

# バイオ計測学特論04

2021年度 第4Q

佐藤しのぶ

# 本日のトピック

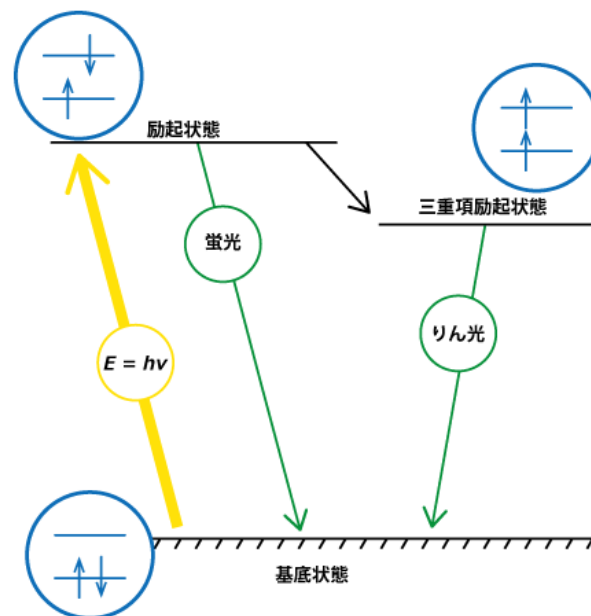
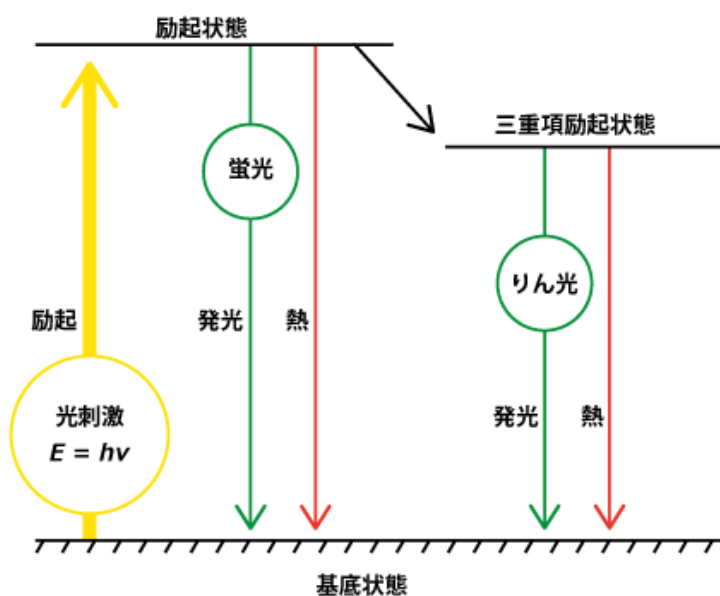
- 分光光度法-蛍光測定法
- ゲル電気泳動

# 蛍光測定 の原理①

蛍光光度法とは、蛍光物質に特定波長の光を照射し、放射される蛍光強度を測定する方法。試料物質が蛍光を示さない場合は、蛍光物質と結合させることで分析を行う。

蛍光が出る原理: 光を当てると、電子が励起一重項状態と呼ばれる状態になり、ここから基底一重項状態(エネルギーが低い状態)に遷移する際に光が放射されること。

ちなみに、励起一重項→励起三重項→ゆっくりと基底一重項状態へ移動する際に放出される光はリン光



# 蛍光測定の実理②

当てる光: 励起光、励起スペクトル≈吸収スペクトル(厳密には違ふ)

出てくる光: 蛍光スペクトル

励起光エネルギーの一部が放出されるのが蛍光といえます。従って、蛍光のエネルギーの方が小さいです。これは波長で言えば、蛍光の波長の方が長い、ということになります。これを Stokes (ストークス) の法則と呼びます。

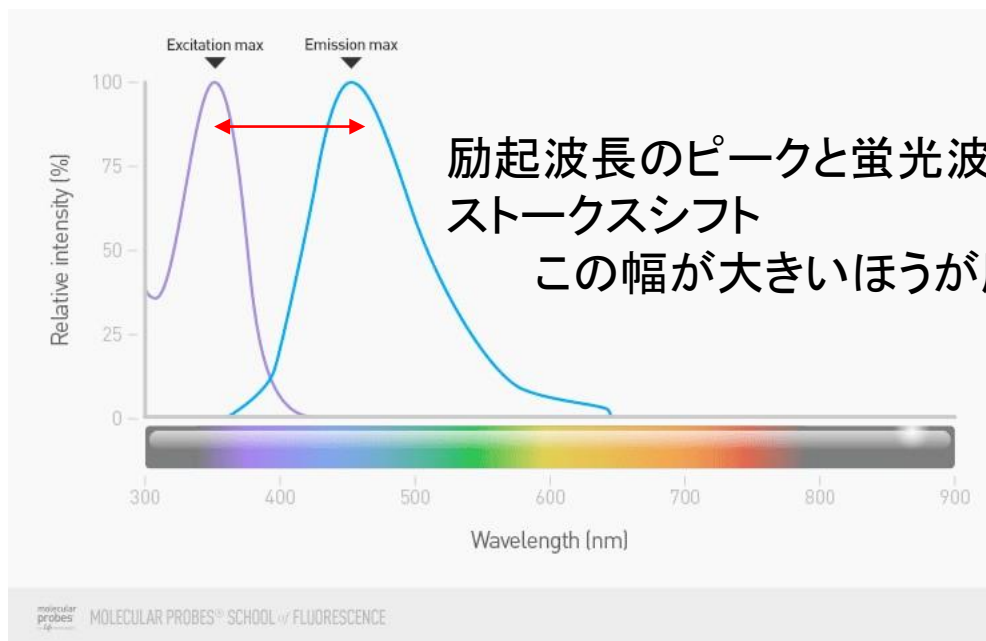
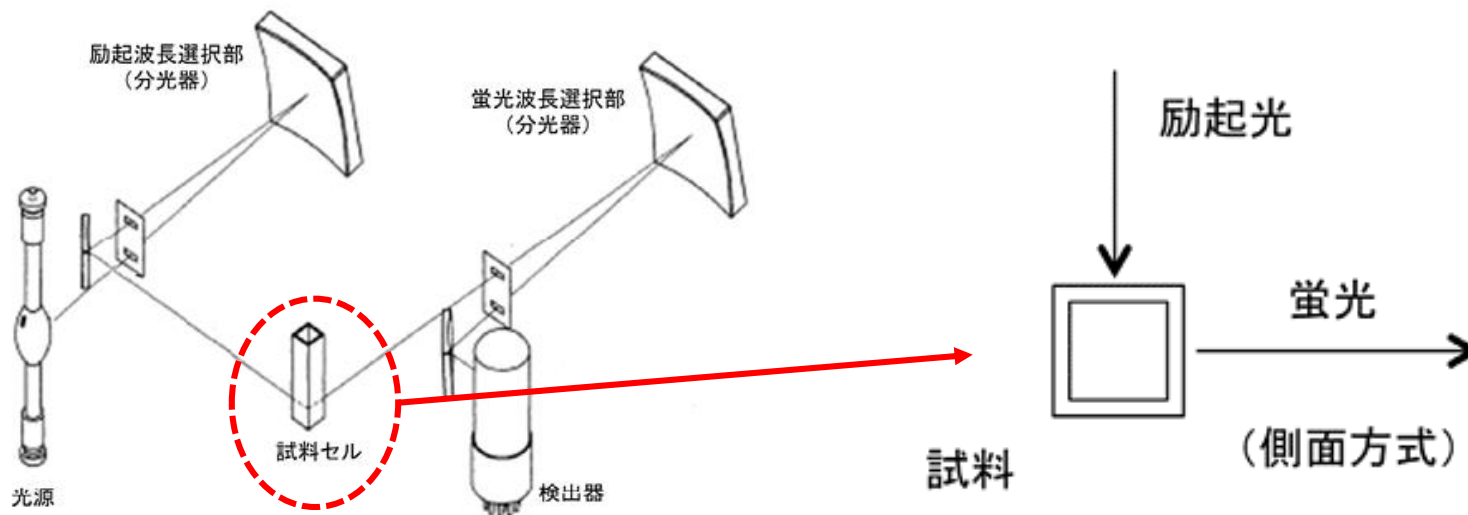


図. 核染色色素(DAPI)の励起および蛍光スペクトル。色素が吸収する一定範囲の波長(励起、紫色で表示)ならびに色素が発する一定範囲の波長(蛍光、青色で表示)を示しています。

