

最先端の機器分析化学

- 物質エネルギー化学専攻 山本 担当
- 本日の講義で紹介すること バイオと機器分析
 - Ab-Ag 抗原-抗体反応
 - ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)
 - FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
 - SDS-PAGE
 - Isoelectric Focusing
 - Western Blotting
 - SPR (Surface Plasmon Resonance)
 - DNA Chip
 - Single molecule imaging

- バイオ: 絵で理解している人が多い。実験プロトコル

機器分析 keypoint

Blackbox (有機FT-NMR)

分析化学・生化学

物理・物理化学・有機化学・無機化学

電気電子工学・機械工学

要するに総合科学を基礎としている。

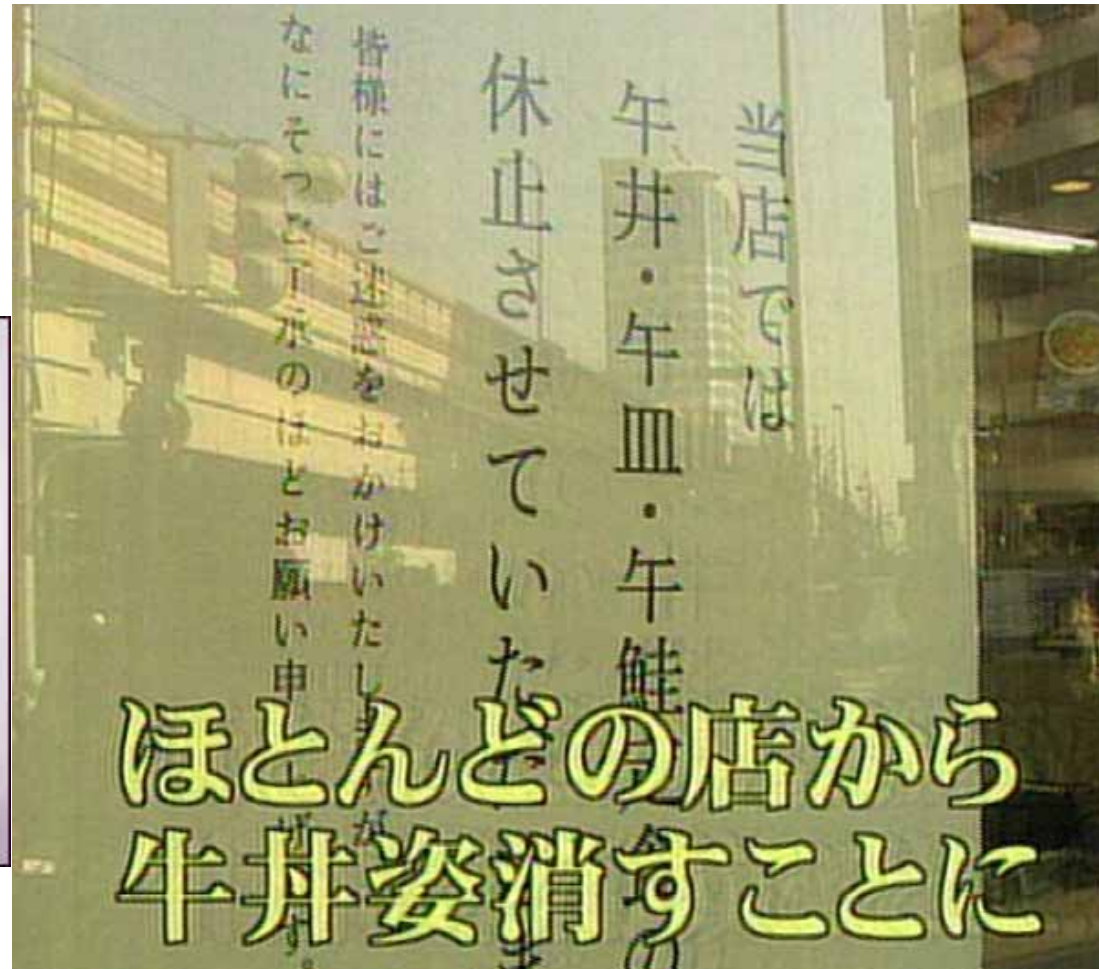
バイオと機器分析 学問的にもactive

Spinoff 即ベンチャー



"TODAY EVERYONE HAS TO KNOW 'WHAT'S IN THE FOOD?', 'WHAT'S
IN THE WATER?', 'WHAT'S IN THE AIR?' THIS IS TRULY THE GOLDEN
AGE OF ANALYTICAL CHEMISTRY."

BSE [牛海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy)] と機器分析化学



BSE:

全頭検査、見直し「20カ月以下、検出不能」 - - 専門調査会

国内のBSE(牛海綿状脳症)対策の見直しを検討する国の食品安全委員会プリオン専門調査会(座長、吉川泰弘東京大教授)は6日、「生後20カ月以下では、BSE感染牛を検出出来なかった」との報告書案を了承した。これを受け、厚生労働省や農林水産省は現在の全頭検査を緩和し、生後20カ月以下の牛を検査対象外にする方針だ。米国产牛肉の輸入再開を巡る日米協議にも大きな影響を与えそうだ。

BSEの病原体が蓄積する特定危険部位の除去は、これまで通り全頭で続ける。

調査会は今年4月にBSE対策の見直しを始めた。7月には、全頭検査について「若い牛を検査対象から外しても、人に感染するリスクは増えない」とする報告書案をまとめたが、若い牛の月齢は示さなかった。

しかし、厚労省、農水省などが「きちんと月齢を明示してほしい」と要望、調査会は報告書案の修正を検討していた。その結果、全頭検査では**最も若い感染例が生後21カ月**だったことを重視し、「生後20カ月以下では検出困難」と結論づけた。

農水省は生後21カ月の感染例から採取した異常プリオンの感染力を調べる実験中。調査会は、実験結果がまとまったり、新しい検査法が開発された場合は、今回の線引きが妥当かどうかを改めて検討する。【江口一】

- 全頭検査によってBSE感染牛がすべて把握できるかという点、そうではない。
- 危険部位
- 一定蓄積濃度以上
- 今の検査技術では異常プリオンは危険部位に一定以上蓄積されないと検出されない。専門家によると蓄積するスピードは遅く、感染牛の症状が表れるのは平均六十カ月。発症する六カ月前にならないと異常プリオンは検出されない。検査の結果、異常プリオンが見つからなくても、BSEに感染していない保証はない。

- < BSE問題 > 末梢神経から異常プリオン検出 動物衛生研

独立行政法人・動物衛生研究所プリオン病研究センターは1日、今年3月に見つかったBSE(牛海綿状脳症)感染死亡牛の末梢(まっしょう)神経繊維と副腎から、感染原因物質の異常プリオンを世界で初めて検出したことを明らかにした。これら部位は食肉処理場で除去が義務づけられている特定危険部位ではないが、検出量は極めて微量で、政府は「すぐさま特定危険部位の範囲の見直しにつながるものではない」(農林水産省)としている。

仙台市で開かれた「プリオン病国際シンポジウム」で同センターが発表した。農水省に入った情報などによると、国内11例目となった感染牛(生後94カ月)の各組織について、たんぱく質を電気的に分離して異常プリオンの存在を調べる「ウエスタンブロット法」で検査。座骨神経や頸骨(けいこつ)神経の末梢神経繊維などから異常プリオンが見つかったという。

現在、国内の食肉処理場で除去されている特定危険部位は、頭部 脊髄(せきずい) 脊柱 小腸の一部 の4部分で、今回の確認部位は含まれていない。農水省と厚生労働省は「蓄積量は脊髄などの100分の1以下程度で、感染性はほとんどないとみている」と説明している。(毎日新聞) 2004年11月

プリオンは感染性をもつ？

正常プリオン蛋白 (cellular PrP、PrP^c)

分子量 33 ~ 35 Kda

蛋白分解酵素感受性

ヘリックス(Helix) 42% シート(Sheet) 3%

外部からのPrP^cjd (PrP^{sc}) の侵入

偶発的変換

遺伝子発現調節の異常

異常プリオン (scrapie PrP、PrP^{sc}、PrP^cjd、PrP^{res})

プロテナーゼKによりN末端67AAが消化 27 ~ 30 Kda

蛋白分解酵素抵抗性

ヘリックス 30% シート 43% アミロイド様性質

一次構造(アミノ酸配列)は変わらない
糖鎖付加、リン酸基の修飾も変化なし

姫路工業大学 環境人間学部 北元先生
のホームページより

<http://www.hept.himeji-tech.ac.jp/~kitamoto/Resources/prion.html>

二次構造(三次構造)が変化

ヘリックス シート...アミロイド変性

プロテアーゼK抵抗性

難溶性、凝集性(プリオン・ロッド形成)

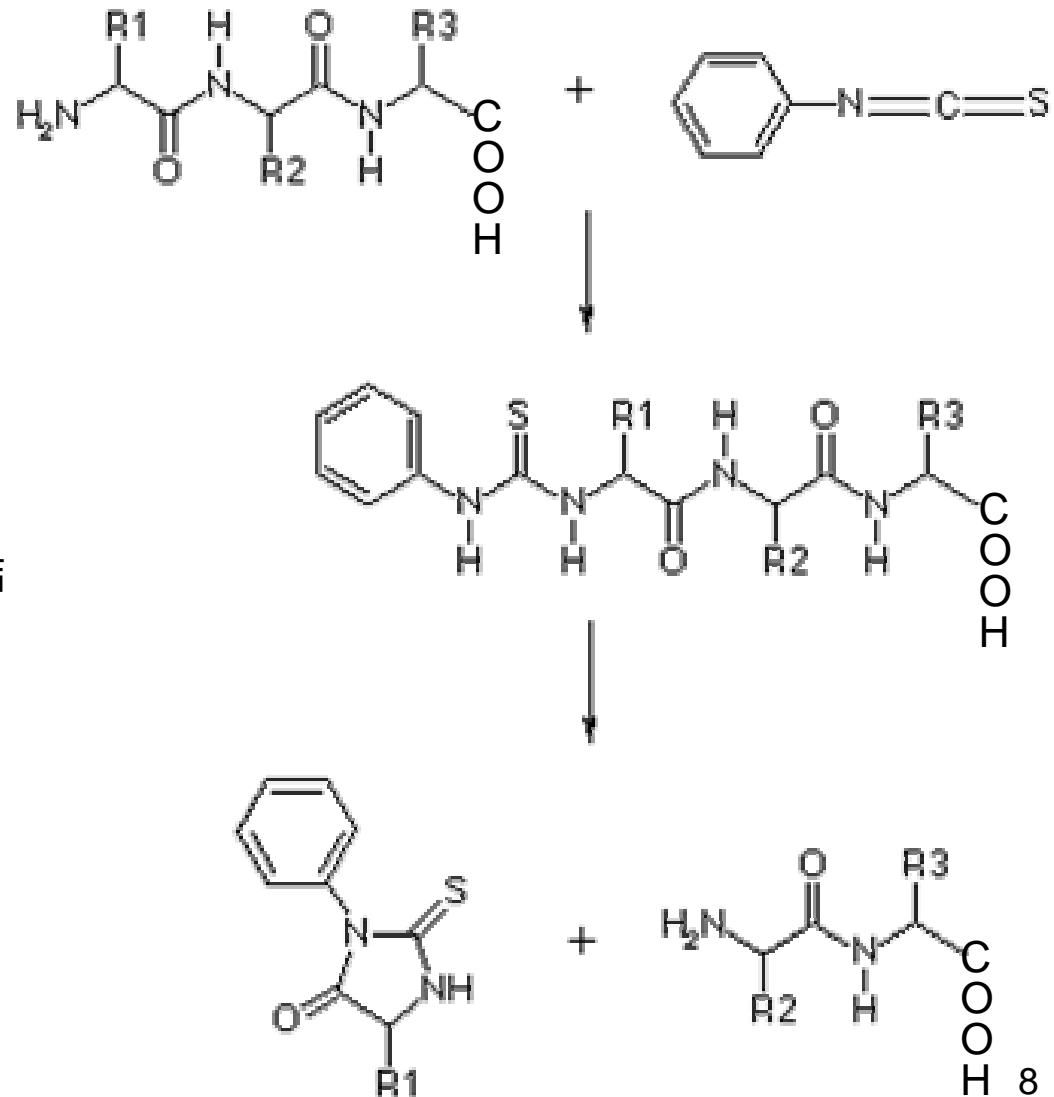
1次構造の決定法

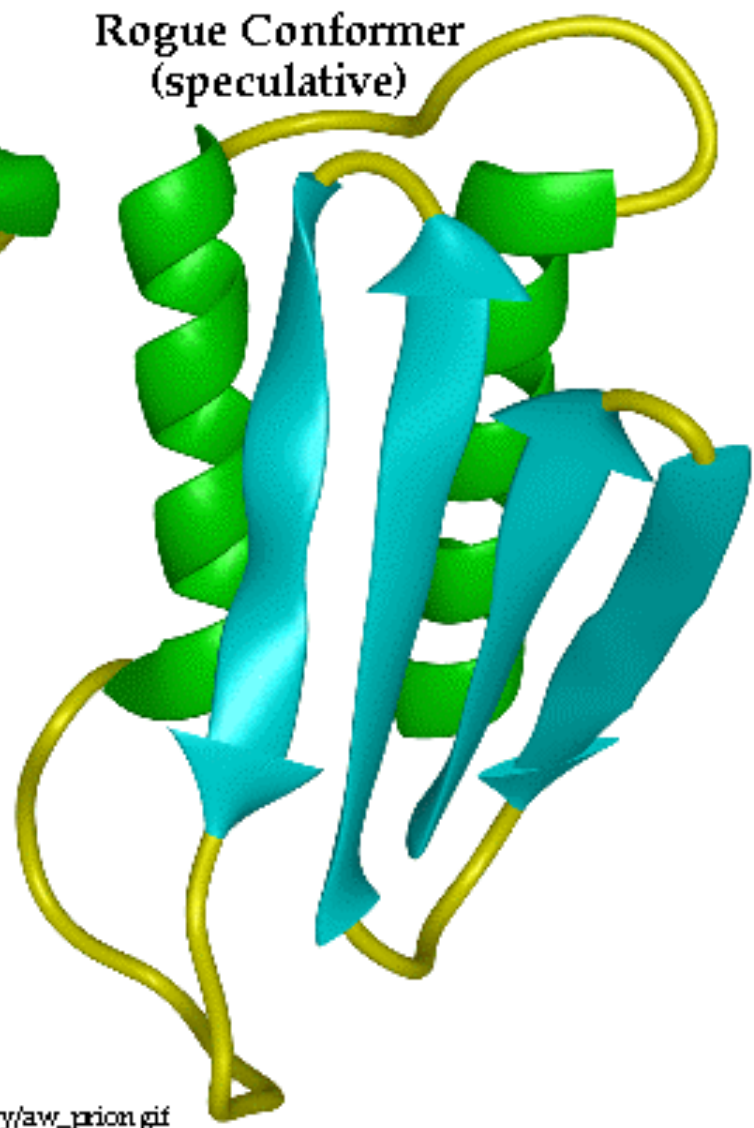
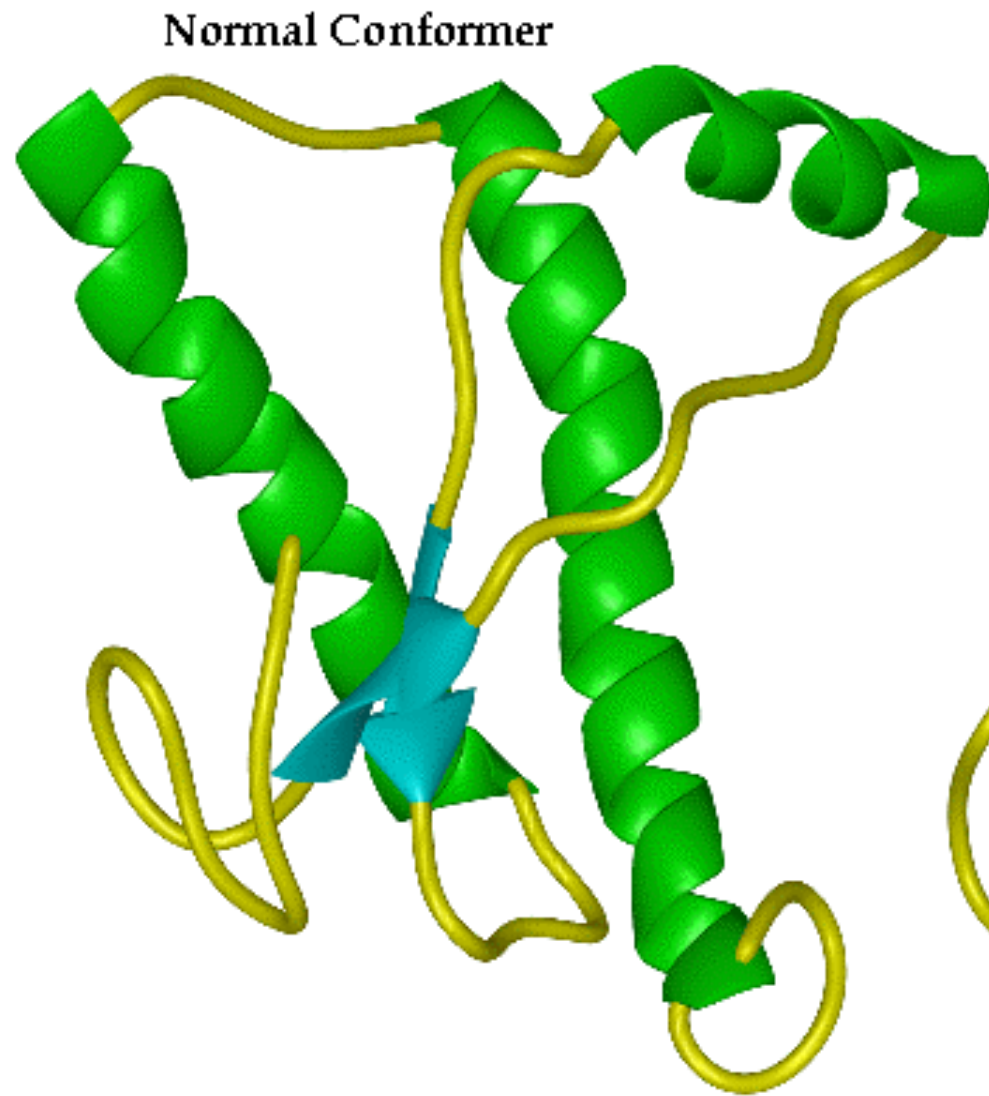
タンパク質を配列決定できる長さ(40 ~ 60残基)に酵素や試薬を用いて切断する.

