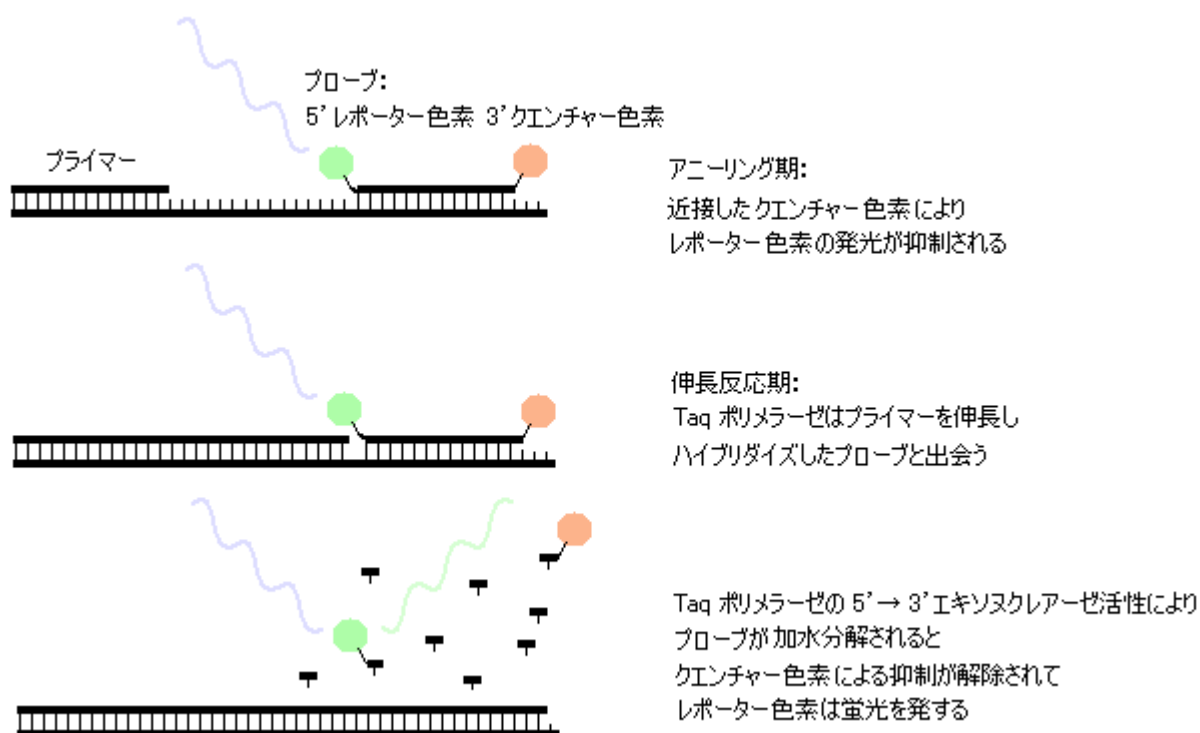


クエンチャーによる消光の原理

クエンチャーによる消光を利用したプローブにおいて一般的に利用されているものの中に、加水分解プローブとステム・ループ構造プローブがあります。本項ではこの二つを例に挙げてクエンチャーによる消光原理を説明します。

■ 加水分解プローブ

ハイブリダイズして二本鎖構造を形成している間、蛍光物質はクエンチングされており、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によってプローブが分解されると消光効果(クエンチング効果)が解消し、蛍光を発します。



■ ステム・ループ構造プローブ

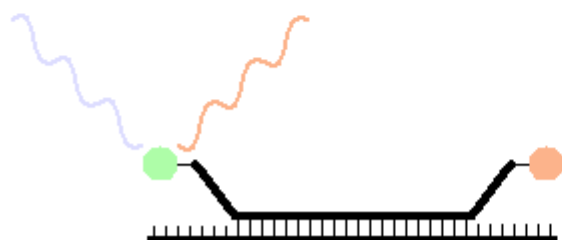
自己ヘアピン構造を有するタイプで、ターゲットにハイブリダイズする際に、ヘアピン構造から引き伸ばされるとクエンチング効果が解け、蛍光を発するようになり

ます。よく用いられる蛍光物質はフルオレセイン(6-FAM)、クエンチャーはDABCYLです。



ステム・ループ構造プローブ: 5'レポーター色素 3'クエンチャー色素

ループ構造:
標的とハイブリダイズする配列を含む
ステム構造:
両ステム部分が結合しているときには
クエンチャー色素によりレポーター色素の発光が抑制される



標的とハイブリダイズすることによりステム部分が開き
クエンチャー色素による抑制が解除されて
レポーター色素は蛍光を発する

加水分解プローブとステム・ループ構造プローブではクエンチング効果に違いがあります。どちらの場合もプローブの長さは 20~40mer であり、この違いは鎖長の違いによるものではありません。

ここで、基本原理に触れますと、加水分解プローブの消光作用は双極子-双極子機構を原理とした『FRET quenching』と呼ばれ、一方のステム・ループ構造プローブの消光作用は電子交換機構を原理とした『Collisional quenching』と呼ばれており、これら二つのプローブは異なる機構で消光が起こっています。

つまり、加水分解プローブの『FRET quenching』は、蛍光物質とクエンチャーが 40base 程度離れていても起こりますが、ステム・ループ構造プローブの『Collisional quenching』は極近接していないと起こりません。『FRET quenching』では分子同士の接触は必要なく、有効距離は 1~10nm で、『Collisional quenching』では有効距離は 0.3~1nm で、これは蛍光物質とクエンチャーの電子軌道の重なりを生じる接触有効距離となっています。