

# バイオ計測学特論05

2021年度 第4Q

佐藤しのぶ

# 本日のトピック

- 水晶発振子マイクロバランス法 (QCM)
- 表面プラズモン共鳴 (SPR)

# QCM(水晶発振子マイクロバランス法)とは

## [原理]

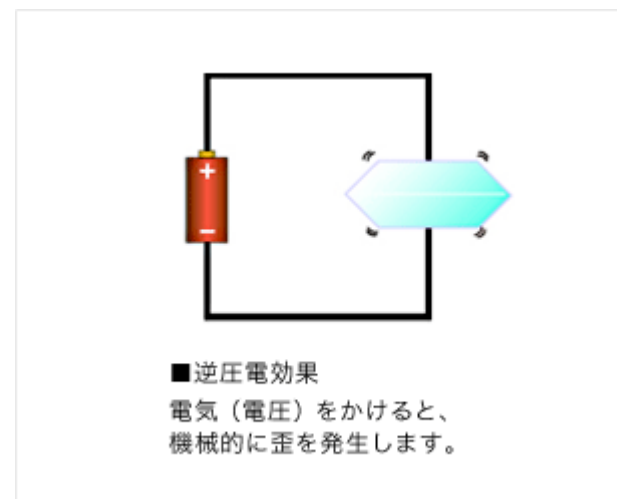
水晶振動子（水晶発振子とも呼ぶ）とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加するとある一定の周波数（共振周波数）で振動する性質を示します。

金属薄膜上にナノグラム程度の物質が吸着すると物質の質量に比例して共振周波数が減少するため、微量天秤として利用することができます。

# QCM(水晶発振子マイクロバランス法)とは

## [水晶の圧電効果]

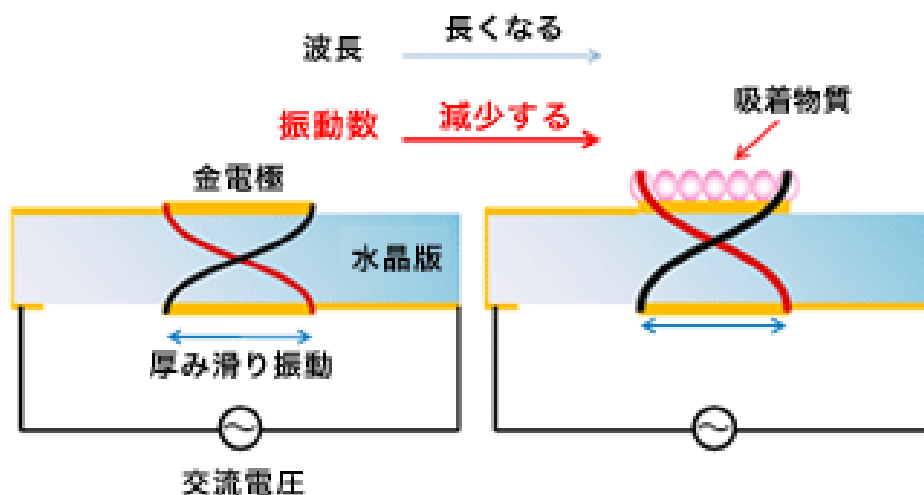
ある種の結晶では、機械的なひずみをかけると結晶内の原子の位置関係が変化し、結果としてひずみの大きさに比例した分極が生じます。この現象は圧電効果 (piezoelectric effect) と呼ばれ、1880年にフランスの物理学者キュリー兄弟によって発見されました。これとは逆に結晶に電場をかけると機械的なひずみを生じます (逆圧電効果)。これらの現象は水晶、ロッシェル塩、電気石などの結晶に見いだされていますが、その中でも特に水晶 (石英 quartz ;  $\text{SiO}_2$ ) は、圧電特性、化学的性質、熱的安定性に優れていることが知られているため、最も用いられます。



# QCM(水晶発振子マイクロバランス法)とは

## [水晶振動子マイクロバランス法]

水晶振動子には様々な種類がありますが、AT-カットという角度で切り出した水晶板薄膜の両面に電極を作製した水晶振動子は厚みすべり振動 (Thickness-shear-mode resonator) と呼ばれ、水晶面に水平な方向にずり振動します。この時の水晶振動子の周波数は水晶の厚さで決まり、薄い水晶板を用いるとより高い周波数で振動する水晶振動子が得られます。



# QCM(水晶発振子マイクロバランス法)とは

水晶板の周波数が、電極上の物質の質量に応じて変化していることが1950年代に報告されました。周波数の変化量と付着物質の質量との関係は、Sauerbrey (ザウアーブレイ) 式と呼ばれる次式で表され、付着物質量が増加すると周波数が減少し、付着物質量が減少すると周波数が増加します。この現象を利用し、水晶振動子の周波数変化を検出することで、その電極上での物質の質量変化を計測する方法を水晶振動子マイクロバランス法 (QCM法) と呼びます。

Sauerbreyの式

$$\Delta F = -\frac{2F_0^2}{\sqrt{\rho_Q \mu_Q}} \frac{\Delta m}{A}$$

$\Delta F$  : 周波数変化量

$\Delta m$  : 質量変化量

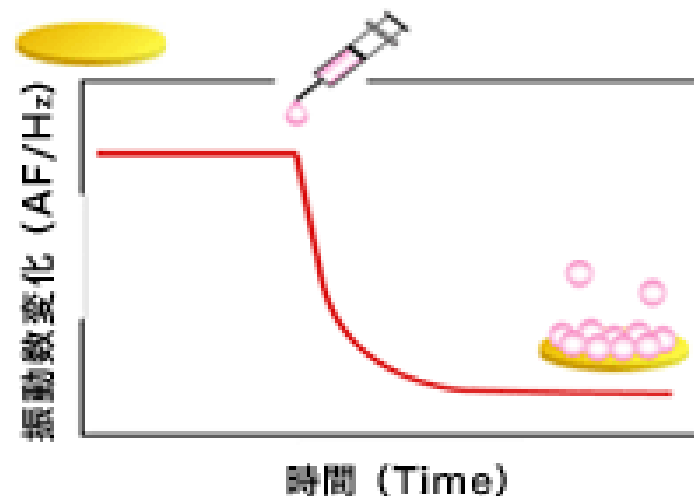
$F_0$  : 基本周波数

$\rho_Q$  : 水晶の密度

$\mu_Q$  : 水晶のせん断応力

$A$  : 金電極面積

$$\begin{array}{l} \Delta F \quad \Delta m \\ -1 \text{ Hz} = 0.62 \text{ ngcm}^{-2} \\ \text{(27MHz センサー上)} \end{array}$$



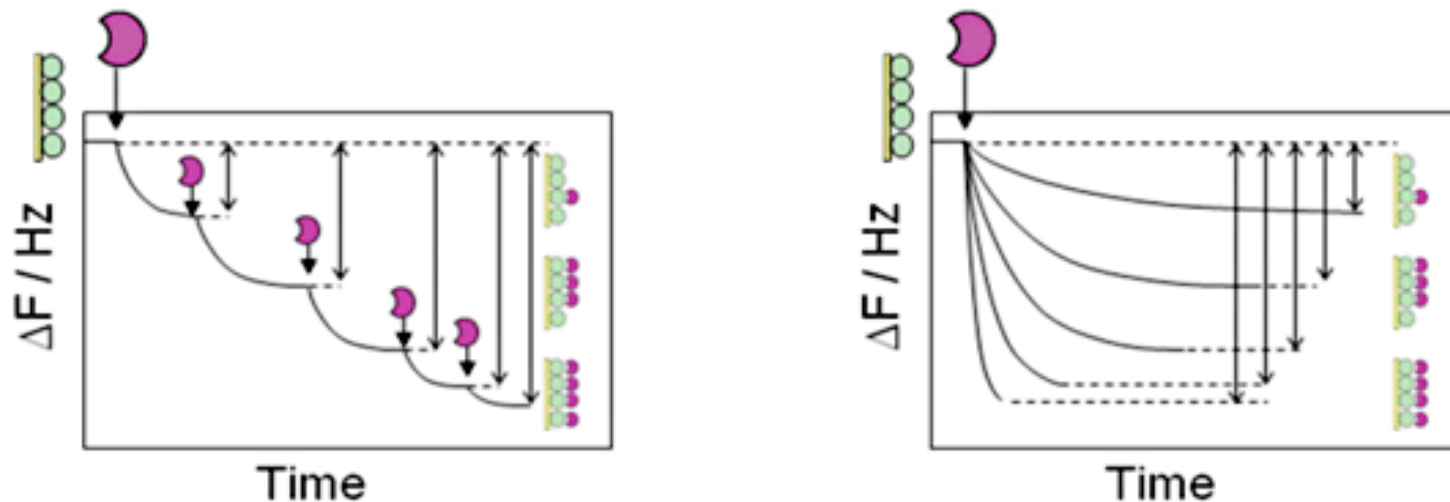
# QCM(水晶発振子マイクロバランス法)でできること

- 気相、液相共に測定可能。
- センサー表面へのナノグラムレベルの吸着量を定量化できる。
- タンパク質などの生体分子でもラベル化することなく、ネイティブに近い状態で相互作用を検出できる。
- 吸着反応をリアルタイムに測定できる。

★ 27 MHzの基本振動数を持つ水晶振動子の場合、1Hzの振動数減少が0.62 ng/cm<sup>2</sup>のセンサー表面上の質量増加を示すことが理論的にも実験的に実証されている。