一回目とは異なる位置でタンパク質を切断し,各断片のアミノ酸配列を決定する.

切断点の異なる断片の配列を比較し全体の配列を決定する.

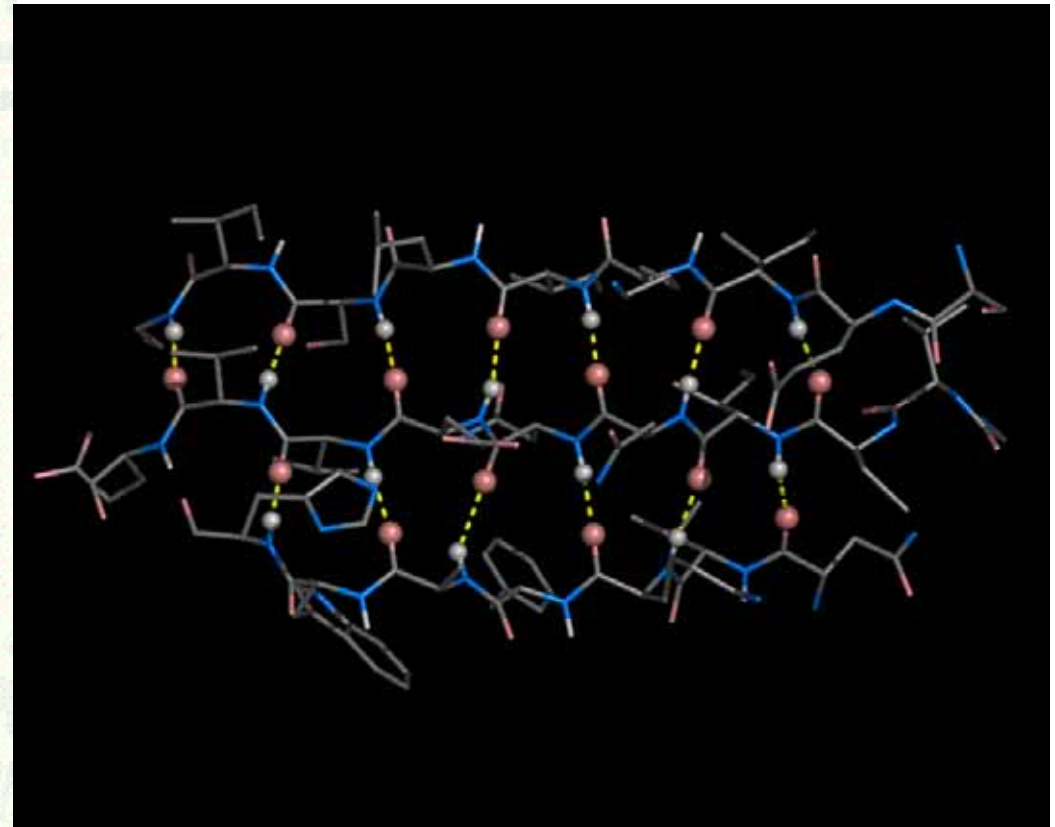
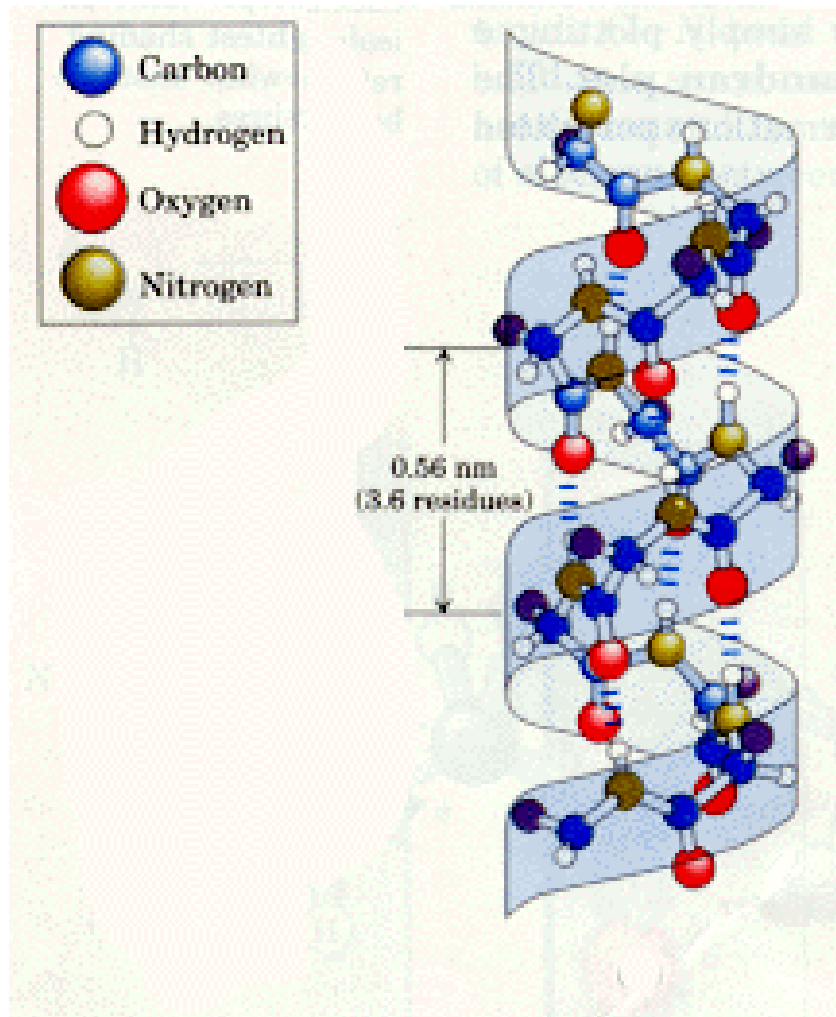
タンパク質にフェニルイソチオシアネートを反応させるとN末端のアミノ基と結合する.これを酸で分解すると,N末端のアミノ酸が2-アニリノ-5-チアゾリン誘導体として分離される.エドマン分解されたアミノ酸は,電気泳動やガス液体クロマトグラフィーにより,同定される.エドマン分解は40~60残基までしか同定できない.それは分解の過程で副反応が起きたり,ペプチド結合が不必要な場所で切れたりするためである.





Adapted from http://www.cmpkarn.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw_prion.gif

-helix and -sheet



正常プリオン(PrP^c)には生理学機能がある！

- ・ PrP^cにはなくてはならない生理的役目がある
 - ・ 脳の学習、記憶
 - ・ 日内周期、睡眠周期の形成
 - ・ 神経細胞(プルキンエ細胞)の長期生存維持

姫路工業大学 環境人間学部 北元先生
のホームページより
<http://www.hept.himeji-tech.ac.jp/~kitamoto/Resources/prion.html>

異常プリオンは強い！

熱・・・100 はもちろん120 2気圧(オートクレイブ、あらゆる生物は死ぬ)でも耐熱性

180 30分、133 2気圧20分以上必要

* PrPcは60～70 で変性

乾燥・・・130 30では死なない

ホルマリン・・・数年生存

DNase、RNase、紫外線・・・抵抗性

蛋白分解酵素(プロテナーゼK、トリプシン)・・・抵抗性

* PrPcは感受性・・・この違いは診断の際に利用される

蛋白変性剤(フェノール、尿素、塩酸グアニジン)・・・感受性

次亜塩素酸ソーダ・・・1%、2時間(2%、1時間以上)

次亜塩素酸ソーダ + 苛性ソーダ + 熱 より効果的

SDS・・・1%、10分

ギ酸・・・80%、2時間

狂牛病の診断 はどのようにされるの？

脳材料 乳剤にし 蛋白分解酵素(あるいはギ酸)で正常プリオンをこわす

(1) 一次検査(スクリーニング:ふるい分け)

ELISA(エライザ)法(時に2回行う)

プレート上で特異抗体と反応させる 2次抗体を使い 発色剤で色をつける* 短時間に多量の検査可能。感度が 高いが特異性に欠ける(疑わしきはすべて罰する)

(2) 二次検査(精密検査)

ウエスタンブロット法(電気泳動で蛋白を流し、抗体と反応させる。

分子量も分かるため特異的)

免疫組織化学染色法(脳などの組織切片内のプリオンを抗体を用いて染め分ける)

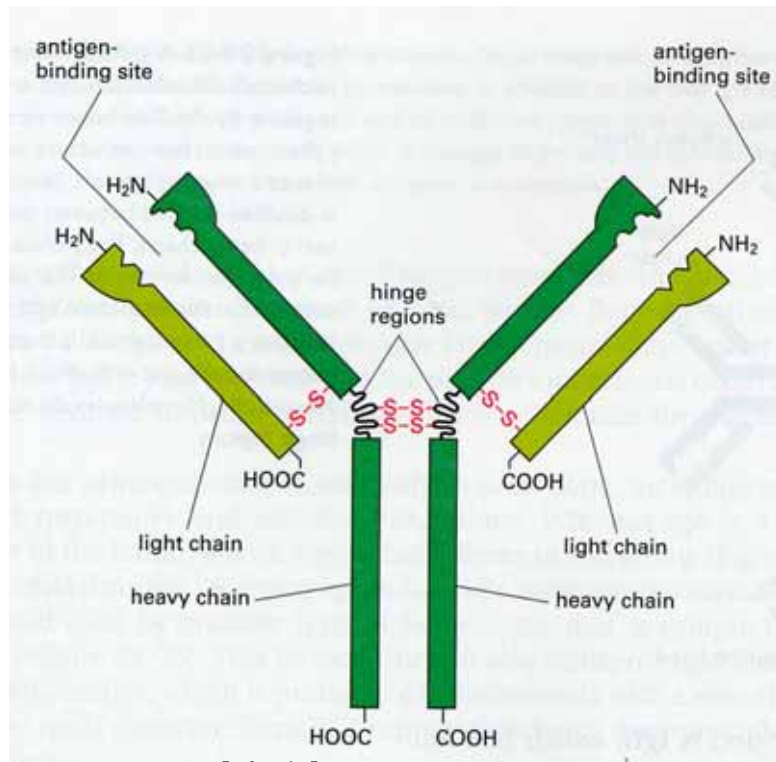
病理組織学的検査法 などの総合判定

* 初めから精密検査ができればいいが、手間と時間とお金がかかるため多量の検査には 不向き

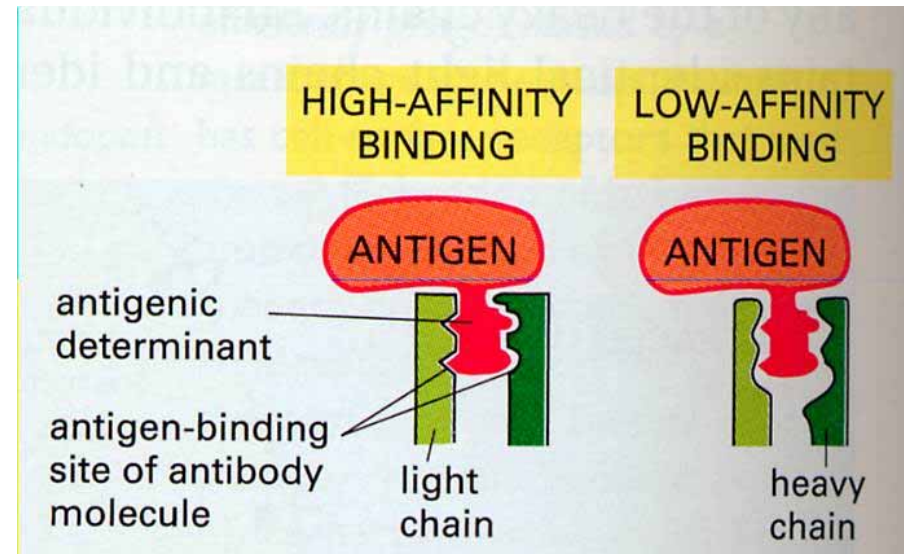
姫路工業大学 環境人間学部 北元先生

のホームページより

<http://www.hept.himeji-tech.ac.jp/~kitamoto/Resources/prion.html>



抗体 (Ab:antibody)



