

バイオ計測学特論03

2021年度 第4Q

佐藤しのぶ

本日のトピック

- 生体分子の取り扱いについて
- 分子分光分析について

生体サンプルの取り扱い

タンパク質、RNA・・・細胞質
DNA・・・核

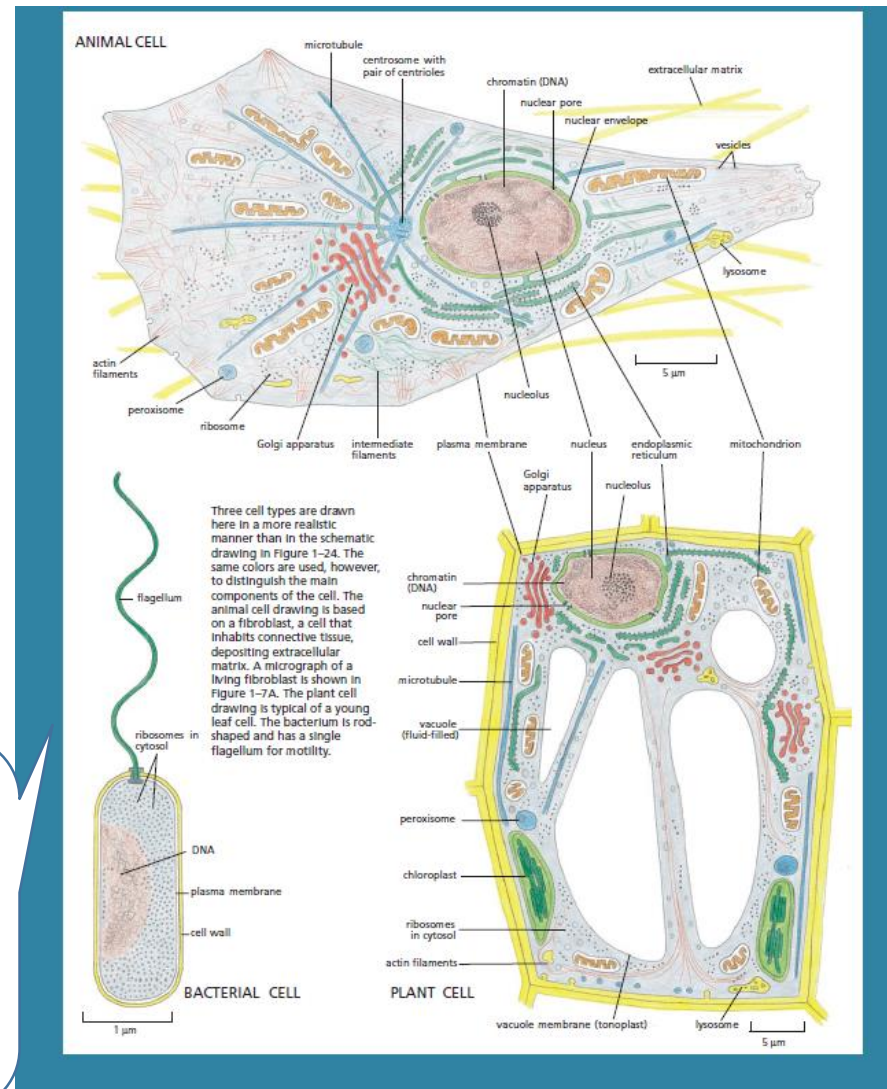
細胞膜が覆っている

細胞の中から、タンパク質や、RNA、DNAなど目的とする生体分子を取り出す必要がある

!注意!

RNAやRNA蛋白質は、細胞内に入っている間は安定です。

細胞から取り出すと、大気中に存在するRNaseなどによるコンタミの影響により分解されやすくなるので、注意が必要です。



生体サンプル取り扱い上の注意

<蛋白質>

高次構造が大事なので、高次構造を壊さないようにする。

凍結・融解はタンパク質の構造を壊します。

→蛋白質は不凍液(エチレングリコールなど)に溶解して、
-80℃で保管する。

激しい攪拌(ボルテックス)はNGです。

激しいピペッティングもNG。

熱にも弱いので、加熱しない。

タンパク質が入ったチューブを手でぎゅっと握るのもダメなものもあります。

生体サンプル取り扱い上の注意

<DNA>

比較的安定な生体サンプル。

DNA分解酵素には注意する。

DNaseのうち、DNase IIは、2価の金属イオン(MgやCa)がトリガーとなって、DNAを分解するので、大切なサンプルには、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を混ぜる。

一般的に、Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA)に溶解することが多い。

種々の高次構造をとるので、アニーリングが必要な場合もある。

生体サンプル取り扱い上の注意

<RNA・RNAタンパク>

かなり不安定な生体サンプル。

RNA分解酵素には注意する。

RNase Aは、唾液や汗に存在し、大気中にも存在する。非常に安定で、200°Cで2時間加熱しないと死なない。

-80°Cでも死なないので、コンタミに注意する。

RNA実験では、RNase Inhibitor (タンパク質やグアニジンチオシアナート)を実験に使用する水に入れておく。

実験はすべてクリーンベンチで行う。

生体分子の処理方法

1) タンパク質の抽出方法

ハードな抽出法

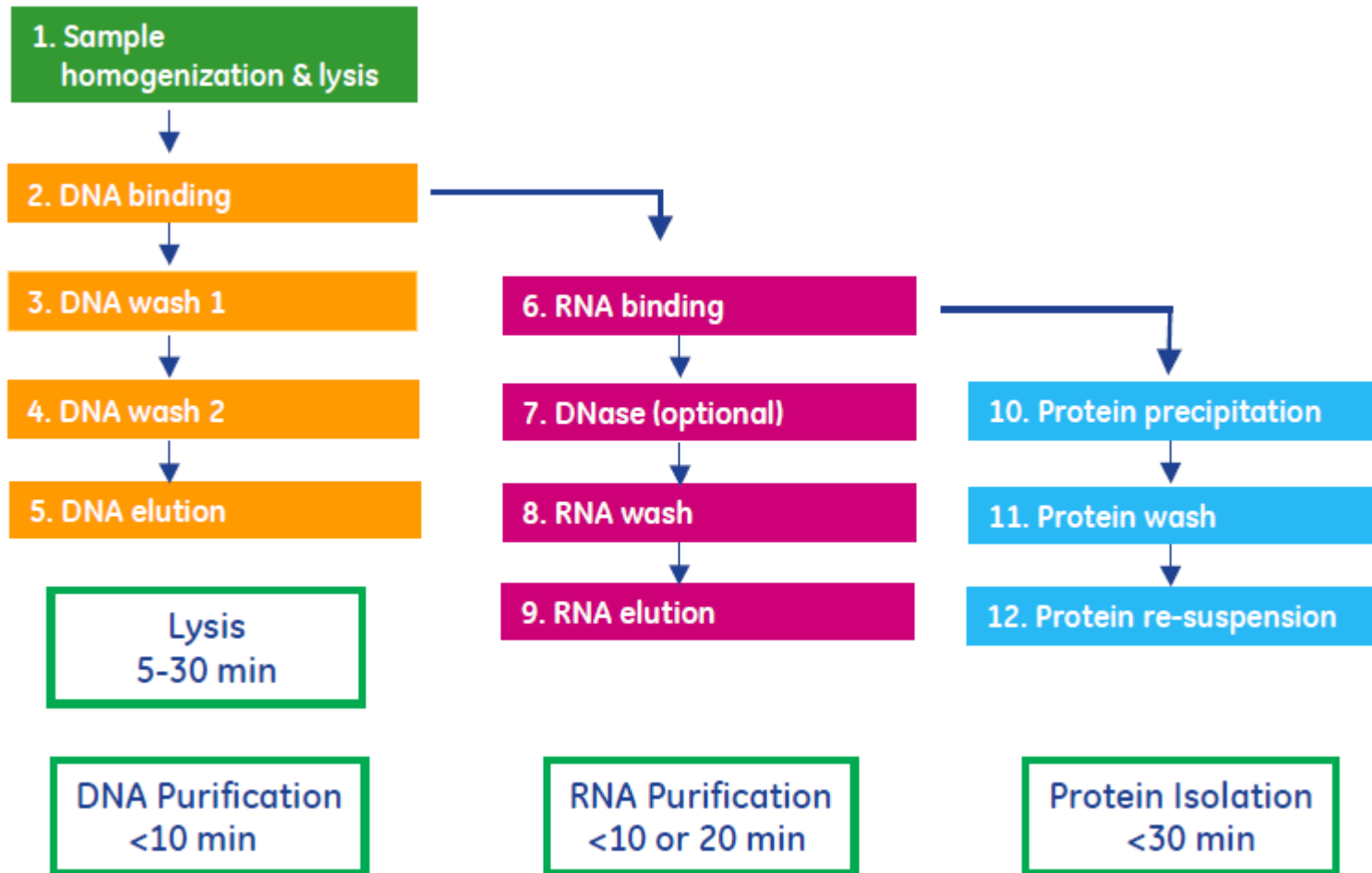
- ✓ 超音波処理
- ✓ 乳鉢による凍結細胞の粉砕
- ✓ ホモジナイザーによる粉砕
- ✓ ガラスビーズによる粉砕

