

蛍光偏光度測定システム



BEACON[®] Series

DNA Hybridization and Detection

DNA-Protein Binding

Protein-Protein Binding

Antigen-Antibody Binding

Ligand-Receptor Binding

Sugar-Lectin Binding

Protease Detection

Conformational Changes



<http://www.invitrogen.co.jp/>

総発売元 ハイブリッド有限公司

インビトロジェン株式会社

Introduction

BEACON®シリーズの概要	1
----------------	---

Characteristics

BEACON®シリーズの特性と特徴	2
BEACON®シリーズの原理とその応用	2
BEACON®シリーズの特徴	4

Application

BEACON®シリーズを用いたアプリケーション	6
タンパク質間相互作用の解析	6
μ-カルpainとカルパスタチンの結合	6
競合阻害反応による肝臓ホモジネート中カルパスタチンの検出	6
耐熱性プロテアーゼとタンパク性インヒビターとの結合反応	6
タンパク質のリン酸化と情報伝達機構の解明	7
アデノウイルスE1A結合p300と、cAMP-制御エンハンサ/CRE結合転写因子複合体の結合	7
抗体分子間の相互作用と抗原-抗体反応の解析	8
Full-Range BEACON® 2000を用いたビレン修飾二次抗体と一次抗体との結合測定	8
抗原(上皮増殖因子EGF)の高感度定量	8
抗体の親和性解析(ccd2HSペプチドとそのモノクローナル抗体の結合)	9
抗体の親和定数の解析(大阪大学 片倉啓雄氏)	10
DNA-タンパク質間相互作用の測定	12
大腸菌IHFタンパクとIHF Box DNAとの結合解析(ゲルシフトアッセイとの比較)	12
TATA結合タンパクとTATA Box DNAとの結合解析(温度依存性相互作用)	12
DNA-DNA間相互作用の解析	13
PCR産物のハイブリダイゼーション法による検出・定量	13
プライマーラベル法によるHIVプロウイルスの迅速PCR検出	13
酵素活性の検出	14
BEACON®プロテアーゼ活性検出キットによるトリプシンの活性検出	14
BEACON® RNase活性検出キットによるRNase Aの活性検出	14
BEACON® DNase活性検出キットによるDNaseの定量	15
BEACON®プロテアーゼ活性検出キットによるProteinase Kの活性検出	15
糖鎖とタンパク質の相互作用の解析	16
Full-Range BEACON® 2000を用いたPA化糖鎖と種々のレクチンの相互作用の解析	16
環境ホルモンとレセプターの結合測定	17
環境ホルモンのエストロゲンレセプターへの結合能測定	17
環境ホルモンのエストロゲンレセプターへの結合能測定	17

Fluorescein Labeling

BEACON®シリーズ用蛍光標識法	18
-------------------	----

Data Analysis Software

BEACON®シリーズ用データ解析ソフトウェア	20
GraphPad PRISM™	20
結合定数の決定(1)	21
結合定数の決定(2)	23

Specification

BEACON®シリーズの仕様	24
----------------	----

Related Products

BEACON®シリーズ消耗品・専用試薬	25
---------------------	----

蛍光偏光度測定システム BEACON® シリーズ

物質間のさまざまな相互作用の解析が、
リアルタイムで簡単に行えます。

蛍光偏光度測定システム BEACON®シリーズは、生体物質間の相互作用(複合体形成、解離、分解、高次構造の変化など)をリアルタイムで高感度に測定・解析できる蛍光偏光度測定装置です。BEACON®シリーズでは、固定化や反応後の抽出分離、洗浄操作は必要なく、ホモジニアスな測定系で、標識物質と溶液中で反応させるだけで解析が可能です。そのため、より天然に近い環境下で物質間相互作用を解析することができます。

医薬品のスクリーニングから分子生物学研究まで、広範な用途への応用が可能です。

用途 レセプターアッセイ(環境ホルモンの研究など)

イムノアッセイ(non-RI)

核酸ハイブリダイゼーション

PCR産物の検出・定量

タンパク質-DNA相互作用解析におけるゲルシフトアッセイの代用

リン酸化ペプチドなどリガンド結合タンパクの検出

酵素活性ならびに阻害剤の高感度検出(専用キット: DNase、RNase、Protease等)

糖鎖とタンパク質の相互作用解析

特長 めんどうな固定化操作、洗浄操作は不要。高価な特殊チップやセンサーも不要。

蛍光偏光度測定により、物質間相互作用をリアルタイムに、高感度モニタリング。

エンドポイント法とキネティック法の各々の設定で、柔軟に対応。

微量物質の検出・測定が可能。貴重なサンプルや、大量調製が困難なサンプルにも適応可能。

BEACON® 2000/Full-Range BEACON® 2000 は励起・蛍光フィルターの変更、

反応温度の変更、測定溶液の少量化(100 µl ~)に対応可能。



Full-Range BEACON® 2000

BEACON®シリーズの原理とその応用

蛍光偏光法による測定原理

蛍光偏光度測定法は、1926年にPerrinによって紹介されて以来、分子間相互作用の研究において有用な手段として利用されています。

液体中の蛍光性分子が平面偏光により励起されると、蛍光性分子中のフルオロフォアが励起状態で、かつ定常状態を保っている場合には同一の偏光平面で蛍光を放射します。しかしフルオロフォアの励起状態中に、蛍光性分子が回転などの運動を行った場合には、励起平面とは異なった平面へ蛍光を放射し蛍光偏光が解消されます。

分子の運動はその大きさに影響を受け、蛍光性分子が低分子の場合は、運動速度が速いために放射光の偏光が解消され、蛍光偏光度は小さい値を示します。一方、高分子である場合には、励起状態の間の分子の運動はほとんどなく、放射光は偏光が解消できず、大きな蛍光偏光度を与えます。

このように偏光度(P)は分子の回転緩和時間に比例し、式で表すと次のようになります。

$$P \text{ 値} \times \text{回転緩和時間} = \frac{3}{RT} V$$

: 溶液の粘度、T: 絶対温度、V: 分子の大きさ、R: 気体定数

したがって、測定条件(溶液の温度、粘度)を一定にしておけば、蛍光偏光度(P)の大小で分子サイズの大小を測定することができます。通常、蛍光偏光法の実験で良好な測定結果を得るためには、分子量の小さい方の物質を蛍光標識し、それと高分子量の物質が相互作用する系を作ります。標識された物質とターゲット物質の分子量の差、あるいはその比が大きければ、蛍光偏光度は増大すると考えられます。

BEACON®シリーズの測定原理を図1に示します。

単色光が垂直偏光フィルターを通過して、サンプルチューブ内の蛍光性分子を励起します。その時、垂直偏光面に対して配向している分子のみが光を吸収し、励起状態となり光を放射します。この放射光を、垂直偏光面および水平偏光面の両平面で測定することにより、サンプルから発する蛍光の偏光度を得ることができます。

蛍光偏光度は、この測定値を用いて以下のように計算され、励起から放射までの間に分子が回転した度合いを示します。すなわち、励起状態で回転数の高い小分子は、放射時に低い偏光度を示し、回転数の低い大分子は高い偏光度を示します。

蛍光偏光度(P)は以下のように定義されます。

$$P \text{ 値} = \frac{\text{強度(平行)} - \text{強度(垂直)}}{\text{強度(平行)} + \text{強度(垂直)}}$$

強度(平行): 励起光平面に平行な放射光(蛍光)の強度
強度(垂直): 励起光平面に垂直な放射光の強度

ところで、文献によく用いられている異方性値(A)と偏光度(P)の関係は、以下の式で表されます。BEACON®システムでは、P値(ディメンジョンなしの光強度比を示す偏光度)を用います。(1PU = 1000 mPU: P_{max}はフルオレセインでは0.5となります)。

$$A = \frac{2P}{3 - P}$$

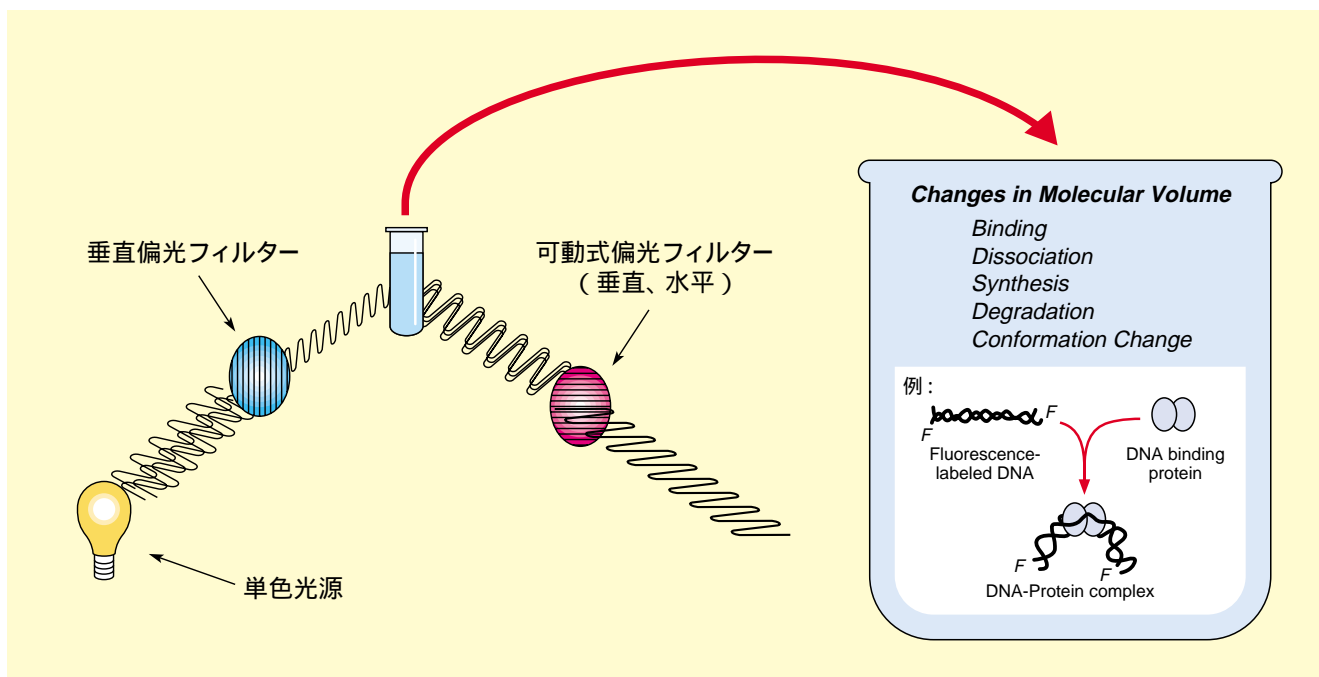

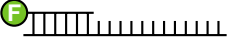
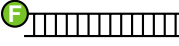


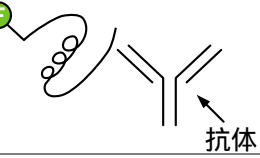

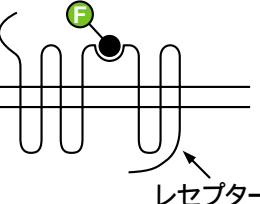
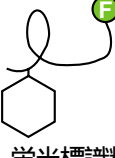
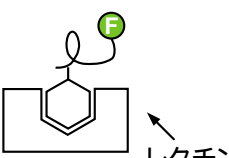


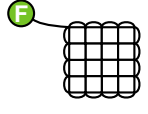



図1. 蛍光偏光度測定の実験原理

物質間相互作用をリアルタイムに、高感度モニタリング
BEACON® シリーズは、前ページの原理を利用して、生体物質
の分子間相互作用を高感度に測定します。物質間の結合(複
合体形成)により分子量が増大すると、偏光度も増大します。逆
に解離や分解により分子量が減少すると、偏光度も減少します。
こうした偏光度の変化から、さまざまな生体物質間の相互作用
を解析することができます(表1)。

また、蛍光偏光度測定法では、過剰のフリー分子から微量の結
合分子を分別する固液分離の必要がなく、ダイレクトかつ迅速
に対象物のバウンド/フリー比を測定することが可能です。
BEACON® 2000とFull-Range BEACON® 2000では、サ
ンプルの反応温度設定の変更が可能のため、幅広いアプリケー
ションに対応できます。

表1. 蛍光偏光度測定のためのさまざまな応用例

解析対象	蛍光偏光度(小)	蛍光偏光度(大)
DNA ハイブリダイゼーション	 蛍光標識オリゴDNA	
DNA-タンパク質	 蛍光標識DNA	 DNA結合性タンパク質
抗原-抗体	 蛍光標識抗原	 抗体
リガンド-レセプター	 蛍光標識リガンド	 レセプター
糖-レクチン	 蛍光標識糖タンパク質	 レクチン
プロテアーゼ検出	 蛍光標識ペプチド	 蛍光標識カゼイン
高次構造変化		

F : 蛍光物質

BEACON®シリーズの特徴

高感度検出で、広範囲の蛍光度と蛍光偏光度を測定
BEACON®シリーズの検出感度は、蛍光偏光度測定(図2)では10 pM、蛍光度測定(図3)では0.1 pMと、非常に高くなっています(フルオレセイン測定時) 測定範囲の直線性は1~5000 pMと広く、解離定数の測定範囲も 10^{-5} ~ 10^{-11} Mとなっています。

BEACON®の励起波長および蛍光検出波長は、それぞれ490 nmと530 nmで設定されており、フルオレセイン標識を主に用いますが、BEACON® 2000では、フィルター交換が可能のため、測定波長領域が広がります(360~700 nm) さらにFull-Range BEACON® 2000では、光源としてハロゲンランプと水銀ランプを交換できるため、測定波長領域が254~700 nmと広がっています。これにより、ピレン系、ダンシル系等の蛍光寿命の長い短波長の蛍光物質による高分子間の相互作用解析が可能です。