# パラメータの算出について

ある基質Sに蛋白質Pが結合するときの結合定数の算出



セルには、8 mLのbuffer, センサ上には、X ngの基質Sが吸着  
→Sの吸着量の絶対量が算出できる。

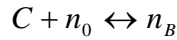
10  $\mu\text{M}$ の蛋白質Pを10  $\mu\text{L}$ 添加すると、セルには、Pは100 pmol添加される。  
→このうち、10 pmolが結合すると、系中には、フリーなPが90 pmol存在する  
10  $\mu\text{M}$ の蛋白質Pを繰り返し添加し、吸着しなくなるまで添加する。

Scatchad解析が適用可能！



## 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。



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。

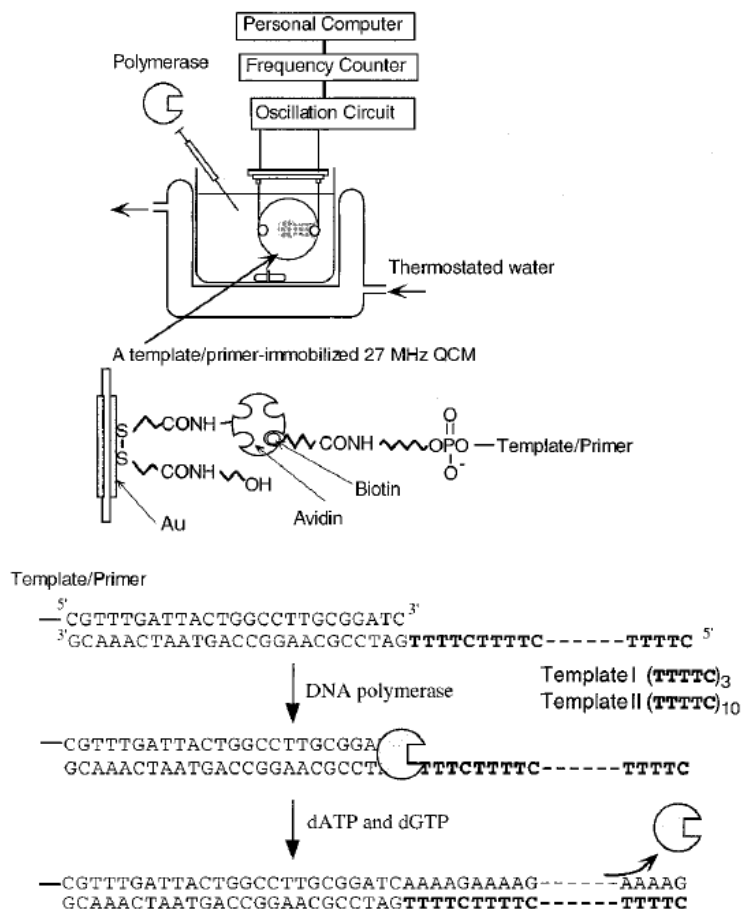
# パラメータの算出について

$$r/LF = K(n - r) \quad (1)$$

ここで、 $n$ は結合個数、 $LF$ はリガンドに結合していない蛋白質濃度、 $r$ はリガンドに結合した蛋白質の量、を求めてScatchardプロットを行い、(1)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。

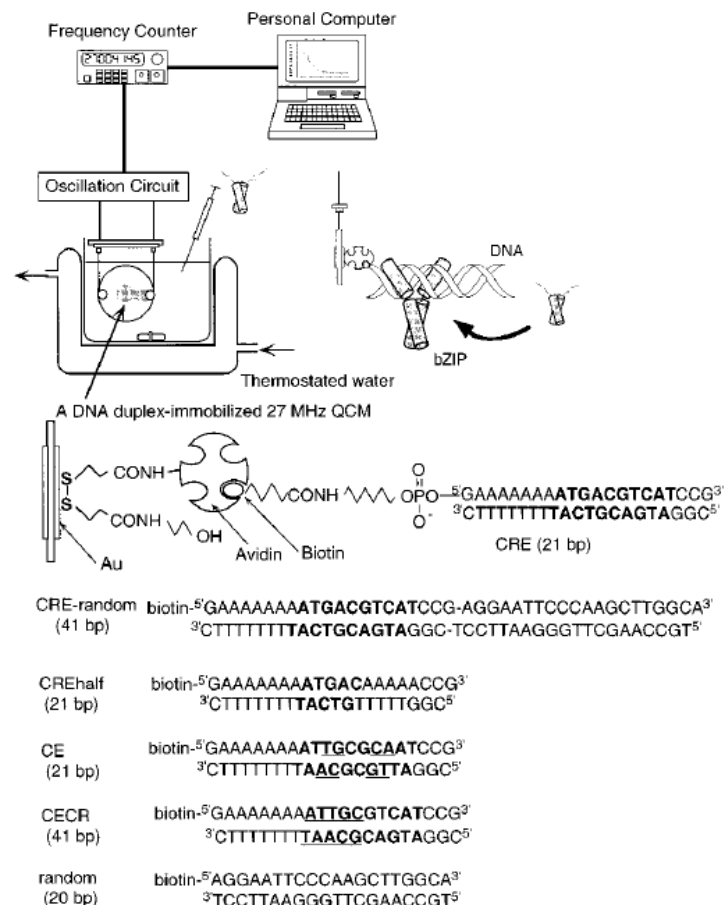
# 測定例

(A)



**Figure 1.** Experimental setup of a polymerase reaction on a template/primer-immobilized 27-MHz quartz-crystal microbalance (QCM) in buffer solution.

(B)



**FIGURE 1:** A schematic illustration of a 27-MHz QCM measurement system and chemical structures of immobilized DNA strands on the Au electrode (4.9 mm<sup>2</sup> area) of the QCM.

# 実験方法（チップ調整方法）

## チップの前処理

ピランハ溶液(30%過酸化水素水：濃硫酸=1:3)をパスツールピペットで一滴発振子の金表面にのせ、5分間放置し、その後超純水で水洗した。もう一度、同様の操作を行い、前処理を行った。前処理後、次に示す手順によりストレプトアビジン修飾プレートを準備した。

### ピランハ溶液

無機固体表面から有機残渣を除去するピラニア処理で用いられる強酸性の溶液で、濃硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) と過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 水溶液を混合したものである。非常に強い酸化剤として働き、ほとんどの有機物を除去し、ほとんどの表面を水酸化（ヒドロキシル基-OHを付加）して高い親水性の表面に変える。

### 調製法

一般的に用いられるピラニア溶液は濃硫酸：30%過酸化水素水を3：1で混合したものである。混合時は過酸化水素水に濃硫酸を静かに加える。溶解時に発熱するため、注意して加えないと突沸する！**過酸化水素が自己分解していくため、使用する度に新規に調製する。保存はできない。**使用後の上清や余りは希釈、中和するなど、事業所の廃棄手順に必ず従う。

# 実験方法（チップ調整方法）

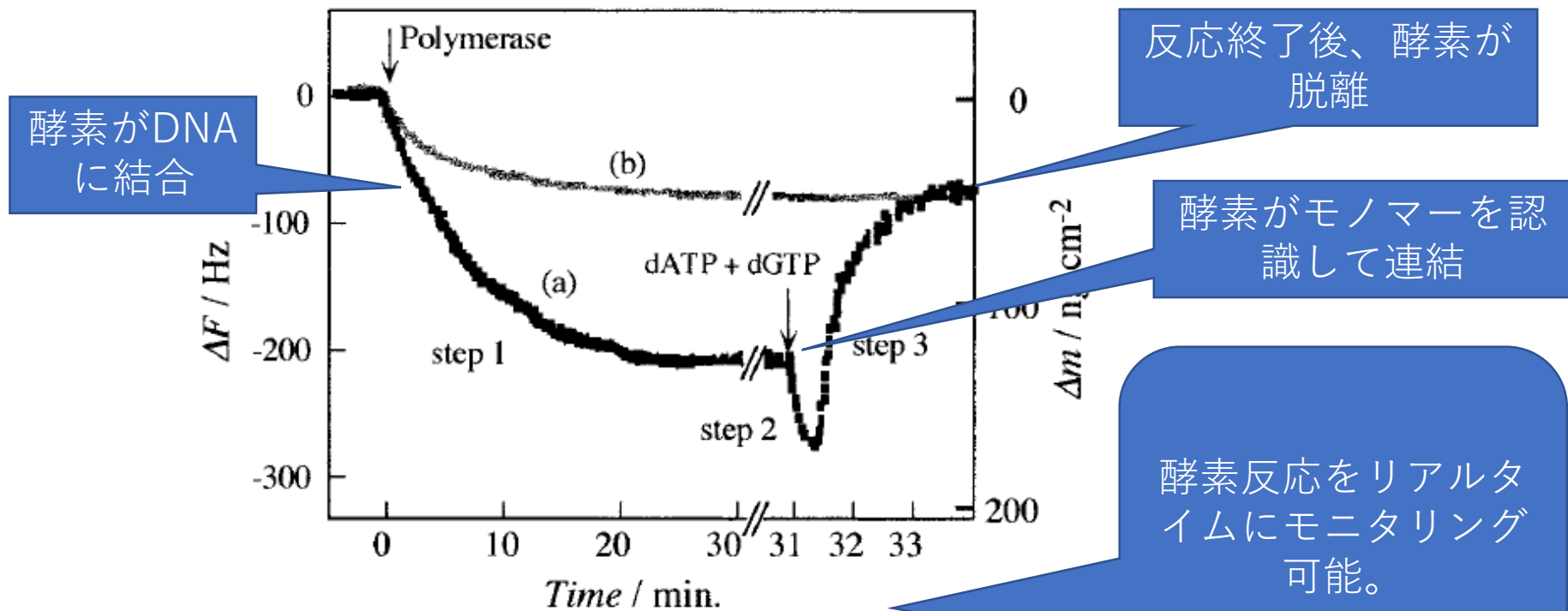
## 【チオール化DNA固定化の場合】

- ① 0.5  $\mu$ M チオール化DNA(保護基 ; HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-S, 0.5 M NaCl溶液)を10  $\mu$ L 添加。37 ° Cで一晩、保湿タッパ中でインキュベートする。【セル中で振動数変化をリングしてもOK】
- ② 水洗後、1 mM 6-メルカプトヘキサノール溶液10  $\mu$ Lを添加し、45 ° Cで1hインキュベートする。