マイルドな抽出法

- ✓ 界面活性剤(CHAPS)の使用
- ✓ 凍結融解法(液体窒素で凍結後、融解x2回)

生体分子の精製については、キットがたくさん販売されています。

GEヘルスケア illustra triplePrep Kit



仔牛胸腺DNAの超音波切断、及び精製

- ① 緩衝液(3.8mM NaH₂PO₄, 0.5nM EDTA・2Na, pH7.0)を、100ml用意した。
- ② メタノール消毒したピンセット2本とアルミ箔1枚を用いて、ctDNAをできる限り細かく刻みながら300 mg計りとった。
- ③ メタノール消毒した200 mlビーカーに、1)で調整した緩衝液を100 ml、2)のctDNA、メタノール消毒したスターラーバーを入れ、パラフィルムでふたをして一晩攪拌した。
- ④ ctDNAが溶解したら、最終濃度が2Mになるように、塩化ナトリウムを加えた。
- ⑤ 照射時間が合計1時間になるように、超音波で処理した(OUT PUT:10、DUTY:CONT、ON:1分、OFF:4分)。このとき、ビーカー中の温度が4～8℃になるように氷食塩バスにつけておいた。
- ⑥ 30cmの透析チューブを5mM EDTA中で煮沸滅菌し、蒸留水で洗浄した。
- ⑦ 超音波処理したDNA溶液を、⑥で処理した透析チューブにいれ24時間透析した。

仔牛胸腺DNAの超音波切断、及び精製

- ⑧ トリス飽和フェノールを調整した。まず、1M トリス塩酸緩衝液(pH8.0)を200ml用意した。次に、フェノール100gに8-ヒドロキシキノリンを0.1g加え、溶解させた。これに、トリス塩酸緩衝液100mlを加え、30分攪拌し、一晩冷蔵庫に保存した。上層(水層)をできるだけ取り除き、トリス塩酸緩衝液100mlをもう1度加えて、30分間攪拌し、もう一晩冷蔵庫に保存した。
- ⑨ ⑦で、調整したDNA溶液と、⑧で用意したトリス飽和フェノール(フェノール層のみ)を等量混合し、10分攪拌後、20分遠心(10000rpm)した。水層とフェノール層が分かれたので、水層を分取した。
- ⑩ 同じ操作をもう一度繰り返し、水層を分取した。
- ⑪ 5M塩化ナトリウムを1/15当量、エタノールを2.5当量加えた。
- ⑫ ⑪をよくふり、冷凍庫で一晩保存した。
- ⑬ スピッツ管に分注し、4°Cで20分遠心(10000rpm)後、エタノールを取り除いた。
- ⑭ 70%エタノールで軽く洗浄後、⑬の操作を行った。
- ⑮ 減圧乾燥を30分程度行った。
- ⑯ 最後にTE緩衝液(10mM Tris-HCl[pH8.0]、1.0mM EDTA)に溶解させた。

紫外・可視分光法の理論

電磁スペクトル

波長	波数 (cm ⁻¹)	振動数 (1/sec)	呼称
50m		6×10^6	電波
10m		3×10^7	
1m		3×10^8	
4mm	2.5	7.5×10^{10}	マイクロ波
25 μm	400	1.2×10^{12}	遠赤外
2.5 μm	4000	1.2×10^{14}	赤外
750nm	1.33×10^4	4×10^{15}	近赤外
400nm	2.5×10^4	7.5×10^{15}	赤 紫
200nm	5×10^4	1.5×10^{16}	近紫外
500Å	2×10^4	6×10^{16}	X線
0.05Å		6×10^{20}	
			γ線