エンドポイント法とキネティック法で、多様なアプリケーションに柔軟に対応

リアルタイムの測定なので、物質間の結合平衡だけでなく、結合反応や解離反応等を解析することも可能です。

(1) エンドポイント法

エンドポイント法は、レセプターアッセイ、PCR産物の検出、イムノアッセイ等、多検体を測定する際に有効です。物質間の結合は各々の親和性に依存して異なりますが、通常2分から3時間でほぼ平衡に達します。また蛍光偏光度は、約6秒/検体で測定されます。したがって、たとえば100検体を恒温槽中で2時間反応させ測定を行った場合、2時間半あればすべての測定が完了します。

またターゲット物質の濃度を変化させることにより、解離定数が求められます(図4、5)。

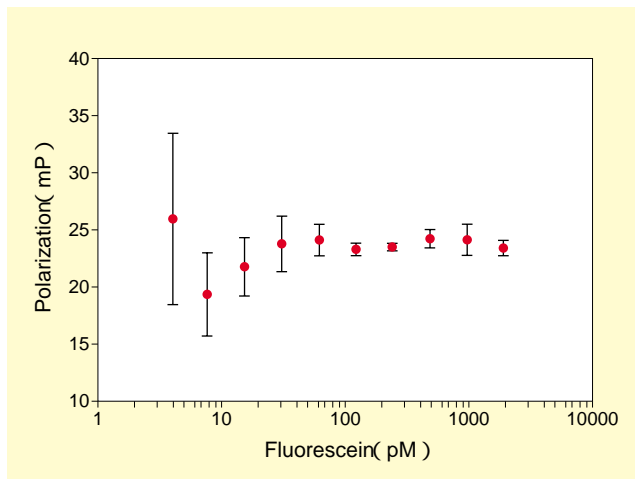


図2. フルオレセインの蛍光偏光度測定

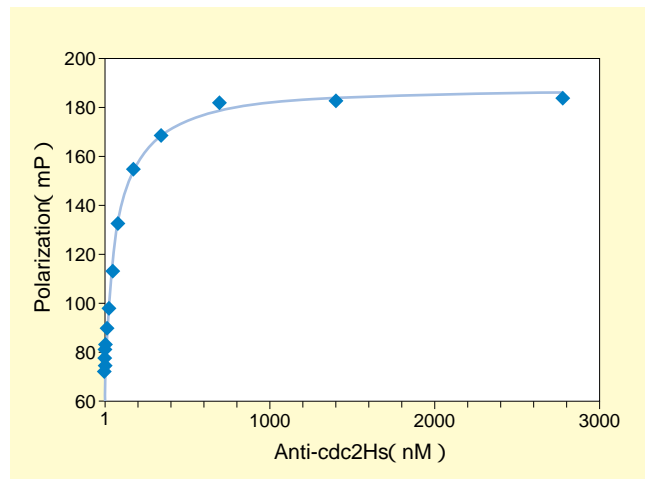


図4. エンドポイント法測定の応用例

フルオレセインで標識したF-cdc2Hs抗原10 pMと、種々の濃度の抗cdc2Hs抗体とを液相中で混合、インキュベートした後、各濃度における蛍光偏光度を測定した。抗体濃度が上昇するにつれ偏光度が上昇することから、抗原-抗体反応の進行が確認できる。

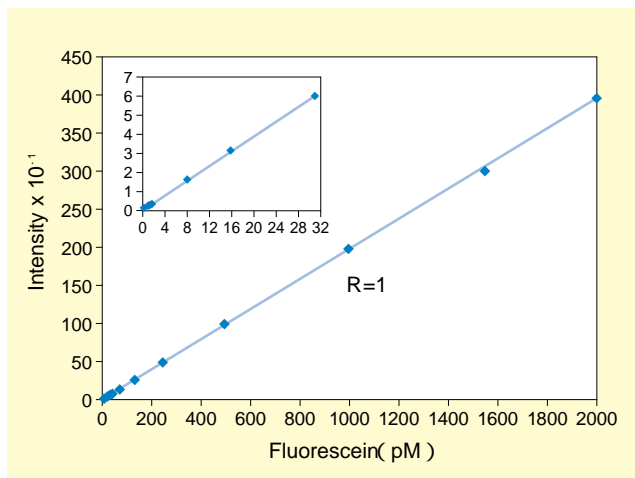


図3. 蛍光度測定によるフルオレセインの定量

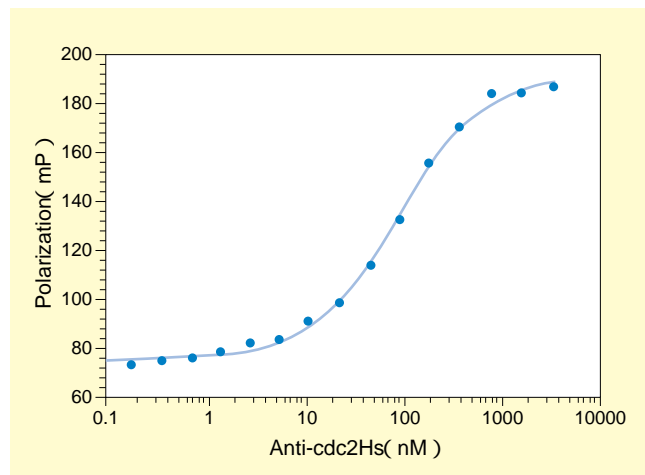


図5. 蛍光偏光度による濃度対応結合曲線

図4のデータを、片対数にプロットして得られたシグモイド曲線。これより解離定数 K_d は、75 nMと考えられる。

(2) キネティック法

キネティック法は、物質間相互作用をより詳細に、反応速度論的に解析する際に有用で、通常 2 ~ 20 分 / 検体で測定が可能です(図 6)。

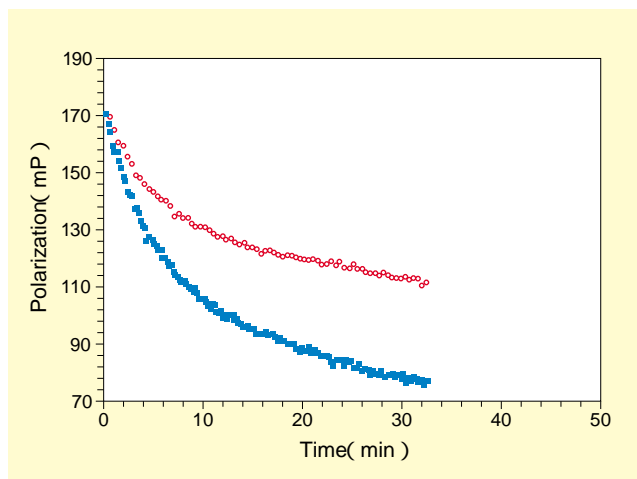


図 6. キネティック法測定の例
バッファー中の基質(FTC-カゼイン)にそれぞれ100 ng(○)、200 ng(□)のトリプシンを加え、13秒間隔で蛍光偏光度を測定した。時間の経過とともにFTC-カゼインの分解が進み、偏光度の低下が確認できる。

微量物質の検出・測定が可能

固相支持体なしの液相中で反応でき、ピコモル(pM)オーダーでの微量平衡分析が可能です。またサンプルは損傷されことなく、再分析や後処理に供することができるので、貴重なサンプルや大量調製が困難なサンプルにも適応可能です。

解析に必要なサンプル量は、親和性の強さによって変動します。親和性の高い相互作用の解析にはサンプルは少量で可能です

が、親和性の低い場合には必要量が増加します。

たとえば、分子量15,000のタンパク質と250 pMのフルオレセイン標識DNAの平衡解離定数($K_d=0.25$ nM)を解析するには、まず18本の試験管に一定濃度の標識DNAと濃度を0.025 ~ 25 nMまで変化させたターゲットタンパク質を、1 ml/tubeとなるように加えて反応させた後、蛍光偏光度を測定します。したがって、この実験に必要なターゲットタンパク質の絶対量は約1 μ gとなります。また、BEACON® 2000/Full-Range BEACON® 2000ではターゲットタンパク質容量は0.1 ml/tubeですので、タンパク質の必要量は約100 ngとなります。一方、レセプターアッセイなどで標識リガンドを用いてその阻害剤をスクリーニングする場合などは、条件さえ決まればレセプター(上記実験ではターゲットタンパク質)の高濃度領域は不要で、かつ一定濃度で多検体が測定できますので、ナノグラム(ng)オーダーのレセプター(またはタンパク質、抗体)があれば、かなりの数の検体が測定できます。

ワイドな標識対象物質の分子量レンジ

通常は分子量の小さい方を標識します。しかし、プロテアーゼやヌクレアーゼなどの分解酵素活性やその阻害剤を超高感度に検出する際には、カゼインや核酸などの高分子基質を標識します(フルオレセインを用いる場合、分子量6万以上の物質を標識することは勧められません)。合成時にその末端の標識が可能で、また立体障害を最小限に抑える目的でも、オリゴヌクレオチドやペプチドを標識するほうが好結果が得られます。蛍光偏光度測定の実理から、標識された物質とターゲット物質の分子量の差、あるいはその比が大きければ、蛍光偏光度は増大すると考えられます。BEACON® シリーズにより相互作用が測定可能であった例を表2に示します。

表 2. BEACON® シリーズで測定された相互作用物質例

標識化合物(分子量 A, kDa)	ターゲット化合物(分子量 B, kDa)	比(B/A)	差(B-A)
Phosphorylated peptide(1)	SH2SH3 domain(20)	20	19
Angiogenin(14)	RNase inhibitor(50)	3.57	36
Fluorescein(0.3)	Single Chain Anti-Fluorescein(50)	167	49.7
cdc2Hs peptide(3)	Anti-cdc2Hs(mono χ 150)	50	147
EGF(6)	Anti-EGF(poly χ 160)	25	144
T7 primer(5)	complementary T7 primer(5)	1	0
TATA box(40)	TATA box binding protein(90)	2.25	50
<i>trp</i> repressor operator(16)	<i>trp</i> repressor(35)	2.19	19

タンパク質間相互作用の解析

酵素とその特異的阻害タンパク質の結合解析

BEACON®シリーズを用いれば、B/F分離が不要なホモジニアスアッセイ系の測定において、細胞ホモジネートのようなクルードなサンプルの結合反応解析を迅速、簡便、高感度に行えます。

μ-カルパインとカルパスタチンの結合

FTC-カルパスタチン 445 pM と、ウシ赤血球 μ-カルパインを種々の濃度で反応させ、蛍光偏光度を測定すると、 0.1×10^{-9} という平衡解離定数 (K_d) が得られました。

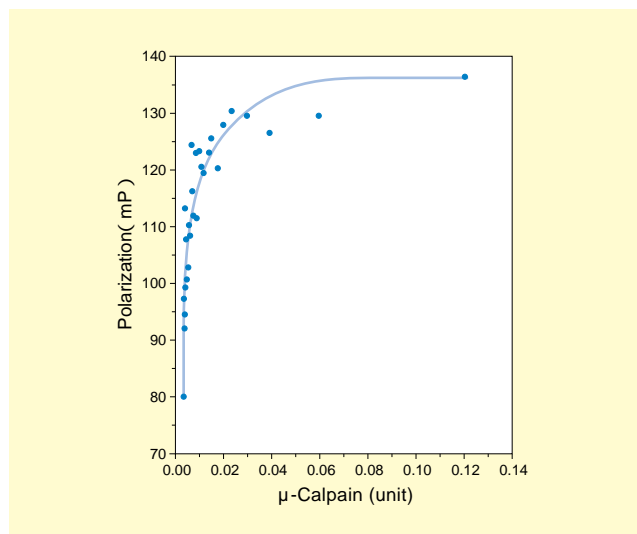


図7. カルパスタチンとμ-カルパインの結合

競合阻害反応による肝臓ホモジネート中カルパスタチンの検出

FTC-カルパスタチン 445 pM と、0.012 U の μ-カルパインを、肝臓ホモジネート液存在下で反応させ、蛍光偏光度を測定すると、 Ca^{2+} 存在下で、ホモジネート添加量に比例して、FTC-カルパスタチンの結合が阻害されました。なお、カルパインとカルパスタチンの結合は、 Ca^{2+} 依存性なので、EDTA 存在下では、偏光度の変化は認められませんでした。