## 【アビジン固定化の場合】 →ビオチン化DNAやビオチン化蛋白質を固定化可能

- ① 1mMジチオプロピオン酸エタノール溶液を100ml発振子上に乗せて湿度を保ち45分放置する。
- ② **直前に調整した**100 mg/mlの1-(3-Dimethylaminopropyl)-3 ethylcarbodiimide, hydrochloride(EDC)水溶液と100 mg/mlのN-Hydroxysuccinimide(NHS)水溶液を等量混合した物を100ml発振子上に乗せて湿度を保ち**20分**放置する。
- ③ 0.15 mg/mlのストレプトアビジン水溶液(1 mM HEPES pH8.0)を10ml発振子上に乗せて湿度を保ち60分放置する。
- ④ 1 Mの2-アミノプロパノール水溶液を100 ml発振子上に乗せて湿度を保ち30分放置する。

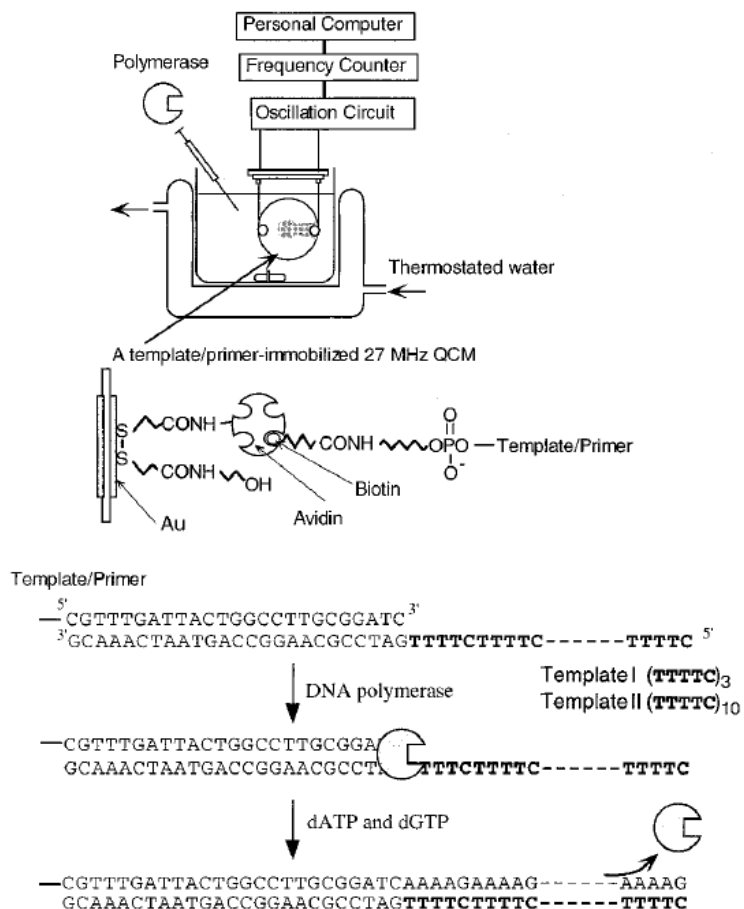
# ポリメラーゼによる伸長反応



**Figure 2.** Typical time courses of frequency changes of the Template 1 (TTTTTC)<sub>3</sub>-immobilized QCM, responding to the addition of polymerase (Klenow fragment) and monomers (dATP and dGTP). (a) Polymerase was added at first, and then excess monomers were added after the enzyme bound. (b) Polymerase was added in the presence of excess monomers. Reaction conditions: 30 °C, pH 7.8, 20 mM Tris buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, [Klenow fragment] = 7.0 pmol per 8 mL, [dATP] = [dGTP] = 520 nmol per 8 mL.

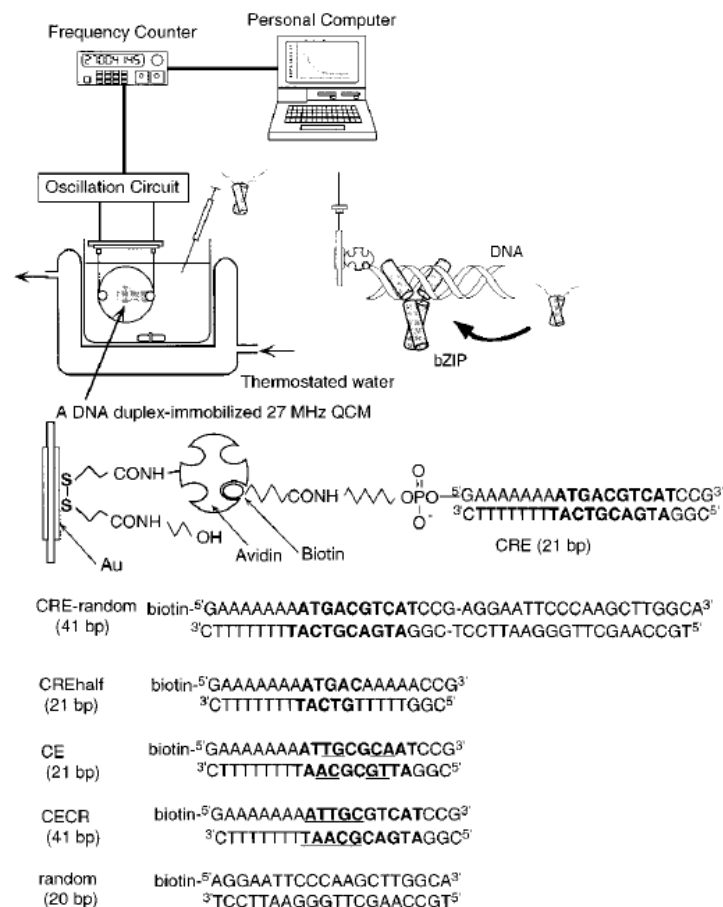
# 測定例

(A)



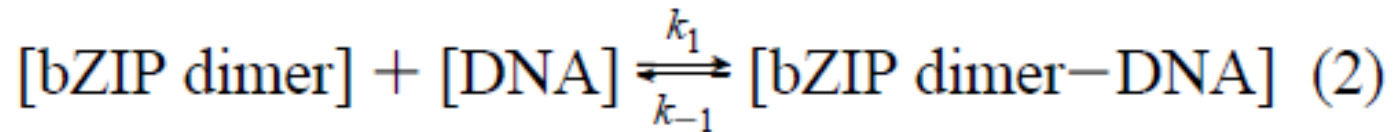
**Figure 1.** Experimental setup of a polymerase reaction on a template/primer-immobilized 27-MHz quartz-crystal microbalance (QCM) in buffer solution.

(B)



**FIGURE 1:** A schematic illustration of a 27-MHz QCM measurement system and chemical structures of immobilized DNA strands on the Au electrode (4.9 mm<sup>2</sup> area) of the QCM.

# 蛋白質とDNAによる相互作用の速度論解析



The amount of bZIP dimer-DNA complex formed at time  $t$  after injection is given by eqs 3–5

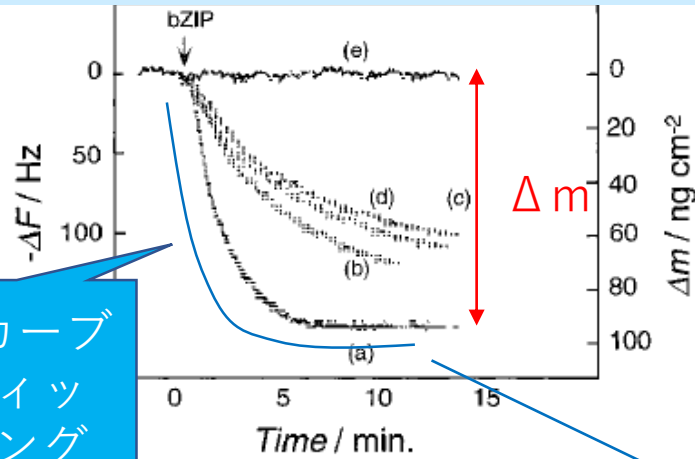
$$[\text{bZIP dimer-DNA}]_t = [\text{bZIP dimer-DNA}]_\infty (1 - e^{-1/\tau t}) \quad (3)$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{\max} (1 - e^{-1/\tau t}) \quad (4)$$

$$\tau^{-1} = k_1 [\text{bZIP dimer}]_0 + k_{-1} \quad (5)$$

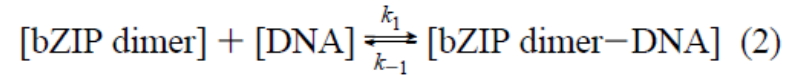
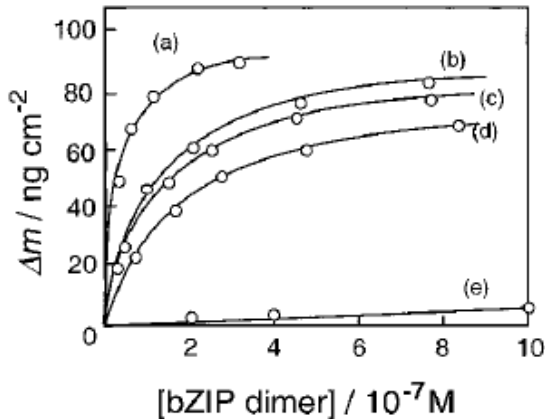


# $k_{on}$ , $k_{off}$ の算出



このカーブ  
をフィッ  
ティング

(B)



The amount of bZIP dimer-DNA complex formed at time  $t$  after injection is given by eqs 3-5

$$[\text{bZIP dimer-DNA}]_t = [\text{bZIP dimer-DNA}]_\infty (1 - e^{-t/\tau}) \quad (3)$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{\max} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (4)$$

$$\tau^{-1} = k_1 [\text{bZIP dimer}]_0 + k_{-1} \quad (5)$$

$$\frac{[\text{bZIP dimer}]_0}{\Delta m} = \frac{[\text{bZIP dimer}]_0}{\Delta m_{\max}} + \frac{1}{\Delta m_{\max} K_a} \quad (1)$$

FIGURE 6: (A) Time courses of bZIP binding to the 27-MHz QCM immobilized with (a) CRE (21 bp), (b) CREhalf (21 bp), (c) CECR (21 bp), (d) CE (21 bp), and (e) random 20 bp (20 °C, pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M KCl, [bZIP] = 0.2 μM). (B) Saturation binding behavior against bZIP dimer concentrations.