紫外・可視分光法の理論

電磁スペクトル

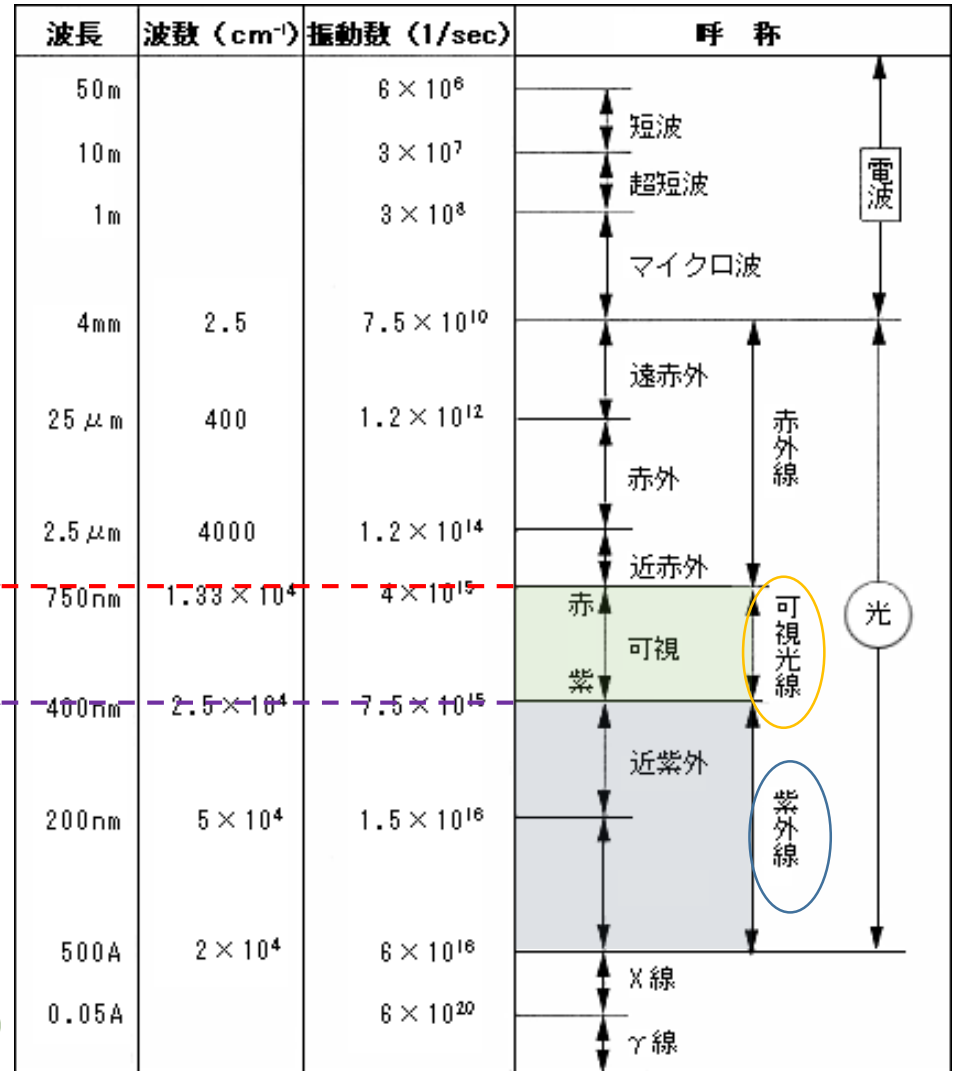
光 = 波

可視光
人の目に見える領域
 $\lambda = 400 - 750 \text{ nm}$

紫外光
UV-A 400-320 nm
UV-B 320-280 nm
UV-C 280-10 nm

赤
橙
黄
緑
青
紫

日焼け止めは、
UV-BとUV-Aを
カットする仕組み

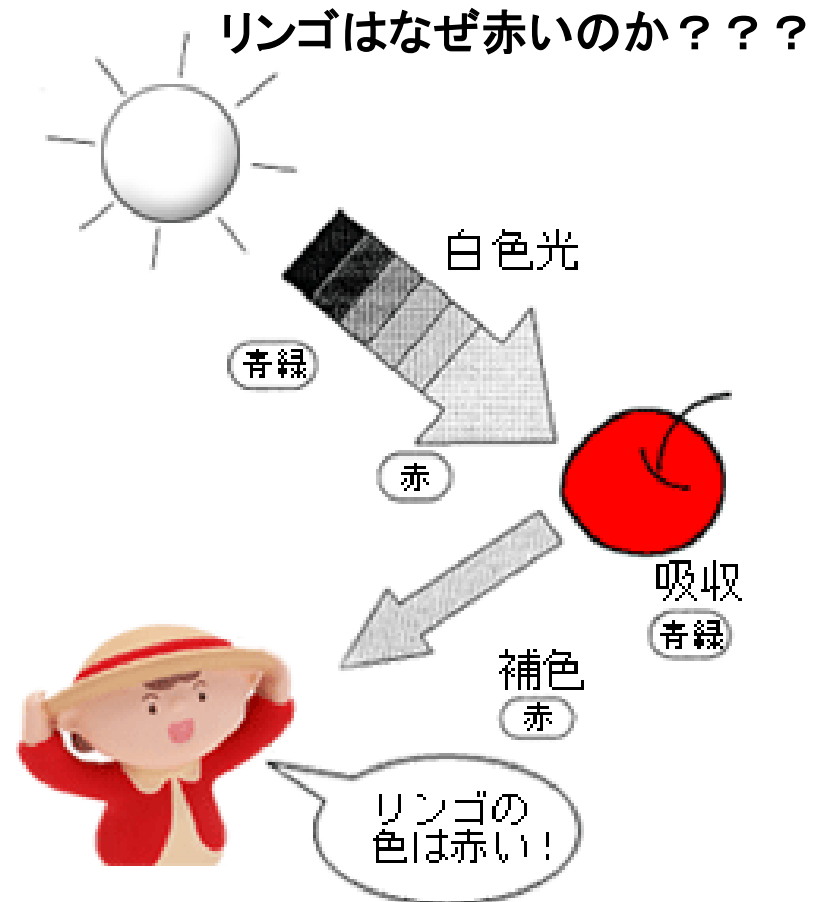


可視光

吸収されるスペクトルの色



光の色	光の波長 (nm)	補色
紫	380 ~ 435	黄緑
青	435 ~ 480	黄
緑青	480 ~ 490	橙
青緑	490 ~ 500	赤
緑	500 ~ 560	紫赤
黄緑	560 ~ 580	紫
黄	580 ~ 595	青
橙	595 ~ 605	緑青
赤	605 ~ 750	青緑
紫赤	750 ~ 780	緑

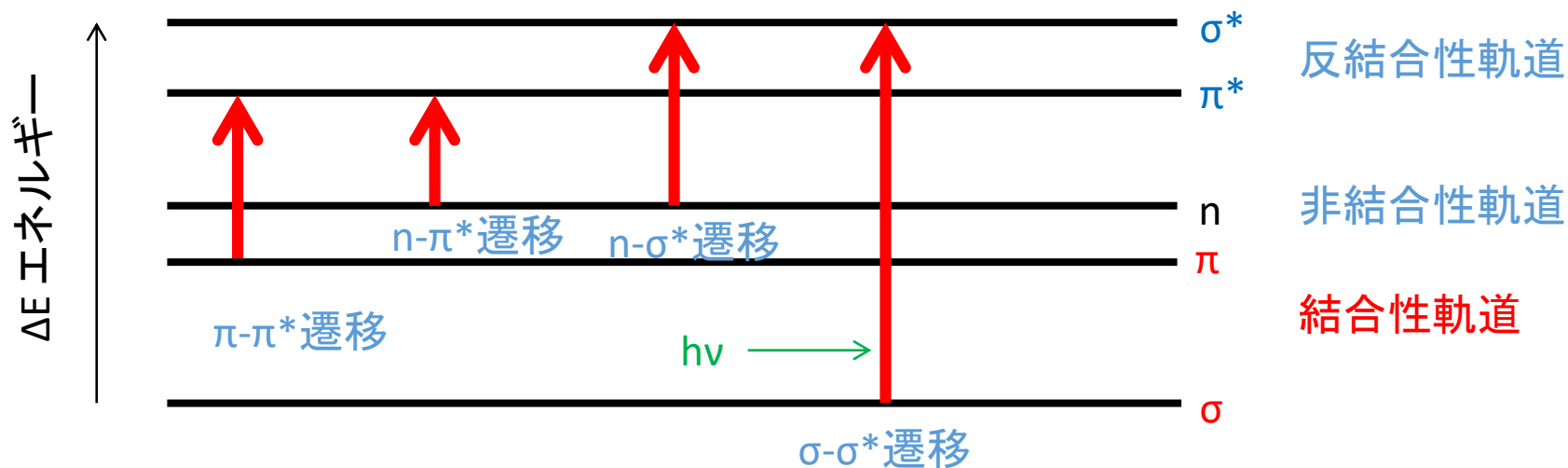


分子の電子遷移

分子は、紫外・可視領域の電磁波を吸収したり、放出することがある。
この現象は**分子内の電子**が基底状態(低エネルギー状態)と
励起状態(高エネルギー状態)の間を遷移することにより起こる。