# 蛍光測定の実理③

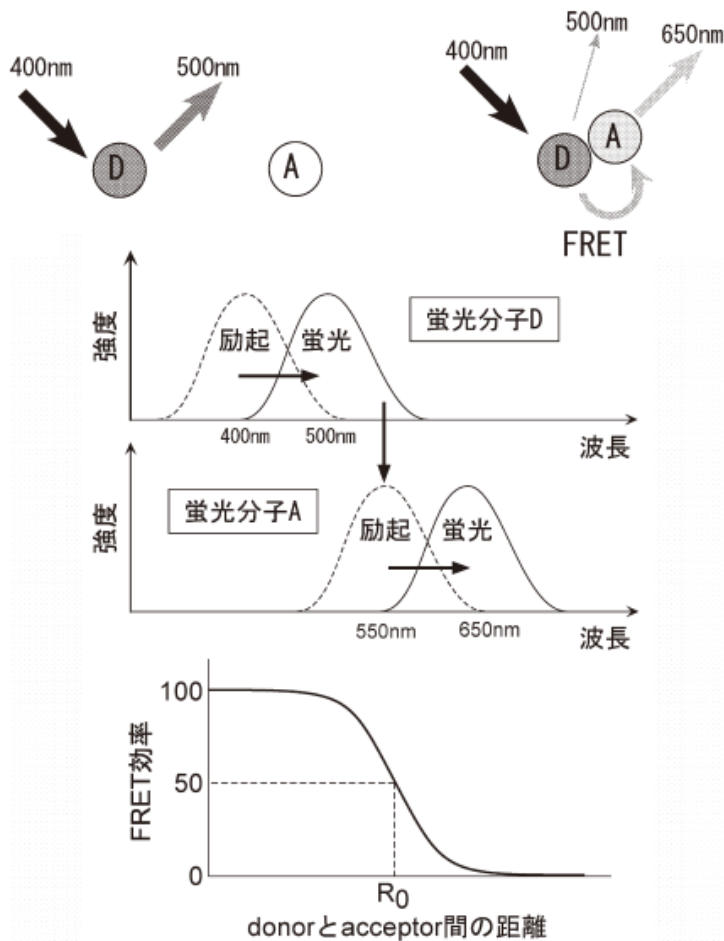
## 測定装置のしくみ



励起光由来の散乱光の影響を少なくするため、励起光に対し直角方向から測定する側面方式がとられる。そのため、全面石英のセルを測定では用いる。

# 蛍光測定のアプリケーション: FRET

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET; Fluorescence resonance energy transfer)



近接した2個の色素分子(または発色団)の間で励起エネルギーが、電磁波にならず電子の共鳴により直接移動する現象。  
 このため、分子Dで吸収された光のエネルギーは分子Aに移動し、分子Aが蛍光分子の場合は分子Aから蛍光が放射される。

FRET効率(E)は以下に依存する。

- ドナーとアクセプター間の距離 (r)
- ドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なり度合い
- ドナーの発光双極子モーメントとアクセプターの吸収双極子モーメントとの相対配向

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad \text{D} \xrightarrow{r} \text{A} \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

$R_0$  = Förster distance = 15-70 Å, 50% transfer efficiency  
 $I_{DA}$  and  $I_D$  are intensities of the donor with and without the presence of an acceptor.  
 r is the distance between Donor and Acceptor molecules.

光学工房, 34, 549(2005).

# 蛍光測定のアプリケーション: フェルスター距離 $R_0$

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad \text{D} \xrightarrow{r} \text{A} \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

$R_0$  = Förster distance = 15-70 Å, 50% transfer efficiency  
 $I_{DA}$  and  $I_D$  are intensities of the donor with and without the presence of an acceptor.  
 $r$  is the distance between Donor and Acceptor molecules.

ドナー発色団とアクセプター発色団の距離がフェルスター距離のときにFRET効率は50%になる。生物学実験で用いる多くの発色団の場合では3-10nm程度、蛍光タンパク質をドナーとアクセプターに用いる場合は5 nm前後である。

# 蛍光測定のアプリケーション

## 蛋白質蛍光プローブの例

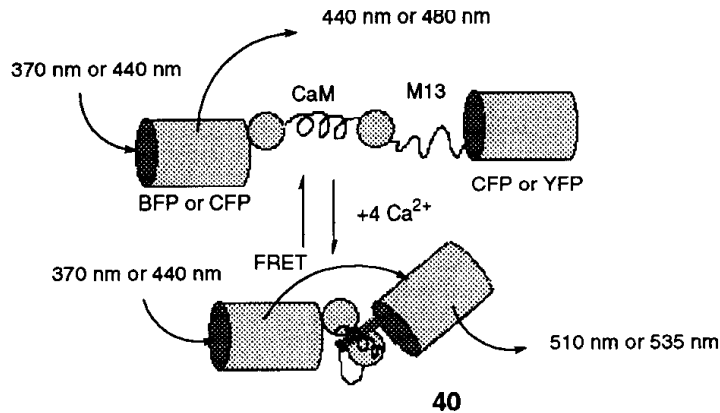


Fig. 19 Response mechanism of Cameleons

中央のカルモジュリン(CaM)とCaが結合すると、CaMのコンフォメーションが変形し、BFPとCFPが接近し、FRETが生じる。

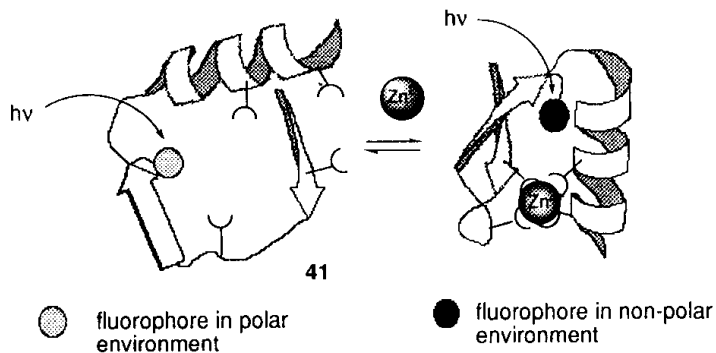


Fig. 20 Recognition mechanism by peptidyl fluorescent probe

Znイオンが配位すると、ペプチド構造が折りたたまれ、蛍光色素の環境が疎水場になり、蛍光が現れる。



## ー生体内でのカリウムイオンー

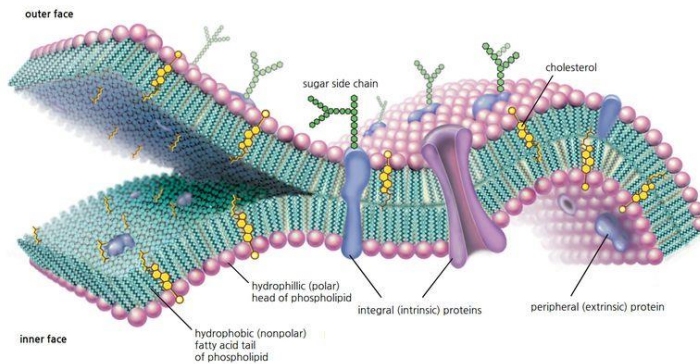
- 細胞の浸透圧の調節
- 細胞膜電位の調節 (神経系のシグナル伝達)
- アポトーシス (細胞死)と細胞増殖
- 脳梗塞や心不全、心循環器疾患、糖尿病などにおいて $K^+$ 濃度異常

B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of The Cell*, 5th ed., Newton Press (2010).

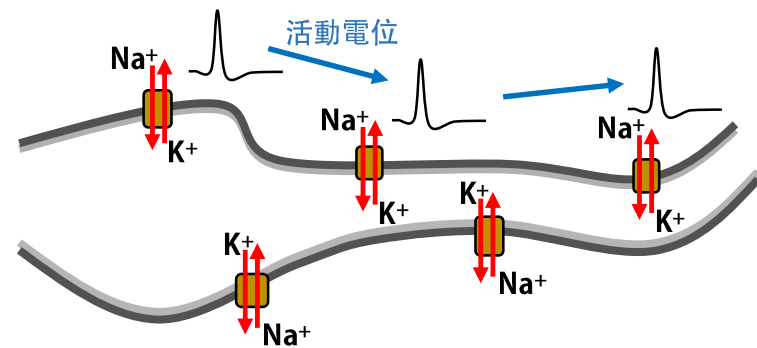
Z. Wang, *Pflügers Arch.*, **448**, 274-286 (2004).