# $k_{\text{on}}$ , $k_{\text{off}}$ の算出

$$\tau^{-1} = k_1 [\text{bZIP dimer}]_0 + k_{-1} \quad (5)$$

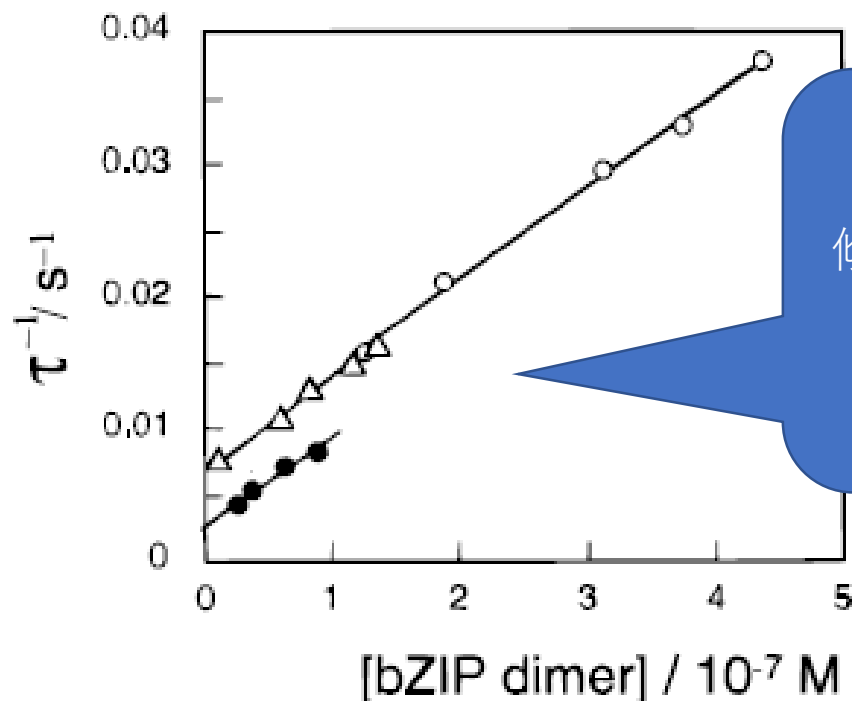
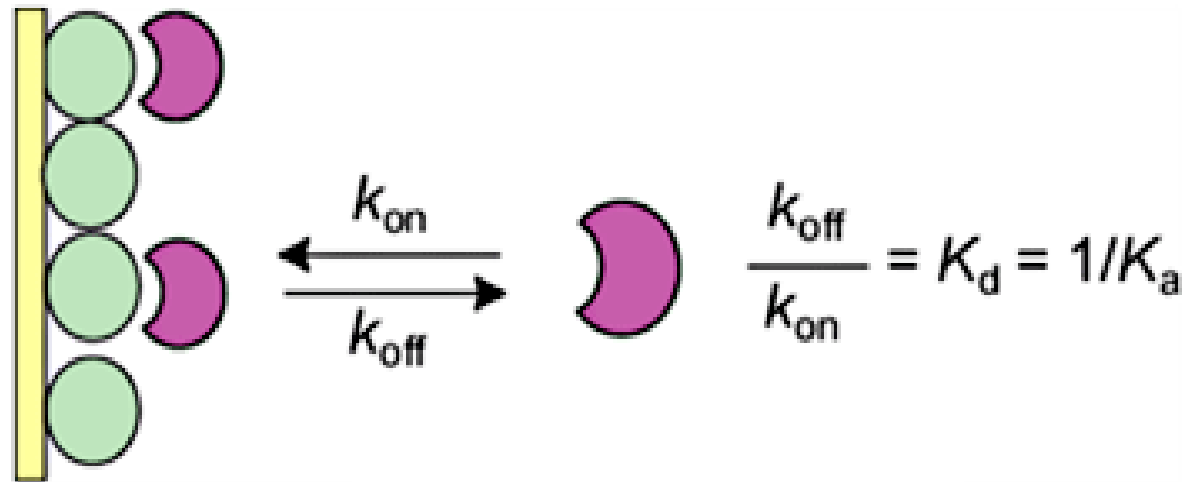


FIGURE 9: Linear reciprocal plots of relaxation time ( $\tau$ ) against [bZIP dimer] according to eq 5: (●) CRE, (△) CECR, and (○) CE 21-bp DNAs.

# パラメータの算出について

水晶発振子



相互作用の速度定数と結合定数

$k_{on}$  : 会合速度定数 ( $M^{-1}s^{-1}$ )

$k_{off}$  : 解離速度定数 ( $s^{-1}$ )

$K_d$  : 解離定数 (M)

$K_a$  : 会合定数 ( $M^{-1}$ )

# DNase I センサの切断確認

(a) 酵素が電極上の DNA を切断

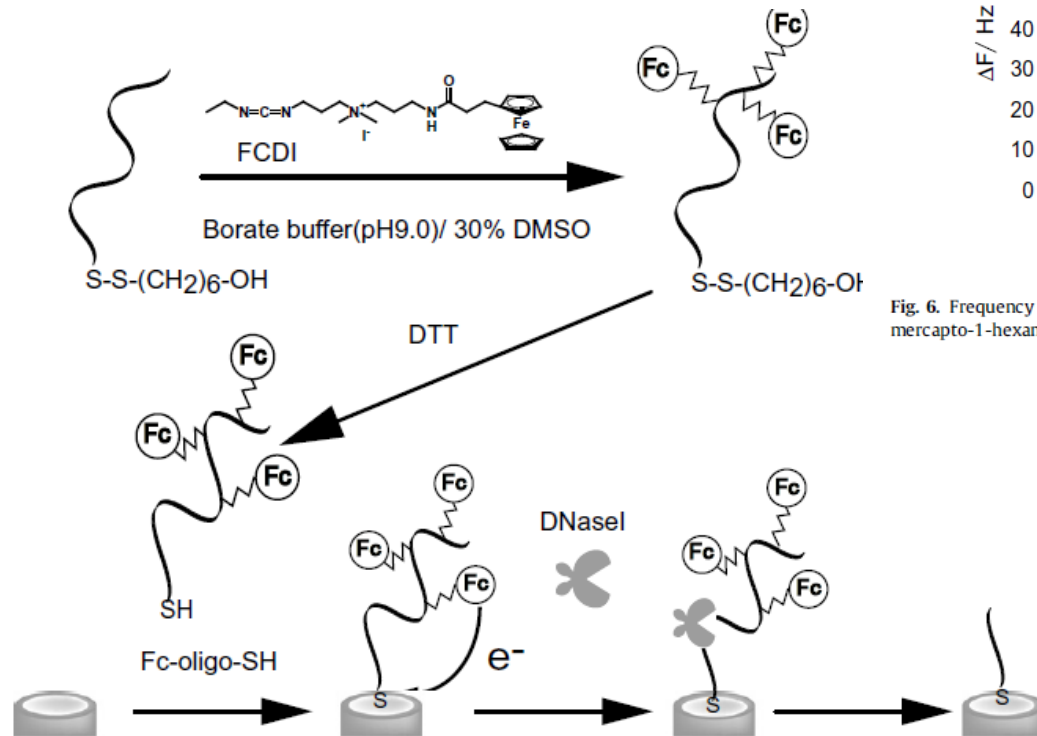


Fig. 1. Principle of electrochemical DNase I assay based on Fc-oligo-SH-immobilized electrode and chemical structure of FCDI.