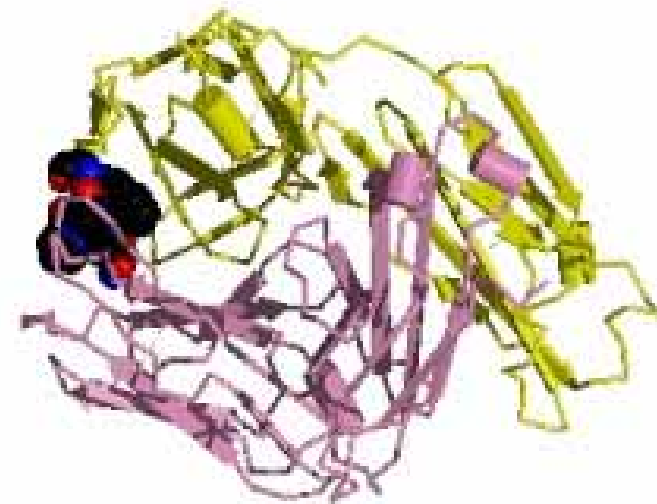
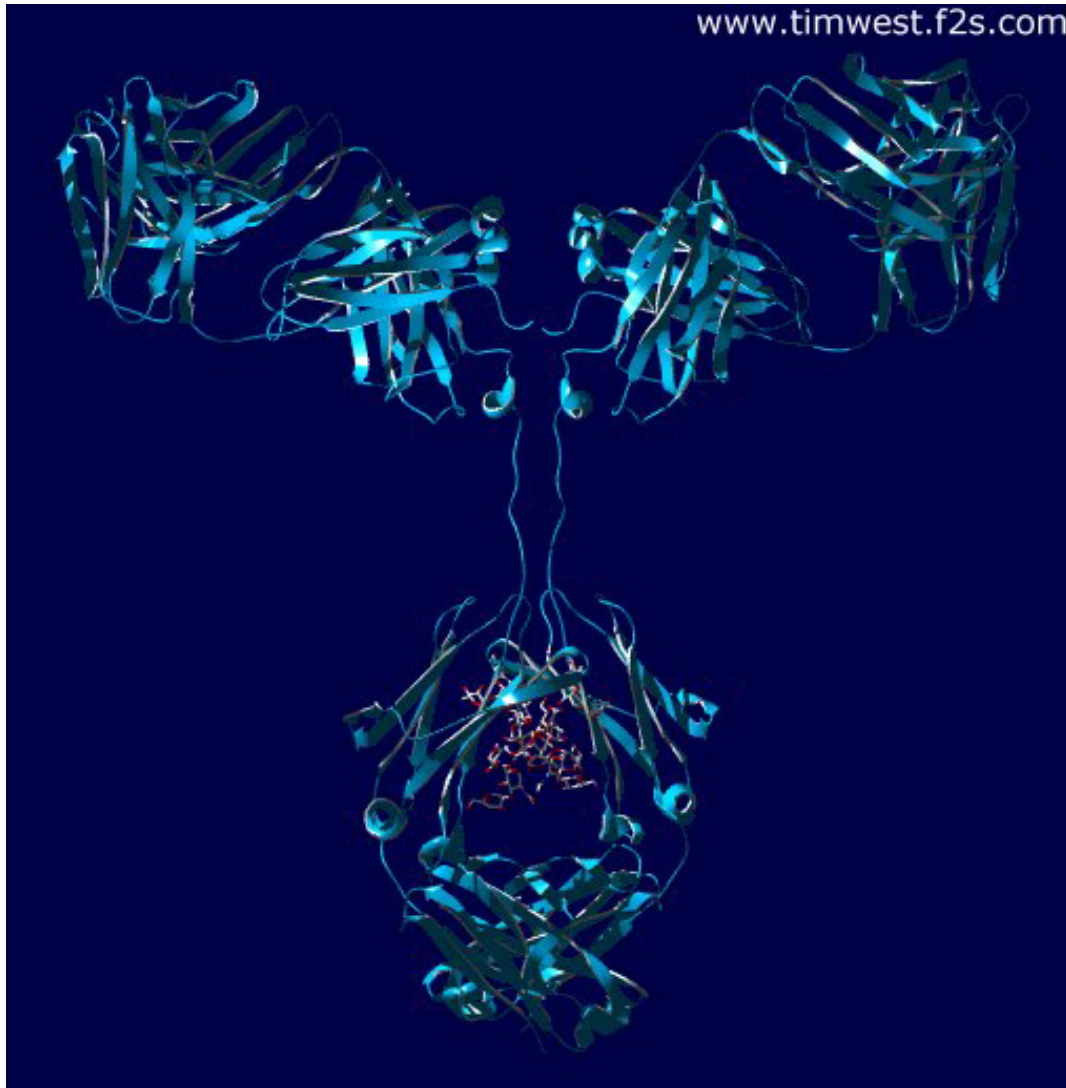
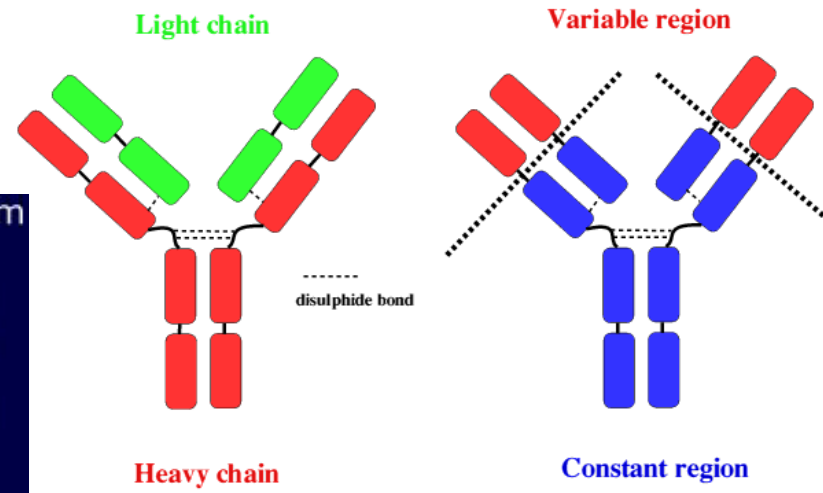
Ref:MBC

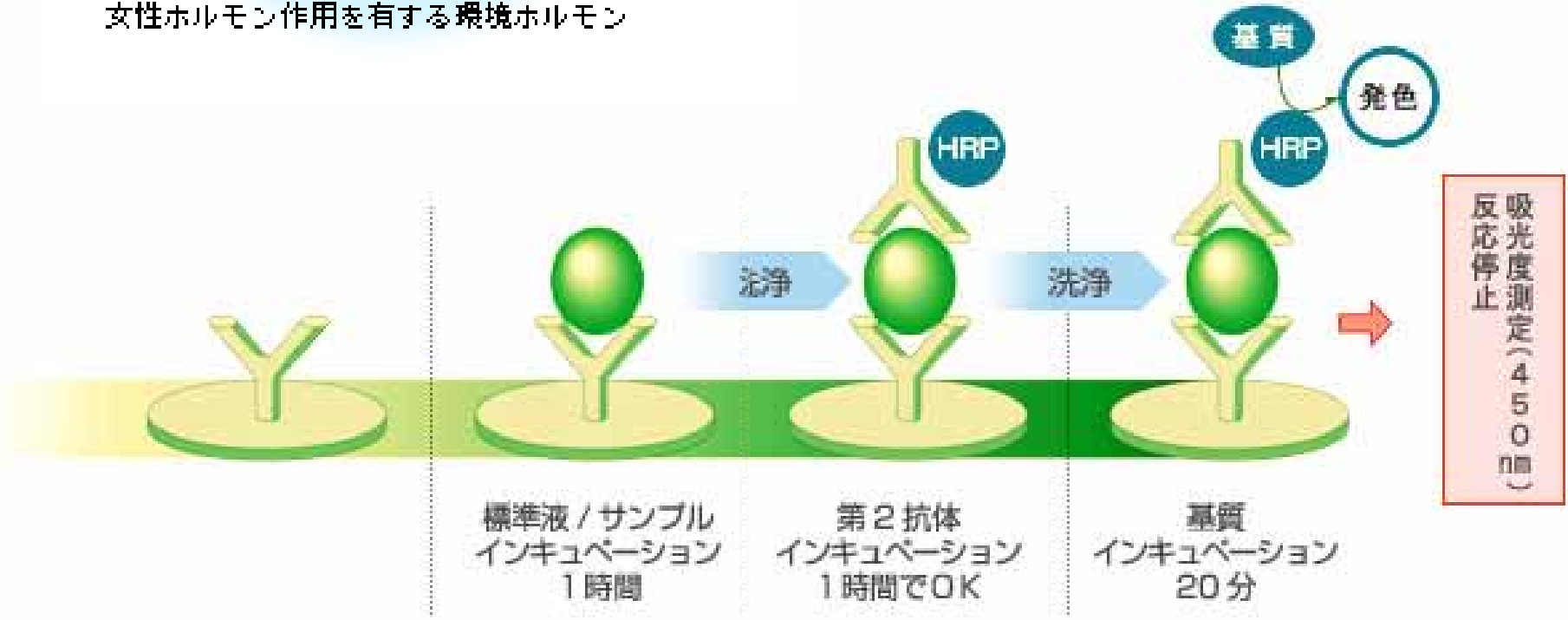
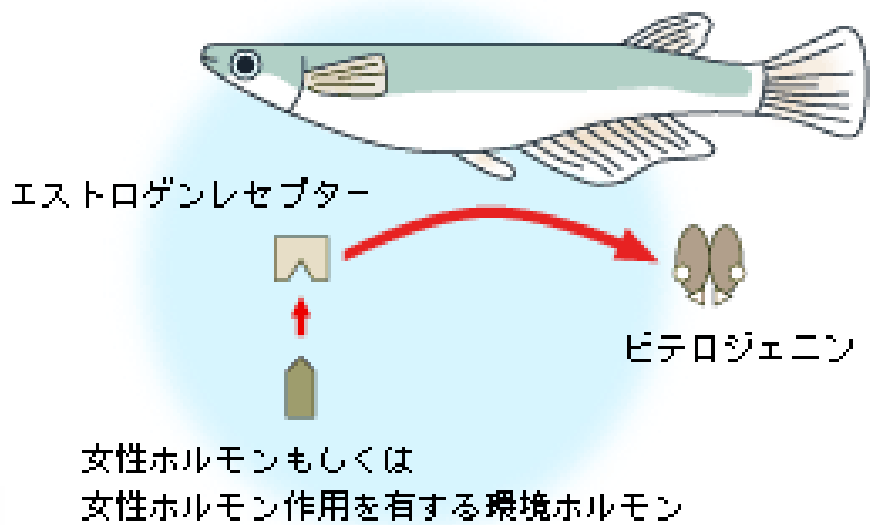
$$K_a = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

$$K_a \simeq 5 \times 10^4 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$$

when $[Ab] = [AgAb]$

Basic structure of an Antibody





ELISA (エライザ) (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)

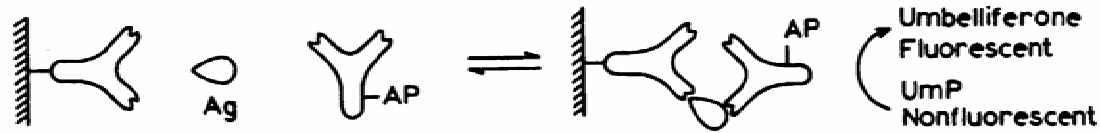
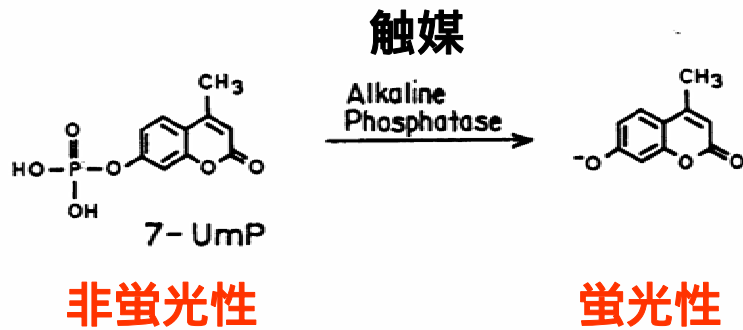
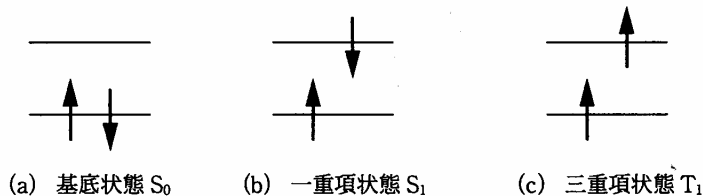


Figure 19.55. Schematic of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AP is alkaline phosphatase, Ag is an antigen, and UmP is umbelliferyl phosphate.



Ref: Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy



Jablonski diagram

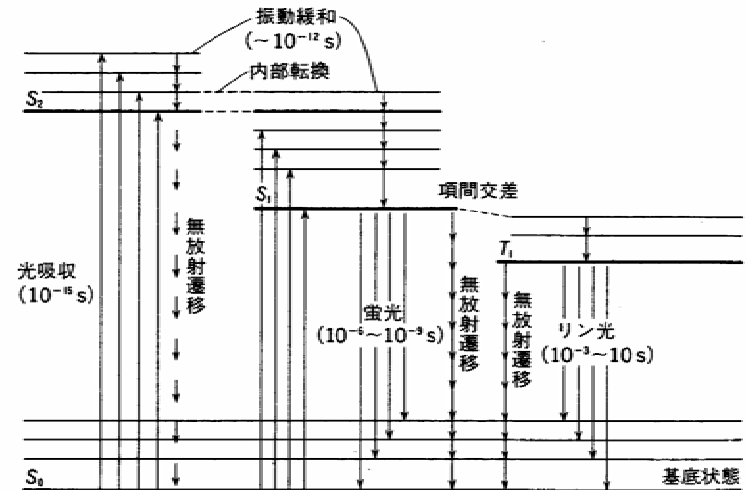


図 3.12 蛍光、リン光および無放射遷移。 S_0 : 電子基底状態、一重項、 S_1 : 第一電子励起状態、一重項、 S_2 : 第二電子励起状態、一重項、 T_1 : 電子励起三重項

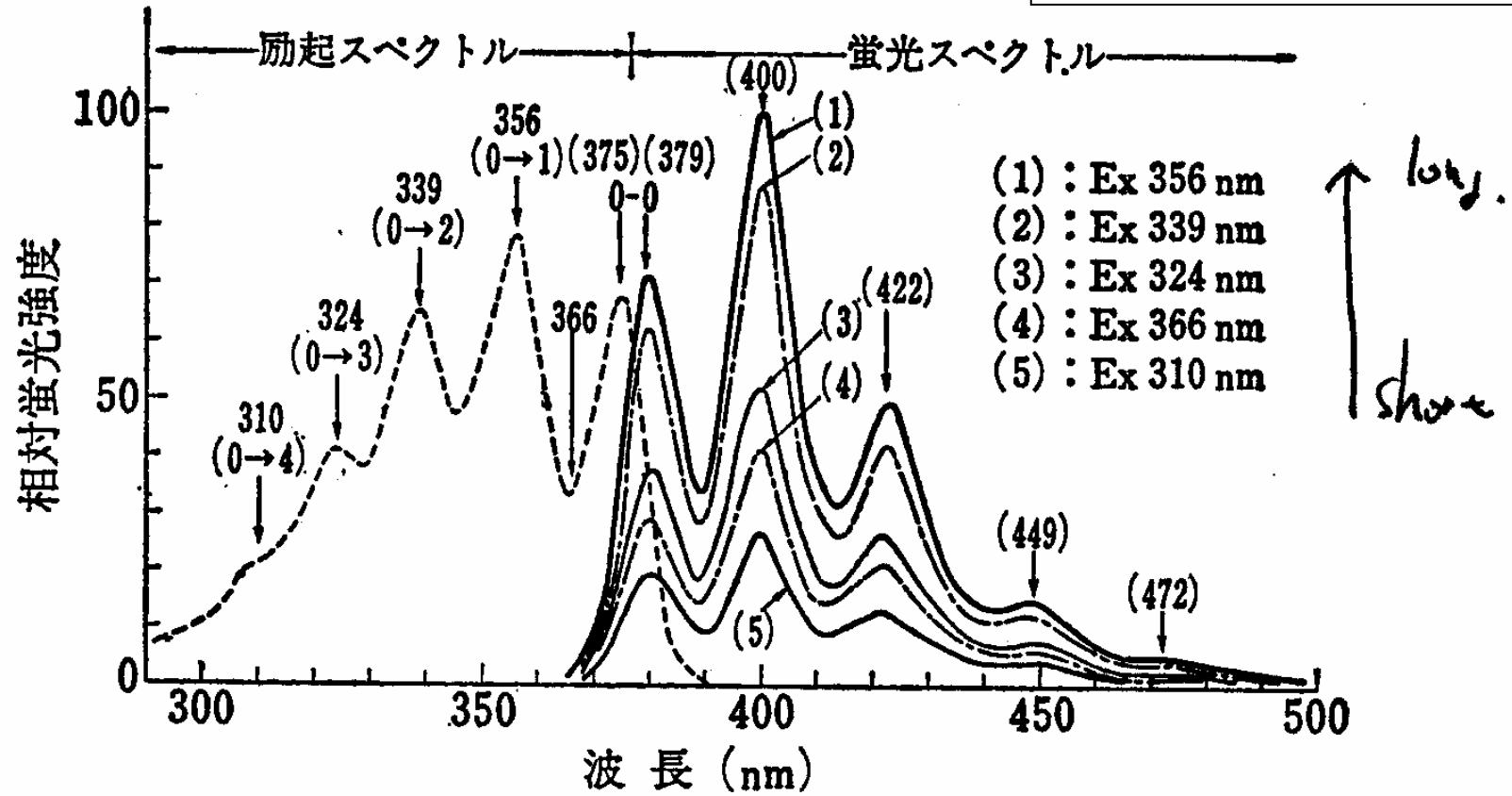


図 1・16 (B) アントラセン (エタノール溶液) の励起スペクトル (点線) と種々の励起波長の光で励起したときの蛍光スペクトル (実線および破線)