S. F. Pedersen et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **291**, R1-R25 (2006).

F. J. Heet et al., *Br. Med. J.*, **323**, 497-501 (2001).



細胞表面の構造



神経細胞におけるシグナル伝達

細胞表面のイオンチャネルによる  
 $K^+$ の動的な変化を蛍光イメージング

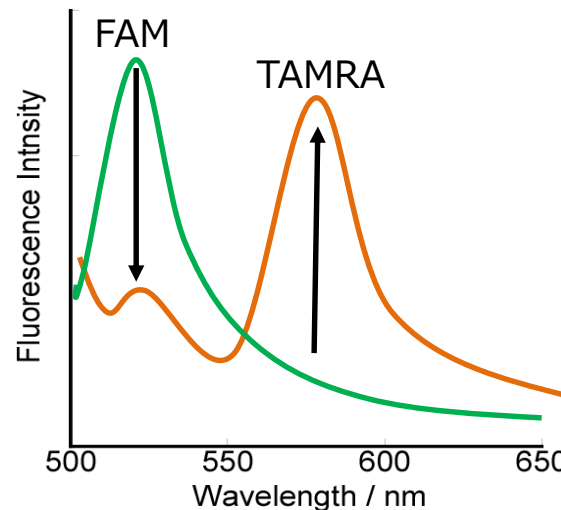
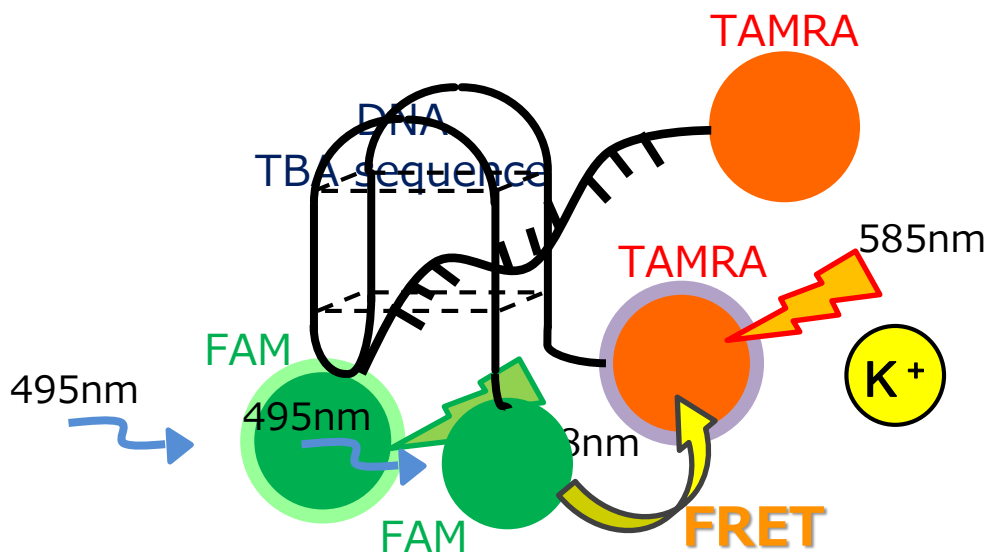
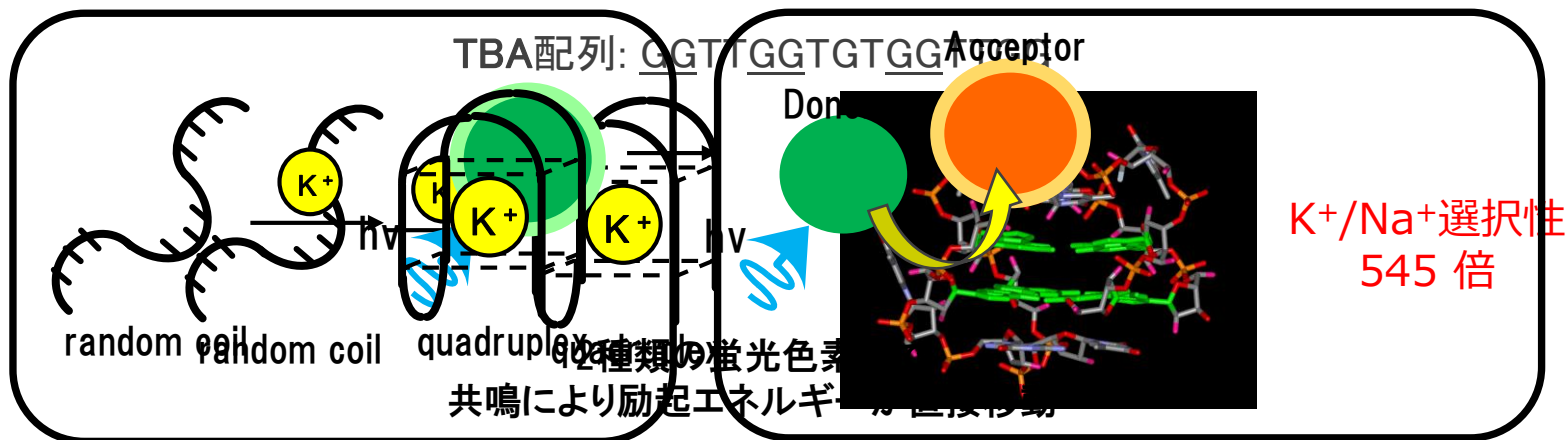


$K^+$ 異常による疾病の究明、  
生体機能の解明

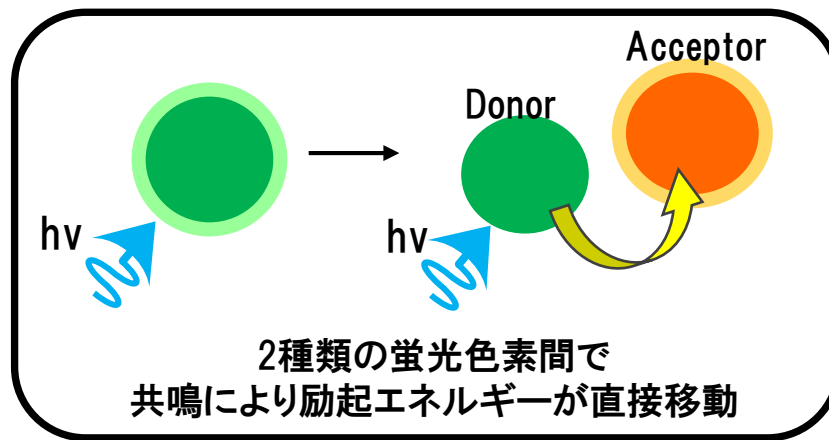
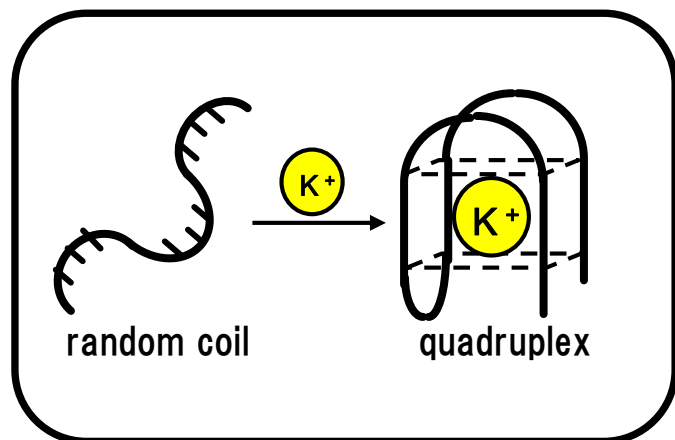
-**PSO**とは-

K<sup>+</sup>による「DNAの四本鎖構造の形成」

蛍光色素対による「**蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)**」を利用した蛍光プローブ



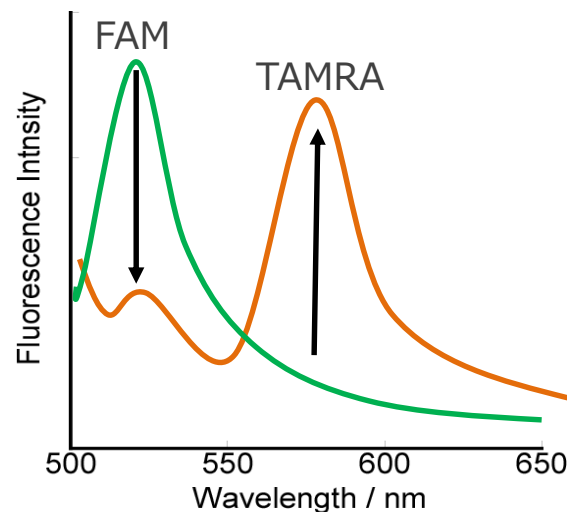
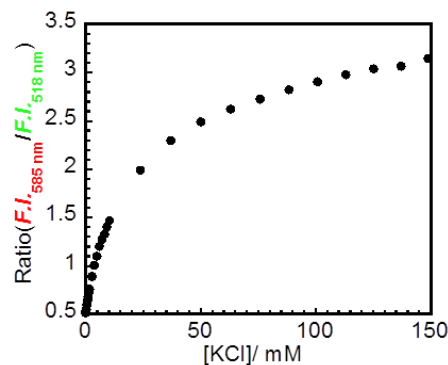
## -PSOとは-