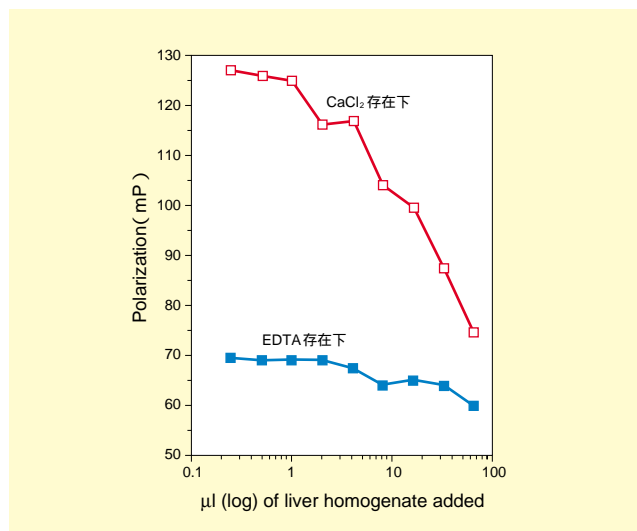


図8. 競合阻害反応による肝臓カルパスタチンの検出

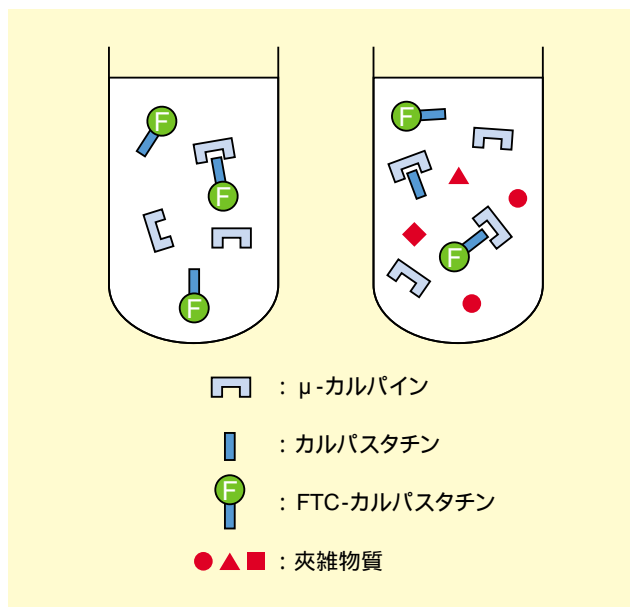


図9. 夾雑物の有無による結合状況の模式図

耐熱性プロテアーゼとタンパク性インヒビターとの結合反応

耐熱性プロテアーゼと、Fluoresceine-C6 Amine (FC6NS) Labeling Kit (PV2099・製造中止) で標識したタンパク性インヒビター (FC6NS-In) との結合反応を、蛍光偏光度を測定することにより解析しました。6、24、65 の3種の反応温度について、偏光度 (mP) を20秒間隔の Kinetic Mode で測定しました。

その結果、6 および24 の反応温度では、時間の経過に伴ってインヒビターとの結合反応が観測されました。また65 では、強い耐熱性プロテアーゼ活性によりFC6NS-In が基質として消化されるため、偏光度の低下が観測されました(図10)。

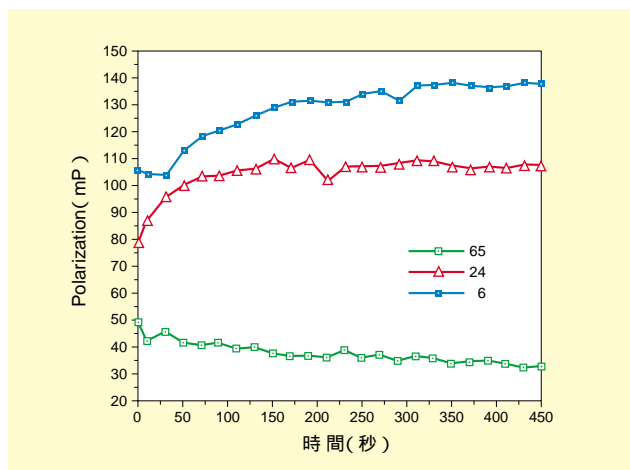


図10. 耐熱性プロテアーゼとタンパク性インヒビターとの結合

タンパク質のリン酸化と情報伝達機構の解明

転写因子 エンハンサー複合体とリン酸化タンパク質の結合解析

BEACON®シリーズは、DNAと2種の異なるタンパク質との3者間の結合解析にも、有用なツールとなります。

アデノウイルスE1A結合p300と、cAMP-制御エンハンサ(CRE) CRE結合転写因子(CREB)複合体の結合23 baseのFTC-CRE(Somatostatin)5 nMを、CREB、あるいはリン酸化CREB 60 nMで飽和結合させた後、種々の濃度のp300を反応させ、蛍光偏光度を測定すると、平衡解離定数(K_d)は 6.4×10^{-7} Mとなりました。これは、CATアッセイの結果とも良く一致し、CREBのリン酸化が情報伝達に重要であることが確認されました。

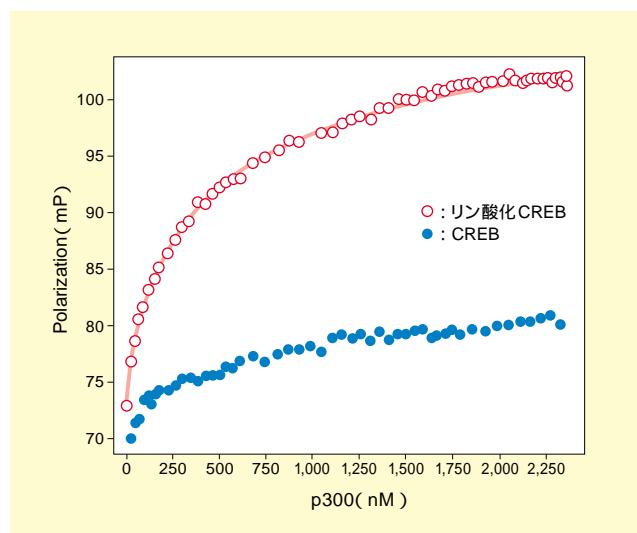


図11. リン酸化CREBの有無による複合体生成曲線

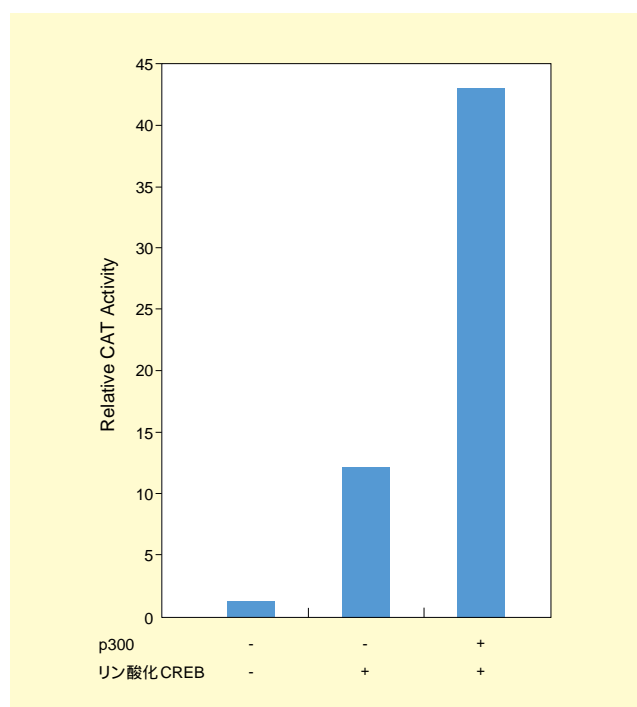


図12. 生成された複合体のCAT活性

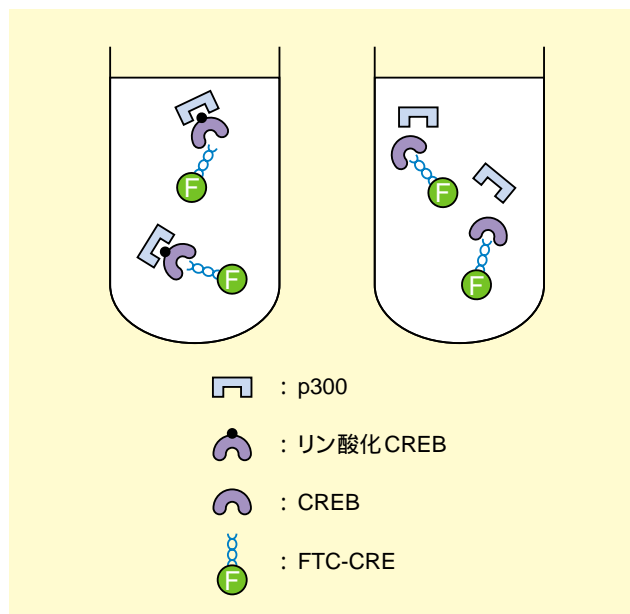


図13. リン酸化CREBの有無による複合体生成の模式図

抗体分子間の相互作用と抗原 抗体反応の解析

溶液中の免疫複合体の形成を直接的に検出

BEACON®シリーズは分離・洗浄などのステップが不要な均一系分析なので、シングルチューブ内で全反応をモニター・検出でき、高精度、高感度測定が迅速に行えます。

さらにFull-Range BEACON® 2000は、ピレン系などの蛍光寿命の長い短波長の蛍光物質が使用可能であり、それらを使用することで抗体のような高分子間の相互作用の測定が可能です。

Full-Range BEACON® 2000を用いたピレン修飾二次抗体と一次抗体との結合測定

ゲルろ過精製したピレン修飾ウサギ抗マウスIgG抗体(終濃度10 nM)に、マウス抗ヒトフィブロネクチンIgG抗体(FN12-8)を種々の濃度で加え、両者の結合をFull-Range BEACON® 2000(励起フィルター350 nm、蛍光フィルター390 nm)で計測しました(図14)。その際に、マウスIgG抗体に特異的な結合であることを確認するために、対照としてウサギIgG抗体を用いました。

なお、本実験では標識二次抗体の量を10 nMとしましたが、1 nMの濃度でも同様な蛍光偏光度が測定できることを確認済みです。

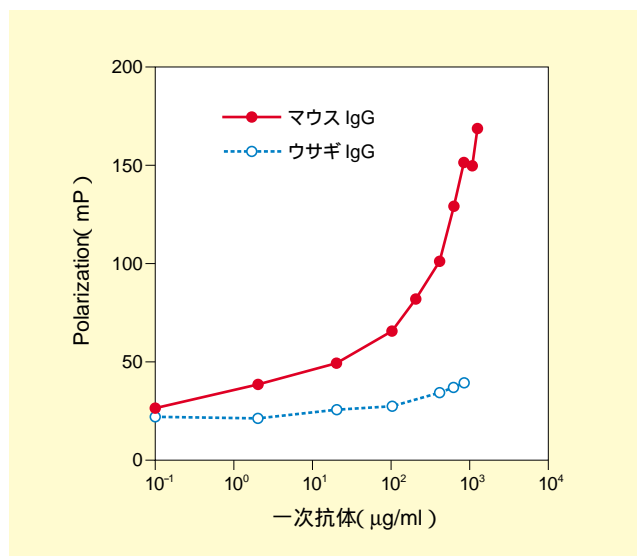


図14. ピレン修飾二次抗体(抗マウスIgG)と一次抗体との結合

抗原(上皮増殖因子EGF)の高感度定量

顎下腺から精製されたEGF、そのEGFをフルオレセイン標識したF-EGF、および抗マウスEGF抗体の競合反応をモニターし、EGF濃度のログ値を横軸に、偏光度(mP)を縦軸にとると、図15のような検量線が描けます。この時、200~1000 pM(1.2~6.0 ng/mlに相当)EGFの範囲で直線となるため、この範囲内で測定が可能となります。この検量線を使った、マウス腹水中のEGF定量例では、60分反応後の偏光度166 mPは、反応チューブ内濃度550 pMに相当し、腹水サンプル中のEGF濃度は、61 nMと計算されました。

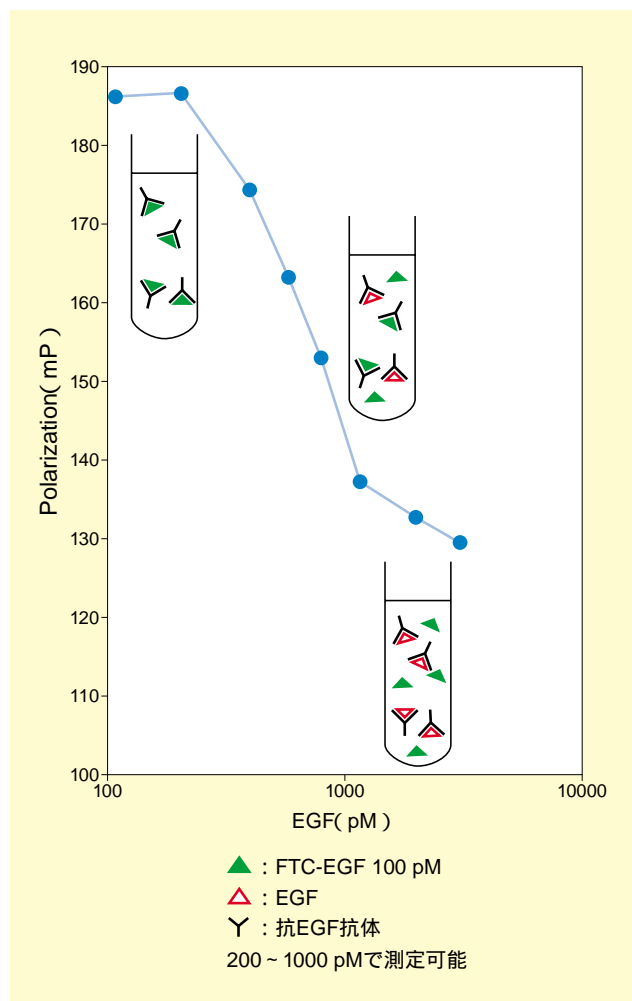


図15. 競合反応を利用した検量線

抗体の親和性解析(cdc2Hs ペプチドとそのモノクローナル抗体の結合)

ヒストンH1 カイネースの構成酵素、p34 カイネースをコードする cdc2Hs ジーンから得られたタンパク質産生物中の、76 ~ 104 位のアミノ酸に対応する 28 残基の cdc2Hs ペプチドを抗原とし、マウス腹水中で産生したモノクローナル抗体の特異性研究の一つとして抗原-抗体結合に関するデータを取得しました。まず、抗原-抗体結合が平衡に達する時間を実験的に求めてから、フルオレセイン標識した cdc2Hs ペプチド(F-cdc2Hs ペプチド)の濃度を固定し、濃度変化させた抗 cdc2Hs ペプチド抗体との結合平衡グラフ(図16)を得ました。このグラフには、変曲点や、最小点/最大点もなく、Clark のモデル曲線に良くあてはまっています。

