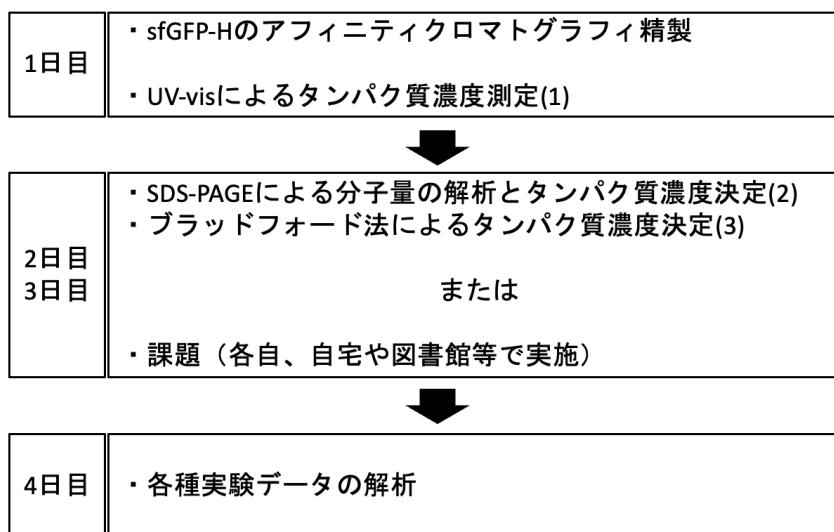


実験 3_タンパク質実験（本多研・加藤研 / 熊谷研・村上研）

2023/9/29 藤野公茂、熊谷純

実験概要

本実習では、組換えタンパク質調製の一般的な手法である、大腸菌を用いた調製法を学ぶ。組換えタンパク質 sfGFP-H を発現させた大腸菌から、タンパク質精製の基本的な手法である His-tag を用いたアフィニティクロマトグラフィにより、sfGFP-H を精製する。得られたタンパク質を、紫外可視分光法(UV-vis)・ブラッドフォード法により濃度決定し、さらに、基本的なタンパク質解析法である SDS-PAGE により解析する。



実験目的

タンパク質の基本的な精製法 (His-tag を用いたアフィニティクロマトグラフィ精製)・濃度決定法 (紫外可視分光法・ブラッドフォード法)・タンパク質解析法 (SDS-PAGE)について、原理を理解し、実施する。

班分け

学生数： I 群 : 25 人 (3 人ペア × 7 班 + 4 人ペア × 1 班) → 8 班

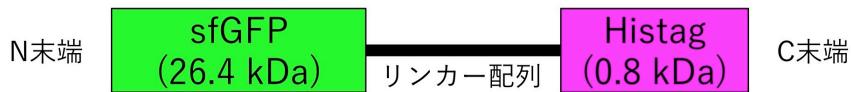
II 群 : 22 人 (3 人ペア × 6 班 + 2 人ペア × 2 班) → 8 班

イントロダクション

sfGFP-H の構造

本実験で用いる sfGFP-H の構造は、sfGFP の C 末端に His-tag を融合した形になっている。sfGFP (super folder green fluorescent protein) は 26.8 kDa の蛍光タンパク質であり、510 nm に蛍光波長のピークを持つ。sfGFP は、様々なタンパク質と融合させることで、その可視化に利用されている。His-tag は、ヒスチジンが 6 残基連續した、タンパク質精製に頻繁に利用される tag 配列である。His-tag は、約 0.8 kDa と非常に小さく、融合相手のタンパク質の性質に影響を与えるにくいことが利点の一つである。今回用意したタンパク質では、融合の結果、合計 28.2 kDa となっている。