吸収: 光の持つエネルギーが電子のエネルギーに変わるプロセス

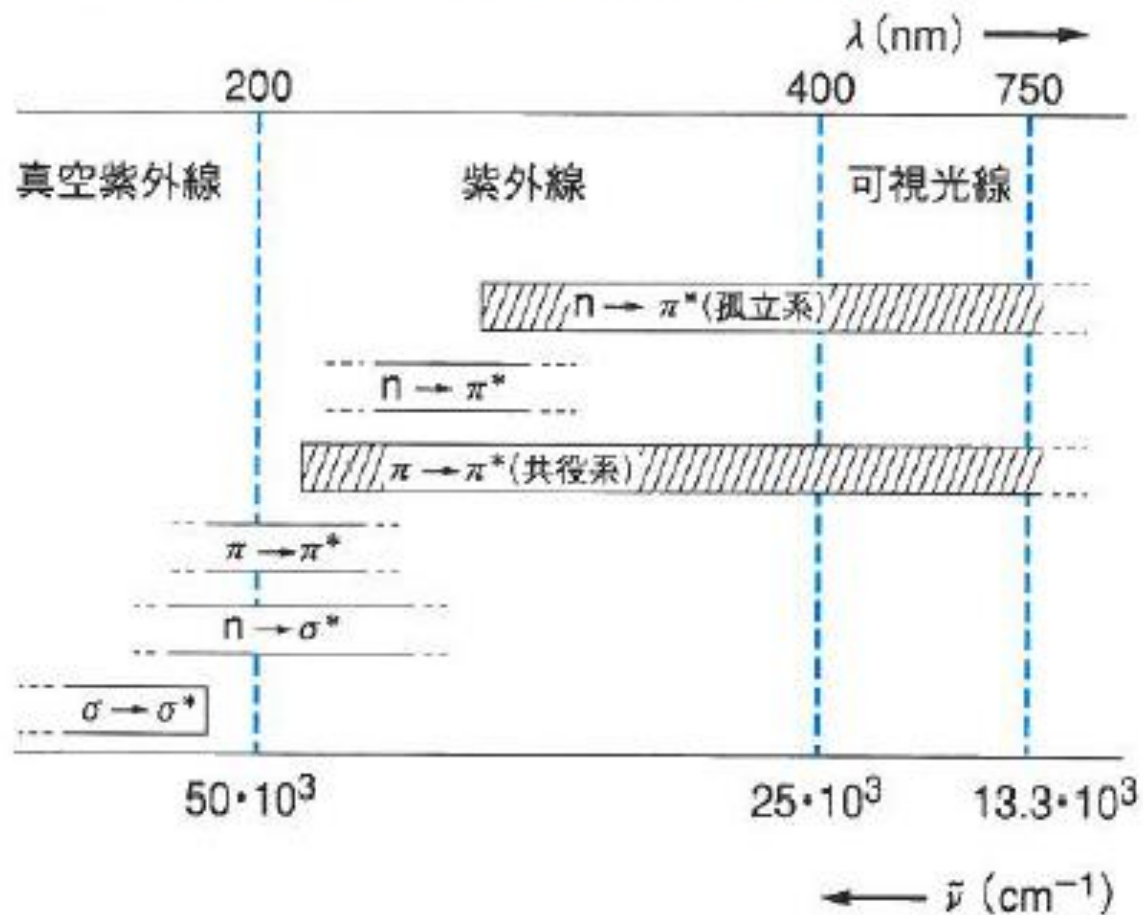
有機化合物の電子遷移



励起された電子は、自然放出、または誘導放出で基底状態に戻る。

分子の電子遷移

電子遷移の種類と吸収波長の関係



Lambert-Beerの法則

強度 I_0 の光線が厚さ d の均一物質を通過すると、反射や回折による損失とは別に、吸収によって光は弱まる。観測できる(透過)光の強度 I は次式で示される。

$$I = I_0 - I_{\text{abs.}}$$

吸収層の厚さの増大 dx による光強度の減少 dI は、次の微分方程式で示される。

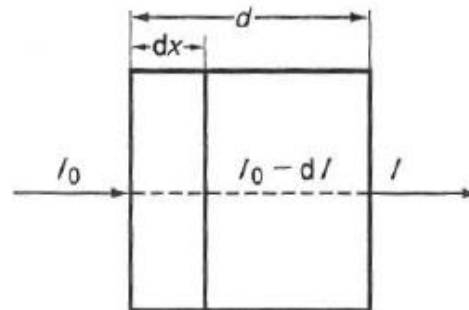
$$dI = -aI dx$$

両辺を積分すると

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\int_0^d a dx$$

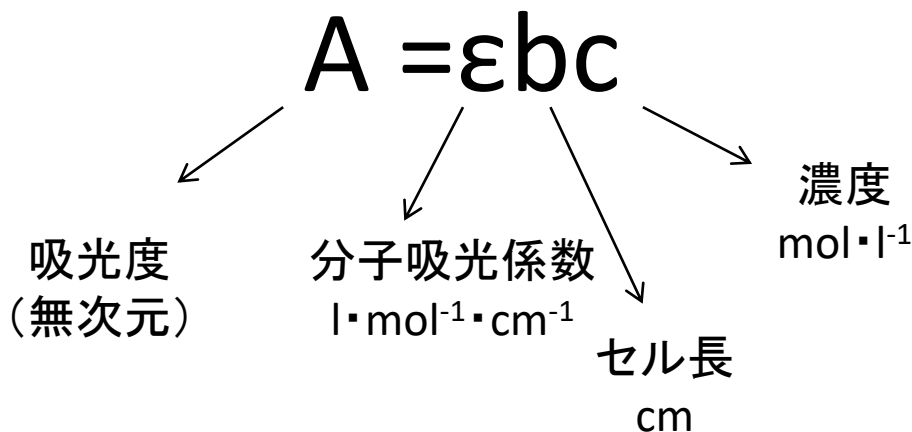
となって、次の関数が導かれる。

$$I = I_0 e^{-ad}$$

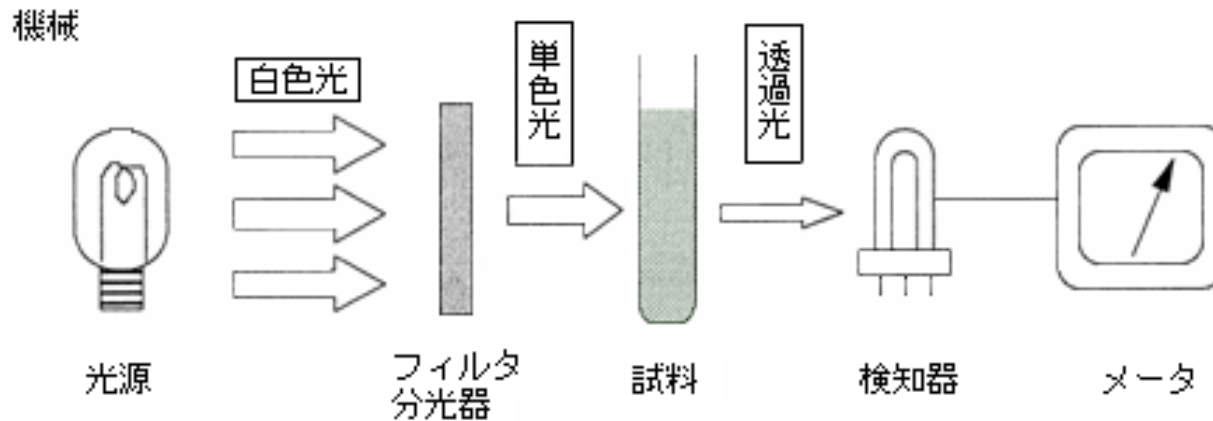


ここで a は媒質固有の吸光係数である。希薄溶液に限定すれば、溶質濃度を c とした場合、 a は $2.303\epsilon c$ で置き換えられ、次式のようになる。

$$\ln \frac{I_0}{I} = 2.303\epsilon cd \quad \text{もしくは} \quad A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon cd$$



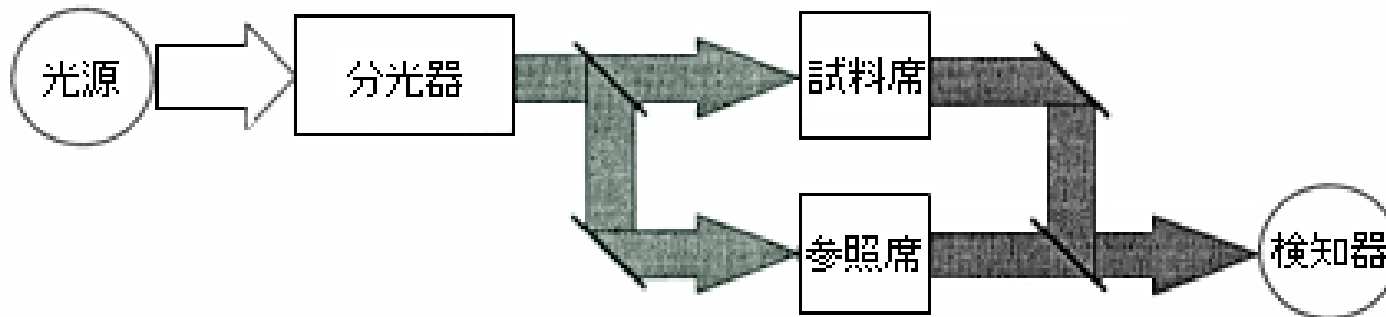
分光光度計のしくみ



ダブルビーム方式

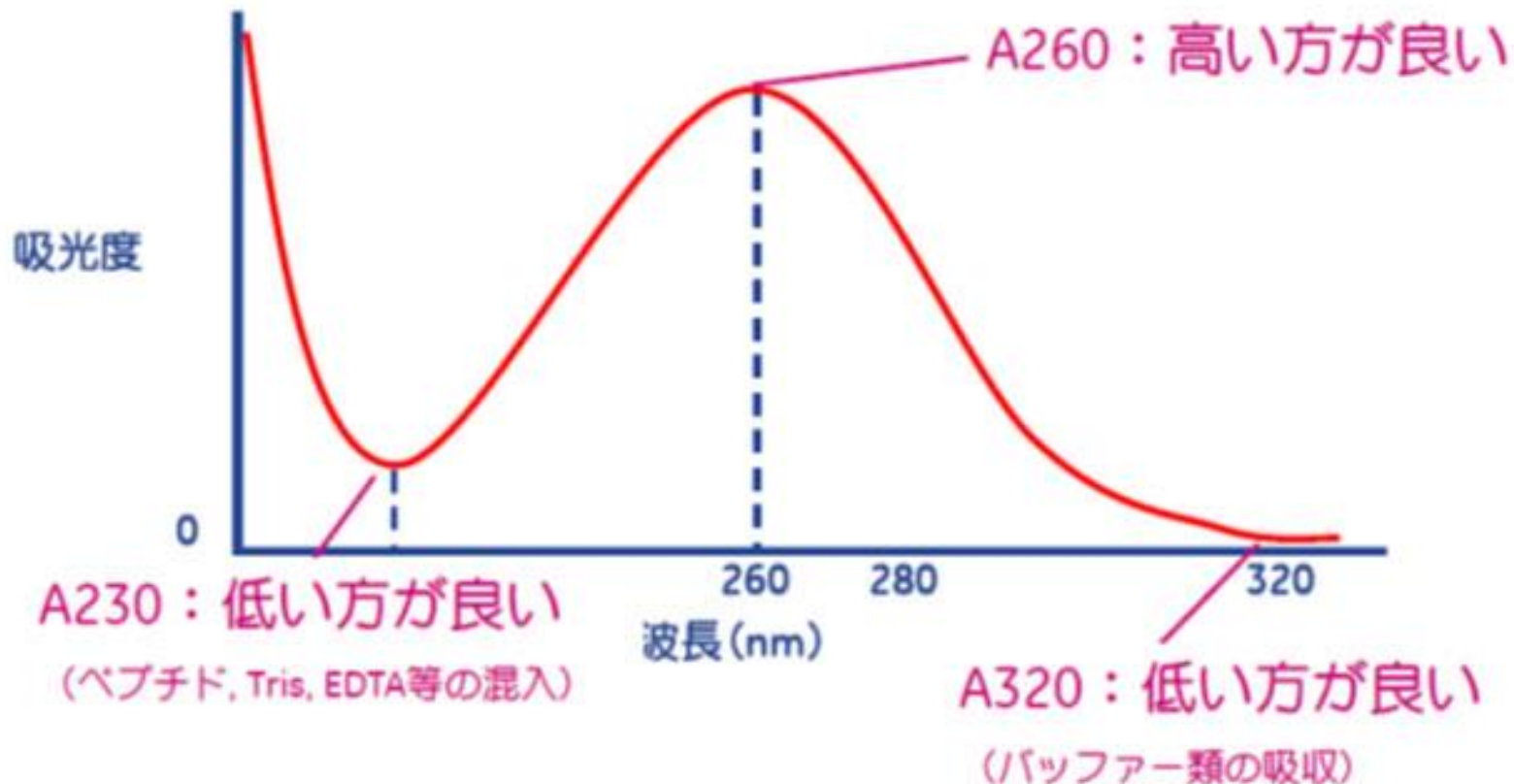
測定場所が一ヶ所しかなかったシングルビーム方式に対し、試料専用席、参照専用席を設けたのがダブルビーム方式です。参照側のエネルギーも検知器に入射しているため、この信号を基準として測光しています。

