく使われるFISH用プローブ	55
■ おわりに	55

**試薬** 24XCyte（M-FISH用カクテルプローブ）

<b>③ リアルタイムPCR</b>	田中順子 56
■ はじめに	56
■ インターカレーター法	56
■ プローブ法	57
■ その他の蛍光色素	57
1. マルチカラー解析 2. リファレンス色素 3. 新たなプローブ	
■ おわりに	59

<b>④ マイクロアレイ</b>	田中順子 60
■ はじめに	60
■ DNAマイクロアレイ	60
1. 直接標識法 2. 間接標識法 3. 蛍光色素の選び方	

■ おわりに	64
--------	----

**試薬** Alexa Fluor® 色素シリーズ

## ⑤ タンパク質検出法 栗原靖之 65

■ はじめに	65
■ ゲル染色	65
1. ゲル染色色素の特性と有用性 2. 実験に応じた蛍光試薬の選択基準	
■ ウェスタンブロッティング法	68
1. 見落としがちな抗体の特性 2. 抗体を用意する 3. 検出法の概要	
4. 実験に応じた蛍光試薬の選択基準	
■ おわりに	70

**試薬** SYPRO® Ruby / Lumitein™

## 2章 細胞染色のためのプローブ

### ① 細胞核構造を染め分ける蛍光プローブ 岩本政明, 原口徳子 71

■ はじめに	71
■ 染色体観察のための低分子蛍光色素	71
1. 固定細胞 2. 生細胞	
■ 核マーカーとしてのGFP融合タンパク質	73
1. 染色体 2. 核膜と核膜孔複合体 3. 核小体 4. 核スペckルと核内ボディ	
■ おわりに	76

### ② ミトコンドリア 石川 香, 林 純一, 設楽浩志 77

■ はじめに	77
■ ミトコンドリアの形態観察・機能解析に用いられる試薬	77
1. 生細胞のミトコンドリアを観察する 2. ATPを測定する 3. ROSを測定する	
■ おわりに	84

**試薬** MitoTracker Green FM/ pDsRed2-Mito/ DCF-DA, DHE

### ③ 細胞骨格—固定材料の染色からライブイメージングまで 渡邊俊之, 米村重信 85

■ はじめに	85
■ 固定材料の細胞骨格の染色	85
1. アクチンフィラメントの観察 2. 微小管の観察 3. 中間径フィラメントの観察	
■ ライブイメージング	86
1. 観察時の注意 2. 観察に使われる蛍光タンパク質	
■ 実験のすすめ方	86
1. 使う細胞を選択するポイント 2. 観察に必要な装置 3. 細胞の固定法	
■ 実験例	88
1. 固定サンプル 2. ライブイメージング	
■ おわりに	89

**試薬** Alexa Fluor®標識ファロイジン

### ④ 小胞輸送ネットワーク内のオルガネラ・膜小胞

日原さえら, 加納ふみ, 村田昌之 90

■ はじめに	90
■ 小胞体・ゴルジ体	90

1. 蛍光試薬を利用した小胞体ネットワーク・ゴルジ体の観察	
2. GFPを利用した小胞体ネットワーク・ゴルジ体の観察	
■ 小胞体—ゴルジ体—形質膜の輸送小胞	93
■ エンドソーム・形質膜	94
■ おわりに	94

**試薬** BODIPY® FL C<sub>5</sub>-ceramide / ER-Tracker Blue-White DPX

## ⑤ 蛍光ニューロントレーサー 田中靖史, 寺島俊雄 95

■ はじめに	95
■ 順行性トレーサーと逆行性トレーサー	95
■ 胎仔や幼若動物の神経回路の標識：カルボシアニン蛍光色素	96
1. カルボシアニン蛍光色素の種類 2. カルボシアニン蛍光色素の長所と短所 3. Dilの特徴	
4. <i>postmortem</i> labeling法 5. フォトコンバージョン法	
■ 鋭敏な逆行性蛍光トレーサー：Fluoro-GoldとFast Blue	100
1. Fluoro-Gold 2. Fast Blue 補足：Diamidino Yellow Dihydrochloride	
■ 成体の神経回路標識に用いる鋭敏な順行性・逆行性トレーサー：デキストラン	106

**試薬** カルボシアニン蛍光色素 / Fluoro-Gold / Fast Blue  
Diamidino Yellow Dihydrochloride (DY) / 蛍光デキストラン試薬一覧

## 3章 *in vivo*イメージングのためのプローブ

### ① 酵母の*in vivo*イメージングプローブ 林 亜紀, 平岡 泰 109

■ はじめに	109
■ 生細胞の蛍光染色	109
1. 低分子蛍光色素 2. 蛍光タンパク質 3. 生細胞蛍光染色の具体例	
■ 蛍光融合タンパク質の構築	110
1. 蛍光融合タンパク質の発現 2. 蛍光融合タンパク質ライブラリー	
■ おわりに	113