鏡像、振動構造

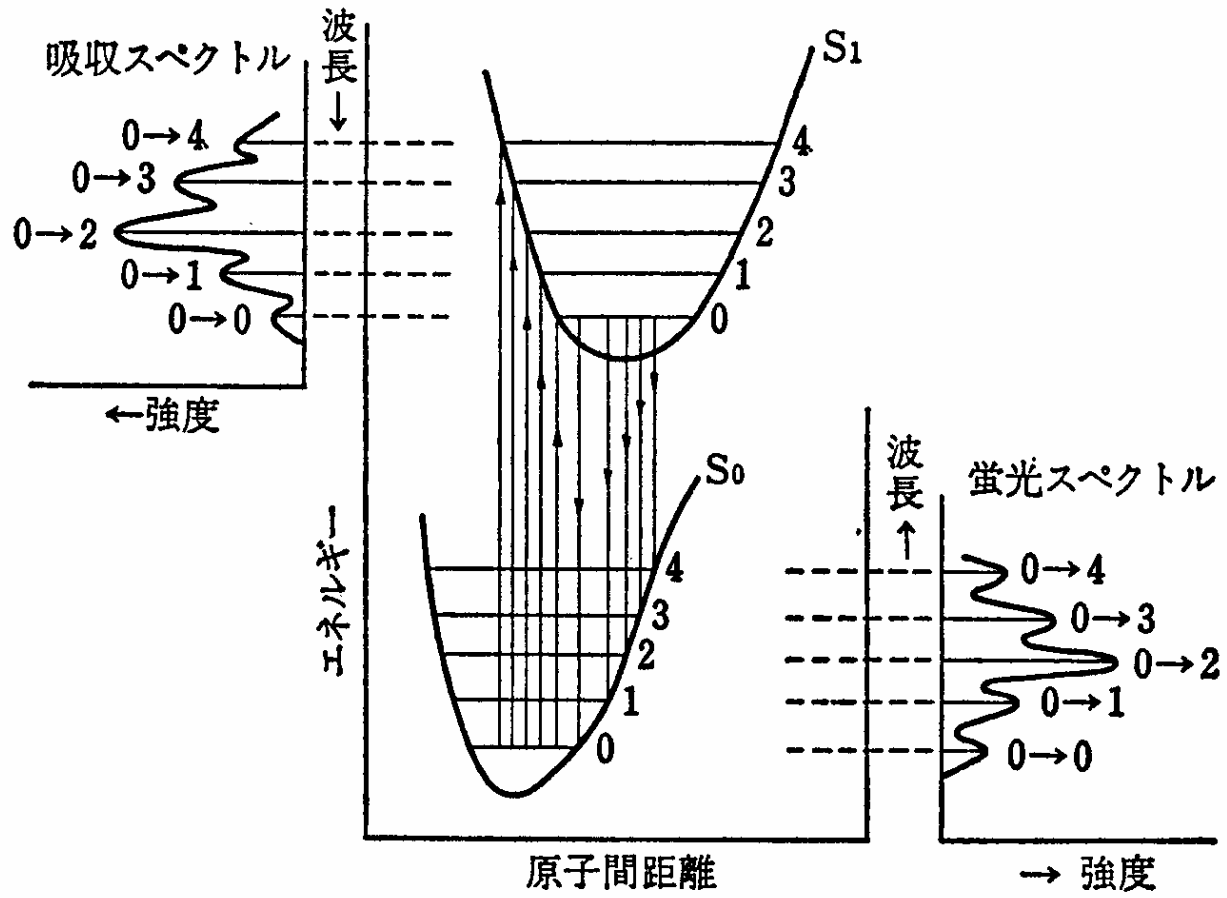
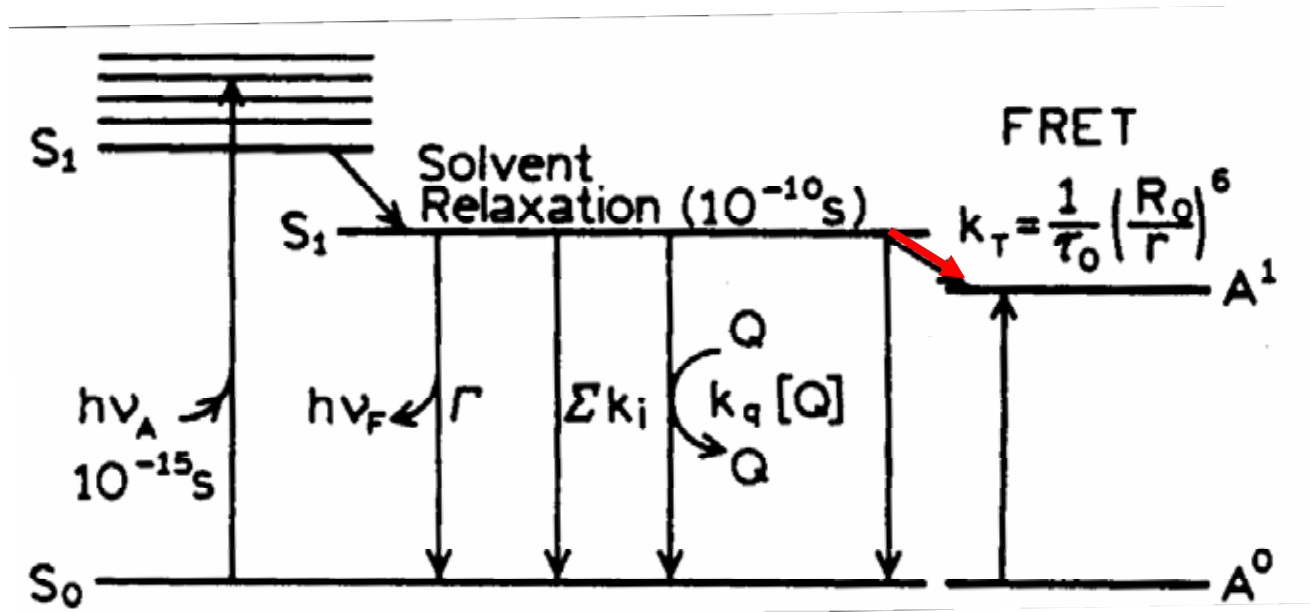


図 1.15 吸収スペクトルと蛍光スペクトル

エネルギー移動

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)



Donor – Acceptor :dipole-dipole interaction
Measure the D-A distance from 15 to 60 Å

Ref: Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy

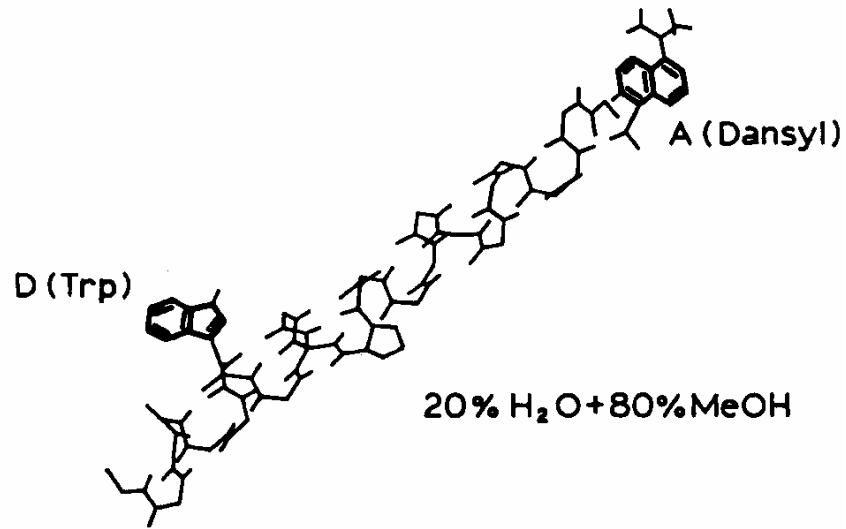


Figure 13.7. Structure of melittin in the α -helical state. The donor is tryptophan-19, and the acceptor is an N-terminal dansyl group. Revised from Ref. 24.

- D-A distance = 24.4 Å

Ref: Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy

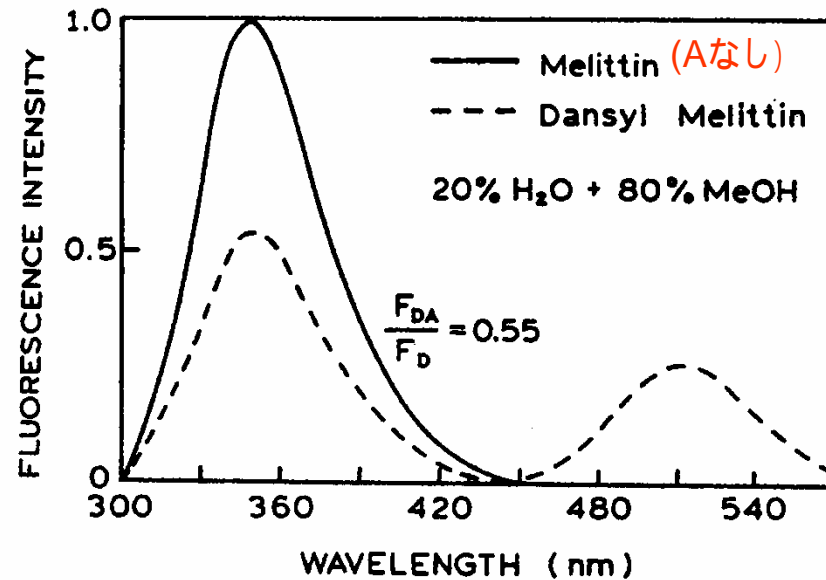
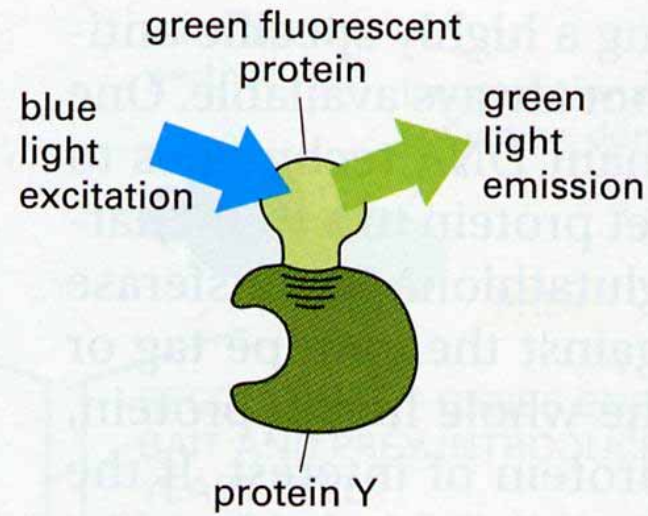
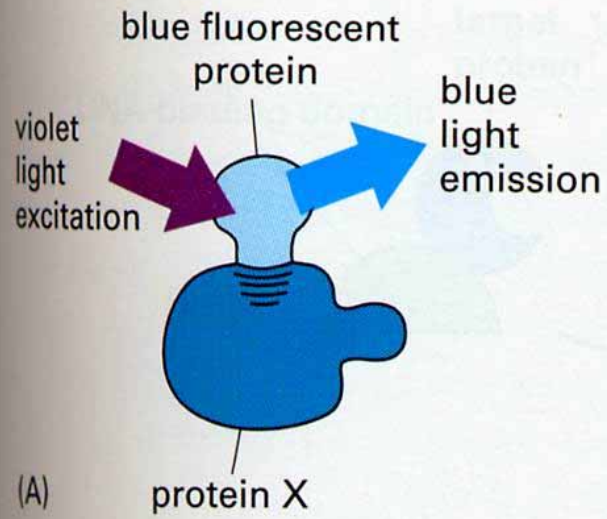
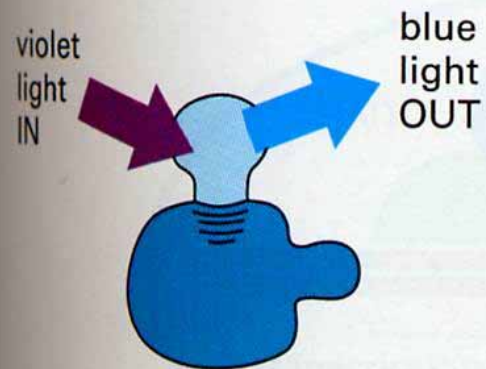


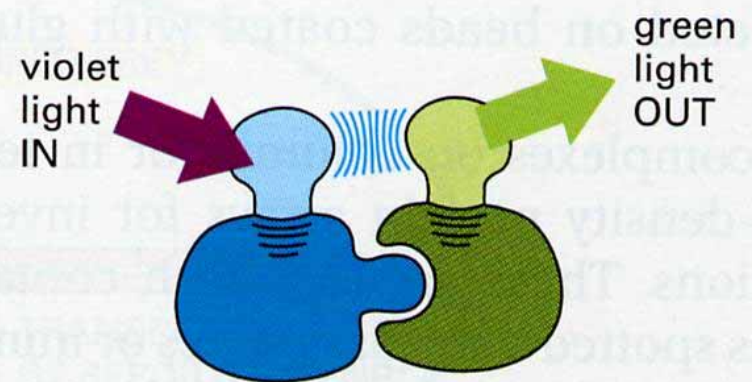
Figure 13.9. Emission spectra of the melittin donor (D) and acceptor-labeled melittin (D-A). Excitation at 282 nm. Revised from Ref. 24.