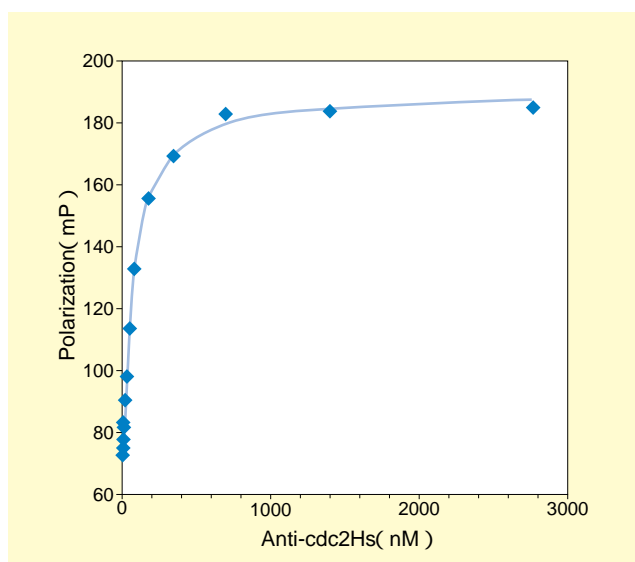


図16. 結合平衡曲線

このデータを、片対数グラフにプロットして、非線形カーブフィッティングで Klotz Plot を得、変曲点から平衡解離定数 (K_d) を計算しました(図17)。

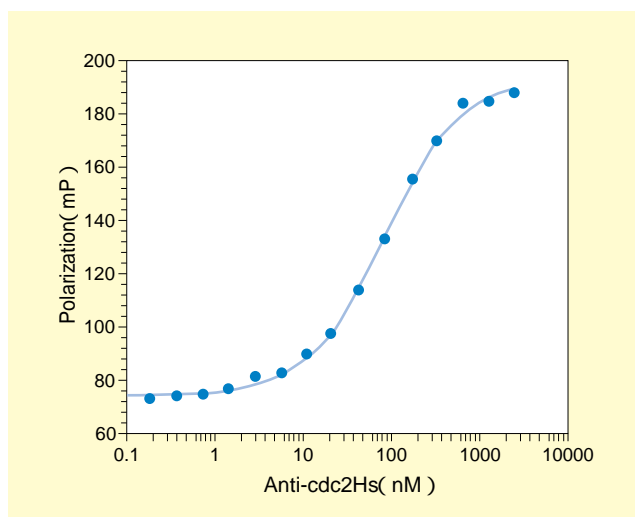


図17. Klotz Plot

さらに、Scatchard Plot(図18)をとると、X軸との切片濃度と反応液中の抗原濃度が一致し、結合部位が一箇所と考えられました。また、勾配から計算した結合定数は、75 nM となり、Klotz Plot から得られた値と良く一致しました。

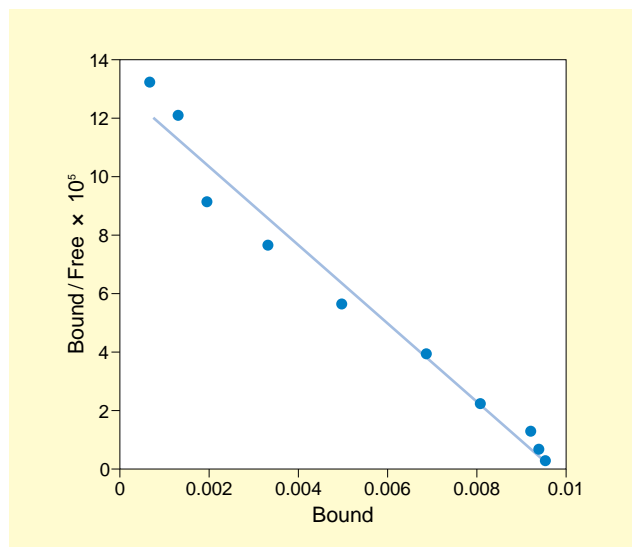


図18. Scatchard Plot

最後に、レセプターとリガンドとの結合は 1 : 1 と仮定してとったデータから、Hill Plot(図19)を描くと、ヒル係数が 1 で同等の相互作用点が存在することが明らかとなりましたが、抗原-抗体結合の場合は 2 : 1 なので、このヒル係数 1 は、実際には 2 と考えられます。

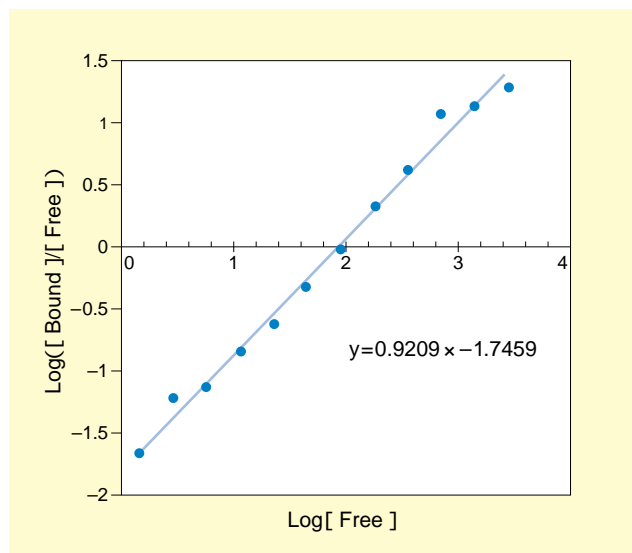


図19. Hill Plot

上記の 4 種のデータ処理結果から、モノクローナル抗体は、フルオレセイン標識 cdc2Hs ペプチドに対して単結合部位を有し、平衡解離定数 (K_d) は 80 nM であることが示唆されました。

抗体の親和定数の解析

大阪大学大学院工学研究科 片倉 啓雄

ウシ膵臓 ribonuclease A (RNaseA) に対するモノクローナル抗体(IgG) およびそのV領域をクローン化し大腸菌で発現させた single chain Fv (sFv)を、それぞれ抗原カラムで電気泳動的に単一に精製したものを抗体とし、fluorescein succinimidyl ester (FS)により、アミノ基が標識されたRNaseAを精製したものを抗原として使用した。

予想される解離定数(親和定数の逆数)の10倍程度の濃度の抗体溶液を適当な緩衝液で調製し、ここから1mlの2倍希釈系列を8~12本作製する。所定の温度で予熱後、バックグラウンドを測定し、10 nM程度の標識抗原溶液10 µlを添加する。平衡が達成されるまで保温した後、蛍光偏光度Pを測定する。抗体非存在下で測定した蛍光偏光度を P_{\min} 、抗体の価数を n (IgGの場合 $n=2$ 、sFvの場合 $n=1$)とし、大過剰の抗体存在下での蛍光偏光度を仮に P_{\max} とすると、測定したPと抗体濃度 x の間に

$$n \cdot x / (n \cdot x + K_d) = (P - P_{\min}) / (P_{\max} - P_{\min})$$

という関係が成立するので、この式に対するカーブフィッティングを行えば、親和定数の逆数である K_d および P_{\max} を求めることができる。

(1) 親和定数の測定

FSなどのfluorescein誘導体でアミノ基を修飾すると、抗原の疎水性は上昇し等電点は低下する。また、修飾部位によってもnetの疎水性や等電点は異なるので、種々のクロマトグラフィーでそれぞれの分子種を分離することが可能である。

図20に抗RNaseA抗体(IgG)の結合部位当たりの親和定数をカーブフィッティングで求めた例を示す。この場合、 $K_d (= 1/K_a)$ は $1.8 \times 10^7 (M^{-1})$ となった。

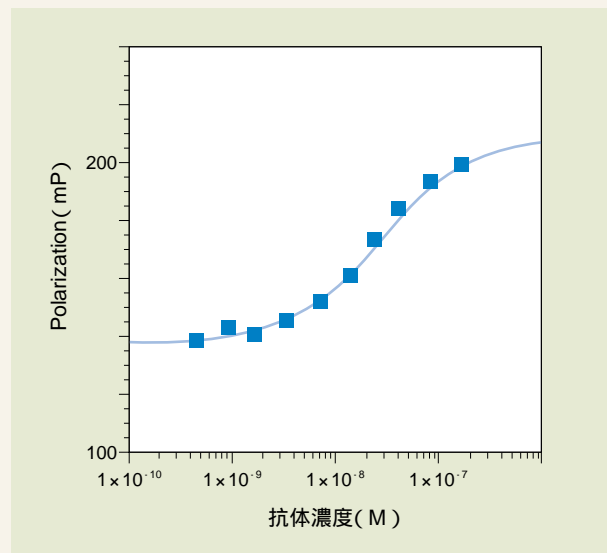


図20. 抗体濃度と蛍光偏光度の関係

(2) 親和定数に及ぼす pH の影響

抗原に用いた RNaseA は分子量約 14 kD であり、平衡透析法や超遠心法などで抗体の親和定数を測定することは困難である。このため筆者らは ELISA で親和定数を測定していたが、この方法は実験操作が煩雑で、信頼できるデータを得るには熟練を要し、ELISA プレートへの抗原のコートニングとブロッキング、あるいは用いる二次抗体の関係で、低い pH での sFv の親和定数の測定は事実上不可能であった。これに対して蛍光偏光法では、蛍光を消光する物質が含まれる場合を除けば、任意の溶液中で再現性の高い測定が可能であり、抗原と抗体をあらかじめ準備しておけば分光光度計を使う感覚で迅速に結果が得られる。図 21 に IgG および sFv の親和定数に及ぼす pH の影響を示す。

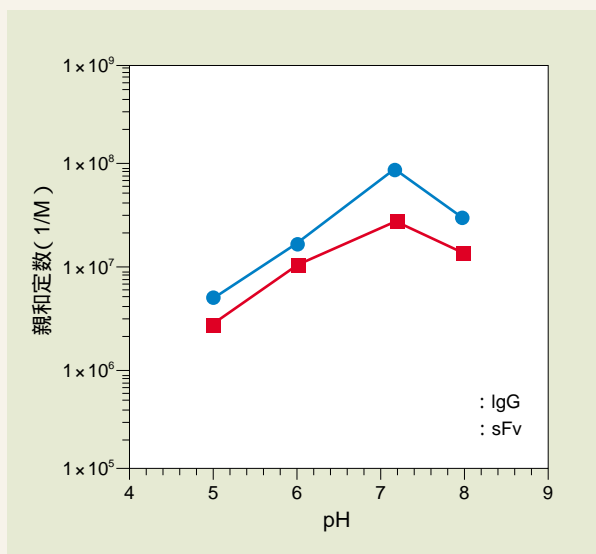


図 21. 抗 RNaseA 親和定数に及ぼす pH の影響

(3) 抗原の標識

抗原を蛍光標識する際には(1)でも触れたように、抗体の結合を妨害しない部位を修飾した抗原のみを用いて測定することが非常に重要である。抗原の標識部位による影響、遊離の蛍光プローブおよび未修飾抗原の混在の影響を考慮してみる(図 22)。抗体の結合に影響しないように標識できた理想的な抗原を用いた場合のカーブを(a)とする。抗体の結合に障害が出る部位が修飾されると(エピトープ付近が標識された場合など)親和性は低下し、カーブは右にシフトする(b)。観測される蛍光偏光度は、測定系に存在する全蛍光物質の平均の蛍光偏光度であるから、(a)と(b)が混在している場合にはカーブは(c)のようになり、真の値よりも高い K_d を与える。同様に、エピトープそのものが標識され抗体の結合が完全に阻害された抗原(d)や、遊離の蛍光プローブ(e)が混在する場合も測定結果に影響する。また、未修飾の抗原が混在している場合には、抗体への結合は標識抗原と拮抗し、やはり結果に影響する。

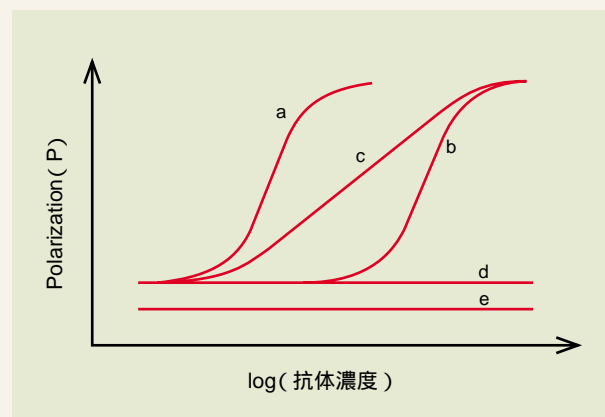


図 22. 標識部位、未修飾抗原および遊離プローブの混在の影響

- a : 抗体の結合にまったく影響しない部位が修飾された抗原
- b : エピトープに近い部位が標識された抗原(抗体の結合が妨害され K_d が上昇する)
- c : a と b が等モル混在している場合
- d : エピトープに近い部位が標識された抗原(抗体はまったく結合しない)
- e : 遊離の蛍光プローブ

DNA タンパク質間相互作用の測定

DNAとDNA 結合性タンパク質の結合解析

BEACON®シリーズでは、リプレッサとオペレータの結合など、DNA-タンパク質間の相互作用の測定が、生体内環境に近い条件の溶液系で、反応を連続モニターしながら、迅速かつ簡単に行えます。ゲルシフトアッセイに代わるツールとして、非常に有用です。