これにより、光源の変動を補正することができ、長時間安定した測定ができます。



核酸の吸光度測定

DNA、RNA、オリゴヌクレオチドなどの核酸は、260 nm付近の紫外光をよく吸収します。これは、核酸の構成物である塩基がこの付近に吸収ピークをもつことに由来します（A：259 nm、T：267 nm、G：253 nm、C：267 nm）。



1 $\mu\text{g/ml}$ のDNA溶液は波長260 nmの光に対し、0.02の吸光度を示します。つまり、 $A_{260}=1.0$ であれば、DNA溶液の濃度は50 $\mu\text{g/ml}$ となります。RNAの場合は $A_{260}=1.0$ のとき、RNA溶液の濃度は40 $\mu\text{g/ml}$ です。また、オリゴヌクレオチドの場合は、塩基長や塩基組成により多少変動しますが、 $A_{260}=1.0$ のとき、オリゴヌクレオチドの濃度は概ね33 $\mu\text{g/ml}$ となります。

したがって核酸の濃度は次の式で算出できます。

DNAの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50$ (光路長10 mmの時)

RNAの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 40$ (同上)

オリゴヌクレオチドの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 33$ (同上)

<配列が明らかな場合>

オリゴヌクレオチドの配列由来のモル吸光係数(260 nm)を利用する。

合成オリゴヌクレオチドのモル吸光係数は計算可能。

<http://sg.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/?c=JP>

https://www.gelifesciences.co.jp/technologies/spectro/spectclub/theo_05.html

核酸の場合、単位に注意

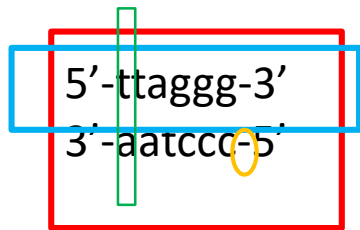
ヒテロメアDNA (TTAGGG)₄(24塩基)を使って実験します。

100 uM-st ヒテロメアDNA

2400 uM-b ヒテロメアDNA



同じ濃度



100 uM-dst 2本鎖DNA

200 uM-st 2本鎖DNA

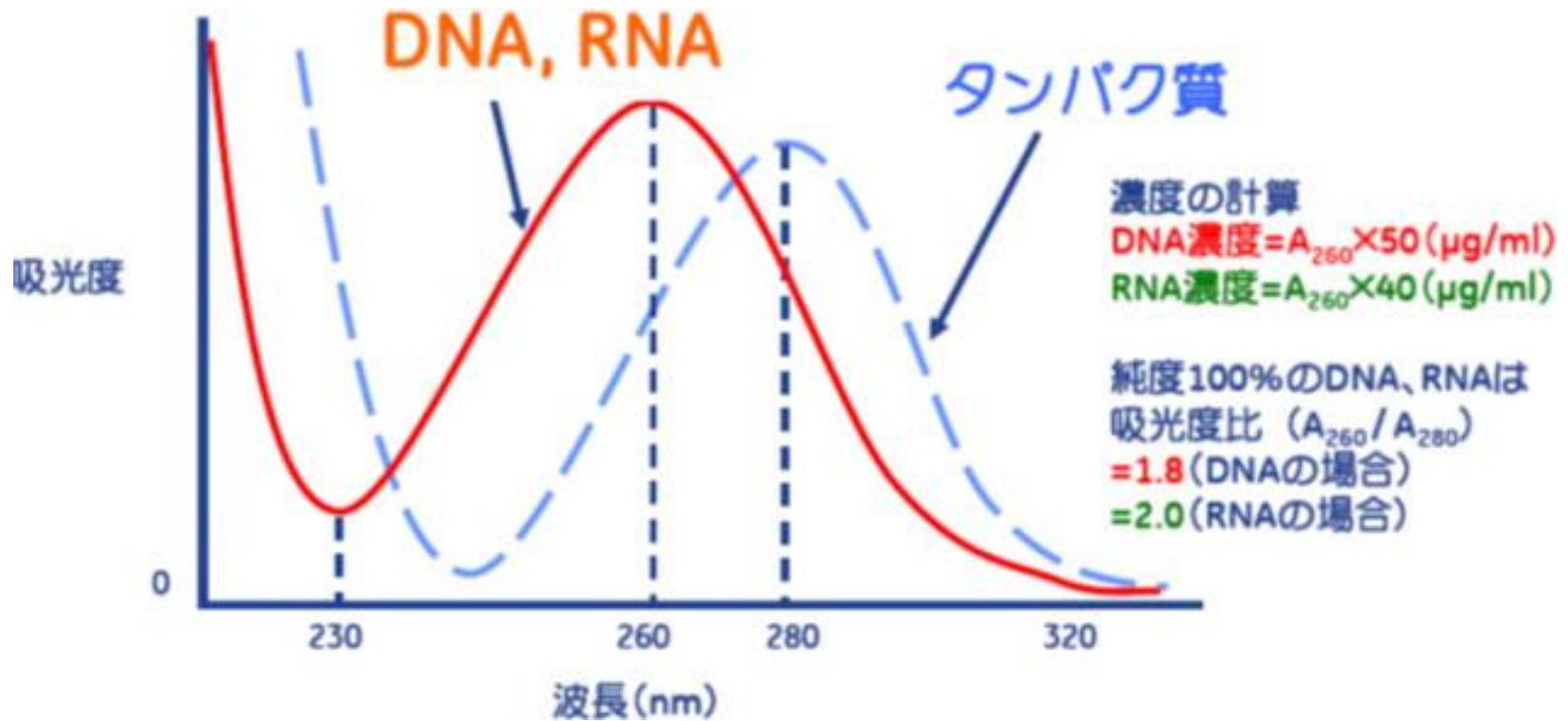
600 uM-bp 2本鎖DNA

1200 uM-b 2本鎖DNA



同じ濃度

タンパク質・RNAの吸光度測定

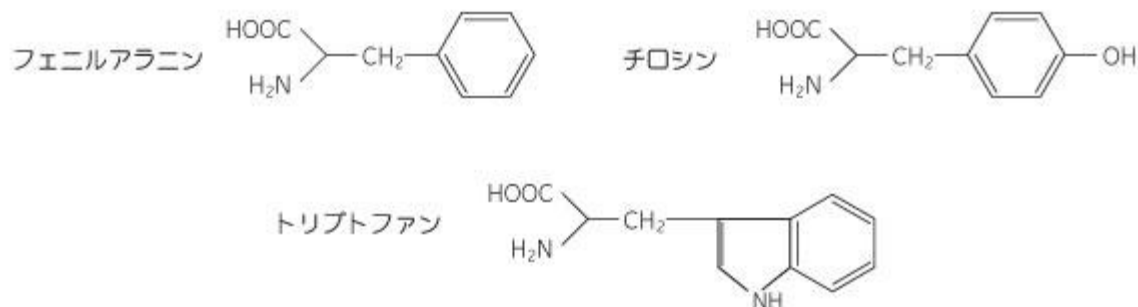


https://www.gelifsciences.co.jp/technologies/spectro/spectclub/theo_05.html

タンパク質の濃度決定

紫外吸収法

タンパク質中のアミノ酸のうち、トリプトファン・チロシン・フェニルアラニンは280 nm付近の紫外光をよく吸収します。これは、トリプトファン・チロシン・フェニルアラニンの芳香族のベンゼン環がこの付近に吸収ピークをもつことに由来します。



スタンダード(common standard protein)としてよく使用される、Bovine Serum Albumin (ウシ血清アルブミン (BSA)) の場合では、0.67の吸光度を示します。 $A_{280}=1.0$ であれば、BSA溶液の濃度は1.493 mg/mlとなります。IgGの場合には、 $A_{280}=1.0$ であれば、濃度は0.73 mg/mlとなります。

https://www.gelifesciences.co.jp/technologies/spectro/spectclub/theo_06.html

比色法

タンパク質に特異的に結合する色素を使用し、さまざまな比色法で濃度の測定ができます。濃度既知の希釈系列サンプル（スタンダードサンプル）の吸光度を測定し、Standard Curve（標準曲線）を作成します。その後、未知サンプルの吸光度を測定、標準曲線から未知サンプルの濃度を算出することができます。各種比色法や、キットによって、測定範囲が異なりますので使用前に測定範囲を確認することをお勧めします。