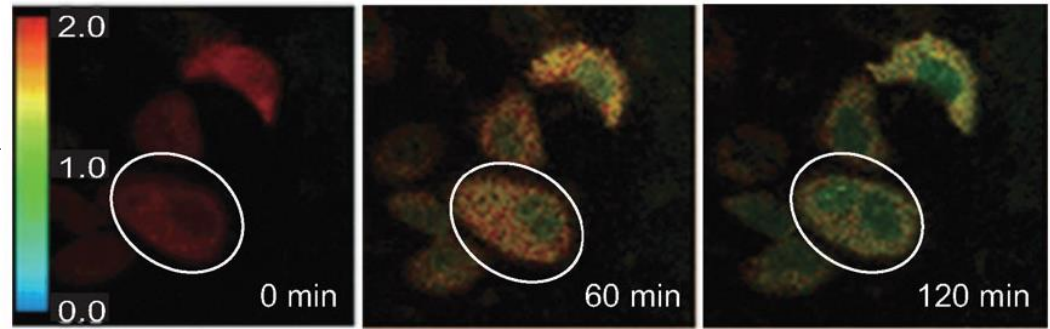
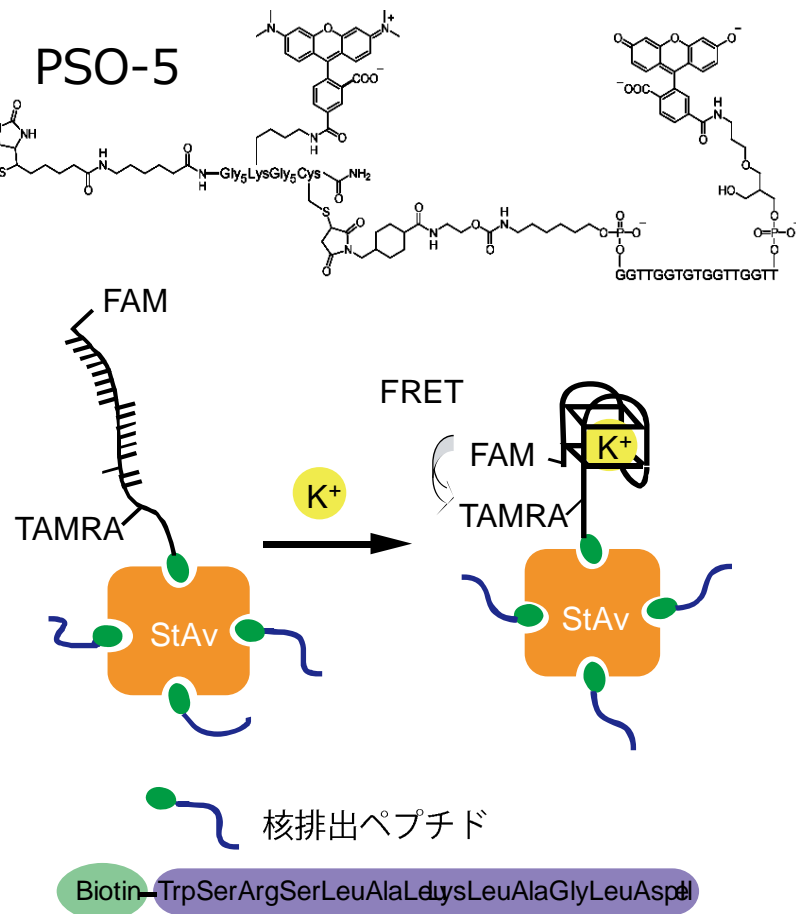
K<sup>+</sup>による「DNAの四本鎖構造の形成」蛍光色素対による「**蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)**」を利用した蛍光プローブ

## FAMとTAMRAの蛍光強度比(Ratio)

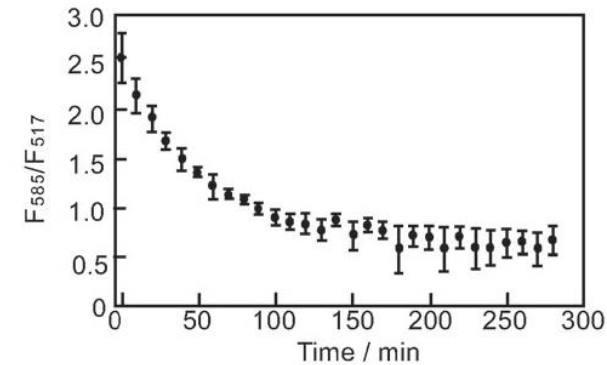
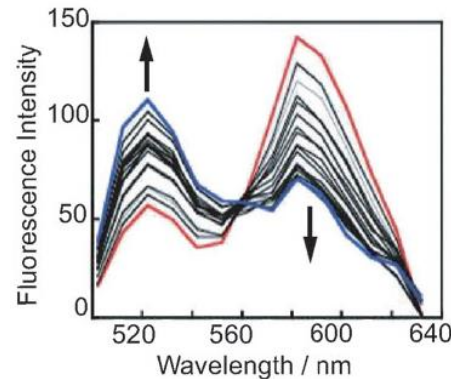
$$\text{Ratio} = \frac{F.I._{585\text{nm}} \text{ (TAMRAの蛍光強度)}}{F.I._{518\text{nm}} \text{ (FAMの蛍光強度)}}$$

褪色・プローブ濃度  
による誤差を排除し  
K<sup>+</sup>濃度を定量可能



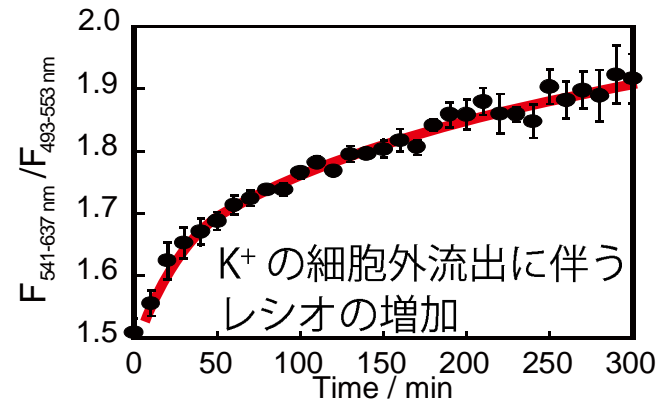
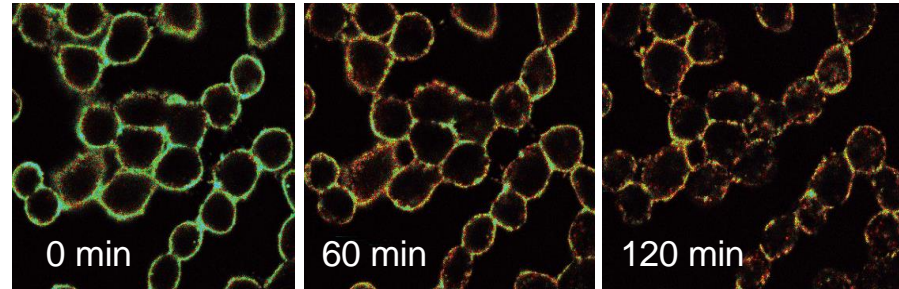
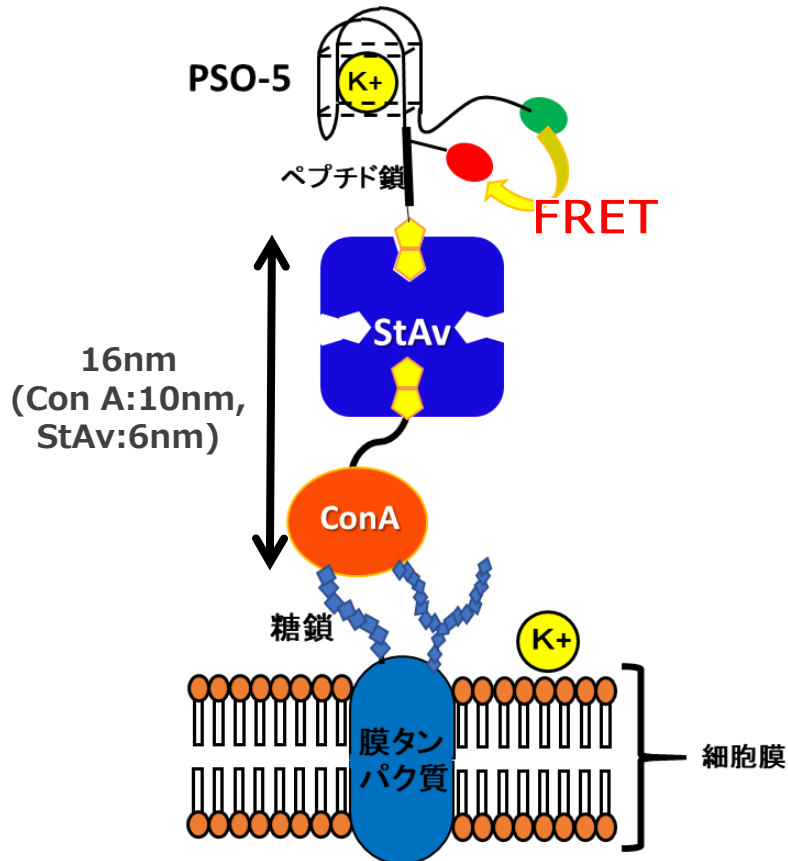


アポトーシス誘導剤 (Amphotericin B, Ouabain, Bumetanide)