Ref:MBC

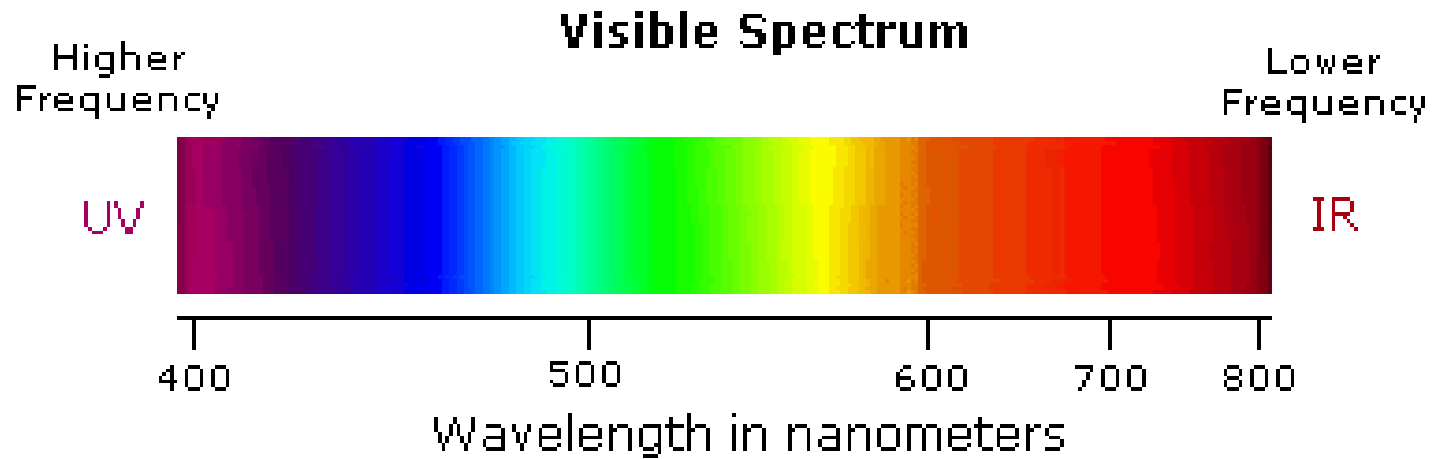


(B) **NO PROTEIN INTERACTION**
 NO EXCITATION OF GREEN
 FLUORESCENT PROTEIN,
 BLUE LIGHT DETECTED

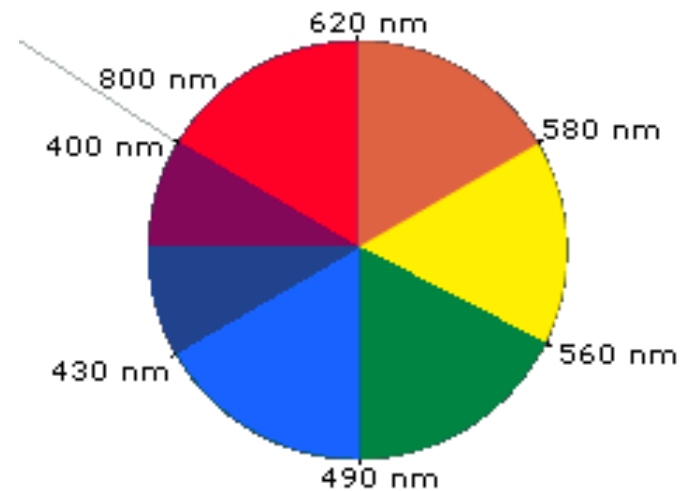


(C) **PROTEIN INTERACTION**
 FLUORESCENCE RESONANCE
 ENERGY TRANSFER,
 GREEN LIGHT DETECTED

可視光・色・補色



- **Violet:** 400 - 420 nm
- **Indigo:** 420 - 440 nm
- **Blue:** 440 - 490 nm
- **Green:** 490 - 570 nm
- **Yellow:** 570 - 585 nm
- **Orange:** 585 - 620 nm
- **Red:** 620 - 780 nm



虹の色の覚え方

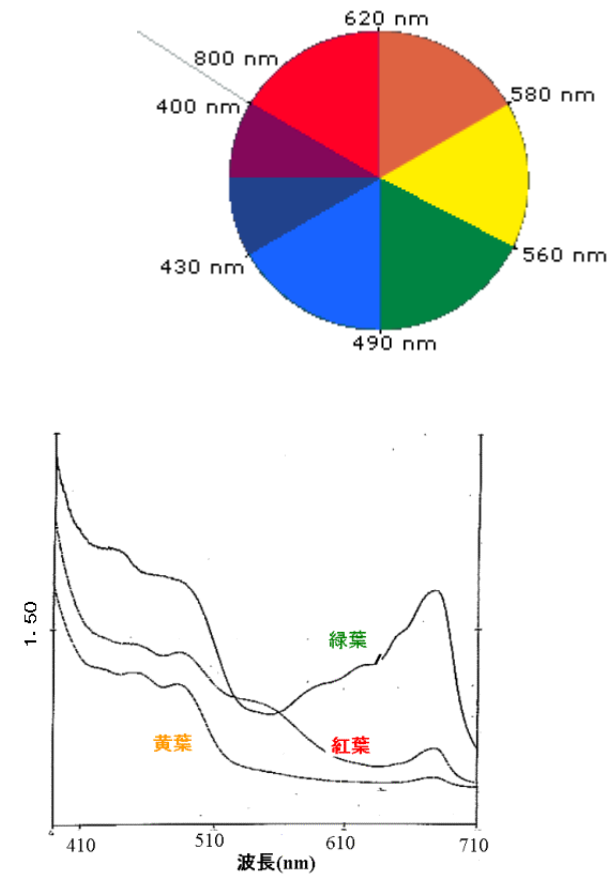
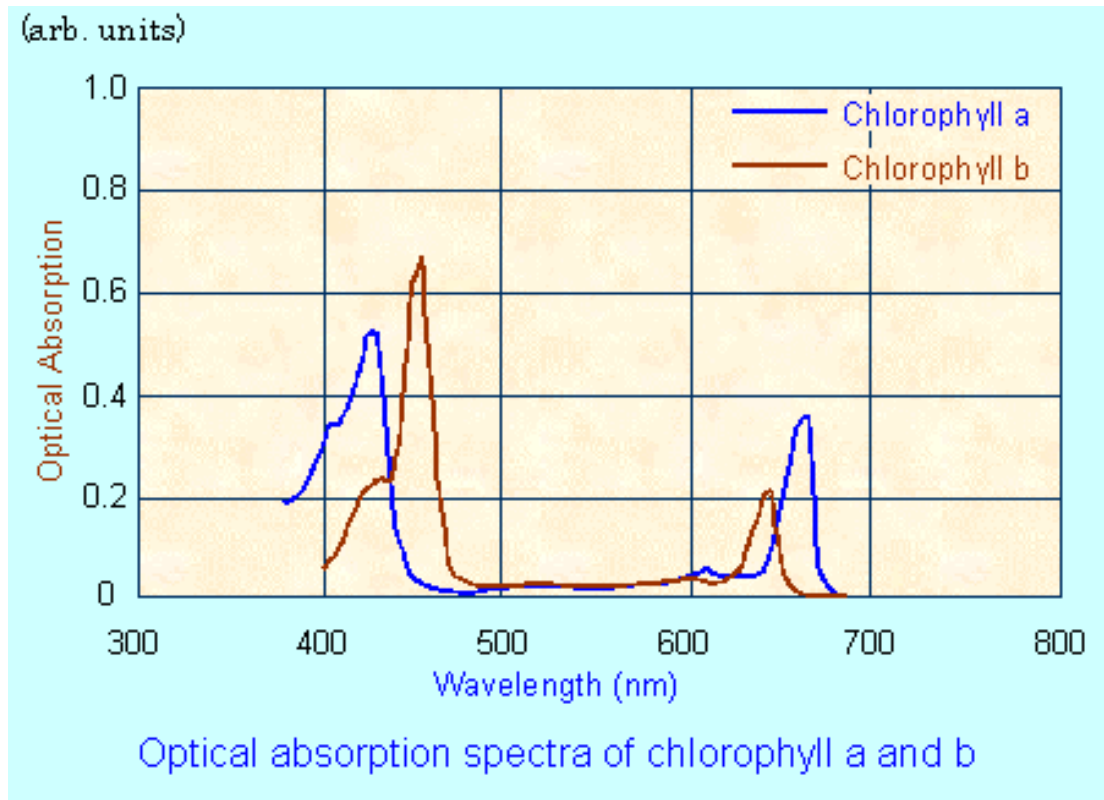
ROY-G-BIV

Richard of York gave battle in vain
Red Orange Yellow Green Blue Indigo Violet

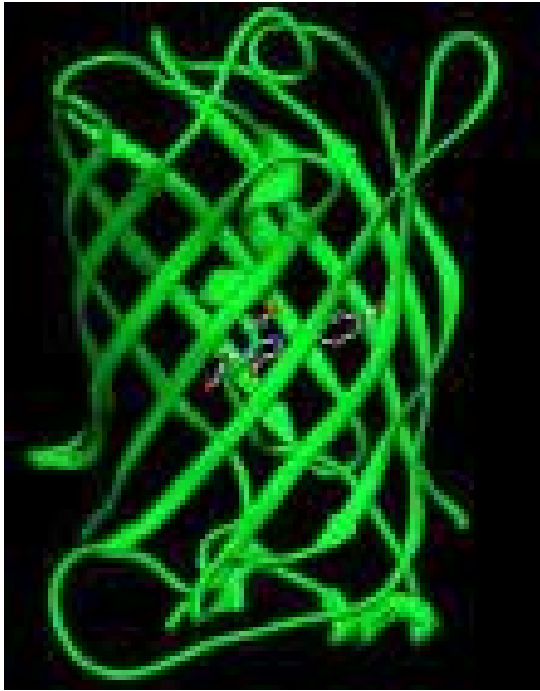
あ たい き み を あい し
赤 橙 黄 緑 青 藍 紫

クロロフィルの光吸収スペクトル

660nm近辺の赤色光は光合成に有効
450nm附近の青色光は形態形成や光屈折性に有効



桜の生の葉の吸収スペクトル 25

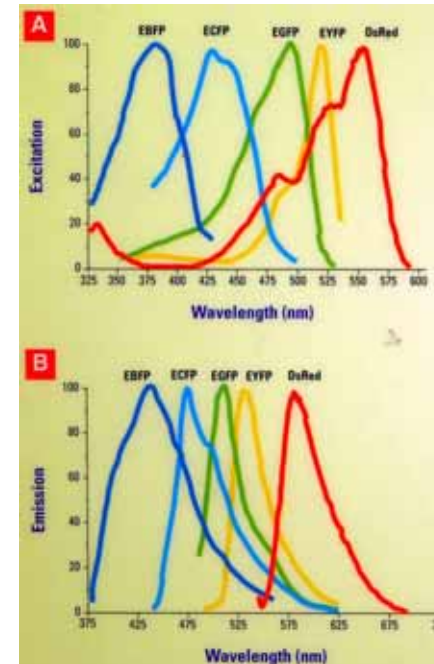
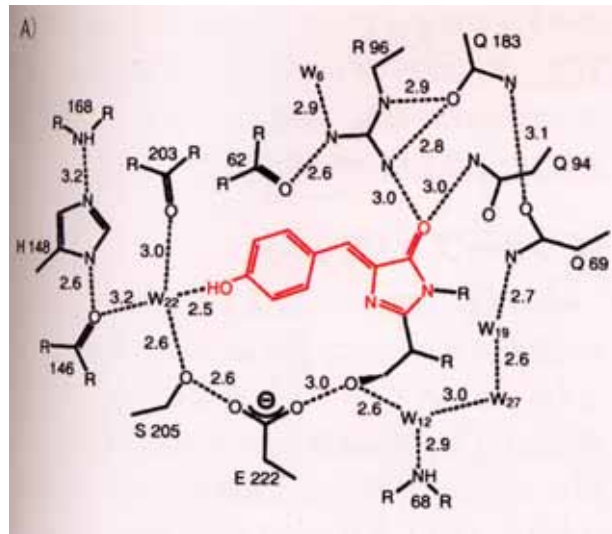


GFP

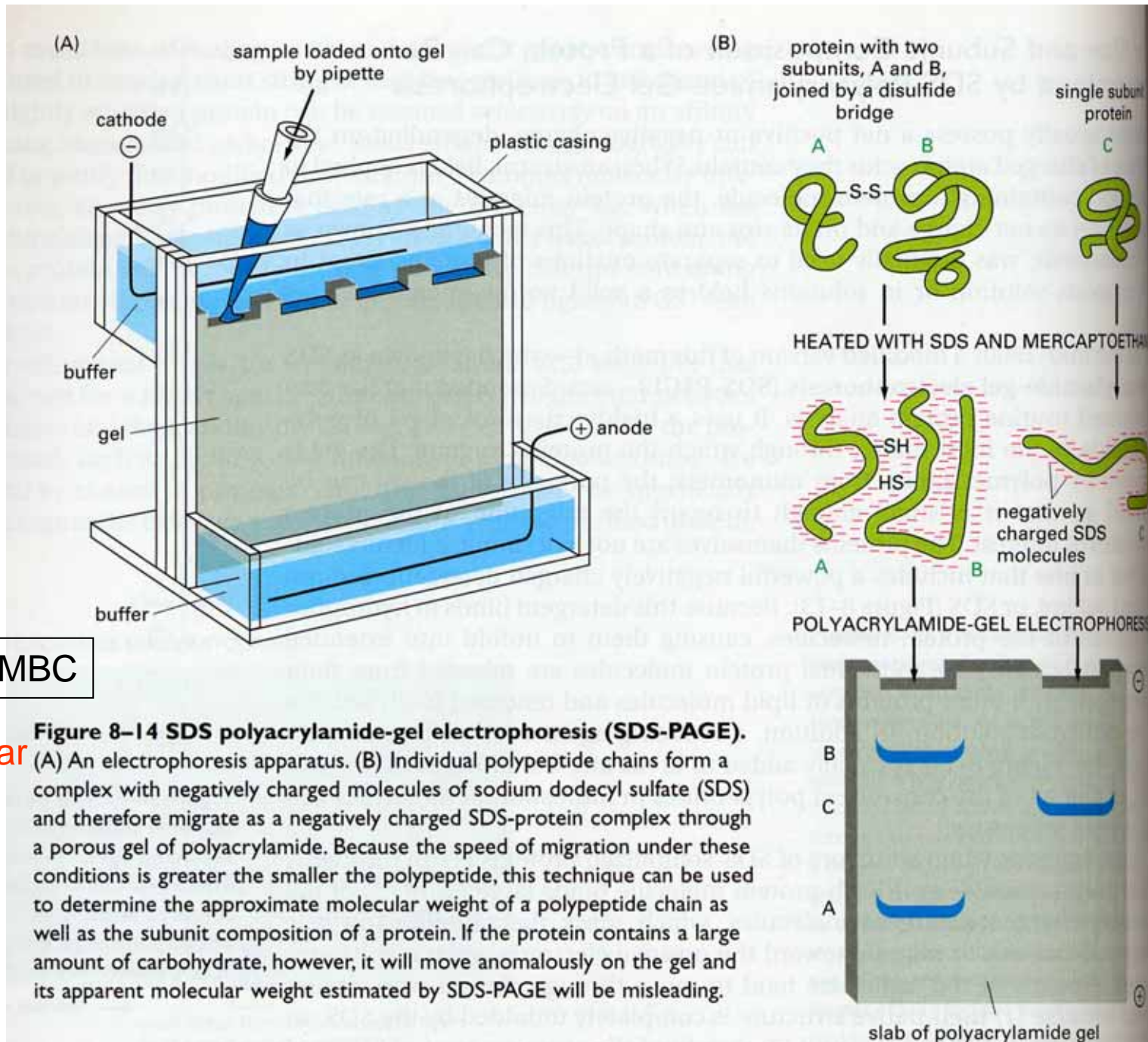
(Green Fluorescent Protein)

オワンクラゲ 1961 下村氏

92年 遺伝子組み替えGFP



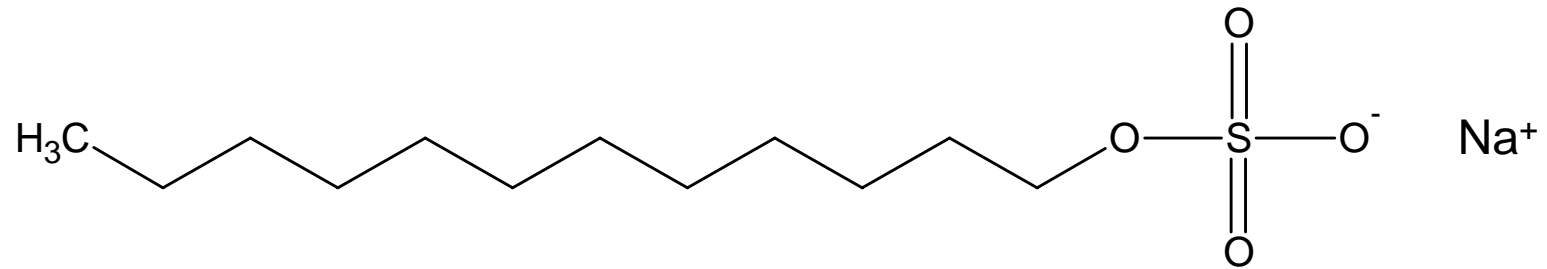
緑、黄、藍、青、赤



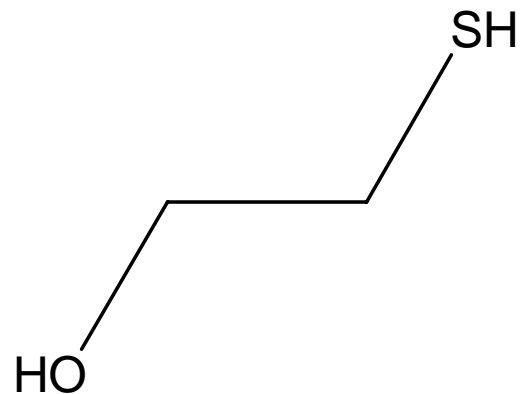
Ref:MBC

Molecular Weight

SDS (Sodium dodecyl Sulfate)