大腸菌 IHF タンパクと IHF Box DNA との結合解析 (ゲルシフトアッセイとの比較)

蛍光偏光度測定では、IHF Boxの配列をもとにDNA(48 mer: トランスポゾン の側末端の配列 -22 ~ +27 領域)を合成し、その5末端をFITCで蛍光標識したセンス鎖とアンチセンス鎖をアニーリングさせた二本鎖DNAとIHFタンパクの結合定数を測定しました。シグモイド曲線の変曲点から、平衡解離定数(K_d)は10 nMと考えられました(図23)。

一方、ゲルシフトアッセイでは、合成DNA(24 mer: トランスポゾン の側末端の配列 -8 ~ +17 領域)の5末端をXRITCで蛍光標識したセンス鎖とアンチセンス鎖をアニーリングさせた二本鎖DNAとIHFタンパク質を結合させた後、反応液10 mlを6%のアクリリアミドゲルで電気泳動して、そのバンド位置の変化から結合定数を15 nMと読み取りました(図24)。両法から得られた K_d 値は、良く一致していると考えられます。

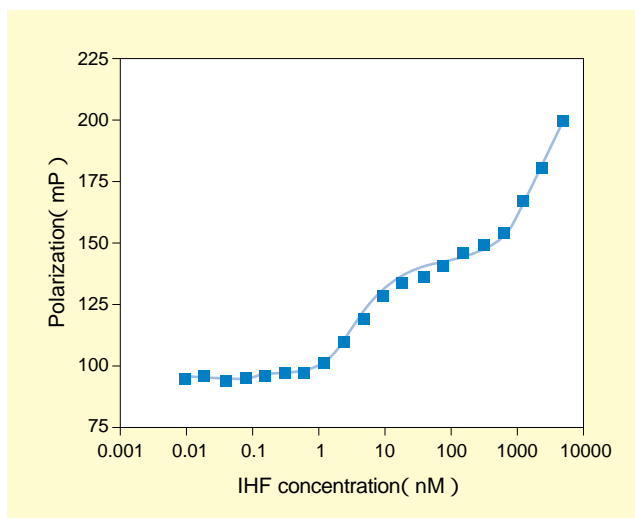


図23. 蛍光偏光度測定

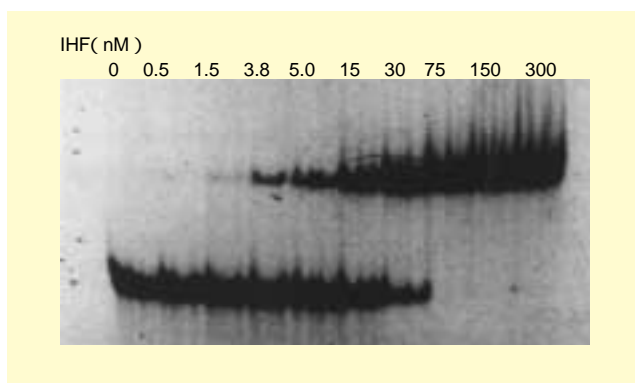


図24. ゲルシフトアッセイ

TATA 結合タンパク質(TBP)とTATA Box DNA との結合解析(温度依存性相互作用)

種々の条件下で結合反応をモニターする場合、ホモジニアスな溶液系で行う蛍光偏光度測定では、試料の損傷がなく、同一反応チューブで繰返して測定することが可能です。

温度依存性を調べるために、酵母のTATA結合タンパク質(yTBP)と、アデノウイルス後期主要プロモータのTATA Box 共通配列DNA(62 bp: -52 ~ +10 領域)との反応を2種の温度条件下で行い、結合曲線を得ました。25 ~ 30分のインキュベーションでは、非特異的な結合がみられたので、さらに、37 ~ 30分インキュベーションして、特異的な結合によるシグモイド曲線を得、平衡解離定数(K_d)は57.5 nMとなりました。これは、ゲルシフトで温度依存性を明らかにしたLeeら(1992)の報告と良く合致しています。

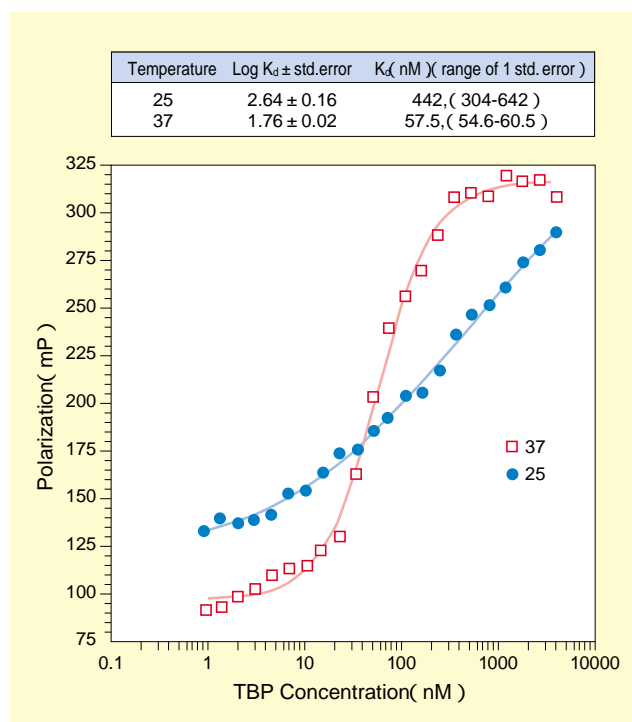


図25. 温度依存性結合曲線(25 と37 反応)

DNA DNA 間相互作用の解析

DNA プロブや DNA プライマーとの相互作用による DNA 検出と定量

液相ホモジニアスな反応系では、蛍光標識したプローブのハイブリダイゼーションや蛍光標識したプライマーの取込み増幅により、DNA 量と蛍光偏光度との間に相関関係を示します。BEACON® シリーズではこれを利用することで、電気泳動やプロットング、洗浄行程なしで、迅速かつ特異的に DNA を検出・定量できます。

PCR 産物のハイブリダイゼーション法による検出・定量
増幅 DNA をアルカリ変性により一本鎖にし、蛍光標識プローブでハイブリダイゼーションすると、増幅 DNA 量と蛍光偏光度との間に十分な定量範囲を有する検量線(PCR 反応液を直接定量するにはプライマーを考慮した補正が必要)が描けます。また、増幅鎖長と蛍光偏光度の各々の逆数との間にも相関関係が認められます。

さらに、増幅産物 DNA の蛍光標識プローブとのハイブリダイゼーションにより得られた蛍光偏光度は、また鋳型 DNA 量とも相関関係を示し、pg(ピコグラム)オーダーの鋳型 DNA を検出・定量できます(図 27)。

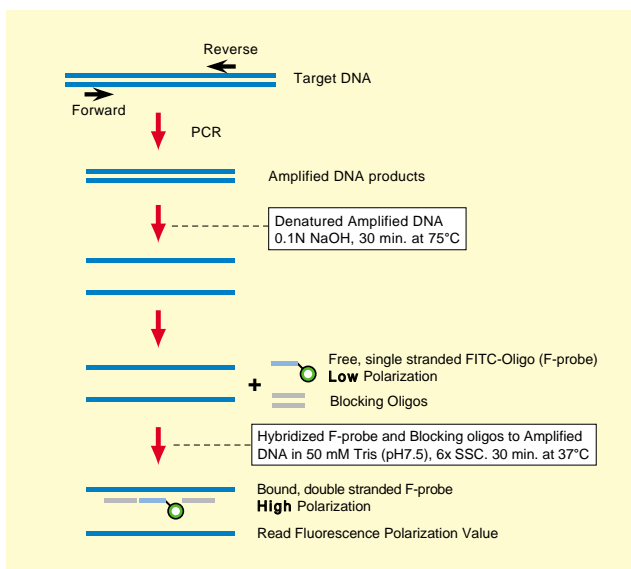


図 26. 増幅 DNA の定量の原理

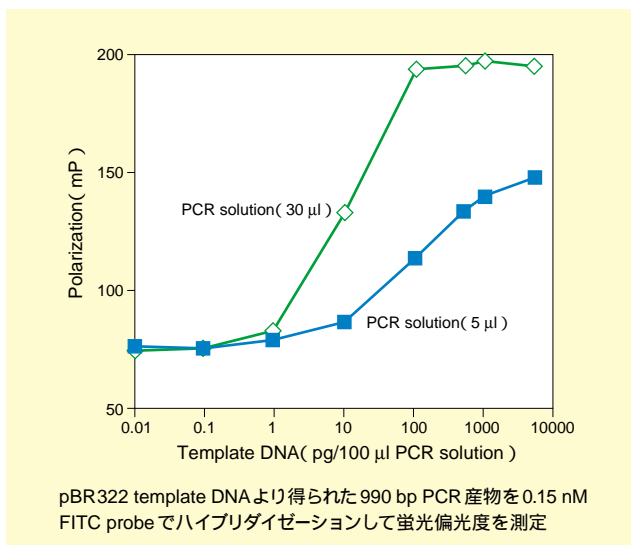


図 27. 鋳型 DNA の定量

プライマー・ラベル法による HIV プロウイルスの迅速 PCR 検出

生体試料より Catrimox-14™ (TAKARA) を用いて迅速に核酸を抽出した後、Nested PCR を用い、2nd PCR 時に片方を FITC ラベルしたプライマーを用いると、その PCR 産物の蛍光偏光度を測定することが可能になります。

図 29 では、サイクル数が増加し、目的の PCR 産物が生成されるに従って、蛍光偏光度の上昇が認められ、電気泳動バンドとも良く一致しています。この方法により、HIV プロウイルスの検出が可能であることがわかります。

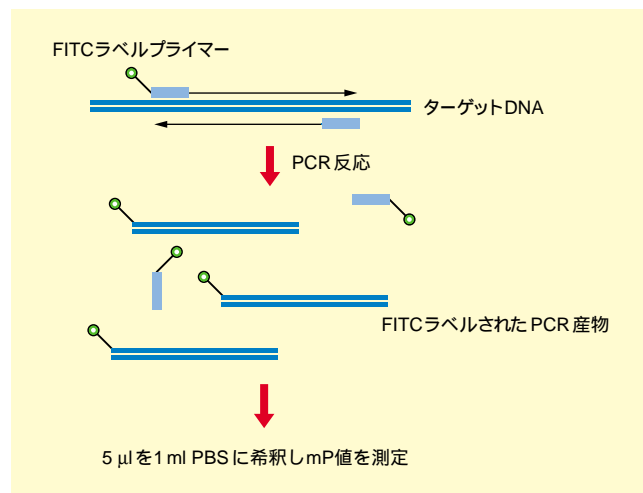


図 28. プライマー・ラベル法による PCR 産物の検出原理

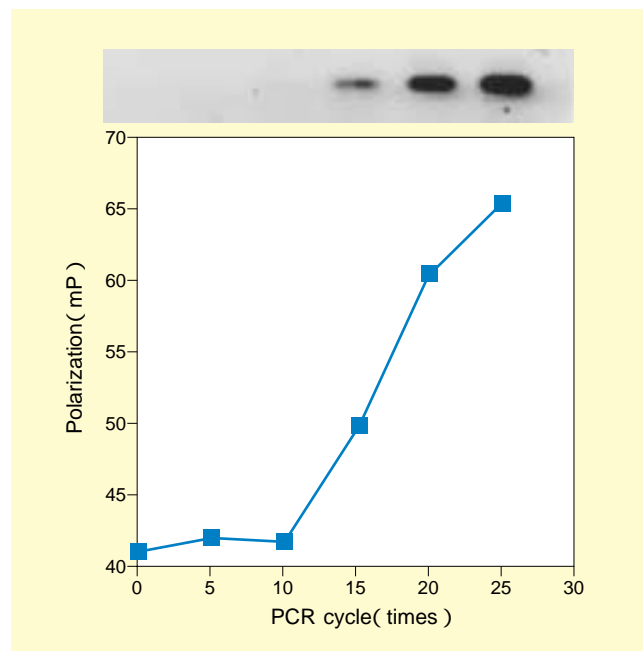


図 29. FITC ラベルされた PCR 産物と偏光度 (mP) との関係

酵素活性の検出

蛍光偏光度測定による酵素活性の高感度検出・定量

蛍光標識した基質が安定で、その蛍光偏光度が高ければ、あらゆる分解酵素活性の測定が可能です。また、蛍光標識基質が安定で、バックグラウンドによる蛍光偏光度が十分に低く、さらに産生物の偏光度上昇が BEACON® シリーズの検出感度以上であれば、合成酵素活性測定が可能です。

BEACON® シリーズを用いると、高感度かつ高精度に、しかも放射性物質を使わず、簡便に酵素活性を検出することが可能です。微量のコンタミの検出が求められる品質管理にも最適です。

BEACON® プロテアーゼ活性検出キットによるトリプシンの活性検出

蛍光標識したカゼイン(FTC-カゼイン)を基質として、トリプシン(タイプXI)活性を測定した結果を図30に示します。図中のドットとエラーバーは、それぞれ連続4回測定の平均値と標準偏差値で、ベストフィット直線は最小二乗法により描いています。FTC-カゼインは、

Serine Protease 類 : trypsin, thrombin, plasmin,
elastase, chymotrypsin, kallikrein
Sulphydryl Protease 類 : papain, cathepsin B
Acid Protease 類 : thermolysin, pepsin, pronase
などのプロテアーゼ活性測定用の基質として使用可能です。