細胞内での蛍光変化及びRatio変化

これまでにPSOを細胞質に局在化させることで、アポトーシスに伴う **K<sup>+</sup>流出のリアルタイムイメージング**に世界で初めて成功

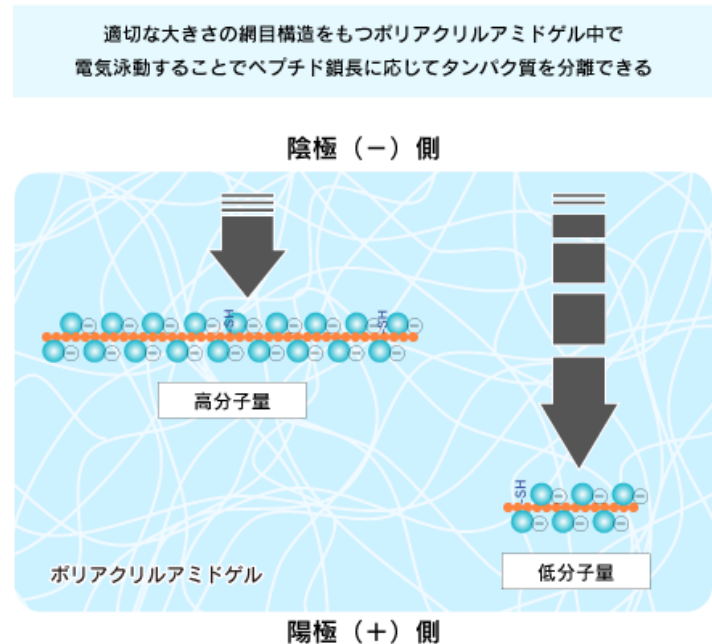


Biotin化ConcanavalinA, StreptAvidin  
を介することで膜表面に局在化

細胞外膜表面にPSOを局在化させ、アポトーシスに伴う  
K<sup>+</sup>流出のイメージングにも成功

# ゲル電気泳動とは？

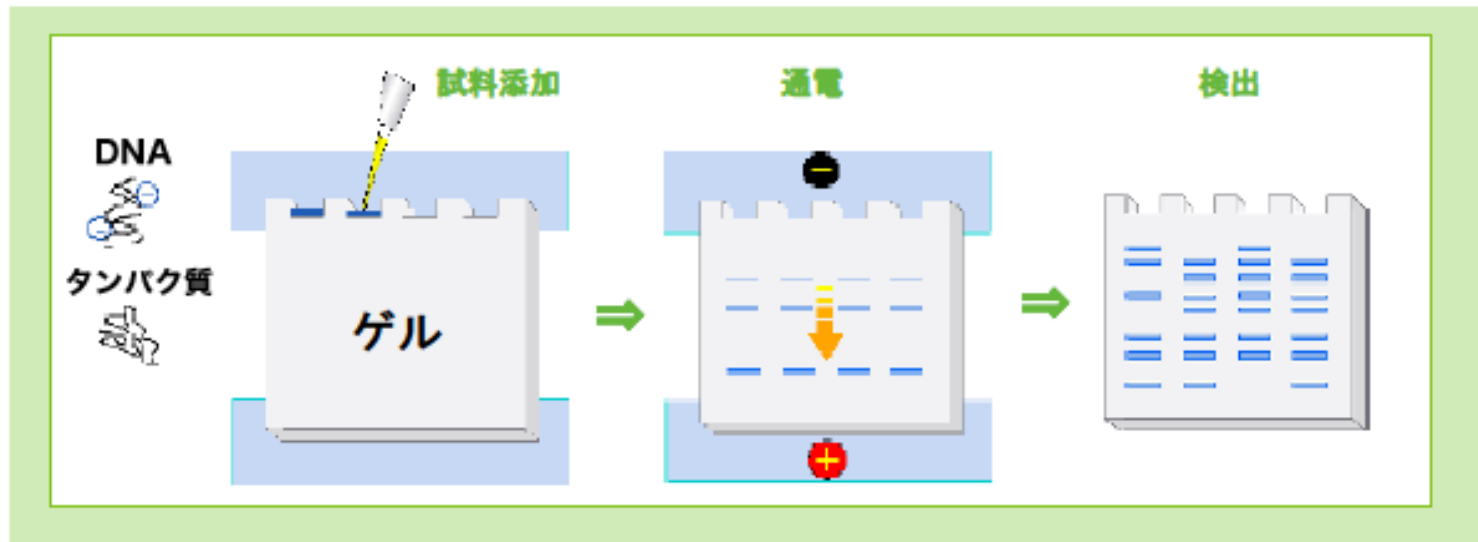
- 核酸や蛋白質をその大きさによって、分離、確認するシステム。
- 精製も可能。
- ゲル中のタンパク質やDNAを電気泳動させると、小さなものほどゲルの網目に引っかからずに早く移動するので、分子量の順にタンパク質やDNAを分離することができます。ゲルの編み目を通り抜ける速さは、個々のタンパク質の分子量だけでなく、高次構造や電荷などの影響を受けます。



# ゲル電気泳動

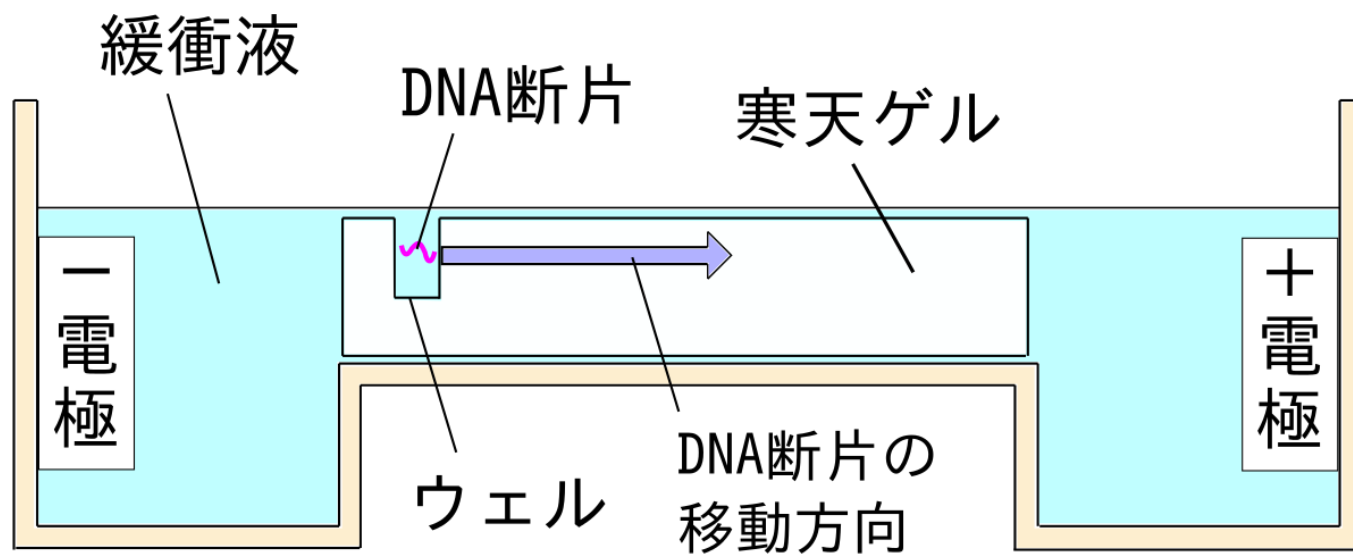
アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル(PAGE)電気泳動、  
SDS-ポリアクリルアミドゲル(PAGE)電気泳動等

ゲルを立てた状態で泳動するスラブ型(PAGE, SDS-PAGE)、  
ゲルを寝せた状態で泳動するサブマリン型(アガロース)がある。



DNAの染色の場合、DNAに結合する蛍光性インターカレータを使うことが多い

# ゲル電気泳動の仕組み





# DNA染色方法

## 2本鎖DNAに結合するエチジウムブロマイド(EtBr)

発がん性があるため、他の色素が利用されることが多い

CyberGreen, GelStarなど、EtBrよりも安全で、バックグラウンドの低い色素が販売されている



## COLUMN エチジウムブロマイドが光るわけ

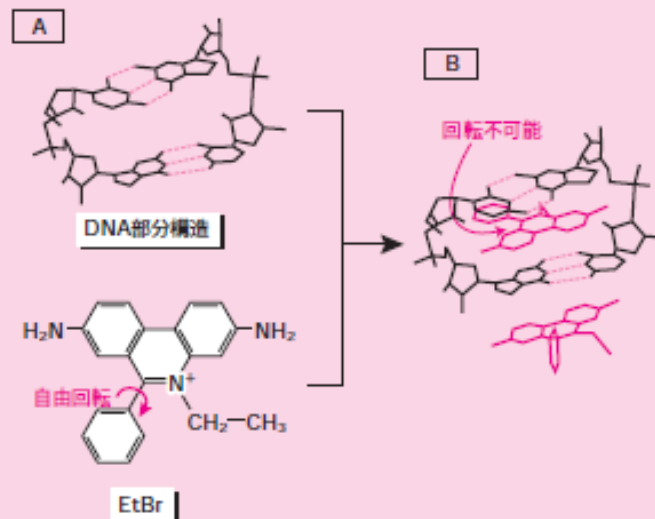
エチジウムブロマイド EtBr は DNA の存在を検出する蛍光試薬である。すなわち EtBr はフリーの状態では紫外線（ブラックライト）を照射しても発光しないが、DNA と結合した状態では発光するのである。

原因は2つ考えられる。1つは DNA からのエネルギー移動である。EtBr は自分では十分な光を吸収することができず、そのため発光を助けるに十分なエネルギーを取り込むことができない。しかし、光を吸収した DNA からエネルギーをもらい、それを使って励起状態になる。