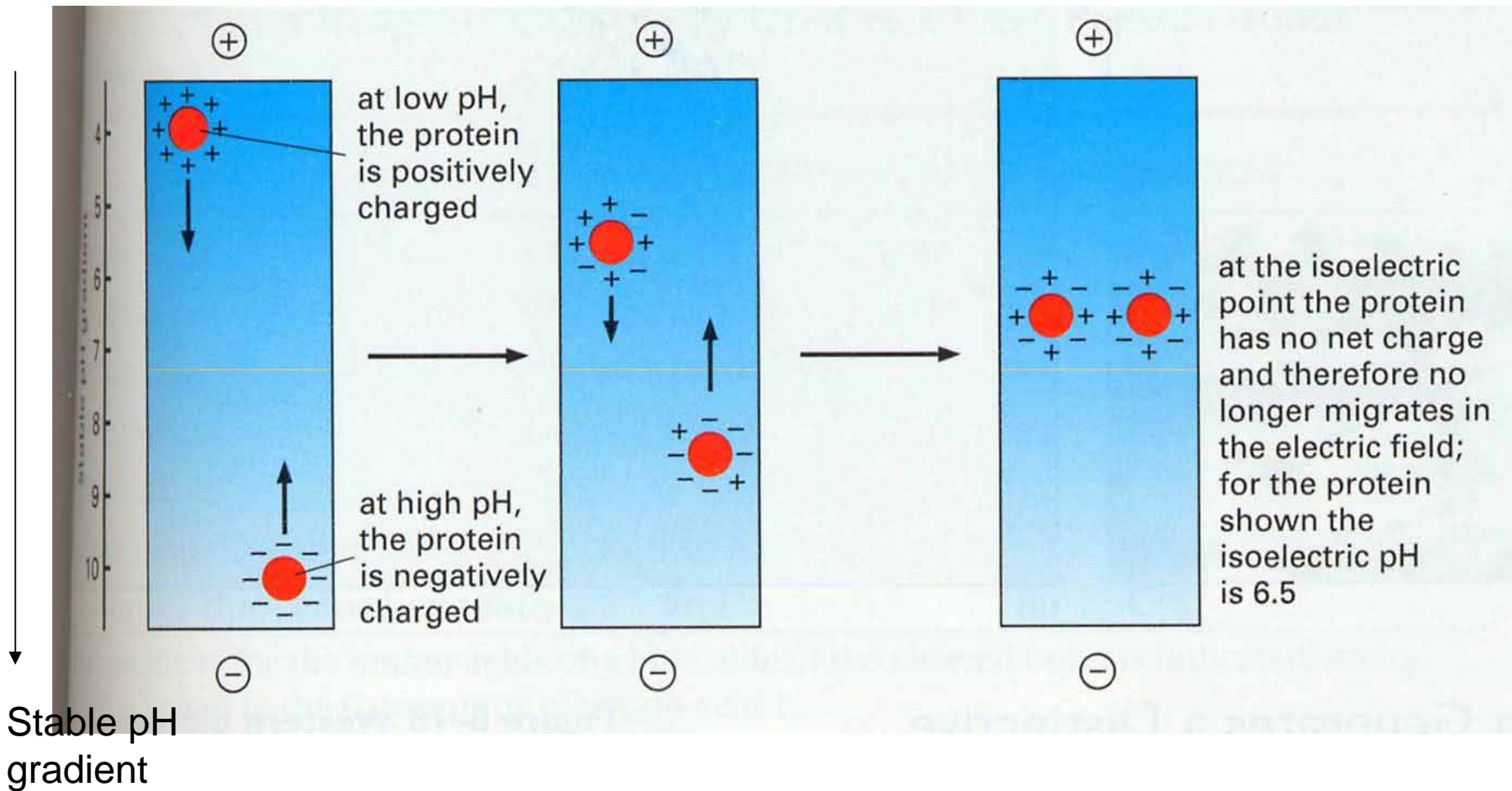


Mercaptoethanol



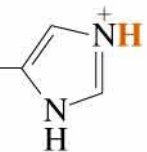
Isoelectric focusing

Ref:MBC




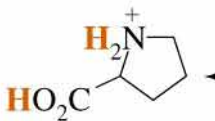
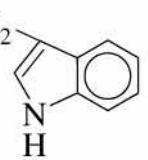
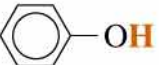
Isoelectric point

Table 11-1 Acid dissociation constants of amino acids

Amino acid ^a	Substituent ^a	Carboxylic acid ^b pK _a	Ammonium ^b pK _a	Substituent ^b pK _a	Formula mass
Alanine (A)	—CH ₃	2.348	9.867		89.09
Arginine (R)	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHC(=NH ₂ ⁺)NH ₂	1.823	8.991	(12.48)	174.20
Asparagine (N)	—CH ₂ C(=O)NH ₂	2.14 ^c	8.72 ^c		132.12
Aspartic acid (D)	—CH ₂ CO ₂ H	1.990	10.002	3.900	133.10
Cysteine (C)	—CH ₂ SH	(1.71)	10.77	8.36	121.16
Glutamic acid (E)	—CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	2.23	9.95	4.42	147.13
Glutamine (Q)	—CH ₂ CH ₂ C(=O)NH ₂	2.17 ^c	9.01 ^c		146.15
Glycine (G)	—H	2.350	9.778		75.07
Histidine (H)	—CH ₂ - 	1.7 ^c	9.08 ^c	6.02 ^c	155.16
Isoleucine (I)	—CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	2.319	9.754		131.17

SOURCE: A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 1 (New York: Plenum Press, 1974).

Table 11-1 Acid dissociation constants of amino acids

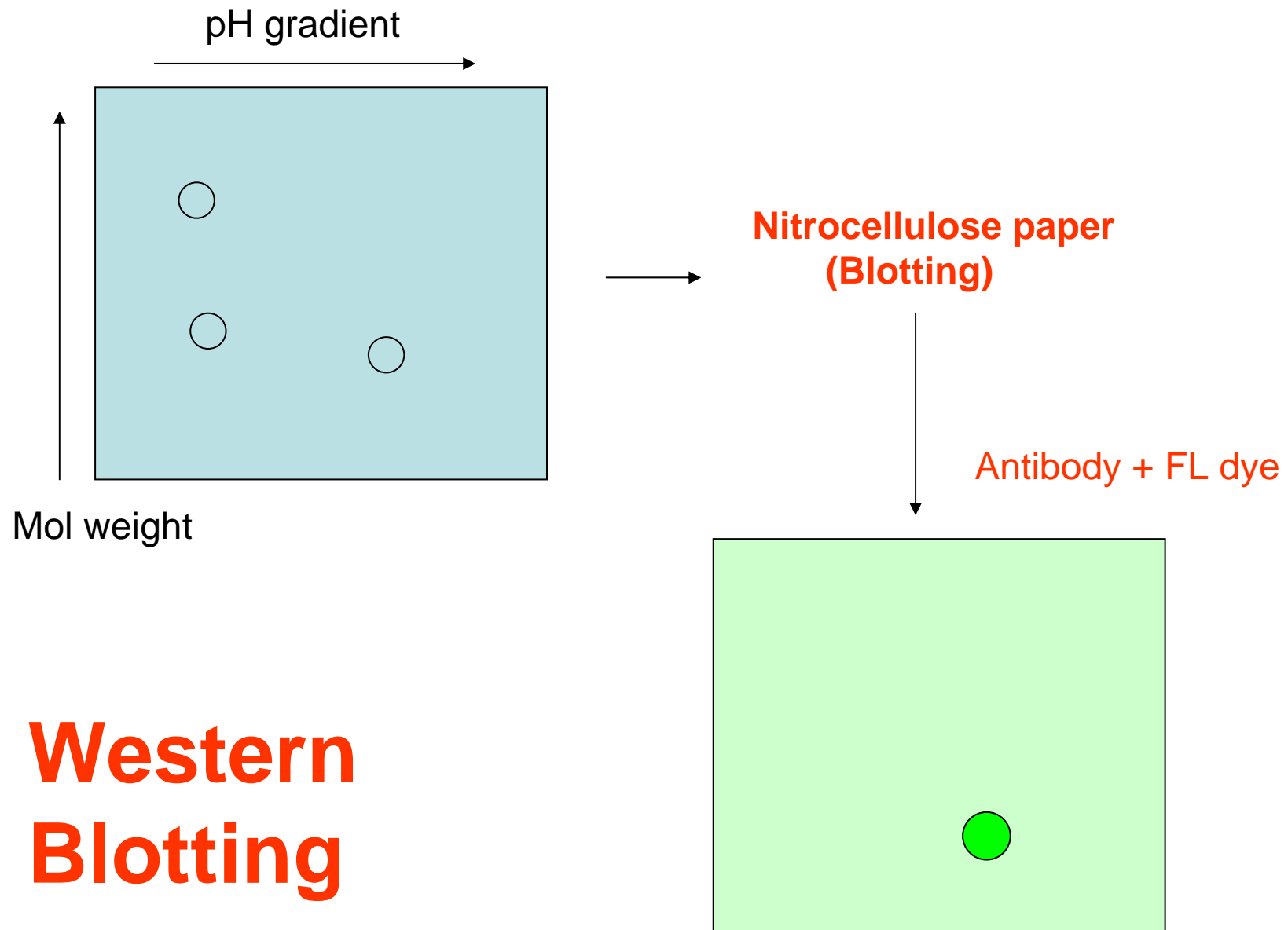
Amino acid ^a	Substituent ^a	Carboxylic acid ^b p <i>K</i> _a	Ammonium ^b p <i>K</i> _a	Substituent ^b p <i>K</i> _a	Formula mass
Leucine (L)	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	2.329	9.747		131.17
Lysine (K)	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	2.04 ^c	9.08 ^c	10.69 ^c	146.19
Methionine (M)	—CH ₂ CH ₂ SCH ₃	2.20 ^c	9.05 ^c		149.21
Phenylalanine (F)	—CH ₂ — 	2.20	9.31		165.19
Proline (P)	 ← Structure of entire amino acid	1.952	10.640		115.13
Serine (S)	—CH ₂ OH	2.187	9.209		105.09
Threonine (T)	—CH(CH ₃)(OH)	2.088	9.100		119.12
Tryptophan (W)	—CH ₂ — 	2.35 ^c	9.33 ^c		204.23
Tyrosine (Y)	—CH ₂ —  —OH	2.17 ^c	9.19	10.47	181.19
Valine (V)	—CH(CH ₃) ₂	2.286	9.718		117.15

a. The acidic protons are shown in **bold** type. Each amino acid is written in its fully protonated form. Standard abbreviations are shown in parentheses.

b. p*K*_a values refer to 25°C and zero ionic strength unless marked by c. Values considered to be uncertain are enclosed in parentheses.

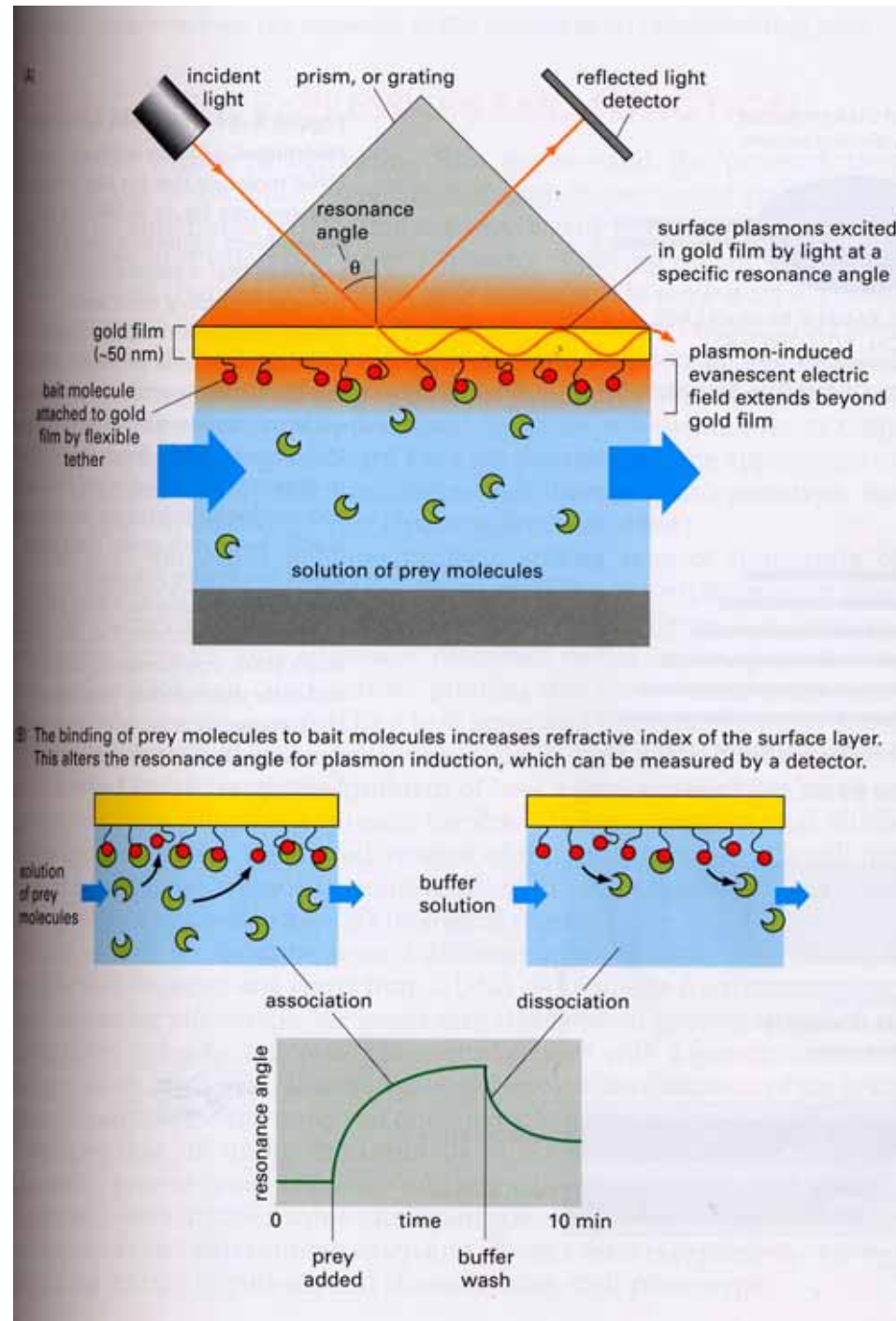
c. For these entries, the ionic strength is 0.1 M, and the constant refers to a product of concentrations instead of activities.

SOURCE: A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 1 (New York: Plenum Press, 1974).