BEACON® RNase 活性検出キットによる RNase A の活性検出

蛍光標識したRNA(FTC-RNA)を基質とし、37℃ 1時間のエンドポイント測定により得られたRNase A活性の検量線です(図31)。キネティック測定も可能で、その際には13秒ごとに蛍光偏光度を測定し、反応を20分間モニターします。

BEACON® シリーズによるRNase測定は、精製RNaseの定量だけでなく、高感度、高精度かつ簡便・迅速に微量のコンタミを検出する際にも有用です。測定範囲は0.5 ~ 500 pgと広範囲で、感度は放射性物質を使う従来法と同等か、それ以上で、1 pgの検出が可能です。

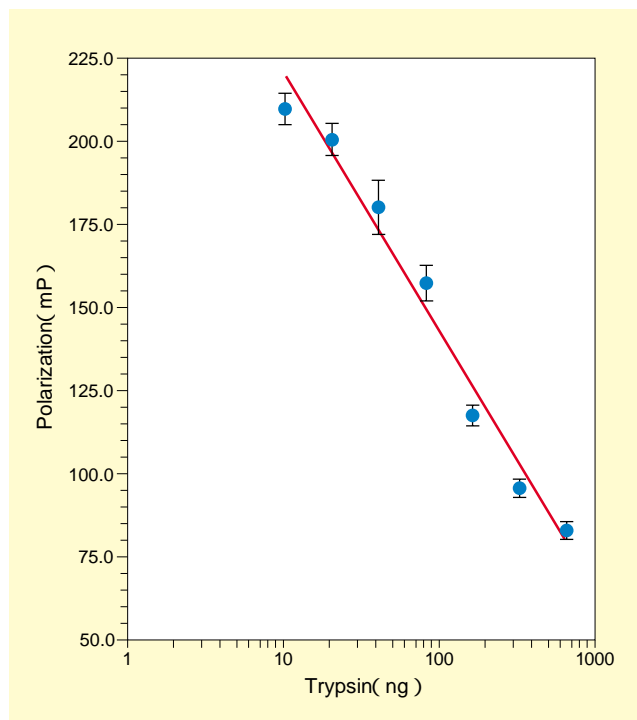


図30. FTC-カゼインを用いたトリプシン活性の高感度検出

バッファー(10 mM Tris-HCl, pH7.8)中のトリプシンにFTC-カゼイン5 pmolを加え、37℃で1時間インキュベートした後に、測定用バッファー(0.5 M Tris-HCl, pH8.8)を加えて蛍光偏光度を測定した。

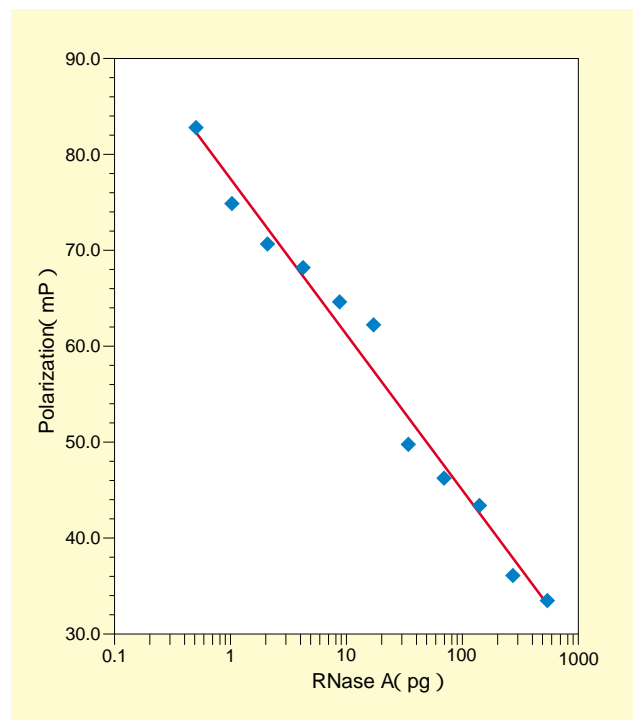


図31. FTC-RNAを用いたRNase A活性の高感度検出

フルオレセイン標識したRNA(25 ng)と種々の濃度のRNase Aを、37℃で1時間インキュベートした後に、反応停止液を加えて蛍光偏光度を測定した。

BEACON® DNase 活性検出キットによる DNase の定量

蛍光標識した 25 bp DNA (FTC-DNA) を基質とし、37 °C 1 時間のエンドポイント測定により得られた DNase 活性の検量線です(図 32)。リアルタイムにデータが得られるキネティック測定も可能です。

図中(A)は DNase I の、(B)は Exonuclease III の検量線です。両者とも、測定濃度範囲は 10^2 のオーダーにわたり、感度は放射性物質を使う従来法と同等か、それ以上で、各々 0.2 ng と 0.1 units が検出限界です。

BEACON®シリーズによる DNase 測定は、精製 DNase の定量だけでなく、高感度、高精度かつ簡便・迅速に微量のコンタミネーションを検出する際にも有用です。

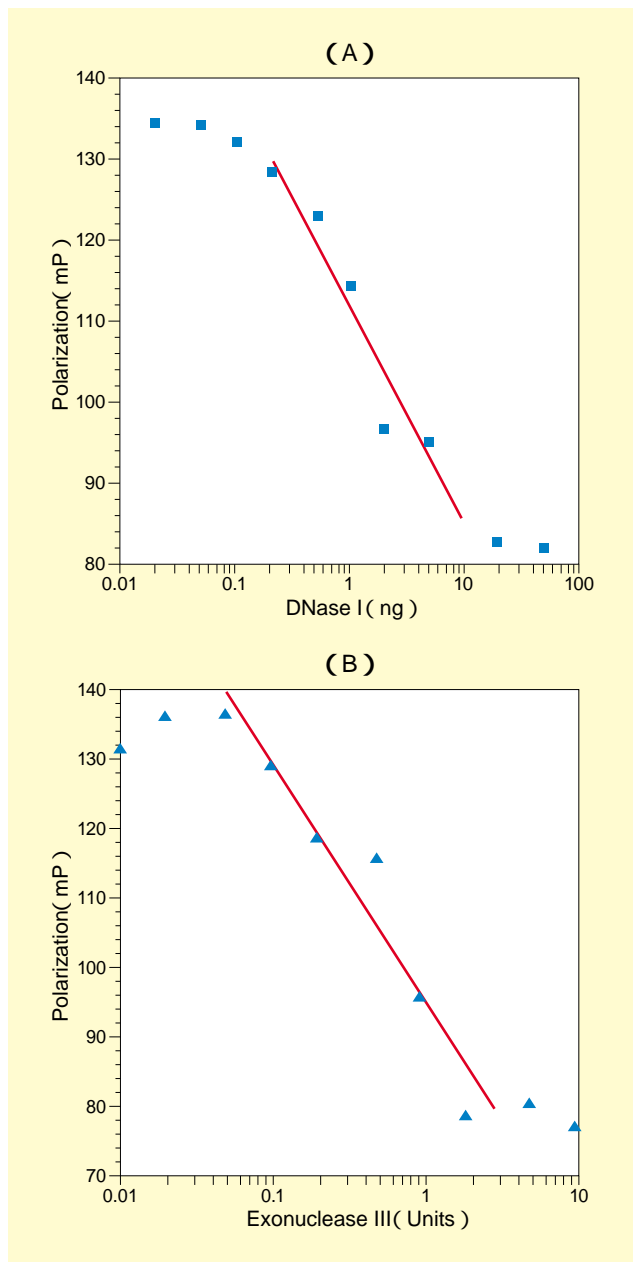


図 32. FTC-DNA を用いた DNase 活性の高感度検出

BEACON®プロテアーゼ活性検出キットによる Proteinase K の活性検出と従来法による検出の比較

(1) FTC-カゼイン - BEACON System 法

275 μ l の反応液(終濃度 0.18 μ g/ml の FTC-カゼイン, 1 p g / m l ~ 10 μ g/ml の Proteinase K を含む)を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、25 μ l の 60% TCA を加えて反応を停止しました。さらに 1 ml の測定用緩衝液(0.2 M Tris-HCl, pH9.0, 0.5% SDS, 0.02% NaN₃)を加え、偏光度(mP)を測定しました。

(2) アゾカゼイン法

200 μ l の反応液(終濃度 0.1% のアゾカゼイン, 1 μ g/ml ~ 10 μ g/ml の Proteinase K を含む)を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、100 μ l の 15% TCA を加えて反応を停止しました。この反応液を遠心分離した上清について 440 nm の吸光度を測定し、Proteinase K を加えずに反応させたブランクとの差(ΔA_{440})を求めました。

図 33、34 に示したように、BEACON®シリーズ法を用いた場合には、アゾカゼインを基質とした場合に比べ 100 ~ 1000 倍

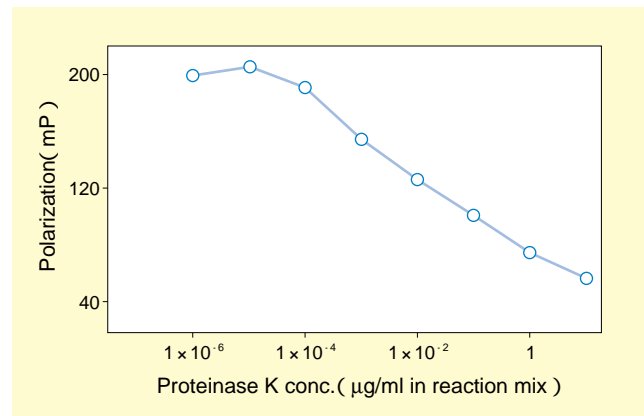


図 33. FTC-カゼイン - BEACON System 法を用いた Proteinase K の活性検出

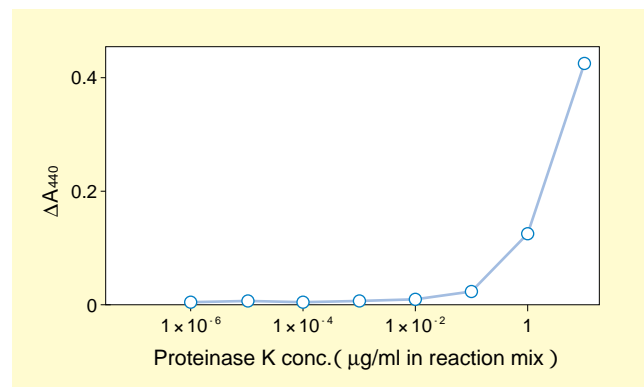


図 34. アゾカゼイン法(従来法)を用いた Proteinase K の活性検出

糖鎖 タンパク質間相互作用の解析

Full-Range BEACON® 2000とピリジルアミノ(PA)化糖鎖とを用いる糖鎖とタンパク質の相互作用の解析

従来は、蛍光偏光度測定に適した標識糖鎖の調製が困難だったため、蛍光偏光による糖鎖とタンパク質の相互作用の解析はあまり行われていませんでした。

Full-Range BEACON® 2000では、PA化糖鎖を用いることにより、糖鎖とタンパク質の相互作用の解析を簡便に行うことが可能です。(本実験で使用された試薬類はタカラバイオ㈱の製品です。)

Full-Range BEACON® 2000を用いたPA化糖鎖と種々のレクチンの相互作用の解析

得られた蛍光偏光度をグラフ作成ソフトGraphPad PRISM™を用いてプロットし、カーブフィッティングを行いました(図35)。いずれも、従来からいわれているレクチンの糖鎖結合特異性と非常に良く一致する結果を示し、Full-Range BEACON® 2000とPA化糖鎖を組み合わせて用いた、糖鎖とタンパク質の結合測定法の有用性がわかります。