ブラッドフォード法 (Bradford法)

ビューレット法 (Biuret法)

ローリー法 (Lowry法)

BCA法 (ビスンコニン酸法)

■ブラッドフォード法 (Bradford法)

定量範囲：10~100 μg

測定波長：595 nm

原理：

CBB G-250色素を酸性条件下でタンパク質と結合させてその吸収を測定します。タンパク質と結合し複合体が生成されると、色素の色は赤茶色（最大吸収波長が465 nm）から青色（極大吸収波長:595 nm）に変化します。CBBは、タンパク質の塩基性アミノ酸残基、芳香族アミノ酸残基と結合することが知られています。還元剤の影響を受けないため、還元剤を含むサンプルにお勧めの定量方法です。

長所：

操作が簡単で妨害物質が少ない

還元剤（DTTや2-メルカプトエタノールなど）やキレート剤の影響を受けない

短所：

特定のアミノ酸側鎖に結合するため、他法に比べてタンパク質によって発色率に差がある

界面活性剤の混入により反応が阻害される

色素がガラスや石英のキュベットに吸着する

参考文献：

Bradford, Marion M. (1976) Anal Biochem 72, 248-254

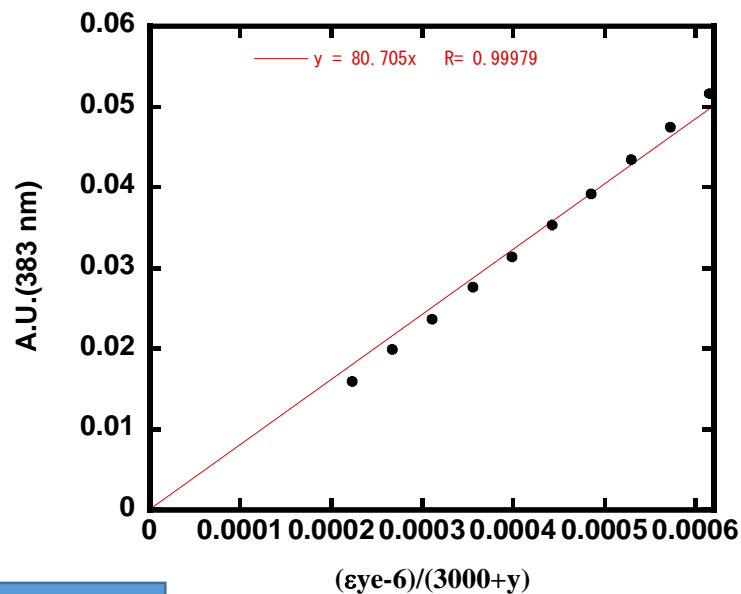
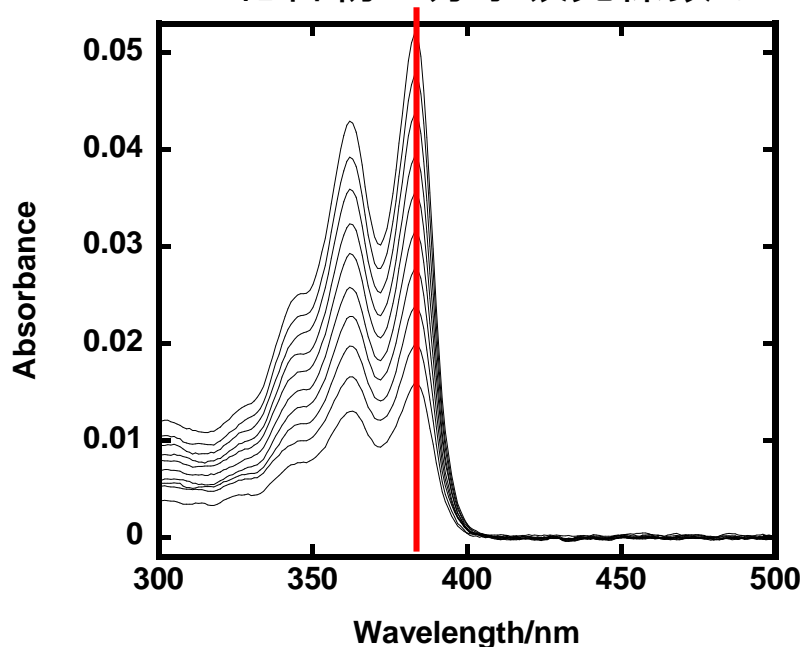
それぞれのキットがすでに販売されているので、これを利用するのが一般的です。

分光光度法を利用してわかること

例: 化合物の濃度

濃度不明の化合物Aを5 μL ずつ、水3000 μL が入ったセルに添加し、吸光度測定を行った。

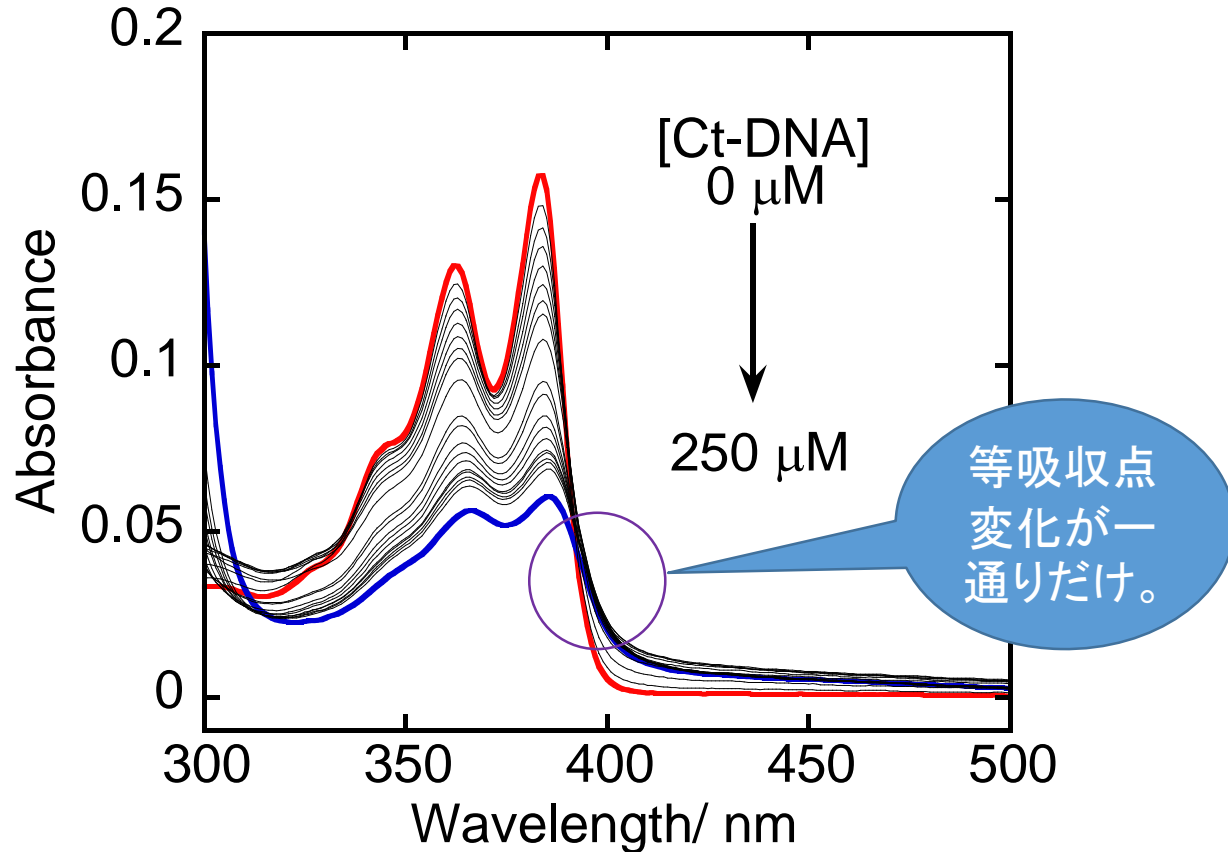
この化合物の分子吸光係数は27000 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}$