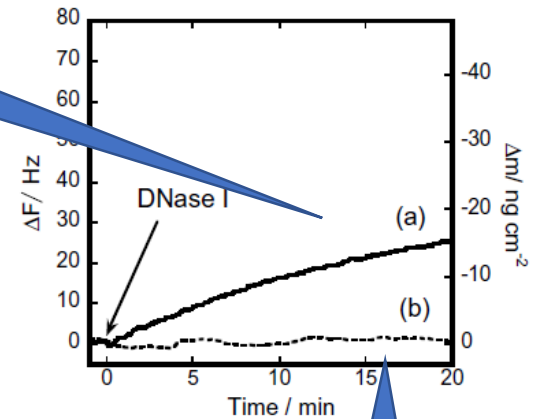
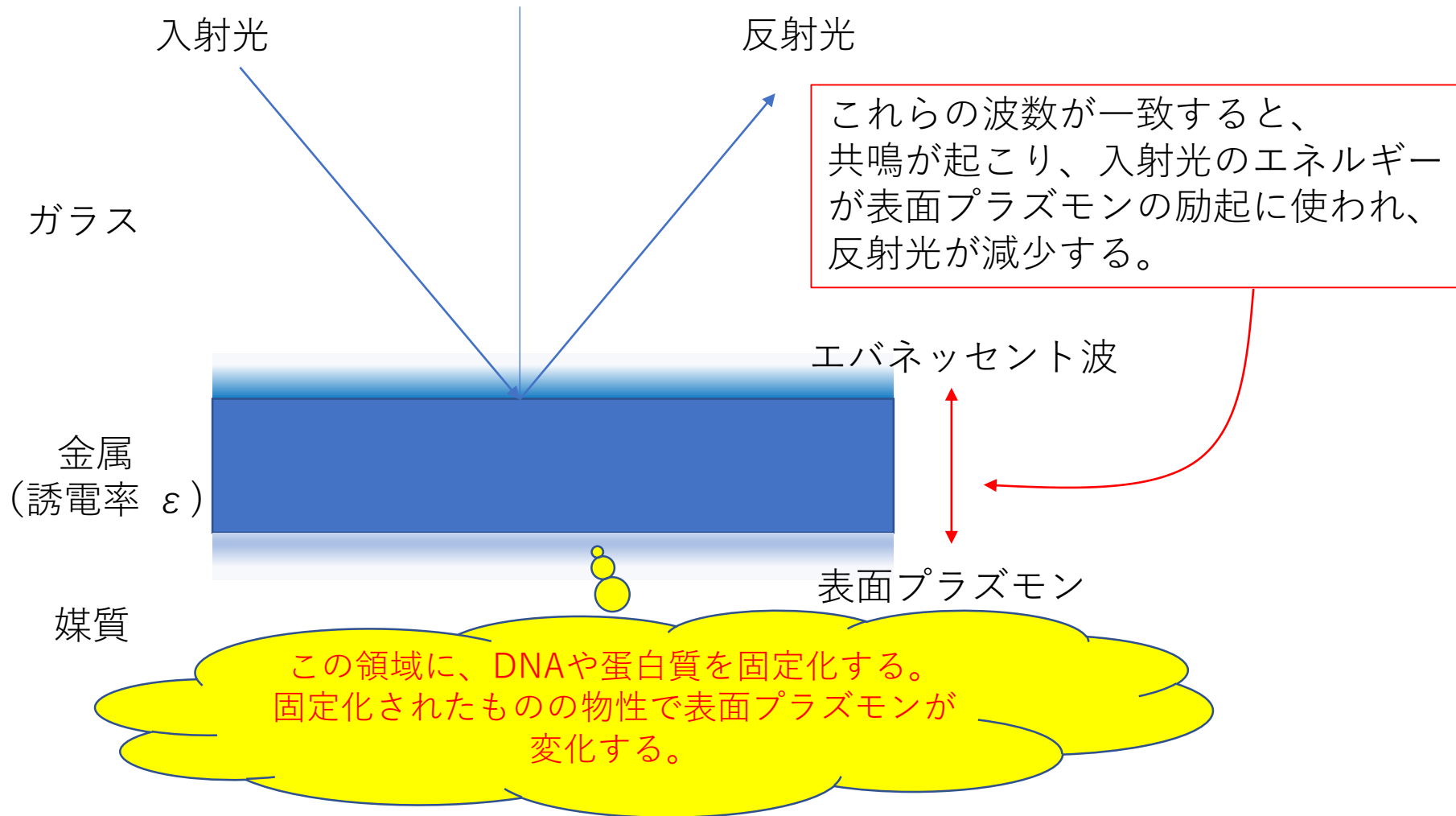


Fig. 6. Frequency change of QCM chip immobilized with the Fc-oligo-SH (a) or 6-mercapto-1-hexanol (b) after the addition of  $5 \times 10^5$  units/ $\mu$ l DNase I.

(b) 電極上にDNAがないので、反応は起こらず、電極上のD重量は変化しない

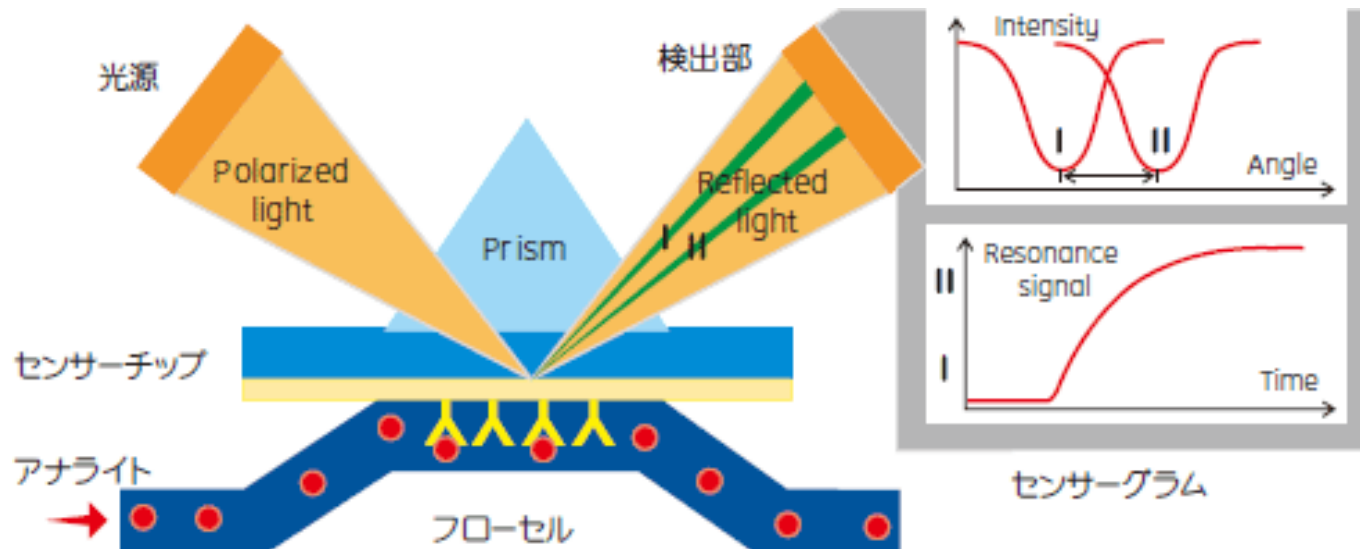
# SPR(表面プラズモン共鳴)とは



# SPR(表面プラズモン共鳴)とは

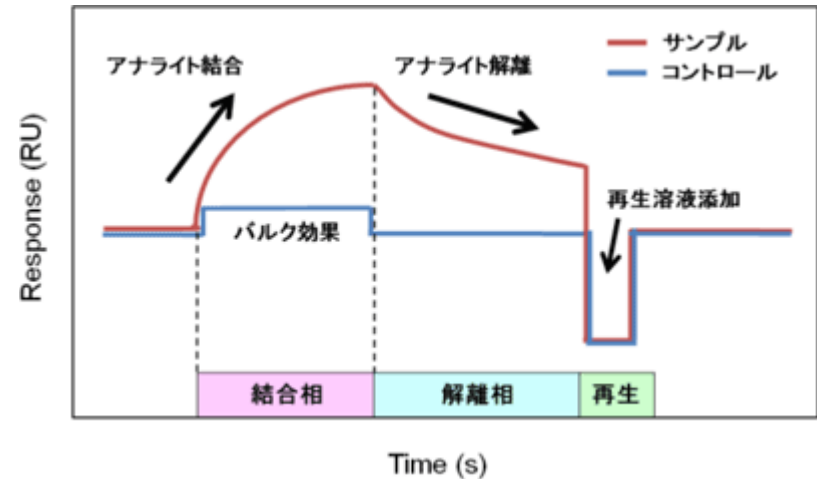
相互作用をみたい物質のうち一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）ができます。相互作用をみたい物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化します。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がIからIIにシフトします。

逆に結合が解離するとシグナルの位置はIIからIに戻ります。



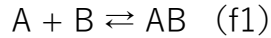
# SPR(表面プラズモン共鳴)とは

一般に、固定化した分子をリガンド、試料として流路に流す分子をアナライトと呼びます。ある一定時間一定速度の連続したアナライトの添加により、リガンドが結合した流路にはアナライトの結合が見られ、コントロールの流路にはバルク効果がしばしば現れます。これが結合相であり、ここから二分子間の結合速度定数 $k_{\text{ass}}$  (1/Ms)を求めることができます。アナライトの添加が終わると、流路には緩衝液のみが流れリガンドに結合したアナライトの解離をモニターする解離相に移ります。ここから、二分子間の解離速度定数 $k_{\text{diss}}$  (1/s)を求めることができます。モニター終了後、二分子間の結合を解くような溶液条件の再生溶液を添加し、アナライトを完全に解離させ初期状態に戻します。



# 結合の反応速度と平衡状態

一般に、溶液中で分子Aと分子Bが相互作用する場合、この二種を混合すると複合体ABが形成されます。これは反応式 (f1) で示され、二分子反応と呼ばれます。



各分子のt時間後における濃度を[A]、[B]、[AB]とすると、時間経過と共に[AB]が増加し、ある一定の割合となったとき平衡状態に達します。ここで二分子反応の反応動力学定数 (kinetic parameters) として、結合速度定数 (association rate constant、単位:  $\text{Ms}^{-1}$ ) を $k_{\text{ass}}$ 、解離速度定数 (dissociation rate constant、単位:  $\text{s}^{-1}$ ) を $k_{\text{diss}}$ とすると、複合体の濃度変化率 $d[\text{AB}]/dt$ は (f2) 式で表され、A、B、ABの測定時点での濃度に依存します。

$$d[\text{AB}]/dt = k_{\text{ass}}[\text{A}][\text{B}] - k_{\text{diss}}[\text{AB}] \quad (f2)$$