もう1つは EtBr の立体構造である。構造は図 A に示したとおりであり、これが DNA に組み込まれたときには図 B のようになる。違いは

フリーの状態では構造が柔軟であるが、結合状態（DNA に組み込まれた状態）では構造の自由度を失っている。特に顕著なのはフェニル基の回転である。フリーの状態では自由回転可能であるが、結合状態では周りの DNA に取り囲まれて回転は阻止されている。

これは、フリーの状態では励起エネルギーを骨格の振動エネルギーやフェニル基の回転エネルギーとして小出しに使うことができることを意味する。それに対して結合状態ではこのような熱エネルギーとしての放出が不可能になるため、光エネルギーとして一挙に放出することになるのである。



EtBr と DNA の相互作用

# 蛋白質染色方法

## Coomassie色素染色

ゲル内タンパク質の検出法としては、Coomassie色素を用いた染色法が最も一般的です。Coomassie染色試薬は数種の染色法が報告されていますが、G-250 (コロイド状)またはR-250いずれかの色素形態が使用されています。コロイド状Coomassie試薬を用いると、1時間以内にタンパク質を効率的に染色することができます。また、水洗浄を行うだけで脱色が可能です(メタノールや酢酸による洗浄は不要)。

酸性バッファ条件下において、Coomassie色素はタンパク質の塩基性/疎水性残基に結合します。この結果、鈍い赤褐色から濃い青色へと変色します。あらゆる染色法と同様、試薬の活性化学やタンパク質組成の差異により、Coomassie色素試薬による検出レベルは各タンパク質ごとに異なります。例えばCoomassie色素試薬は、一部のタンパク質についてはバンド1つあたりわずか8~10ナノグラムでも検出できますが、大半のタンパク質についてはバンド1つあたり25ナノグラム以上ないと検出することができません。

Coomassie色素による染色法は、単一の既製試薬が利用できる点や、タンパク質を化学的または非可逆的には修飾しない点から、非常に有用性が高いと言えます。最初のステップで水で洗浄することは、色素結合を妨害する残留SDSを除去するために必要です。次いで染色試薬を添加します(通常は約1時間);最後に、水または単純なメタノール:酢酸による脱色手順で、過剰な非結合色素をゲルマトリックスから除去します。化学修飾はされないため、切除されたタンパク質バンドは完全に脱色することができます。その後、質量分析法や配列決定法で分析を行うために、タンパク質を回収することができます。

# 蛋白質染色方法

## 銀染色法

銀染色法は、極めて高感度な比色法により総タンパク質を検出することができます。この染色法では、タンパク質バンドの位置でゲル表面へ金属銀を析出させます。銀イオン(染色試薬中の硝酸銀に由来)が、特定タンパク質の官能基に相互作用および結合します。特にカルボン酸基(アスパラギン酸およびグルタミン酸)、イミダゾール(ヒスチジン)、スルフヒドリル(システイン)、アミン(リシン)などに対して非常に強力な相互作用が発生します。タンパク質への銀イオンの結合特異性や効率をコントロールしたり、結合した銀を金属銀へ有効に変換(可視化)させるには、種々の増感剤/エンハンサー試薬の使用が不可欠です。可視化プロセスは、基本的に写真フィルムの現像プロセスと同様です;銀イオンは金属銀に還元され、黒褐色へと変色します。

銀染色法プロトコルに要する各工程は、試薬品質だけでなくインキュベーション時間やゲル厚による影響も受けます。市販の銀染色キットは、組成やプロトコルが最適化/一貫生産されているため、使用毎の差異が最小限に抑えられるといった利点があります。最適化されたプロトコルを備えたキットでは、使いやすい上に安定したパフォーマンスを誇り、標準ゲル中で0.5ナノグラム未満のタンパク質でも検出できます。

銀染色法では、増強剤としてグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドのいずれかを使用します。これらの試薬を使用した場合、ゲルマトリックス中のタンパク質が化学的架橋を起こすため、質量分析(MS)のために行う脱色/溶出法にはあまり適合しません。したがって、MS-ワークフローの一環として銀染色を実行する場合、感度とタンパク質回収率の最適化を行ってください。

タンパク質の電荷やその他特性に応じて、銀染色によりタンパク質バンドを黒/青茶色/赤/黄に染色するが可能です。これは、2次元ゲル上の重複部分を識別するうえで極めて有用です。

# 放射性同位体（ラジオアイソトープ：RI）による染色

放射性同位体を標識した核酸（リン酸を $^{32}\text{P}$ にしたもの）を取り込んだDNAなどを検出

→ただし、だんだんメーカーもラベル販売の取り扱いをやめつつある。

# アガロースとPAGEの違い

アガロースゲルはゲルの調製が簡単で、分離できる核酸サイズの範囲も広く便利です。しかし、ゲル厚やゲル濃度を調節しても直鎖状DNAの1~2塩基の違いを検出できない。

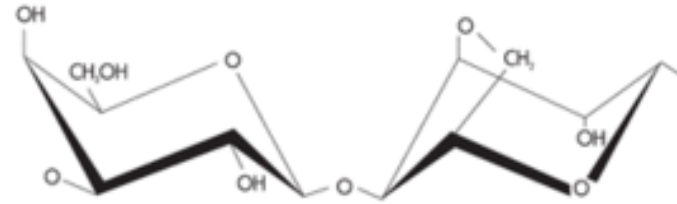
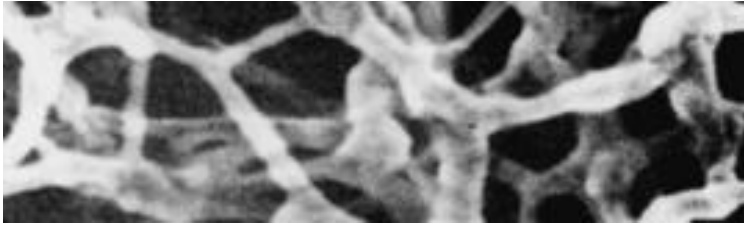
1000~10000 bpの分画に向いている。

アクリルアミドゲルはDNAサイズの分解能が良く1塩基の違いも検出でき、小さいサイズ(数塩基)から数kb程度のサイズの断片の泳動にも使用できる。

しかし、分離できるDNAサイズの範囲が狭いためサイズに合わせてゲル濃度を変える必要がある。

10~1000 bpの分画に向いている。

# アガロースゲル電気泳動の方法



多糖類の構造はガラクトンで、図のように アガロビオース 1-3、 1-4結合によって形成される。この化学構造により、アガロースは低濃度でも非常に耐久性のあるゲルを形成することができる。アガロースゲルの網状構造の形成は水素結合によるもので、このことが“加熱すれば溶解する”という熱可逆性につながっている。

- [準備]
- 50xTAE緩衝液 : 2M Tris-Acetate pH8.0, 0.1M EDTA
- アガロース
- 色素液 : 6倍濃度 (グリセリン、BPB、XC)
- エチジウム・ブロミド溶液 (10mg/ml) : 強い発ガン性があり、取り扱いに注意!!

# アガロースゲル電気泳動の方法

1. 1xTAE(約1litter)緩衝液を準備する。
2. 三角フラスコに寒天を1g量って入れ、100 mlの1xTAE緩衝液を加え、電子レンジで完全に溶かす。(電子レンジで溶かす前にアガロースと1倍TAE緩衝液を十分に混ぜること、沸騰厳禁！)
3. アガロースが冷めたところで(約50°C)、コームをセットしたゲル作成用のホルダーへ注ぐ。この時空気の泡が入らないように注意し、入った場合には滅菌したパスツール・ピペットで取り除く。
4. 完全に固化したところでコームを垂直に上げて取り除き、ゲルをホルダーごと泳動槽へ移し、静かに1xTAE緩衝液をゲルが液面の下になるまで加える。
5. 5  $\mu$ lのDNA溶液と1  $\mu$ lの色素液をパラフィルム上で混合し、全量をゲル穴に加える。
6. 100Vで約30分間泳動する。電気泳動中は高電圧になるのでくれぐれも注意すること！
7. 色素のバンドがゲルの3分の2に達したところで泳動を止め、ゲルを取り出し、0.5-1 $\mu$ gの濃度のエチジウム・ブロミドの入った容器へ移し、ゆっくり振盪して30分間染色する。
8. ゲルを蒸留水の入った容器へ移し、脱染色(30分)する。
9. UVイルミネーターでDNAのバンドを観察し、写真撮影する。