化合物Aの濃度を算出することができる。

分光光度法を利用してわかること

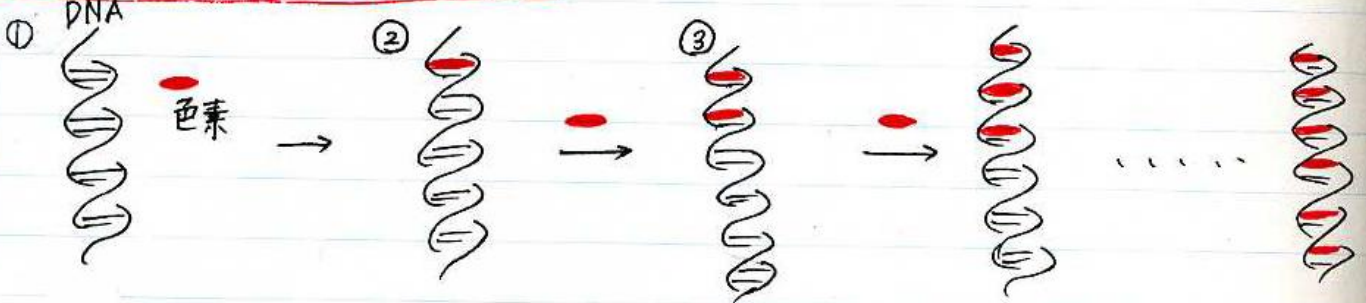
例：化合物Aともう一つの物質(たとえばDNA)との結合定数がわかる。
結合様式がわかる。



結合挙動解析: Scatchard解析

(Scatchard解析)

MacGhee-von Hippelの式について



色素がDNAにインターカレートするとき、①→②の場合と②→③の場合とで、色素のインターカレートのしやすさに差が生ずることがある。

ω : 協同性パラメータ
* ω が

① 差が生じない場合 ... $\omega = 1$ (協同性なし)

化合物がDNAに結合し、結合に伴い化合物の吸光度変化が生じるとき、その変化から結合率を算出し、結合挙動解析を行うことができる。

スカッチャードプロット

MacGheeとvon Hippelは、 r (飽和度、加えたDNAあたりに結合した色素の量)と LF (DNAに結合していない色素の量)とを用いてScatchardプロットの理論曲線を導いている。色素同士の相互作用(協同性)がないときには、

$$r/LF = K(1-nr)\{(1-nr)/[1-(n-1)r]\}^{n-1} \quad (1)$$

である。また、協同性がある場合には、

$$r/LF = K(1-nr)\{[(2\omega-1)(1-nr)+(n-R)]/[2(\omega-1)(1-nr)]\}^{n-1}\{[1-(n-1)r+R]/[2(1-nr)]\}^2 \quad (2)$$

(ただし、 $R = \{[1-(n+1)r] + 4\omega n(1-nr)\}^{1/2}$)

である。ここで、 n は座位数(色素分子が結合することによって被われるDNA塩基対数)で、 K は会合定数、 ω は協同性パラメータである。従って、色素とDNAとの種々の比率での r と LF を求めてScatchardプロットを行い、(1)または(2)式を用いて非線型最小二乗法によって最適化させることによって K 、 n 、 ω を求めることができる。

Langmuirの結合等温式から導かれるScatchard法

フリーなゲストをC、フリーなホストを n_0 、ゲストと結合したホストを n_B とすると以下の式が示される。 $C + n_0 \leftrightarrow n_B$

ここで、これらの結合定数Kは次のように示される([]は対応する化学種の濃度)。

$$K = \frac{[n_B]}{[C][n_0]} \quad (1)$$

ここで、全ゲストの数Nは $N = n_0 + n_B$ であるため、

$$K = \frac{[n_B]}{[C][N - n_B]} \quad (2)$$

つまり、以下のように示される。

$$\frac{n_B}{N} = \frac{KC}{1 + KC} \quad (3)$$

ここで、ホスト分子にm個の結合サイトがあるとするならば、(3)式は次のように変形できる。

$$\frac{n_B}{mN} = \frac{KC}{1 + KC} \quad (4)$$

これより、式を変形すると、 $\frac{n_B}{C} = K(mN - n_B)$

となり、ここで、 n_B (ゲストと結合したホストの数)をv, C(ゲスト濃度)をL, mN(結合サイトの数)をnとおくと、

$v/L = K(n - v)$ が導かれる。

実験方法

- (1) 以下の表に示す濃度のリファレンス溶液と滴下剤を用意した。
- (2) 測定溶液は、FNDのみ含まれていない溶液を用意した。
- (3) リファレンス溶液と(2)溶液を用いて、リファレンス測定を行ったのち、FNDが5 μ Mになるように、測定溶液にFNDを加える。
- (4) 添加剤を数 μ L 測定溶液に加え、ピペットマン(200 μ Lのものを100 μ Lにあわせたもの)で20回ピペッティングする。
- (5) 1分放置したあと、UV測定を行う。

	最終濃度		
	測定溶液	リファレンス溶液	滴下剤
MES (pH 6.2)	10 mM	10 mM	10 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM
NaCl	100 mM	100 mM	100 mM
FND	5 μ M		5 μ M
仔牛胸腺DNA	—		3 mM
全体積	3000 μ L	3000 μ L	300 μ L

DNAを分解する酵素DNaseはMgイオンやCaイオンで活性ONになる。EDTAで2価カチオンをキレートすることで、DNaseを不活性にできる。

希釈効果を見逃すことができるのは、測定溶液の体積変化10%まで。

滴下剤にもFNDを入れておくことで、滴下剤の添加に伴う測定溶液の増加による希釈効果を受けずに測定可能。

ただし、DNAによっては、あらかじめFNDとDNAを加えておくことと凝集することがある。その場合、あらかじめ混合できないため、希釈効果を加味しなければならない。

$$r/LF = K(1-nr)\{(1-nr)/[1-(n-1)r]\}^{n-1} \quad (1)$$

- ここで、nは座位数(色素分子が結合することによって被われるDNA塩基対数)で、Kは会合定数である。従って、色素とDNAとの種々の比率でのr(DNA 1bpに結合した化合物の数)とLF(DNAに結合していない化合物)を求めてScatchardプロットを行い、(1)または(2)式を用いて非線型最小二乗法によって最適化させることによってK、nを求めることができる。

セル中のフリーなリガンド濃度: 吸光度 $5\mu\text{M} * (A - A_F) / (A_0 - A_F)$

最大吸収波長での変化(データがぶれにくい)

DNAに結合したリガンド濃度: $5\mu\text{M} - LF$

セル中のDNA濃度

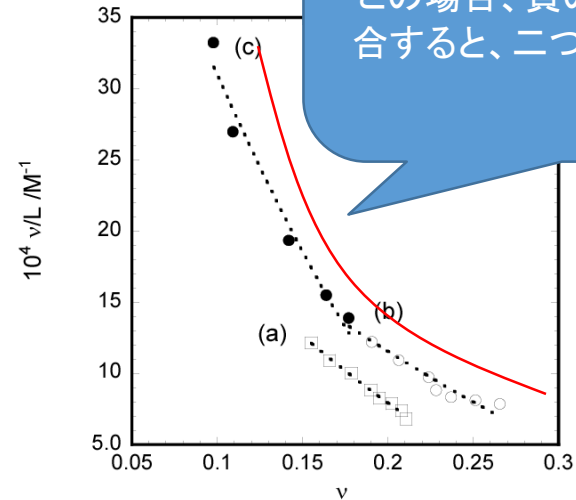
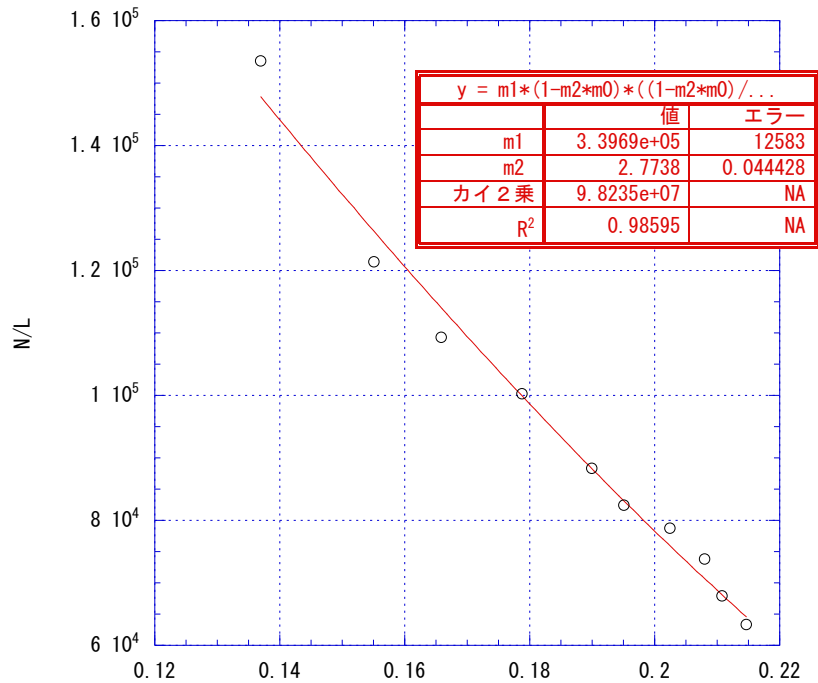
化合物のDNAへの結合率: $LB / (5\mu\text{M}) \times 100\%$