平衡状態では結合速度と解離速度は等しいですから、複合体ABの濃度の変化率 $d[\text{AB}]/dt$ はゼロとなるため、下記の式を導くことができます。

$$k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}} = [\text{A}][\text{B}]/[\text{AB}] = \text{KD} \quad (f3)$$

$k_{\text{diss}}$ と $k_{\text{ass}}$ の比から、解離定数KD (dissociation constant、単位: M) が算出され、この値が小さいほど結合が強いことを示します。また結合定数KA (association constant、単位:  $\text{M}^{-1}$ ) は解離定数の逆数となります。

(f2) 式において、A、Bの濃度はいずれも反応に伴い減少するため、初期濃度を、 $[\text{A}]_0$ 、 $[\text{B}]_0$ とすると、 $[\text{A}] = [\text{A}]_0 - [\text{AB}]$ 、 $[\text{B}] = [\text{B}]_0 - [\text{AB}]$ を用いて書き換えることができます。

$$d[\text{AB}]/dt = k_{\text{ass}}([\text{A}]_0 - [\text{AB}])([\text{B}]_0 - [\text{AB}]) - k_{\text{diss}}[\text{AB}] \quad (f4)$$

片方の濃度、例えばAの濃度をBに対して「大過剰」用いることにより、Aの減少量を無視すると $[\text{A}]_0 - [\text{AB}] = [\text{A}]_0$ となり、(f4) 式を変形すると (f5) 式が誘導されます。

$$d[\text{AB}]/dt = k_{\text{ass}}[\text{A}]_0[\text{B}]_0 - (k_{\text{ass}}[\text{A}]_0 + k_{\text{diss}})[\text{AB}] \quad (f5)$$

さらに、 $k_{\text{ass}}[\text{A}]_0 + k_{\text{diss}} = k_{\text{app}}$ と置き換えれば、

$$d[\text{AB}]/dt = \text{定数} - k_{\text{app}}[\text{AB}] \quad (f6)$$

(f6) 式において、[AB]の変化量は見掛け上の一次反応として取り扱うことができます。求められる見掛けの反応速度定数 $k_{\text{app}}$   $= k_{\text{ass}}[\text{A}]_0 + k_{\text{diss}}$  (単位:  $\text{s}^{-1}$ ) は既知の $[\text{A}]_0$ に依存するので、 $k_{\text{app}}$ を $[\text{A}]_0$ に対してプロットすると結合速度定数 $k_{\text{ass}}$  (単位:  $\text{Ms}^{-1}$ ) を算出することができます。



# フローシステムを採用したSPR測定における速度論の取扱い

前述のように、速度定数の測定のためには二分子反応であっても見掛け上の一次反応の条件を作り出せば良いわけです。GE社Biacoreのようなフロー法を採用している測定系では、固定化した固相の分子Bに液相の分子Aを一定の濃度で供給し続けるシステムを持っています。すなわち (f2) 式において、[A]は時間に関係なく[A]<sub>0</sub>の状態を保持することで[A] >> [B]の条件を満たさなくとも[A] = [A]として扱うことが可能です。アナライツ濃度をC、形成された複合体濃度をレスポンスの変化量Rに置き換え、[B]<sub>0</sub>を最大結合量R<sub>max</sub>に対応させると、速度式は

$$dR/dT = k_{ass} C(R_{max} - R) - k_{diss} R, \quad (f7)$$

(f7) 式のように表され、これを変形すると下記の式を導くことができます。

$$dR/dT = k_{ass} C R_{max} - (k_{ass} C + k_{diss}) R, \quad (f8)$$

これは (f5) 式と同形であり、一次反応の取り扱いができることとなります。

ここで、上述の反応速度論的解析法では、得られたセンサーグラムを非線形最小二乗法により直接カーブフィッティングさせ、解析する非線形解析 (Non linear fitting) 法は、例えばGE社製Biacoreに付属の解析プログラムを用いることで可能となります。解析にはLocal fitting (アナライツの各濃度に対する1本のセンサーグラムごとに一つずつパラメータを算出) とGlobal fitting (アナライツの全濃度にわたって同時にカーブフィッティングを行う) があります。

低アフィニティーの相互作用では反応が極めて早く平衡へと移行し、その結果、結合領域および解離領域が極めて短く、速度論的解析が困難になることがあります。その場合については、アナライツ濃度を変化させ、平衡に達したときのRU値の解析からReqを直接測定してKDを求めることもできます。(f8) 式において  $dR/dt = 0$ 、 $R = Req$ 、 $k_{diss}/k_{ass} = K_D$ と置き換えて変形すると (f9) 式が得られます。

$$Req/C = R_{max}/K_D - Req/K_D, \quad (f9)$$

Req/CをReqに対してプロット (Scatchard Plot) すると直線が得られ、その傾きの逆数からKDの算出が可能となるわけです。

# van't Hoffエンタルピー（ファントホッフエンタルピー）

相互作用の結合定数の温度変化を求めることで、ファントホッフエンタルピーを計算することができます。

結合のギブスエネルギー変化は

$$\Delta G/T = \Delta H/T - \Delta S, \quad (f10)$$

と表すことができます。この温度微分は

$$d(\Delta G/T)/dT = d\Delta H/TdT - \Delta H/T^2 - d\Delta S/dT, \quad (f11)$$

となります。ここで

$$d\Delta H = \Delta Cp dT \text{ならびに} d\Delta S = \Delta Cp dT/T, \quad (f12)$$

ですので、(f11)式は

$$d(\Delta G/T)/dT = \Delta Cp/T - \Delta H/T^2 - \Delta Cp/T = -\Delta H/T^2, \quad (f13)$$

と書き換えることができます。ギブスエネルギーと解離定数 $K_D$ は

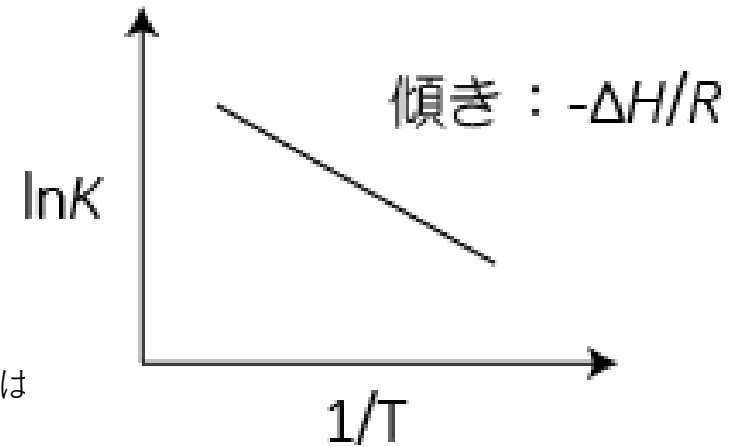
$$\Delta G = RT \ln K_D, \quad (f14)$$

(f13) (f14) 式から

$$d \ln K_D / d(1/T) = -\Delta H/R, \quad (f15)$$

が導かれます。ここでは $d(1/T)/dT = -1/T^2$ を用いました。

(f15) 式から、平衡定数の対数と温度の逆数をプロット（線形ファントホッフプロット）することで、反応のエンタルピーを求めることができます。熱測定に頼らずにファントホッフエンタルピー変化量を求めることができるというわけです。



# SPR実験のポイント

- 相互作用の特性に応じて、異なる実験条件を設定する必要があること
- チップ表面に結合するすべての分子の総質量を観察していること
- 測定のたびにチップに固定されている分子の構造・活性が初期状態に戻っていることを確認する必要があること

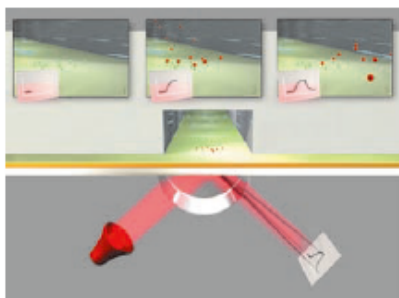
# チップの調整方法 (Biacoreの例)

## センサーチップ

### センサーチップ選択ガイド



2種類の形状の異なるセンサーチップがあります。お使いのBiacoreシステムに合ったセンサーチップをお選びください。



表面プラズモン共鳴という現象を応用して生体分子の相互作用解析をリアルタイムに行います。

Biacoreで相互作用を研究するためには、相互作用の一方の分子(リガンド)をセンサーチップ表面に固定化します。固定化はリガンドをセンサー表面に直接カップリングする方法、または表面にあらかじめカップリングされたキャプチャー分子を介した間接的な捕捉法のいずれかでを行います。分子間相互作用は、リガンド分子を固定化したセンサーチップ表面にサンプルをインジェクションしてモニタリングします。インジェクション後、結合した分子を選択的に解離させてセンサー表面を再生します。再生用パッパァーは、固定化されたリガンド分子の結合特性に影響を与えずに、結合分子を完全に解離できるように条件を最適化することが重要です。

豊富な種類のセンサーチップを取り揃えていますので、固定化する分子の種類および解析の内容によって最適なセンサーチップを選択することができます。リガンド分子の固定化量は、アッセイの種類によって調整する必要があります。一般的に濃度測定および特異性解析の場合には固定化量が多い方がよく、一方、カインेटクス解析では固定化量をなるべく少なくすることをおすすめします。