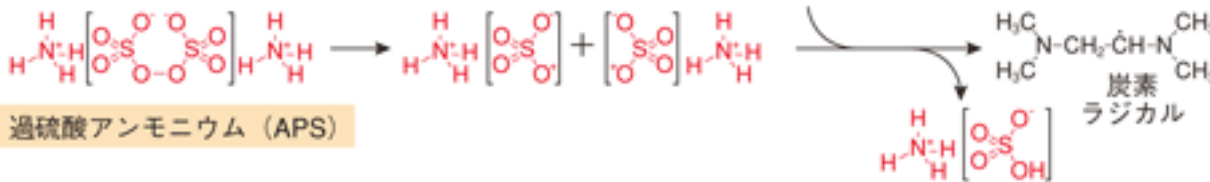
サンプルをゲルに入れる際に、ゲルを突き抜けることがあります。注意！

# ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (非変性 PAGE)

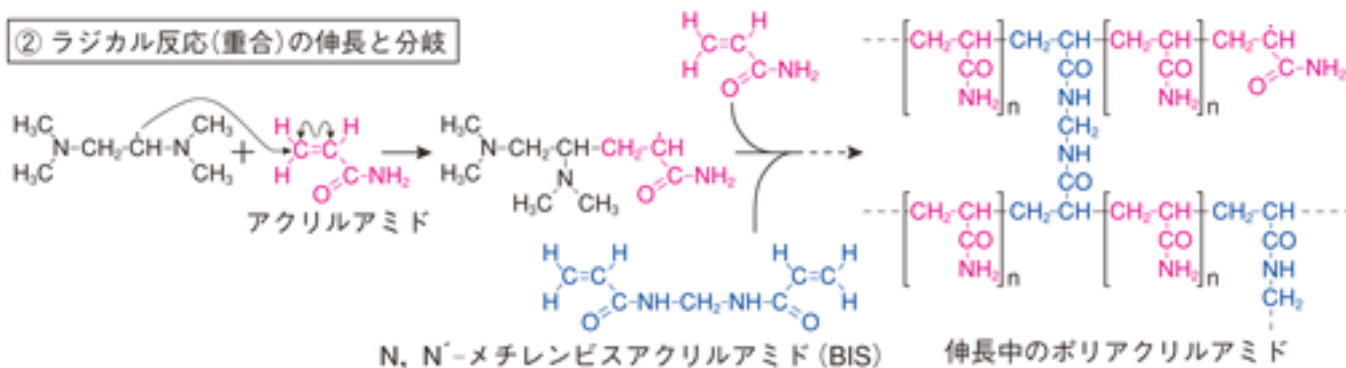
## Principle

N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)

### ① ラジカル反応(重合)の開始



### ② ラジカル反応(重合)の伸長と分岐



### ③ ラジカル反応(重合)の停止



ポリアクリルアミドゲル作製の重合反応

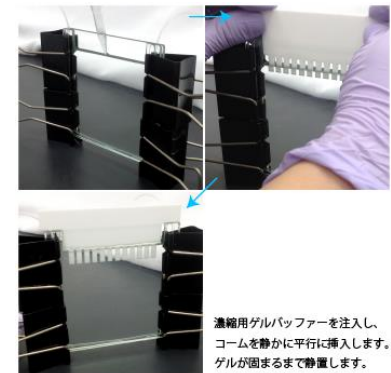


# ポリアクリルアミドゲル電気泳動(非変性PAGE)

- [準備]
- 40(w/v)%-アクリルアミド/ビス混合液(19:1)
- 5xTBE 緩衝液: トリスヒドロキシメチルアミノメタン 5.39 g, ホウ酸 2.75g, EDTA・2Na 0.37g を超純水で100 mLにメスアップ。
- テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)
- 10%過硫酸アンモニウム水溶液(1回分ずつ小分けして、冷凍保管)
- 色素液: 6倍濃度(グリセリン、BPB、XC)
- エチジウム・ブロミド溶液(10mg/ml): 強い発ガン性があり、取り扱いに注意!!

# ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (非変性PAGE)12.5%アクリルアミドの場合

1. 【ATTOのミニゲルの場合】ガラス板をエタノールできれいに拭き上げ、セットしておく。
2. 40(w/v)%-アクリルアミド/ビス混合液(19:1)を2.5 mL, 5xTBEを 2mL, 超純水 3.5 mLをファルコンチューブに合わせて、よく混合する。
3. 10%過硫酸アンモニウム 50 uL, TEMED 5 uLを2に加えて、ファルコンチューブのフタをし、転倒混和を3-4回行う。
4. 混合後、直ちに、1のゲルに注ぎ込み、コームを差し込む。この際、気泡が入らないように、注意する。
5. 全体を、ラップでかるく包み、37 °Cのインキュベータに静置する。1時間ほどで固まる。
6. 泳動槽にセットする直前にコームを外す。
7. 泳動槽にガラス板をセットし、気泡が入らないように、1xTBEを注ぎ込む。
8. DNAサンプル10 uLと色素液 2uLをパラフィルム上で混合し、12 uLすべてをコームでできたウェルに入れる。なるべくゲルの真ん中にセットするのが良い。
9. 200 Vで90分泳動する(時間は、状況によって変化する)。2つの色素の最初の色素がゲル板を流れ切らないくらいで止め、ゲルを取り出し、0.5-1 $\mu$ gの濃度のエチジウム・ブロミドの入った容器へ移し、ゆっくり振盪して30分間染色する。
10. ゲルを蒸留水の入った容器へ移し、脱染色(30分)する。
11. UVイルミネーターでDNAのバンドを観察し、写真撮影する。



濃縮用ゲルバッファーを注入し、コームを静かに平行に挿入します。ゲルが固まるまで静置します。

# ゲル濃度の目安

## 3.1.1. DNA分離用のアガロースゲル濃度の目安

Gel percentage	DNA size range
0.5%	1–30 kb
0.7%	0.8–12 kb
1.0%	0.5–10 kb
1.2%	0.4–7 kb
1.5%	0.2–3 kb
3–4% sieved agarose	0.01–1 kb

## 3.1.3. タンパク質分離用のポリアクリルアミドゲル濃度の目安

Gel percentage	Protein size range
5%	57 - 212 kDa
7.5%	36 - 94 kDa
10%	16 - 68 kDa
15%	12 - 43 kDa

## 3.1.2. DNA分離用のポリアクリルアミドゲル濃度の目安

Gel percentage	DNA size range
3.5%	1,000–2,000 bp
5.0%	75–500 bp
8.0%	50–400 bp
12.0%	35–250 bp
15.0%	20–150 bp
20.0%	5–100 bp

# ゲル濃度と色素移動度の目安

## 3.2.1. 未変性ポリアクリルアミドゲルでの色素の移動

Gel percentage	Bromophenol blue	Xylene cyanol
3.5%	100 bp	460 bp
5.0%	65 bp	260 bp
8.0%	45 bp	160 bp
12.0%	20 bp	70 bp
15.0%	15 bp	60 bp
20.0%	12 bp	45 bp

## 3.2.2. 変性ポリアクリルアミドゲルでの色素の移動

Gel percentage	Bromophenol blue	Xylene cyanol
5.0	35 nucleotides	130 nucleotides
6.0	26 nucleotides	106 nucleotides
8.0	19 nucleotides	75 nucleotides
10.0	12 nucleotides	55 nucleotides
20.0	8 nucleotides	28 nucleotides

# SDS-PAGEとは

ゲル中のタンパク質を電気泳動させると、小さなタンパク質ほどゲルの網目に引っかからずに早く移動するので、分子量の順にタンパク質を分離することができます。ゲルの編み目を通り抜ける速さは、個々のタンパク質の分子量だけでなく、高次構造や電荷などの影響を受けます。

タンパク質の高次構造や電荷などの影響をできるだけ排除し、ペプチド鎖長のみが反映された泳動結果を得るために、SDS (Sodium dodecyl sulfate = Sodium lauryl sulfate)とポリアクリルアミドゲルを利用した電気泳動系がSDS-PAGEです。