### ② 線虫*C. elegans* 小西隆文, 杉本亜砂子 114

■ はじめに	114
■ 蛍光タンパク質の活用法	114
1. 実験目的に応じた蛍光タンパク質の選択 2. 発現コンストラクトの構築	
3. 形質転換株の作製	
■ 蛍光化合物の活用法	116
1. 生細胞核酸染色試薬 2. ニューロントレーシング用試薬 3. 細胞膜トレーシング用試薬	
■ 実験例	118
■ おわりに	118

### ③ ショウジョウバエ GAL4エンハンサートラップ法を用いた*in vivo*イメージング 上川内あづさ, 伊藤 啓 119

■ はじめに	119
■ 細胞の形態解析のための蛍光レポーター	119
■ 神経細胞の機能解析のための蛍光レポーター遺伝子	121
1. 蛍光強度による活動変化の検出：UAS-GCaMP	
2. FRETによる活動変化の計測 ①：UAS-Cameleon 2.1	
3. FRETによる活動変化の計測 ②：UAS-TN-XL 4. pH変化の計測：UAS-SpH	
■ 実験に際し留意すべきこと	122
■ おわりに	124

#### ④ ゼブラフィッシュの蛍光イメージング — 木村有希子, 佐藤千恵, 東島眞一 125

■ はじめに	125
■ プロブの概要	125
1. DNA系プロブ 2. 化学系プロブ	
■ DNA系プロブを用いた実験	126
1. DNA系プロブを発現させる 2. 蛍光タンパク質を選択する	
■ 化学系プロブを用いた実験	128
■ 蛍光タンパク質のアプリケーション実例	130

#### ⑤ マウスの*in vivo*イメージング — 三輪佳宏 131

■ はじめに	131
■ マウスの <i>in vivo</i> イメージングの概要	131
■ 蛍光・発光試薬の選び方	132
1. 蛍光タンパク質 2. 低分子の蛍光物質や発光基質	
■ 装置（検出法）の問題	133
■ マウスでの蛍光 <i>in vivo</i> イメージングの実際	134

試薬 Angiosense, Osteosense, prosense

## 4章 細胞・酵素活性測定のためのプロブ

### ① ルシフェラーゼプロブによる細胞機能の解析

中島芳浩, 野口貴子, 近江谷克裕 136

■ はじめに	136
■ ルシフェラーゼプロブの特徴と測定法	136
■ 実験例	139
1. リアルタイム測定 2. 1細胞イメージング	
■ おわりに	142

試薬 ホタルルシフェリン (D-ルシフェリン) / セレンテラジン (レニラルシフェリン)  
ウミホタルルシフェリン

### ② アポトーシスの検出—生きた細胞・個体におけるカスパーゼ活性のライブ検出

竹本 研, 永井健治, 宮脇敦史, 三浦正幸 143

■ はじめに	143
■ アポトーシスに伴う形態的变化を検出する手法	143
1. 核・染色体DNAの断片化検出 2. ホスファチジルセリンの検出	
■ FRETを利用した観察	144
1. cDNAにコードされたカスパーゼ指示薬 2. YFPを用いる際の注意点	
■ SCAT3を用いた生きた細胞におけるカスパーゼ活性化の ライブイメージングの実験例	145
■ おわりに	146

### ③ 細胞周期の解析 — 三輪佳宏 148

■ はじめに	148
■ 固定した細胞での観察	148
■ 固定していない細胞での観察	149
1. 生細胞での観察 2. 死細胞の判定 3. 蛍光タンパク質との併用	

試薬 Propidium Iodide / 7-amino actinomycin D

## ④ $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の検出 ————— 神谷真子, 浦野泰照 153

■ はじめに .....	153
■ $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出試薬の種類と特性 .....	153
1. 緑色蛍光を発する試薬   2. 青色蛍光を発する試薬   3. 赤色蛍光を発する試薬 .....	
■ おわりに .....	157

## ⑤ FRETプローブ—蛍光分子の組み合わせ選択から分子間距離の計算法まで

永井健治, 小寺一平 158

■ はじめに .....	158
■ FRETペアの選択基準 .....	158
■ 計算の方法 .....	159
■ 実験例—テロメア配列の構造変化観察 .....	161
■ おわりに .....	161

# 第Ⅲ部 新しい蛍光試薬

## ① Quantum Dot —量子ドット ——— 赤松謙祐, 鶴岡孝章, 縄舟秀美, 杉本直己 164

■ はじめに：量子ドットとは .....	164
■ 量子ドットの特長 .....	164
1. 電子構造と発光のしくみ   2. 安定性の高さ   3. 単一励起光による多色発光 .....	
■ 量子ドットの合成 .....	166
1. 量子ドットの構造   2. 実験室での合成方法 .....	
■ 量子ドットの表面修飾 .....	168
1. ナノ粒子の水溶化の方法例   2. 実験目的に応じた修飾 .....	
3. アミド結合形成反応を利用した修飾方法例 .....	
■ 量子ドットを利用した細胞のイメージ化の実験例 .....	169
■ おわりに .....	170