	Sensor Chip CM5	Sensor Chip CM7	Sensor Chip CM4	Sensor Chip CM3
	CM基を導入したデキストランをつけたタイプ	CM基の密度が高いタイプ (固定化量 CM5の3倍)	CM基の密度が低いタイプ (固定化量 CM5の1/3)	CMデキストランが多いタイプ (固定化量 CM5の1/3)
固定化する分子				
タンパク質	● アミノ基、チオール基、アルデヒド基およびカルボキシル基を介した固定化	● アミノ基、チオール基、アルデヒド基およびカルボキシル基を介した固定化	● 夾雑物の正電荷が高い場合	● アナライトが巨大な場合
タグ付タンパク質	● 6Sタグ付きのタンパク質を抗6S抗体を介して間接的に固定化			
膜結合分子				
核酸	● アミノ基で修飾されている分子の場合	● アミノ基で修飾されている分子の場合	● 夾雑物の正電荷が高い場合	● アナライトが巨大な場合
糖質	● アルデヒド基を介して固定化する場合	● アルデヒド基を介して固定化する場合	● 夾雑物の正電荷が高い場合	● アナライトが巨大な場合

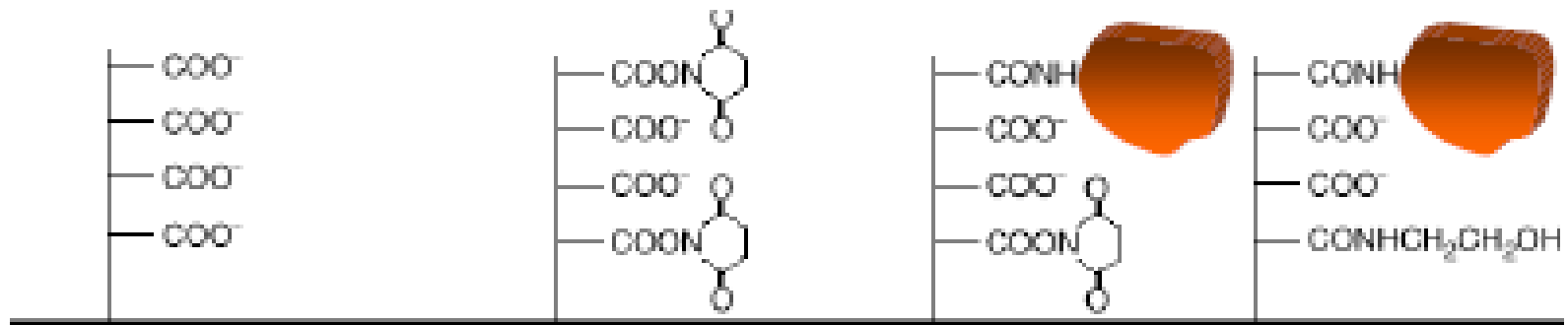
Sensor Chip C1	Sensor Chip SA	Sensor Chip HPA	Sensor Chip L1	Sensor Chip NTA
金面にCM基を直接導入したタイプ (固定化量 CM5の1/10)	ストレプトアビジンを固定化したタイプ	金面を脱水層でコーティングしたタイプ	デキストラン層に脱水層を導入したタイプ	NTAを固定化したタイプ
● アナライトが多量または巨大な場合	● ビオチン化されている場合			
		● 阻害単分子系に組み込んで固定化	● 阻害二重系に組み込んで固定化	● His-タグタンパク質を固定化
● アナライトが多量または巨大な場合	● ビオチン化されている場合			
● アナライトが多量または巨大な場合	● ビオチン化されている場合			

この表はBiacoreシステム発売以来の多くの研究者のさまざまなタンパク質相互作用研究にもとづいて作成されました。

# リガンドの固定化方法

## ビアコア CM5の場合: カルボキシメチルデキストラン修飾チップ

①アミンカップリングリガンド表面に存在するアミノ基（N末端アミノ基あるいはリジン  $\epsilon$ -アミノ基）を利用して固定化する方法。CMデキストランのカルボキシル基をNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、プレコンセントレーションを利用して濃縮したリガンドを固定化する。残った活性NHS基をエタノールアミンでブロッキングする。



# リガンドの固定化方法

## ビアコア CM5の場合: カルボキシメチルデキストラン修飾チップ

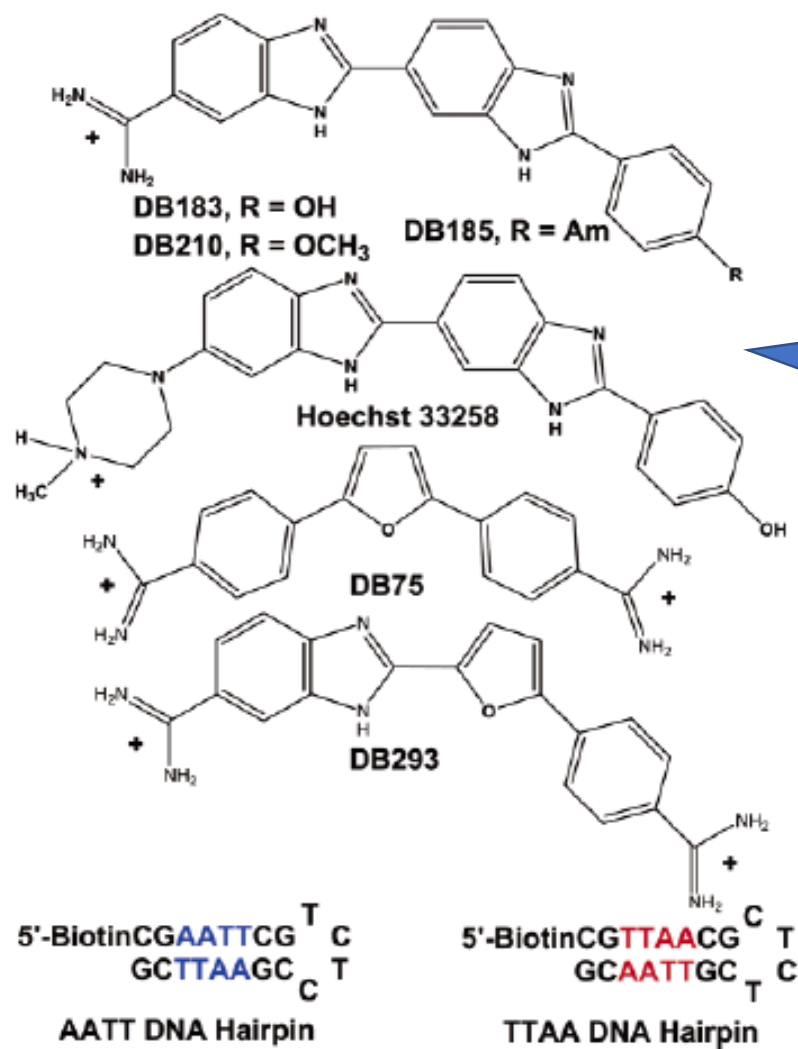
②アルデヒドカップリング法 糖タンパク質の糖鎖を介して固定化する方法である。あらかじめ糖タンパク質をメタ過ヨウ素酸で還元し、糖鎖の非還元末端を開裂（ホルミル基に）させたものを作成する。また、センサーチップ表面は、ヒドラジン等でアミノ基末端を作成する。メタ過ヨウ素酸処理済リガンドをインジェクトし、シッフ塩基で固定化後、還元して（アマドイ転移）共有結合化させる方法である。

（準備するもの） ・ 5mM ヒドラジン溶液 ・ メタ過ヨウ素酸処理糖タンパク質（BIAapplication Handbook を参照） ・ 0.1M Na-cyanoborohydride in 10 mM Acetate buffer (pH4) ・ 再生溶液（例、10 mM Gly-HCl, pH2）

③リガンドチオールカップリング法 リガンド表面にある遊離のチオール基を介して固定化する方法である。

（準備するもの） ・ リガンド（プレコンセンタレーション効果のある緩衝液に希釈したもの。） ・ NHS ・ EDC ・ 80 mM PDEA in 0.1 M Borate buffer(pH 8.5) ・ 50 mM l-cysteine-1 M NaCl in 0.1 M Formate buffer(pH 4.3)

# 測定例



DNAのグルーブバインダーの塩基配列選択性を確認

Figure 1. Structure of the compounds and the DNA sequences used in this study.



# 測定例

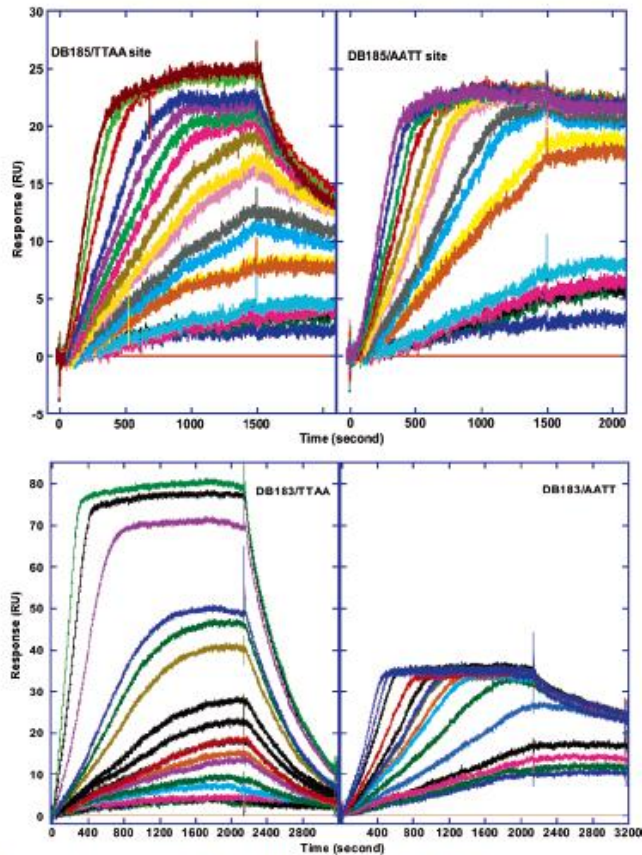


Figure 5. A. SPR sensorgrams for the interaction of DB185 with AATT and TTAA hairpin DNA. The DB185 concentrations are from  $1 \times 10^{-11}$ M (lower curve) to  $4 \times 10^{-9}$ M (highest curve) for AATT binding and from  $1 \times 10^{-11}$ M (lower curve) to  $8 \times 10^{-9}$ M (highest curve) for the TTAA binding. The experiments were conducted at 25 °C in MES 10 with a flow rate of 10  $\mu$ L/min. B. SPR sensorgrams for the interaction of DB183 with AATT and TTAA hairpin DNA. The DB183 concentrations are from  $1 \times 10^{-10}$ M (lower curve) to  $1 \times 10^{-7}$ M (highest curve) for AATT and TTAA binding. The experiments were conducted at 25 °C in MES 10 with a flow rate of 7  $\mu$ L/min.