Western Blotting

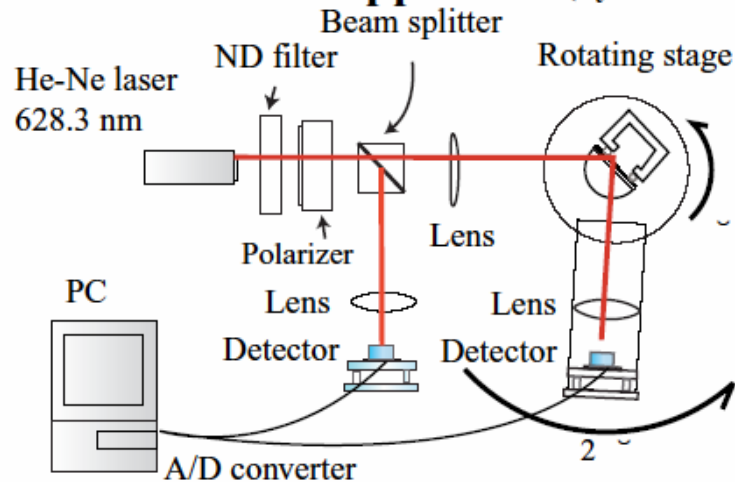
SPR (surface plasmon resonance)



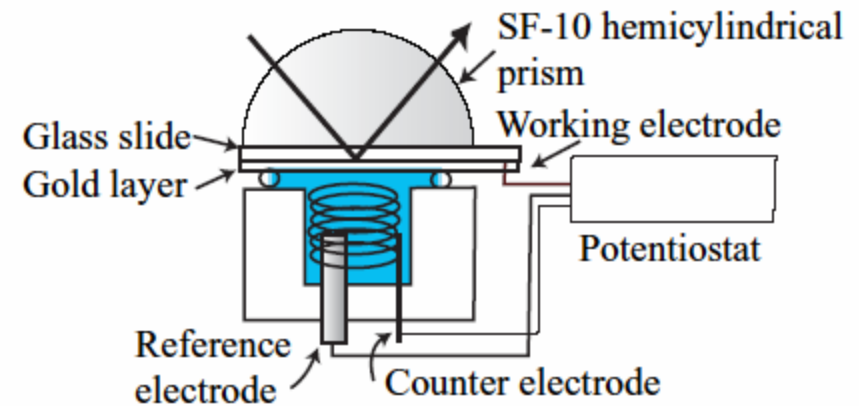
Ref:MBC

SPR apparatus

Home-made SPR Apparatus (by A. Shirakami)



Electrochemical Cell for SPR



Details of the Sample Setup

SF10 glass Prism
n matching oil
SF10 slide glass
MPS
Au film (50nm)
SAM

SPR principles

光による表面プラズモン(電荷密度波)の励起による共鳴

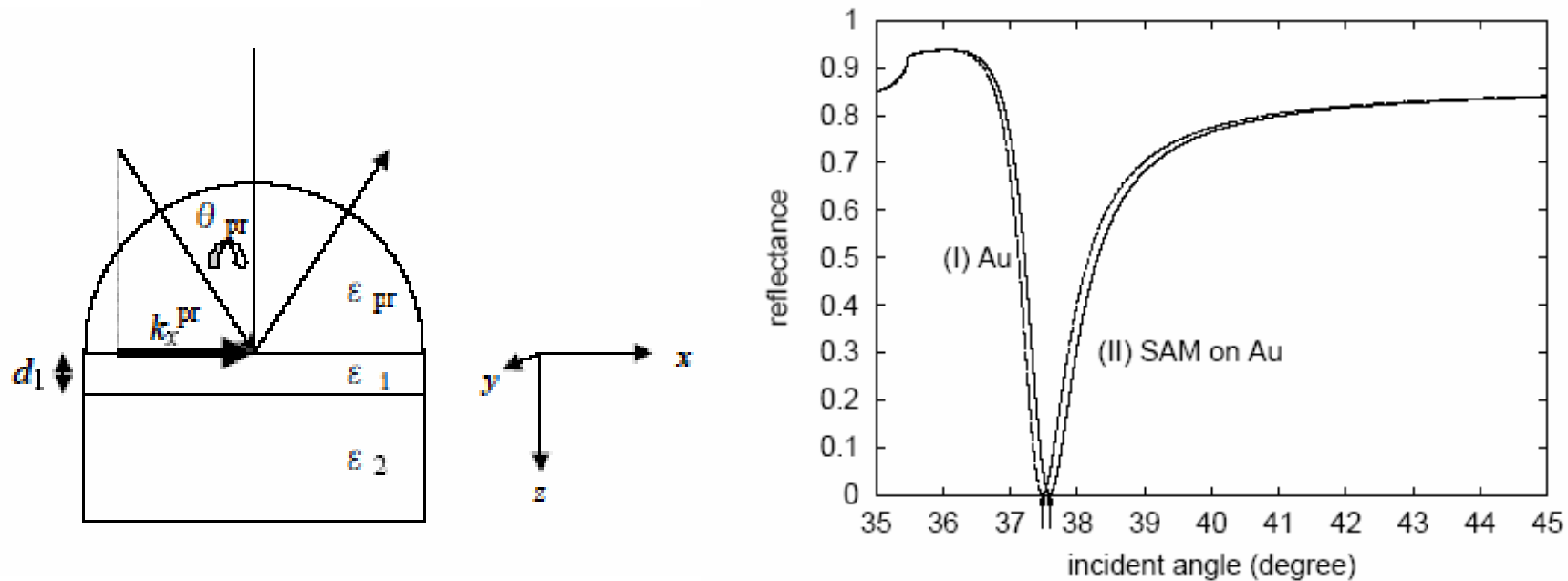
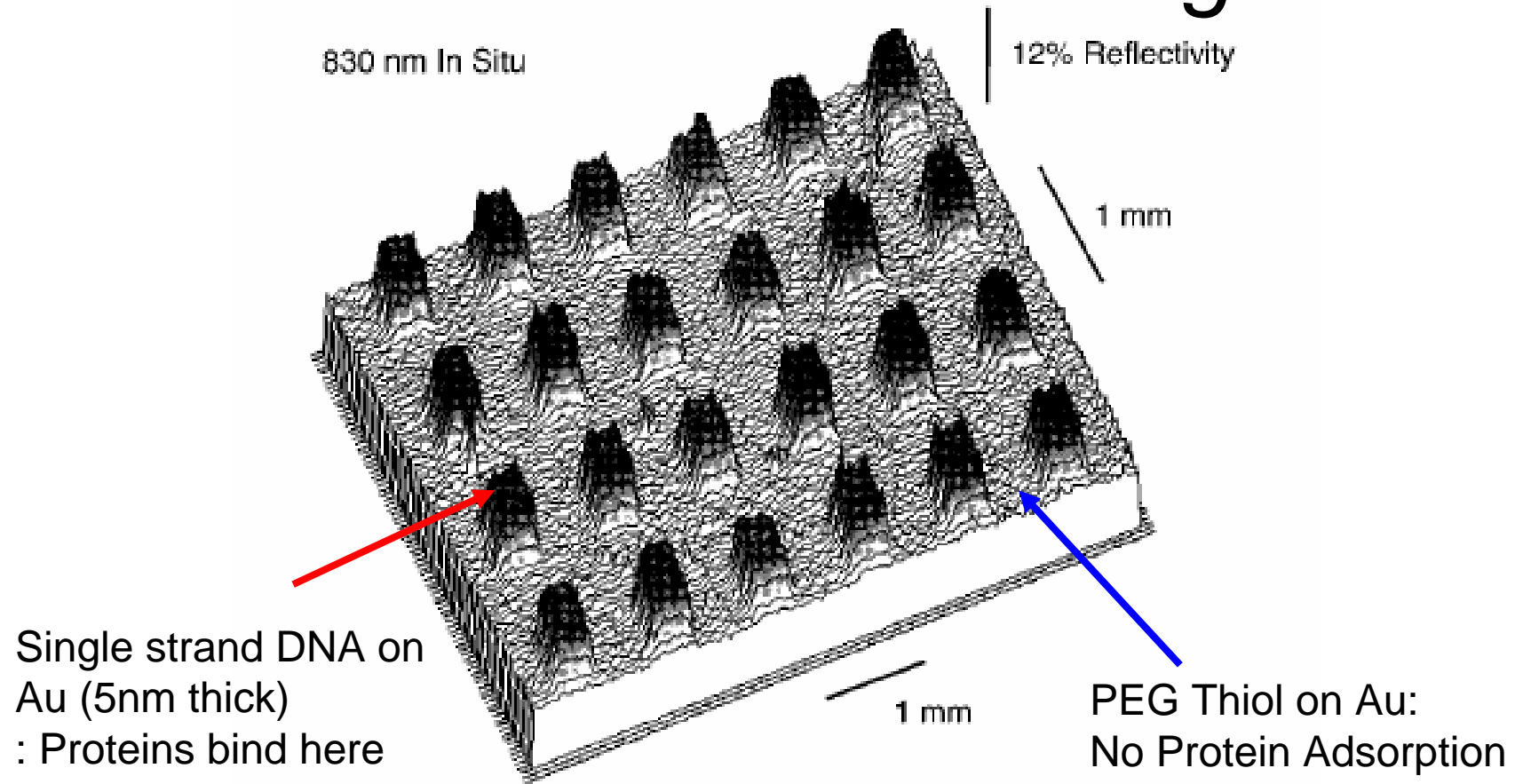


Figure 14: SPR curves for (I) the SF10 glass prism($n=1.723$)|Au($n + ik = 0.1726 + i3.4218$, 50nm)|Air($n=1.0$) and (II) the SF10 prism|Au(50nm)|SAM($n=1.61245$, 1nm)|Air systems.

Binary SAM on Au: Surface Plasmon Resonance Sensor *DNA-Protein binding*



SPRの詳細は

- <http://fm.ehcc.kyoto-u.ac.jp/japanese.html>

のSelf-Study Notes

1. 表面プラズモン共鳴:

Maxwell equations から----->

Electromagnetic Wave at Interface ----->

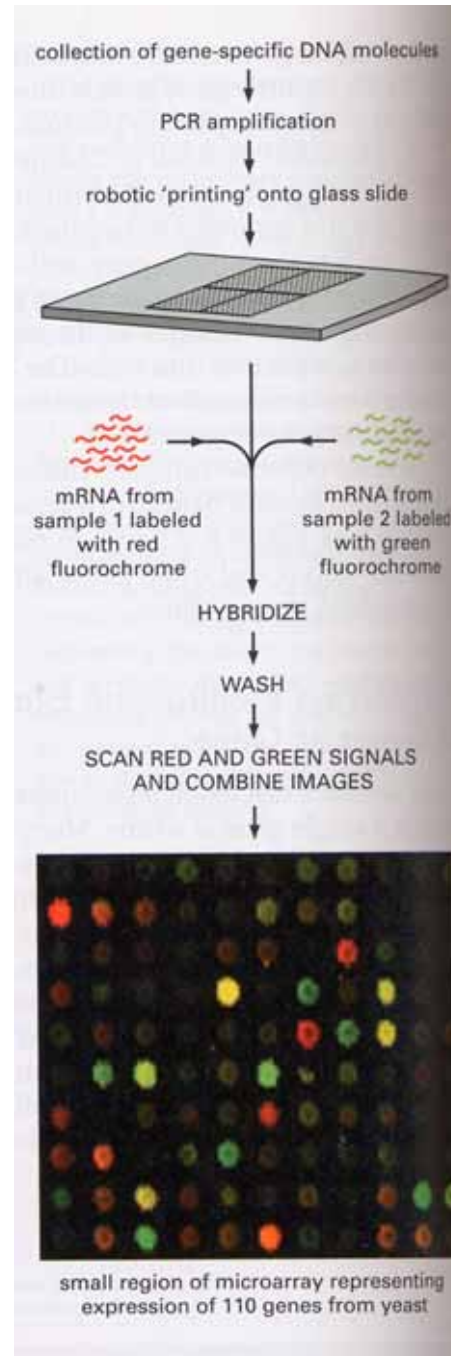
SPR(surface plasmon resonance)