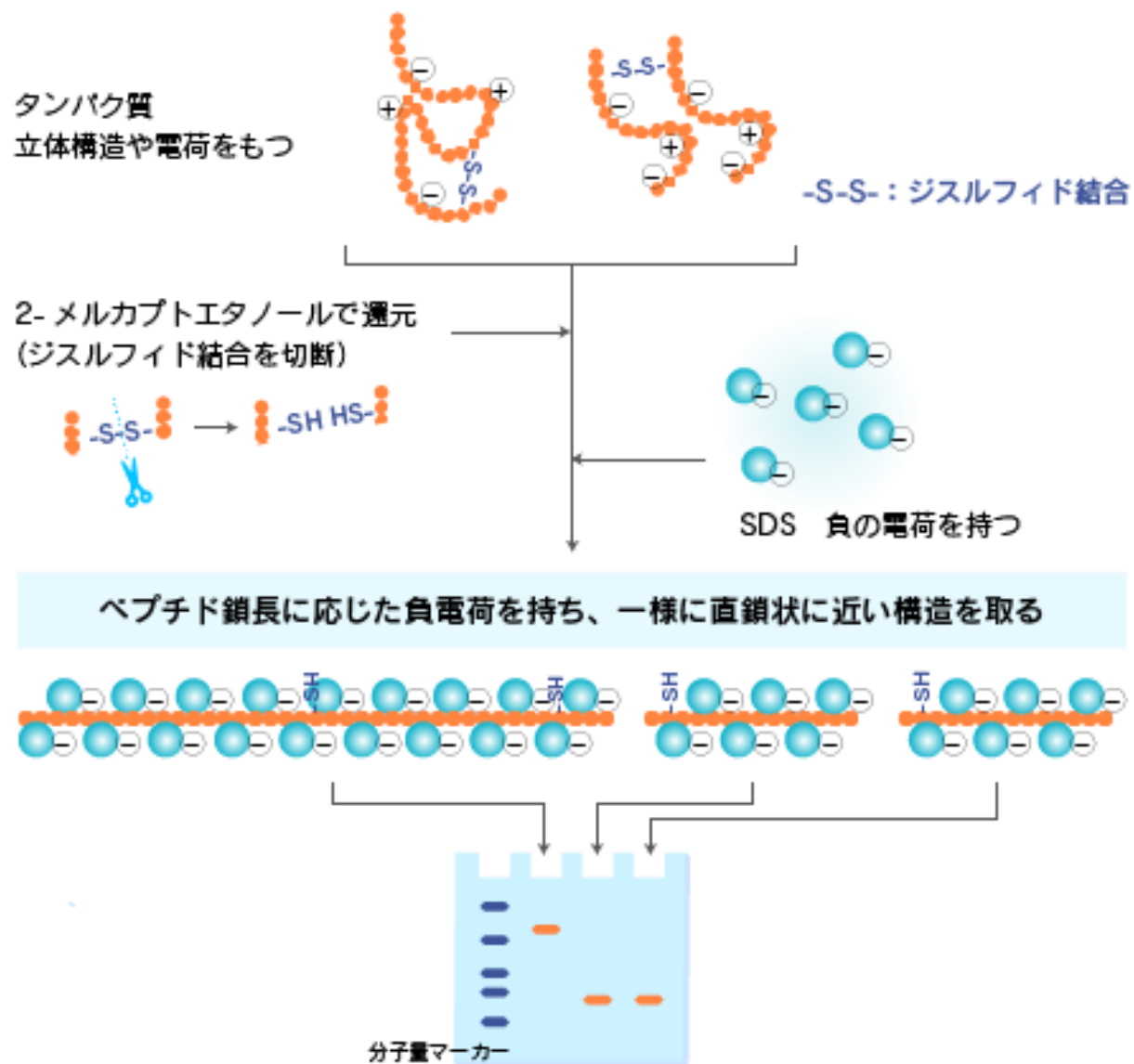
SDSはタンパク質の主ペプチド鎖部分に一定の割合で結合する性質があり、タンパク質変性作用が強い界面活性剤です。そのため、タンパク質はSDSの存在(かつタンパク質の立体構造形成上重要なジスルフィド結合を切断するような還元条件)下では、ペプチド鎖長に応じた負電荷を持ち、一様に直鎖状に近い構造を取ることになります。

他方、重合したアクリルアミド(ポリアクリルアミド)は一般的な分子量のタンパク質を分離するのに適切な大きさの網目構造を持ち、硬度も取扱いしやすいものです。SDSを作用させたタンパク質試料をポリアクリルアミドゲル中で電気泳動することで、容易・安価・比較的正確にペプチド鎖長に応じてタンパク質を分離することができます。

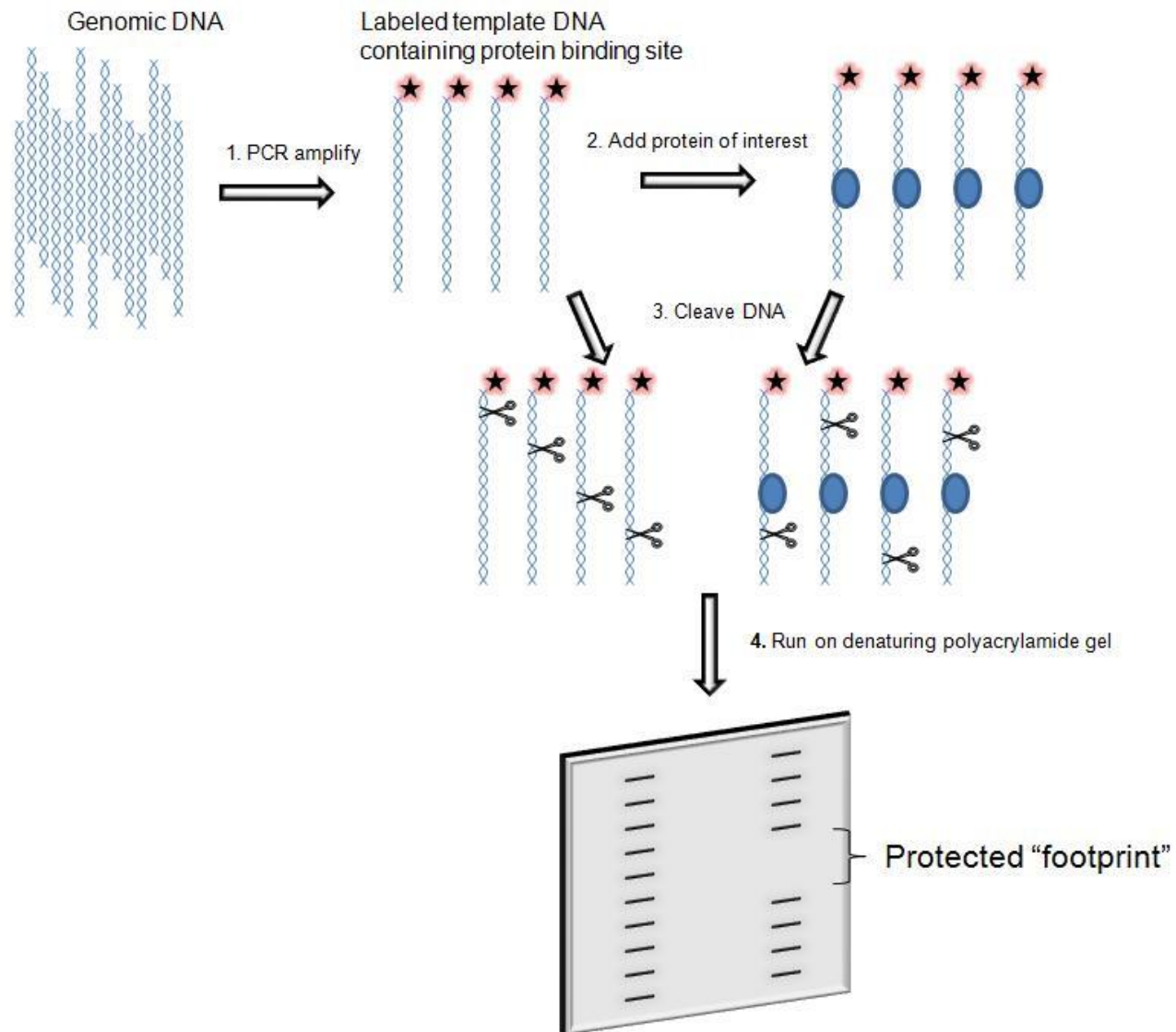
ただし、蛋白質が2量体なのか、など、高次構造まで識別したいときは、(非変性)PAGEを用いる。

<http://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/sds-page.html>

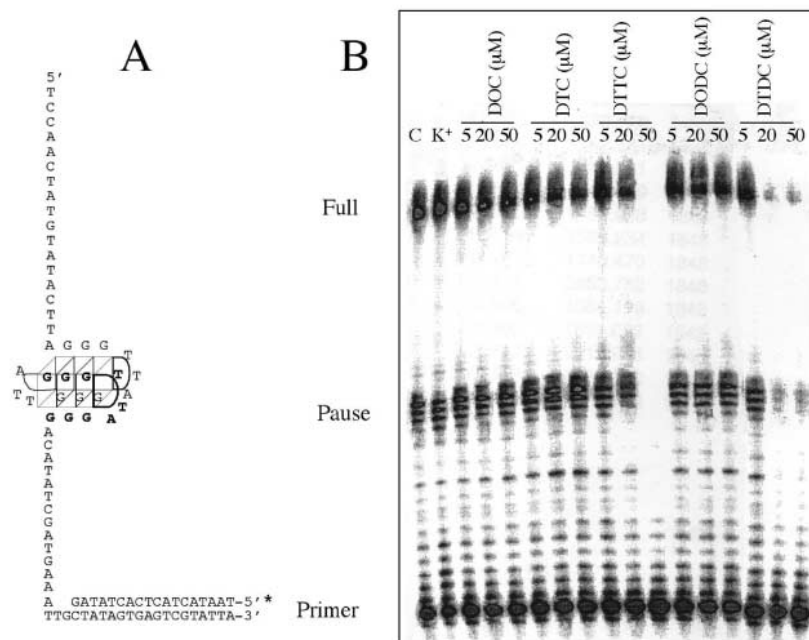
# SDS-PAGE



# ゲル電気泳動の応用-DNA footprinting



# ゲル電気泳動の応用-ポリメラーゼストップアッセイ



**Figure 2.** (A) Primer/template used in the polymerase stop assay. The template contains a region consisting of four repeats of the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG), which forms a G<sup>4</sup>-DNA structure under the assay conditions. (B) Autoradiogram of the polymerase stop assay products. 5'-Labeled primer was annealed with the template strand in 10 mM Tris, pH 8.0, containing 50 mM KCl. The primer/template was incubated with the carbocyanines at the indicated concentrations for 15 min, and the primer extension reactions were initiated by the addition of dNTP (100 μM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), and Taq polymerase (2.5 U/reaction). After 15 min incubation at room temperature, stop buffer (95% formamide, 10 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.1% xylene cyanol) was added and the products separated by PAGE.



## 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。