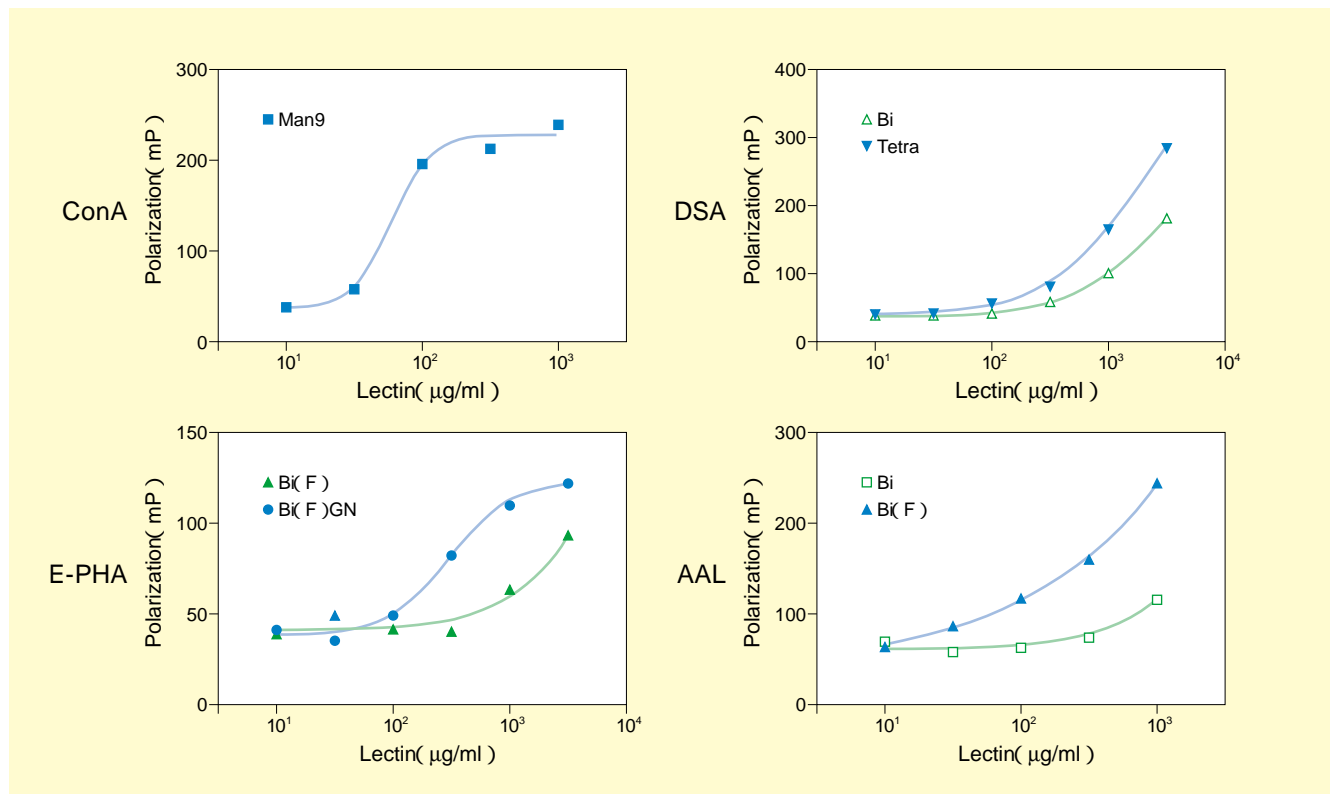


図 35. 各種レクチンとピリジルアミノ化糖鎖との結合

環境ホルモンとレセプターの結合測定

Full-Range BEACON® 2000 を用いた環境ホルモン研究

生体の機能を正常に維持していくために体内ではさまざまなホルモンが働いています。その1つであるエストロゲンは性ホルモンの一種で、特に雌の動物において付属性腺(子宮、膣など)の発育や生殖に非常に重要な役割を果たしています。Full-Range BEACON® 2000を用いると、このエストロゲンと競合する物質(estrogen competitors)を放射性物質を使用せずにスクリーニングすることが可能です。エストロゲンレセプターと結合する新規化合物の同定や、最近問題となっているホルモン攪乱物質(環境ホルモン)の *in vitro* 研究に応用できます。

環境ホルモンのエストロゲンレセプターへの結合能測定
種々の濃度のエストロゲンレセプター (ER) に 10 nM の蛍光性非ステロイドエストロゲン(FES1)を混合し、蛍光偏光度を測定し結合曲線を得ました(図36)。

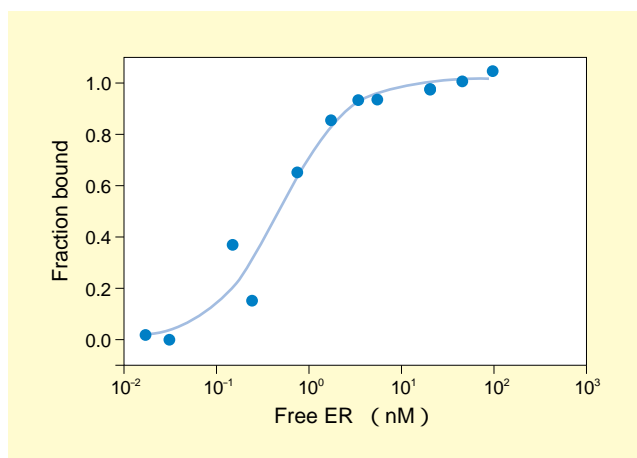


図36. FES1とERとの結合曲線

蛍光偏光度測定を用いた環境ホルモンの結合能測定には、サンプルがERに対して結合能を有する場合、FES1-ER複合体中のリガンド結合部位でFES1と競合し置換する性質を利用します。

ERと結合することが知られている天然のエストロゲン(17-Estradiol: E₂)および、種々の化学物質をFES1-ER複合体に添加し、ERへの競合阻害作用をFull-Range BEACON® 2000を用いて測定しました(図37)。さらにこのグラフをもとにIC₅₀およびRBAを算出したものが表3です。

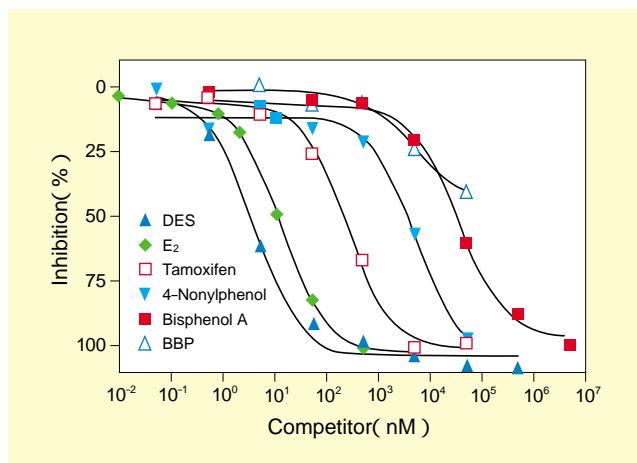


図37. FES1-ERに対するさまざまな化合物の競合結合曲線

表3. ERに対する親和性

化合物	IC ₅₀	RBA
E ₂	15.6 nM	100
DES	4.0 nM	390
Tamoxifen	240 nM	6.5
4-Nonylphenol	5.2 μM	0.3
Bisphenol A	35 μM	0.05
BBP	N.D.	N.D.

IC₅₀: FES1-ER複合体全量の50%のFES1がサンプルと置換し、サンプル-ER複合体を形成するポイント

RBA(Relative Binding Affinity): E₂のIC₅₀を100として、それぞれの蛍光偏光度測定の結果を比較しやすいように比率化した数値

環境ホルモンのエストロゲンレセプターへの結合能測定
ERとFES1の親和性をERの場合と同様に、蛍光偏光度を測定し結合曲線を得ました(図38)。

この結果からFES1-ERのK_dは1.0 nMであることがわかりました。

また、ERの場合と同様にして、ERに対する種々の物質のIC₅₀およびRBAを算出したものが表4です。

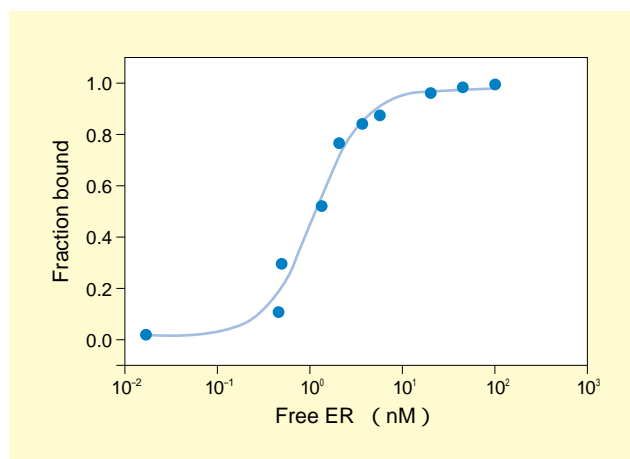


図38. FES1とERとの結合曲線

表4. ERに対する親和性

化合物	IC ₅₀	RBA
E ₂	56.5 nM	100
DES	9.1 nM	621
Tamoxifen	816 nM	6.9
4-Nonylphenol	6.7 μM	0.8
Bisphenol A	162 μM	0.04
BBP	N.D.	N.D.

BEACON®シリーズに用いる蛍光標識法

専用標識キットと汎用標識試薬により、幅広いアプリケーションに対応

BEACON®シリーズは、フルオレセインで標識した物質を用いることで、ターゲット物質の相互作用の解析を行います。BEACON® 2000は360～700 nmに設定されているため、使用可能な標識用蛍光色素も拡がります。さらにFull-Range BEACON® 2000では254～700 nmに設定されており、ピレン系、ダンシル系等の蛍光寿命の長い短波長の蛍光物質の使用も可能です。

フルオレセイン標識の際には、FITCも使用できますが、BEACON®シリーズ専用の標識キットを用いることで、より効率的で精度の高い解析が可能になります。

タンパク質、ペプチドの標識

Fluorescein Amine Labeling Kit

(カタログ番号 P2058)

FS(Fluorescein succinimidyl ester)を用いて、タンパク質、ペプチドのN末端を選択的に標識するためのキットです。 -NH_2 基の標識がFITCより特異的に行え、また、反応液のpHを低くすることで -NH_2 基を特異的に標識できます。さらに結合は、FITCとは異なりペプチド結合性ですので、標識化合物の安定性も向上します。

通常、分子量2,000のタンパク質ならタンパク質100 μg ずつを36回標識できます。

汎用標識試薬

上記キット以外に、 -SH 基、 -OH 基、 -COOH 基を標識する市販の試薬も使用できますが、標識部位の特異性や反応性、および試薬の純度を考慮すると、専用キットによる -NH_2 基の標識をお勧めします。

糖鎖の標識

還元末端を5((2-aminoethyl)thiouredyl)fluoresceinで標識します。糖鎖と混合し、90℃で30分反応させた後、還元剤($(\text{CH}_3)_2\text{NHBH}_2$ など)を加え、90℃で1時間反応させます。

オリゴヌクレオチドの標識

ホスホアミダイト法などの化学合成法を用いた5'末端などへの標識が最適です。これは、オリゴヌクレオチドの末端標識が定量的に行えるだけでなく、C6スパーサーを入れることで、標識による立体障害を最小限に抑えることが可能だからです。オリゴヌクレオチドの合成時にC6-アミノリンクを付加しておき、FITCもしくはFSと反応させます。また、最近では、合成時にダイレクトにラベルできるアミダイトも市販されています。

有効な標識試薬一覧

色素単体、標識タンパク質(抗体やアビジンなど)、標識ヌクレオチドや標識糖鎖			
これら蛍光色素は共有結合でタンパク質やヌクレオチドを標識します。標識成分と蛍光色素の分離には、ゲルろ過クロマトグラフィーやゲル電気泳動が用いられています。標識済みのプローブあるいは特定の抗体も市販されています。	標識試薬	励起光 (nm)	放射光 (nm)
	FITC	490	520
	Fluorescein succinimidyl ester	490	520
	Fluorescein-C6-succinimidyl ester	490	520
	5-((2-aminoethyl)thioureidyl)fluorescein	490	520
標識ヌクレオチド、末端標識オリゴヌクレオチド			
蛍光標識ヌクレオチドは、DNA 合成の際に取り込まれます。別法としては、シアノエチルホスホアミダイト化学合成法を利用し、オリゴヌクレオチド合成の際に 5' 末端へアミノリンカーを導入し、アミノ基と反応する蛍光色素でオリゴヌクレオチドを標識できます。	標識試薬	励起光 (nm)	放射光 (nm)
	Fluorescein-11-dUTP oligos	490	520
	FAM	495	535
DNA 結合性(インターカレーション)蛍光色素(結合型のスペクトル)			
これら蛍光色素は二本鎖 DNA と結合し、一本鎖 DNA や RNA ともある程度は結合します。これら色素の一部は、DNA との結合により蛍光強度が増加します。	標識試薬	励起光 (nm)	放射光 (nm)
	SYBR® Green I	494	519
RNA および一本鎖 DNA 用蛍光色素(結合型のスペクトル)			
これら蛍光色素は RNA や一本鎖 DNA の検出に使用されます。	標識試薬	励起光 (nm)	放射光 (nm)
	SYBR® Green II	494	519