$$RU = RU_{\max} \times \frac{(K_1 \times C_{\text{free}} + 2 \times K_1 \times K_2 \times C_{\text{free}}^2)}{(1 + K_1 \times C_{\text{free}} + K_1 \times K_2 \times C_{\text{free}}^2)}$$

where  $K_1$  and  $K_2$  are macroscopic equilibrium constants for two types of binding sites, RU is the SPR response at the steady-state level,  $RU_{\max}$  is the maximum SPR response for binding one molecule per binding site, and  $C_{\text{free}}$  is the concentration of the compound in solution. For a single-site model ( $K_2 = 0$ ),  $RU_{\max}$  can be predicted using the following equation

$$RU_{\max} = (RU_{\text{DNA}} / MW_{\text{DNA}}) \times MW_{\text{compound}} \times RII$$

where  $RU_{\text{DNA}}$  is the amount of DNA immobilized in response units (RU), MW is molecular weight of compound and DNA, and RII is the refractive index increment ratio of compound to refractive index of DNA.<sup>17</sup>

J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 143–153.

Table 1. Binding Constants for the Interaction of DB183, DB210, and DB185 with AATT and TTAA Sites

sequence	DB183			DB210			DB185
	$K_1$	$K_2$	$(K_1 K_2)^{1/2}$	$K_1$	$K_2$	$(K_1 K_2)^{1/2}$	$K$
CGAATTCG		$1.6 \times 10^{10}$			$2.6 \times 10^{11}$		$> 3 \times 10^{11}$
CGTTAACG	$7.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$	$2.7 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$	$3.4 \times 10^9$	$3.2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^9$

Experiments were conducted in MES10 at 25 °C. See Figure 1 for the DNA hairpin sequences.



# 測定方法

## *Materials.*

All binding studies based on SPR phenomenon were performed on a four-channel BIACORE 3000 optical biosensor instrument (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). All experiments were performed on sensorchips SA (sensorchips with streptavidin covalently immobilized on a carboxymethylated dextran matrix) obtained from Biacore AB, Uppsala, Sweden.

## *Immobilization of biotinylated DNA probes.*

Both flow cells of an SA streptavidin sensor chip were coated with biotinylated probes. Three 5'-biotin-labeled oligonucleotide sequences (Eurogentec, Belgium) were used in these experiments. Two hairpin duplexes were chosen from previous published work,<sup>3</sup> referred to as the 22-mer [(CG)<sub>4</sub>], (5'-TTCGCGCGCGTTTTTCGCGCGCG sequence) (1000 RU immobilized on flow cell 2) and the 20-mer [AATT] (5'-CGAATTCGTCTCCGAATTCG sequence) (1000 RU immobilized on flow cell 3) and the human telomeric quadruplex DNA, referred to as the 22-mer [G<sub>4</sub>], corresponding to the 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG sequence (1000 or 300 RU immobilized on flow cell 4 for Figures 2 and 3, respectively). No target oligonucleotide was captured on flow cell 1 so that it could be used as a reference surface. All immobilization steps were performed at a final DNA concentration of 10 nM and at a flow rate of 2  $\mu$ L/min. Injections were stopped when sufficient RU levels were obtained.

# 測定方法

## *BIA analysis.*

Binding analyses were performed with multiple injections of different compound concentrations over the immobilized DNA surface at 25°C. All samples were diluted in HBS-EP/KCl buffer and were injected over the sensor surface for 5 minutes at a flow rate of 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . All diluted samples were injected at the same time over the four channels (flow cells). Flow cell 1 was used to obtain control sensorgrams showing nonspecific binding to the streptavidin-coated surface as well as refractive index changes resulting from changes in the bulk properties of each solution. Control sensorgrams were subtracted from sensorgrams obtained with immobilized DNAs to yield true binding responses. Kinetics constants were calculated using BIAevaluation 4.0.1 software and apparent association constants ( $K_a$ ) were calculated as the ratio of  $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ .

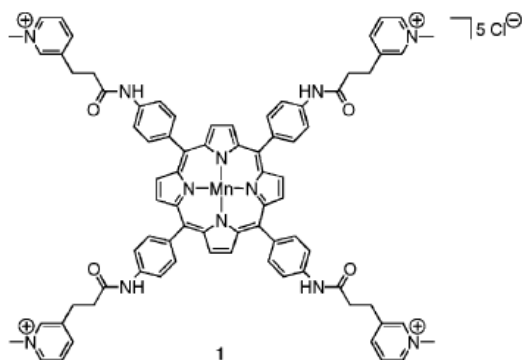
For each molecule, we calculated  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  and  $K_a$  constants using both 1-site (Langmuir) and 2-site algorithms and we selected the best fit corresponding to the lower Chi2 parameter value (not shown).

Sensorgrams (resonance units, RU, versus time) for the concentration-dependent binding of manganese porphyrin **1** on duplex and quadruplex DNA. The sensorgrams were recorded at 1.5, 3, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 nM concentrations of **1** for duplex and quadruplex DNA in Figure 2. In Figure 3 the sensorgrams were recorded at 0.3, 0.75, 1.5, 3, 6.25, 12, 25, 50 nM concentrations of **1**.

## *Scatchard Analysis.*

For all the molecules tested, data obtained from sensorgrams were used for Scatchard analysis using the equation  $R_{\text{eq}}/C = K_a (R_{\text{max}} - R_{\text{eq}})$  where  $R_{\text{eq}}$  is the response at equilibrium in Resonance Units (RU),  $C$  is the concentration of analyte in solution (nM) and  $R_{\text{max}}$  is the theoretical maximum response (proportional to the amount of immobilized ligand).  $R_{\text{eq}}$  was calculated by BIAevaluation 4.0.1 software. As  $R_{\text{max}}$  remains constant, a plot of  $R_{\text{eq}}/C$  versus  $R_{\text{eq}}$  has a slope of  $-K_a$  in the case of 1-site model of interaction. From Scatchard plots was determined the 1-site or non-equivalent 2-site model of interaction for quadruplex DNA.

# 4本鎖DNAに結合する化合物の評価



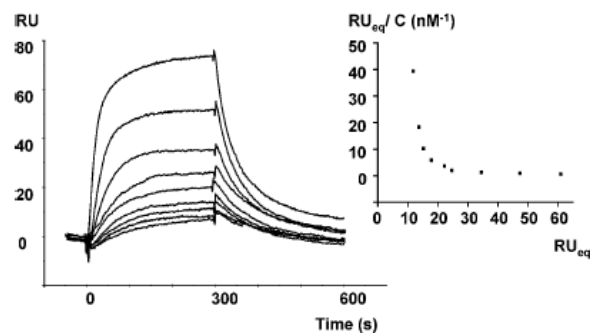
**Figure 1.** Pentacationic manganese(III) porphyrin **1**.

4本鎖DNA選択的な化合物。  
2本鎖DNAとの結合能を  
比較したい。

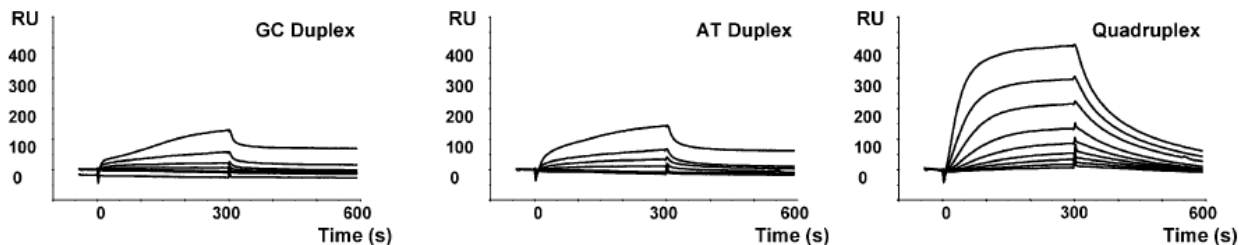
**Table 1.** Kinetic and Equilibrium Constants for the Interaction of **1** with Quadruplex DNA<sup>a</sup>

$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_a (M^{-1})$
<b><math>0.5 \times 10^6</math></b>	<b><math>5 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>1 \times 10^9</math></b>
$3.7 \times 10^5$	$1 \times 10^{-2}$	$3.7 \times 10^7$

<sup>a</sup> Values in bold correspond to a site of higher affinity. Values are from the data of Figure 3.



**Figure 3.** Sensorgrams (resonance units vs time) for the binding of porphyrin **1** (0.3 to 100 nM) on quadruplex DNA at low chip loading, with the corresponding Scatchard plot in the inset.



**Figure 2.** Sensorgrams (resonance units vs time) for the binding of porphyrin **1** on duplex and quadruplex DNA at high chip loading (See Supporting Information).

GC Duplex : 5'-TTCGCGCGTTTTTCGCGCG  
 AT Duplex: 5'-CGAATTCGTCTCCGAATTCG  
 G4 : 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG

12/24 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。

**課題提出締め切り： 1/7**