multilayer simulation まで

[\(latex2html or pdf document\)](#) 29page

DNA Chip

Ref:MBC



柳田敏雄、「生物分子モータ
: ゆらぎと生体機能」
岩波物理の世界

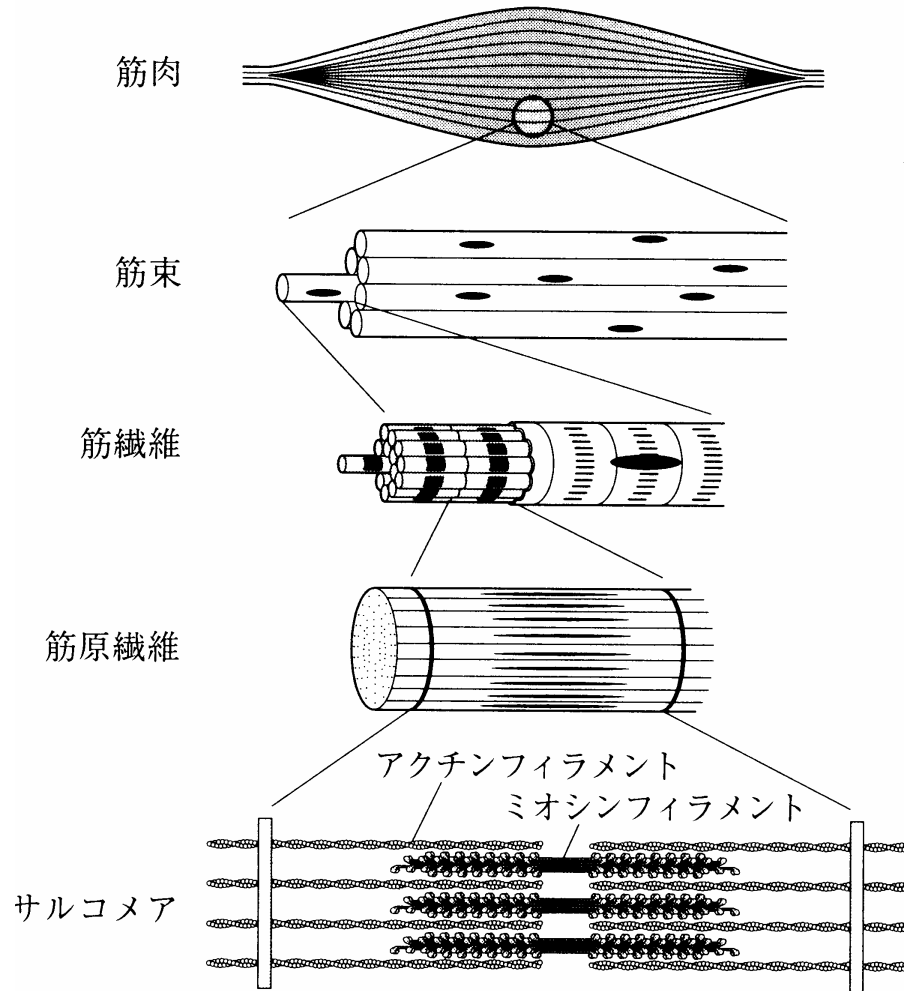


図 2.1 筋肉(横紋筋)の階層構造

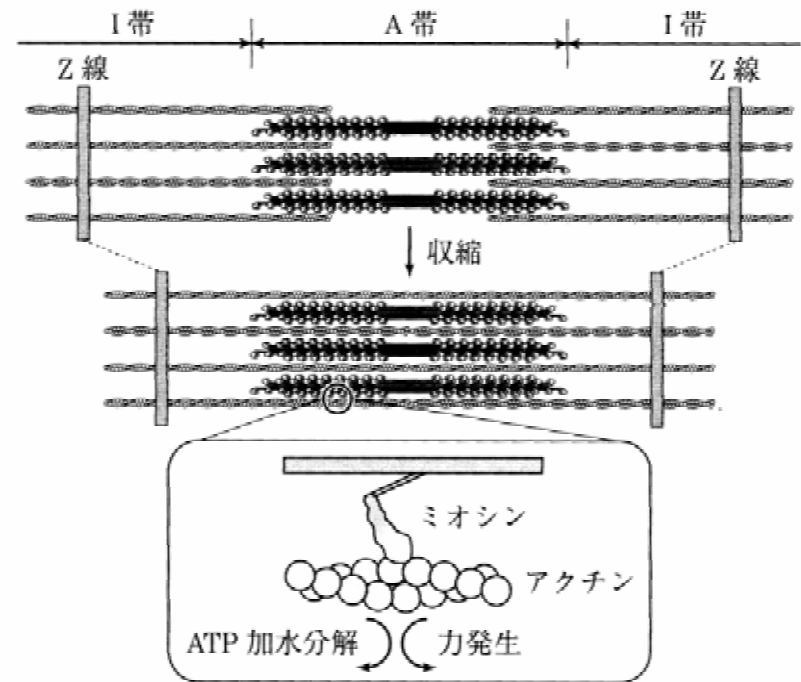


図 2.2 筋肉のスライディングモデル. 筋の収縮はミオシンフィラメントとアクチンフィラメントがおたがいに滑ること

1分子イメージング

エバネッセント波 を利用する

柳田敏雄、「生物分子モータ
:ゆらぎと生体機能」
岩波物理の世界

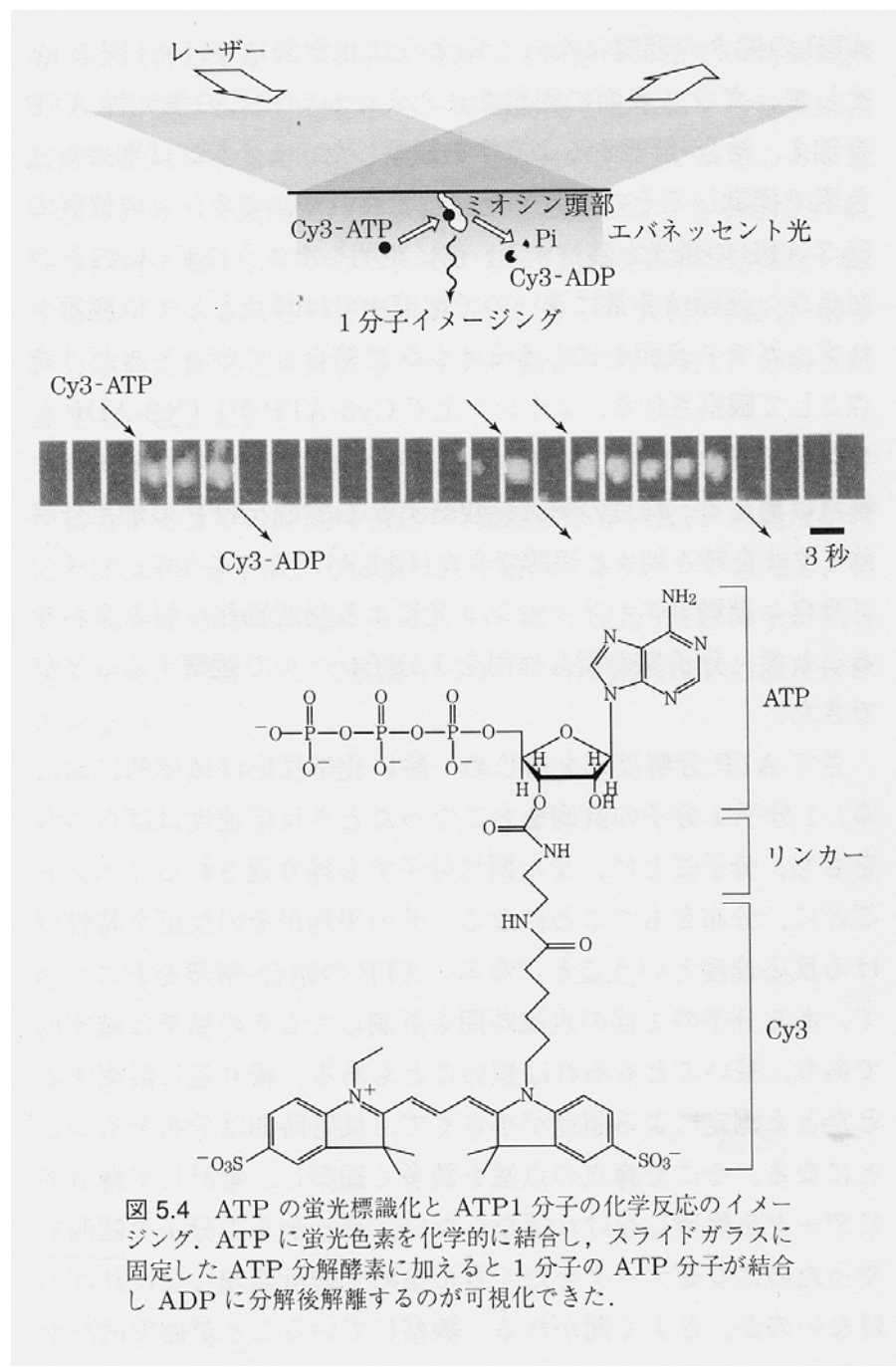
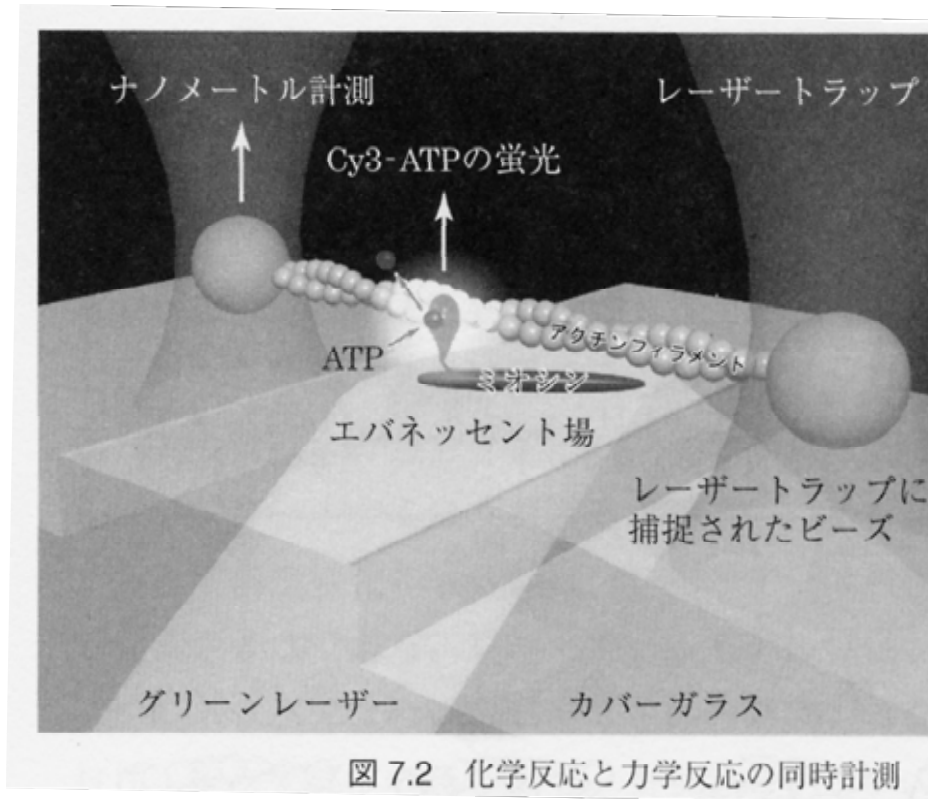
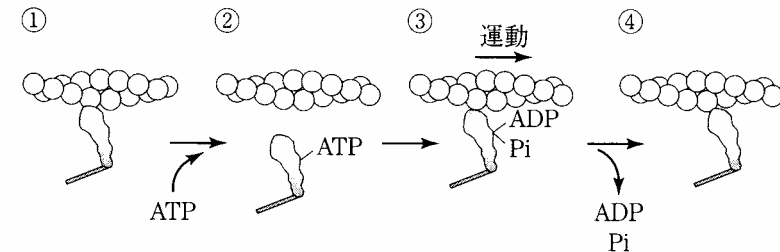
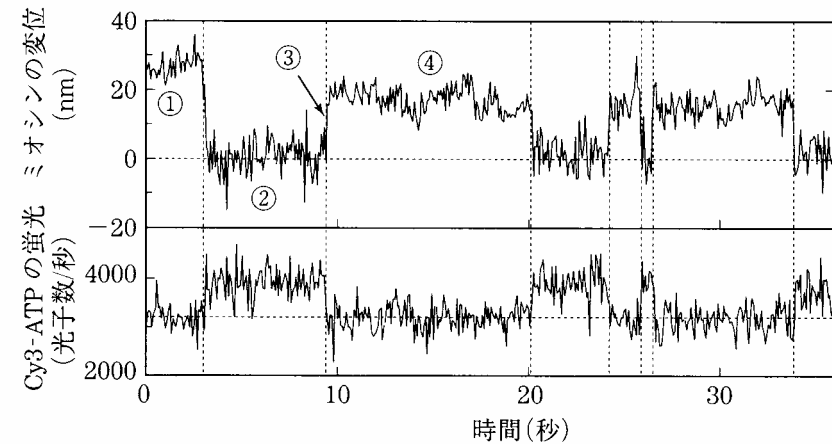


図 5.4 ATP の蛍光標識化と ATP1 分子の化学反応のイメージング. ATP に蛍光色素を化学的に結合し, スライドガラスに固定した ATP 分解酵素に加えると 1 分子の ATP 分子が結合し ADP に分解後解離するのが可視化できた.



柳田敏雄、「生物分子モーター
:ゆらぎと生体機能」
岩波物理の世界



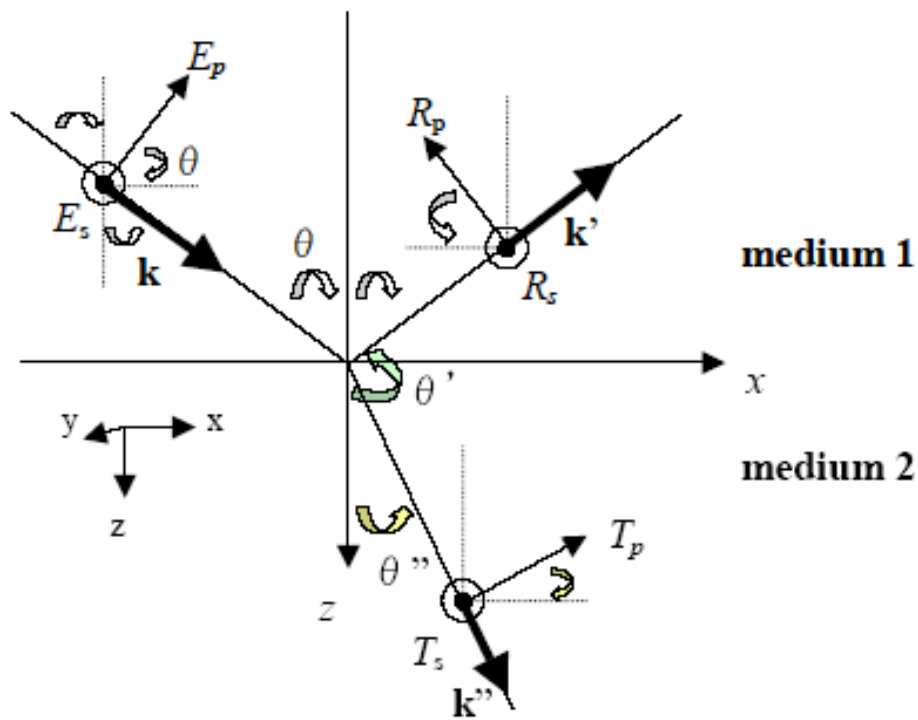
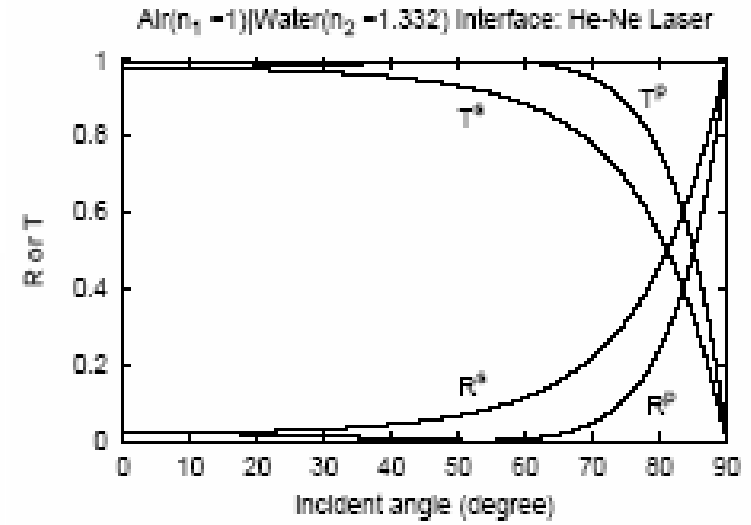
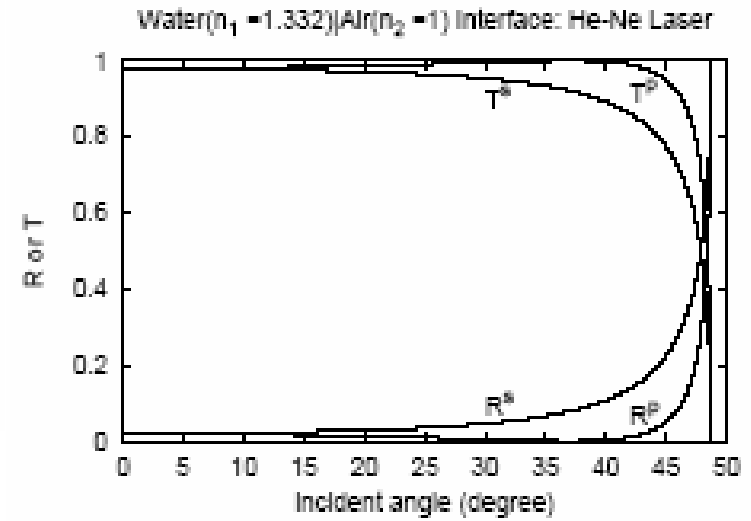


Figure 3: Reflection and Transmission of Light

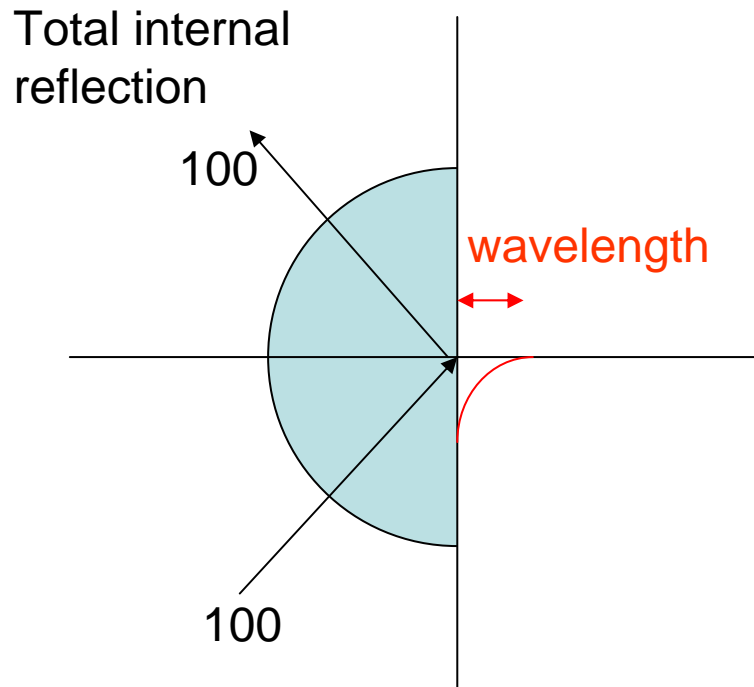
From Fig 0



He-Ne laser light at air|water interface



Evanescent wave



The transmitted wave can be written as

$$\mathbf{E}'' = \mathbf{T}_0 e^{i(\mathbf{k}'' \cdot \mathbf{r} - \omega'' t)} \quad (121)$$

$$= \mathbf{T}_0 e^{i(k'' \sin \theta'' x + k'' \cos \theta'' z - \omega'' t)} \quad (122)$$

$$= \mathbf{T}_0 e^{i(k'' \sin \theta'' x - \omega'' t)} e^{-k'' \sqrt{(n_1/n_2)^2 \sin^2 \theta - 1} z} \quad (123)$$

$$= \mathbf{T}_0 e^{i \frac{n_2 \omega \sin \theta''}{c} x} e^{-i \omega'' t} e^{-\frac{n_2 \omega \sqrt{(n_1/n_2)^2 \sin^2 \theta - 1}}{c} z} \quad (124)$$

The transmitted light intensity decays as $e^{-\frac{2n_2 \omega \sqrt{(n_1/n_2)^2 \sin^2 \theta - 1}}{c} z}$. The decay length is the order of wavelength because $c/\omega = \lambda/2\pi$. The Poynting vector \mathbf{S} in the z direction in the medium 2,

- Ab-Ag
- ELISA
- FRET
- SDS-PAGE
- Isoelectric Focusing
 - Western Blotting
 - SPR
 - DNA Chip
- Single molecule imaging