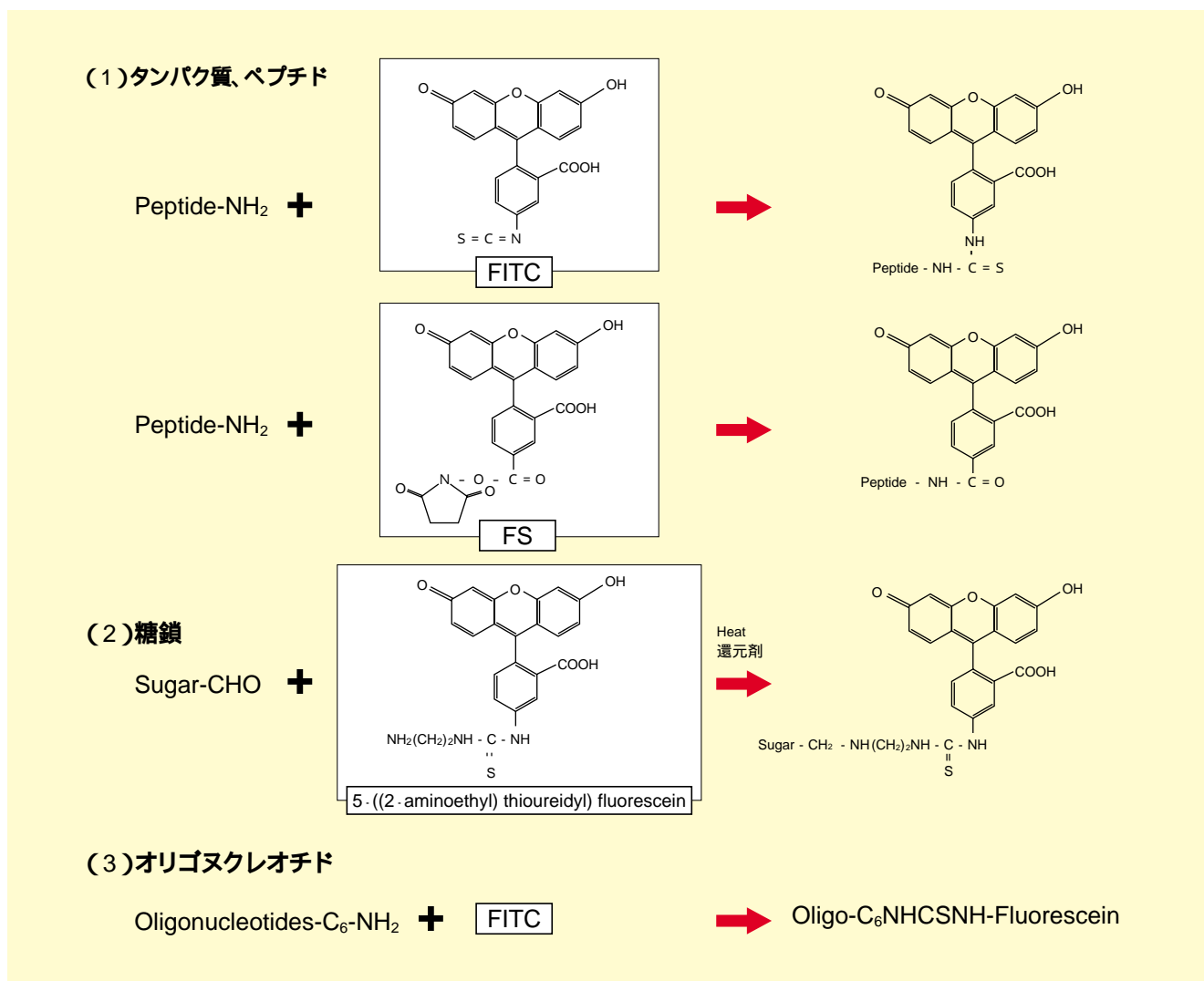


図 39. 蛍光ラベル法の一例

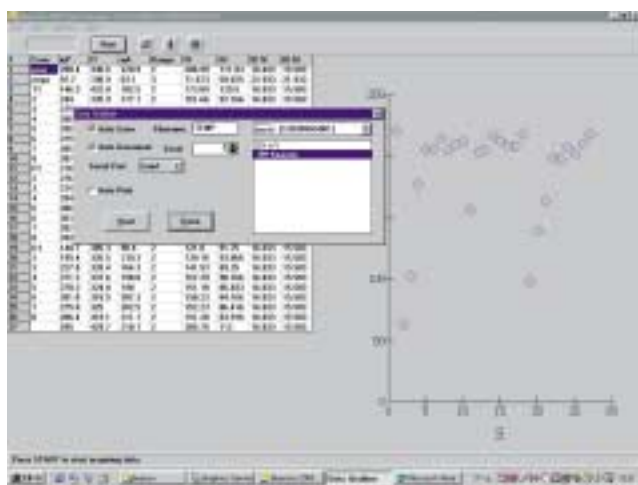
GraphPad PRISM™ (このソフトウェアは、インビトロジェンでは販売していません。)

標準装備のデータマネジメントソフトに加え、GraphPad PRISM™の使用で、効率の良い研究を実現

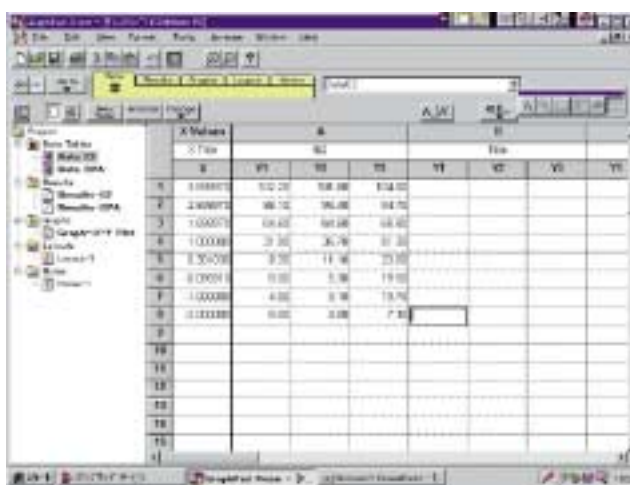
GraphPad PRISM™は、複雑なデータを迅速に処理するためのソフトウェアです。BEACON®シリーズに標準装備のData Management Softwareで収集したデータをもとに、適用したい方程式を選択するだけで容易にその定数を求めたり、データ系列の解析が可能です。

また、グラフのレイアウト機能を用いることにより、データのプロットからグラフの作成までを自動で行うことができるだけでなく、必要な凡例などの情報を付加したグラフも自動的に描けます。編集機能を用いると、結果、グラフ、ページレイアウト、脚注などを、すべて一つの実験ファイルの中に、まとめて整理し保存することができます。

そのため、多種多様な実験や考察が求められる、複雑な研究プロジェクトで得られたデータも容易に管理することができます。



BEACON® Data Management Software



GraphPad PRISM™

グラフ作成と統計解析の統合

GraphPad PRISM™には、基本的な統計処理機能がすべて組み込まれています。例えば、二群比較には、tテスト、U検定など、多群比較には反復測定分散分析ANOVA、また、分散の²検定、度数分布の歪度、尖度解析などがあります。信頼区間、相関係数、2方向ANOVA分散分析、CV値などの計算も簡単にできます。

グラフ作成

非線型回帰(カーブフィッティング)曲線、回帰直線、XYグラフ、バークラフ、分布曲線、エラーバークラフなどが、非常に簡単に作成できます。またベースラインの削除などの前処理により、関連データからより有意性の高いグラフを作成することができます。

ページレイアウト

データの表組や複数のグラフ、脚注等をまとめて1ページに表示できます。

さらに、グラフに使用する線種、ドットの形状、シンボル、文字の書体、カラーやレイアウト等も、多様な中から選べるため、より説得力の高い研究レポートを作成することができます。

データ・アウトプット

Windows®またはMacintoshのプリンター・ドライバーを使います。

適用環境

for Windows(Ver. 3.0)

作動システム: Microsoft Windows® 95、98もしくはNT(Ver. 4.0以上)

(Ver. 3.0ではWindows® 3.1以下、Windows® NT(Ver. 4.0以下)は使用できません)

推奨環境: ハードディスクの空き容量 6 MB以上
RAM 16 MB以上

for Macintosh(Ver. 2.0)

作動システム: 68kもしくはPower Macintosh System 7.2以上

推奨環境: ハードディスクの空き容量 4 MB以上
RAM 8 MB以上

結合定数の決定(1)

GraphPad PRISM™を用いることで、得られたデータから結合定数を簡単に決定することが可能です。実際には、ソフトウェアのプログラム中で、B vs L_F Plot、Klotz Plot、Scatchard Plot、Hill Plotなどの解析が行われています。ここでは、それぞれの解析方法について簡単に説明します。

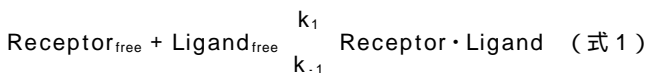
Clark's Theory と B vs L_F Plot

ここでは、もっともシンプルな相互作用である Clark のモデルについて説明します。

リガンドとレセプターとの相互作用が、

- (a) 2分子が結合して1分子を形成する(1分子が解離して2分子となる)ような相互作用で、かつ可逆的である
- (b) 結合したレセプターと遊離レセプターの総量が常に一定で、互いに相互作用を及ぼさない
- (c) 生物学的なレスポンスが、レセプターの結合している部位数に比例する
- (d) 平衡状態に達した後に、相互作用とレスポンスの測定が可能である
- (e) リガンドが平衡反応以外には関与しない、すなわちリガンドが遊離状態およびレセプターに結合した状態でしか存在しない

といった5つの条件を満たす場合、レセプターとリガンドの平衡反応は、以下の式で表されます。



また平衡解離定数 K_d は、以下の式で表されます。

$$\frac{L_F \cdot R_F}{B} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \quad (\text{式 2})$$

L_F : Ligand_{free} の濃度、R_F : Receptor_{free} の濃度、
B : Receptor · Ligand の濃度

さらに、R_T をレセプターのトータルの濃度とすると、

$$\frac{L_F(R_T - B)}{B} = K_d \quad (\text{式 3})$$

が成り立ち、

$$B / R_T = L_F / (K_d + L_F) \quad (\text{式 4})$$

が得られます。

ここで、B / R_T (f : fractional occupancy) が 0.5、すなわちレセプターの結合部位の 50% が結合しているときに、結合が平衡状態にあると考えられます(図 40)。

Klotz Plot

解析を行うには、まず最初に Klotz Plot を行います。

これは、横軸に L_F の対数を、縦軸に B をとると、シグモイド曲線が得られます(図 41)。この Klotz Plot は、測定に用いたりガンド濃度の適正や、どのような相互作用が働いているかを調べる際に有用です。

Klotz Plot により得られた曲線は、K_d に対応する変曲点に対して対称となり、リガンドの濃度が 10⁻¹ ~ 10 K_d の範囲では、ほぼ直線と考えても差し支えありません。また、10⁻² ~ 10² K_d の範囲で 99% の結合部位が反応に関わるため、十分な濃度範囲で測定が行われていなければ、濃度の設定に不備があることがわかります。

さらに、リガンド濃度が 10⁻¹ ~ 10 K_d の範囲で、10 ~ 90% の結合部位が反応に関わるような曲線が得られます。したがって、これより狭い濃度範囲で同様の曲線(narrow sigmoidal)が得られた場合は、正の相互作用(positive cooperativity)が働いていると考えられます。一方、広い濃度範囲で曲線(wide sigmoidal)が得られた場合は、負の相互作用(negative cooperativity)が働いていることとなります。

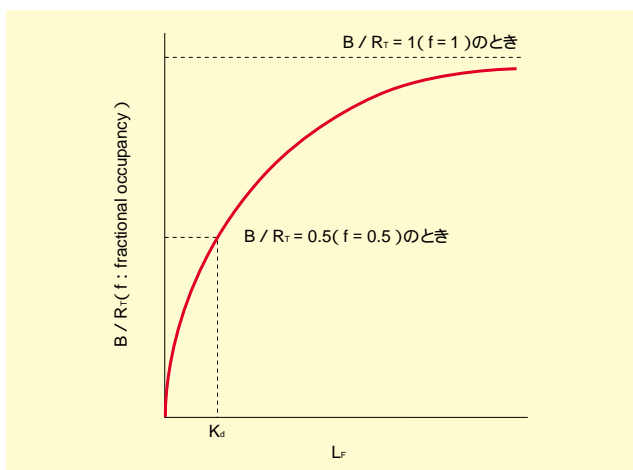


図 40. B vs L_F Plot

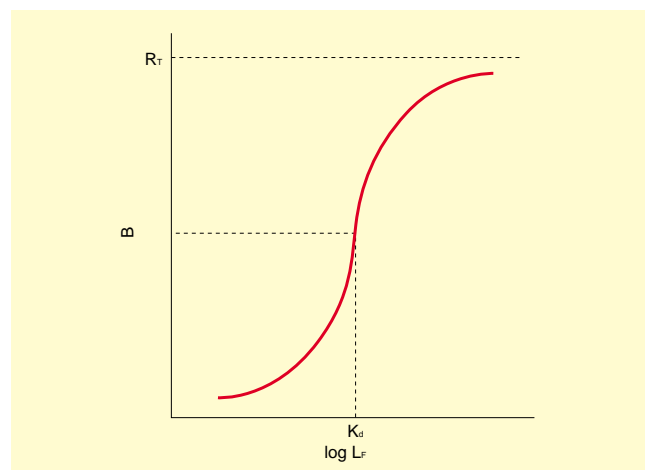


図 41. Klotz Plot

BEACON™2000システム概要

	Red Range	Standard
感度	偏光モード: 10^{-11} M fluorescein 蛍光モード: 10^{-13} M fluorescein	
測定波長領域	254 ~ 900nm	360 ~ 700nm
精度	2mP SD 未満	
測定モード	スタティックモード、キネティックモード	
ユーザーファイル数	99個	
コンピュータインターフェイス	RS-232C ポートからのシリアル出力および本体付属プリンターによる感熱紙出力	
専用ソフトウェア	BEACON™2000 Data Manager Software	
測定サンプル量	6x50mm(100 μ l) または 10x75mm(500 μ l) 使い捨てチューブ	
反応温度	6 ~ 65	
測定サンプル数	1	
光学系	高出力クォーツハロゲン and 水銀ランプ	高出力クォーツハロゲンランプ
ランプの耐用時間	ハロゲンランプ: 2000 時間 水銀ランプ: 200 時間	
検出器	フォトマルチプライヤーチューブ	
光学システム 光学フィルタ	干渉フィルタ: L-フォーマットディファレンシャル偏光励起発光 ex: 490nm em: 535nm (標準) / 交換可能	
寸法	28(W)x53(D)x24(H) cm	
重量	17.9kg	15.9kg
電源	100V 2.9A 50/60Hz	
消費電力	185W	

BEACON™2000 System 価格表

製品名	カタログ番号	サイズ	価格
Standard	P2300	1式	3,850,000
Red Range	P2810	1式	6,800,000
専用チューブ	P2244	4x250本	18,000
感熱ロール紙	P2285	10本	15,000
Fuses	P2248	5個	8,000
交換用ハロゲンランプ	P2249	2個	18,000
One-step FP Standardization Kit	P3081	1Kit	31,500
UV Standardization Kit	P2500	1Kit	21,000

オプションフィルタは別途お問い合わせください。コンピュータは標準では付いておりませんので御必要の際は別途お問い合わせください。

輸入元 インビトロジェン株式会社

総発売元 ハイブリッド有限公司

〒532-0002 大阪市淀川区東三国4-11-4 新大阪明成ビル

TEL 06-6394-9450 FAX 06-6394-9451

URL : <http://www.hybrid-ij.com>

E-mail: hybrid-fujita@nifty.com