DNA 1bpに結合した化合物の数: $LB / [DNA]$

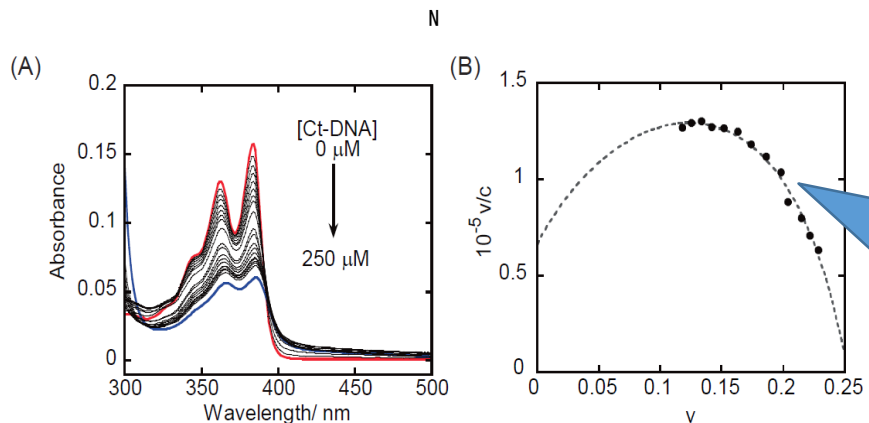
滴下量/uL	383nm	[DNA]	LF	LB	B	r	r/LF
A_0 → 0	0.14942		0	4.97E-06	3.49E-08	0.698795	0
3	0.14242	0.0000015	4.54E-06	4.57E-07	9.13253	0.304418	67002.56
6	0.13502	0.000003	4.1E-06	9.02E-07	18.04819	0.300803	73409.78
9	0.12894	0.0000045	3.73E-06	1.27E-06	25.37349	0.281928	75556.99
12	0.12352	0.000006	3.4E-06	1.6E-06	31.90361	0.265863	78084.45
15	0.11868	0.0000075	3.11E-06	1.89E-06	37.73494	0.251566	80804.95
18	0.11453	0.000009	2.86E-06	2.14E-06	42.73494	0.237416	82918.39
21	0.11016	0.0000105	2.6E-06	2.4E-06	48	0.228571	87912.09
24	0.10535	0.000012	2.31E-06	2.69E-06	53.79518	0.224147	97023.03
30	0.09849	0.000015	1.9E-06	3.1E-06	62.06024	0.206867	109050.5
36	0.09298	0.000018	1.57E-06	3.43E-06	68.6988	0.19083	121931.4
42	0.08822	0.000021	1.28E-06	3.72E-06	74.43373	0.177223	138638.3
48	0.0846	0.000024	1.06E-06	3.94E-06	78.79518	0.164157	154829.5
60	0.07922	0.00003	7.36E-07	4.26E-06	85.27711	0.142129	193071.5
84	0.07374	0.000042	4.06E-07	4.59E-06	91.87952	0.10938	269393.8
96	0.0719	0.000048	2.95E-07	4.7E-06	94.09639	0.098017	332057.8
120	0.07004	0.00006	1.83E-07	4.82E-06	96.33735	0.080281	438377.2
180	0.06776	0.00009	4.58E-08	4.95E-06	99.08434	0.055047	1202339
240	0.06792	0.00012	5.54E-08	4.94E-06	98.89157	0.041205	743478.3
A_F → 300	0.06759	0.00015	3.55E-08	4.96E-06	99.28916	0.033096	931186.4

Scatchard解析では、結合率30-70%の変化で評価する。

カレイダグラフでフィッティング

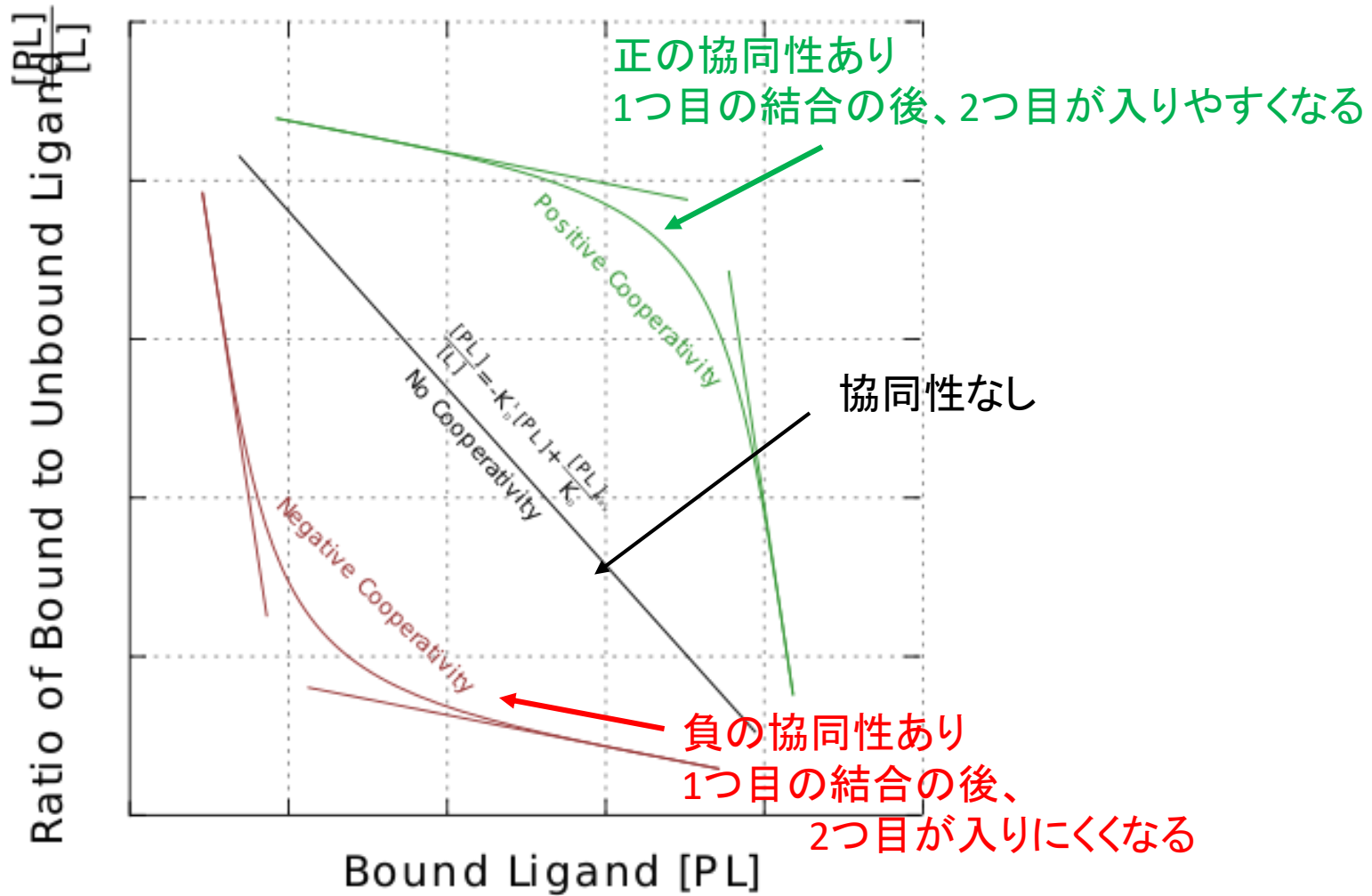


フィッティングカーブが下に曲がってしまった！
 →結合に協同性あり。
 この場合、負の協同性(一つが結合すると、二つ目が結合しにくくなる。)



フィッティングカーブが上に曲がってしまった！
 →結合に協同性あり。
 この場合、正の協同性(一つが結合すると、二つ目が結合しやすくなる。)

Scatchard Plot



Scatchard解析の利用上の注意

結合率を算出するので、結合が飽和するまで変化しないものでないといけない。

→ 飽和しない場合、Benesi-Hildebrandプロットという方法で、 K_n 値(結合定数と結合個数を掛けた値)を算出することが可能。

UV-Vis測定でなくても、結合によって、一定の変化をするものであれば、別の測定手法でも適用可能。

電気化学測定 of 電流変化、QCM、SPRでも応用可能。

宿題について

出欠および評価のため、
Moodleの課題を提出して下さい。