試薬 EviTags, Qdot®など

## ② Lumioタグ, HaLoタグ ————— 三輪佳宏 171

■ はじめに .....	171
■ 原理 .....	171
1. Lumioタグ   2. HaLoタグ .....	
■ 共有結合性タグの必要性 .....	171
1. 時間分解解析への応用   2. 生化学的解析への応用 .....	
■ 将来的な応用の可能性 .....	173
■ 実際の使用上の注意点 .....	174
1. Lumioタグ   2. HaLoタグ .....	
■ ラベリング反応の効率 .....	174
■ タンパク質としての性質 .....	175

付録：代表的な蛍光試薬のスペクトル一覧 .....

試薬名索引 .....

索引 .....

広告特集 .....

後付1~21

●資料請求はがき .....

巻末

# 執筆者一覧

## 編集

三輪佳宏 (Yoshihiro Miwa)

筑波大学大学院人間総合科学研究科

## 執筆者(五十音順)

赤松謙祐 (Kensuke Akamatsu)

甲南大学理工学部機能分子化学科／先端生命工学研究所 (FIBER)

粟田ひろ子 (Hiroko Awata)

総合研究大学院大学 葉山高等研究センター

石川 香 (Kaori Ishikawa)

筑波大学大学院生命環境科学研究科

伊藤 啓 (Kei Ito)

東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野

岩本政明 (Masaaki Iwamoto)

情報通信研究機構 未来ICT研究センター

呉 純 (Chun Wu)

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

浦野泰照 (Yasuteru Urano)

東京大学大学院薬学系研究科

近江谷克裕 (Yoshihiro Ohmiya)

北海道大学大学院医学研究科／

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

加納ふみ (Fumi Kano)

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻生命環境科学系

上川内あづさ (Azusa Kamikouchi)

ケルン大学動物学研究所 フォルクスワーゲン財団研究室

神谷真子 (Mako Kamiya)

東京大学大学院薬学系研究科

木村有希子 (Yukiko Kimura)

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

栗原靖之 (Yasuyuki Kurihara)

横浜国立大学大学院環境情報研究院 自然環境と情報研究部門

小寺一平 (Ippei Kotera)

北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学研究分野

小西隆文 (Takafumi Konishi)

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 発生ゲノミクス研究チーム

佐藤千恵 (Chie Sato)

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター／

生理学研究所／総合研究大学院大学

設楽浩志 (Hiroshi Shitara)

東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 疾患モデル開発センター

杉本亜砂子 (Asako Sugimoto)

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 発生ゲノミクス研究チーム

杉本直己 (Naoki Sugimoto)

甲南大学理工学部機能分子化学科／先端生命工学研究所 (FIBER)

竹本 研 (Kiwamu Takemoto)

北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学研究分野

田中順子 (Junko Tanaka)

筑波大学大学院人間総合科学研究科

田中靖史 (Yasufumi Tanaka)

神戸大学大学院医学系研究科 神経発生学分野

田辺秀之 (Hideyuki Tanabe)

総合研究大学院大学先端科学研究科 生命共生体進化化学専攻

谷 知己 (Tomoki Tani)

北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学研究分野

鶴岡孝章 (Takaaki Tsuruoka)

甲南大学大学院自然科学研究科

寺島俊雄 (Toshio Terashima)

神戸大学大学院医学系研究科 神経発生学分野

永井健治 (Takeharu Nagai)

北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学研究分野

中島芳浩 (Yoshihiro Nakajima)

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

縄舟秀美 (Hidemi Nawafune)

甲南大学理工学部機能分子化学科／先端生命工学研究所 (FIBER)

野口貴子 (Takako Noguchi)

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

林 亜紀 (Aki Hayashi)

情報通信研究機構 未来ICT研究センター

林 純一 (Jun-ichi Hayashi)

筑波大学大学院生命環境科学研究科

原口徳子 (Tokuko Haraguchi)

情報通信研究機構 未来ICT研究センター

東島眞一 (Shin-ichi Higashijima)

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター／

生理学研究所／総合研究大学院大学

日原さえら (Saera Hihara)

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻生命環境科学系

平岡 泰 (Yasushi Hiraoka)

情報通信研究機構 未来ICT研究センター

三浦正幸 (Masayuki Miura)

東京大学大学院薬学系研究科

宮脇敦史 (Atsushi Miyawaki)

理化学研究所 脳科学総合研究センター

三輪佳宏 (Yoshihiro Miwa)

筑波大学大学院人間総合科学研究科

村田昌之 (Masayuki Murata)

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻生命環境科学系

米村重信 (Shigenobu Yonemura)

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 細胞形態形成研究チーム

渡邊俊之 (Toshiyuki Watanabe)

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 細胞形態形成研究チーム／

神戸大学大学院自然科学研究科 生命機構科学専攻