タンパク質の構造を以下に示す。



プラスミド上の遺伝子配列を以下に示す（各部の色は上図に対応）。

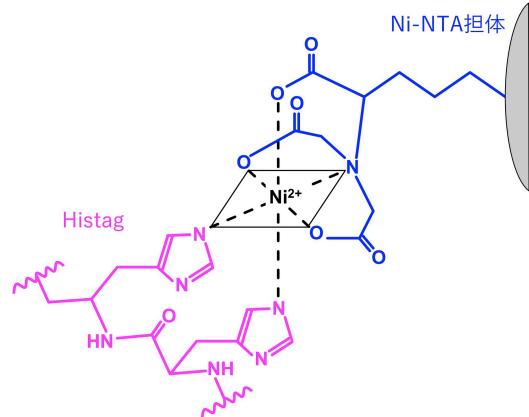
(5')...ATGTCAAAAGGCGAAGAACTGTTACGGGTGTTGCCGATCCTGGTGGAACTGGACGGTGATGTCAACGGTCATAAA
TCAGCGTGC CGCGAAGGTGAAGGCGATGCGACCAATGGTAAACTGACCCCTGAAATTATTGCACCACCGTAAACTG
CGCGTGC CGTGGCCGACCCCTGGTACCCACCTGACCTATGGTGTGCA GTGTTAGCCGTTACCGGATCACATGAAACGC
CATGATTCTTAAAAGCGCGATGCCCGAAGGTTATGTTCAAGAACGTAACCATCAGCTTAAAGATGATGGCACCTATAAAC
CCGCGCCGAAGTGAAATTGAGGTGATAACCCCTGGTTAACCGTATTGAACTGAAAGGCATCGATTCAAAGAAGATGGTAACA
TCCTGGGCCATAAACTGGAATACAACCTAACAGCCATAACGTGTACATCACCGCGGATAAACAGAAAAACGGTATCAAAGCC
AACTCAAAATCCGCCATAATGTGGAAGATGGCAGCGTTAGCTGGCCGATCATTATCAGCAGAACACCCCCGATTGGTGTG
GCCCGGTGCTGCTGCCGATAATCATTATCTGAGCACCCAGAGCGTCTGAGCAAAGATCCGAAACGAAAACGTGATCACAT
GGTCCTGCTGGAATTGTGACGGCGGCTGGCATTACGCACGGTATGGATGAACTGTATAAA GGATCCGGTAG
TGGATCTGGATCA CACCATCATCACCAACCACTAA...(3')

sfGFP-H のアフィニティクロマトグラフィ精製

本実習では、sfGFP-H を大腸菌によって発現させ、菌体を超音波破碎した破碎液から sfGFP-H の精製を行う。菌体破碎液の中には、大腸菌のゲノムに由来する内在性タンパク質が多量に含まれており、これらを除く必要があるためである。本実習で用いる融合タンパク質 sfGFP-H は、C 末端に His-tag を融合した設計となっており、Ni 固定化担体を用いてアフィニティクロマトグラフィが可能である。His-tag は、タンパク質性アミノ酸であるヒスチジンが 6 残基連續したペプチド配列である。ヒスチジンが Ni などの金属イオンをキレートすることで、His-tag を持つタンパク質は、Ni 固定化担体に結合

する。その後、His-tag を持たない大腸菌内在性タンパク質を洗い流し、高濃度(250 mM)のイミダゾールを用いて、sfGFP-H の溶出を行う。イミダゾールはヒスチジンの側鎖と同じ構造を持つため、高濃度で加えることで担体上のヒスチジンを置換され、His-tag 融合タンパク質の溶出が可能である。

Ni 固定化担体と His-tag の結合を示す（ただし、本



実習で用いる Ni 固定化担体は金属イオンの結合様式が公表されていないため、一般的に用いられる Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 担体の構造を示す)。

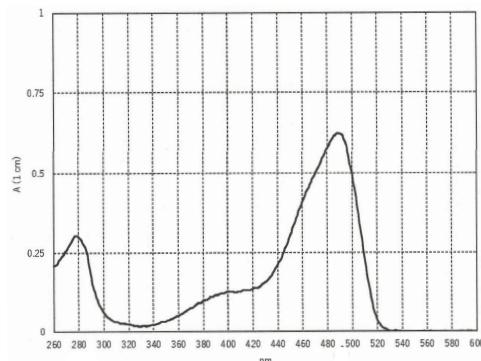
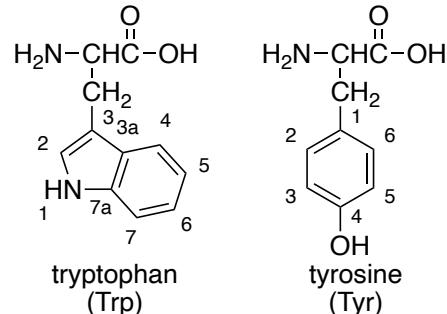
紫外可視分光法によるタンパク質の定量

履修者の皆さんには、化学生命工学実験 1 の機器分析実験「電子スペクトル」で既に紫外・可視吸収スペクトルについて学んでいるが、本実験ではこの分光法をタンパク質の定量に応用する。測定原理や式の導出は、p. 12-15 に詳細を掲載したので、事前に確認しておくこと。

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合してできた高分子である。ここでは、遷移金属等を含まないタンパク質について考える。タンパク質の主鎖はペプチド結合であるが、その光吸収波長は深紫外領域(190~220 nm)であり、その測定は容易ではない。

一方、タンパク質のアミノ酸側鎖のうち、チロシン(Tyr)・トリプトファン(Trp)は芳香族基を持つために、280 nm 付近の紫外光を吸収する性質を持つ。この性質を利用することにより、sfGFP 溶液の濃度を紫外・可視分光法で定量することができる。

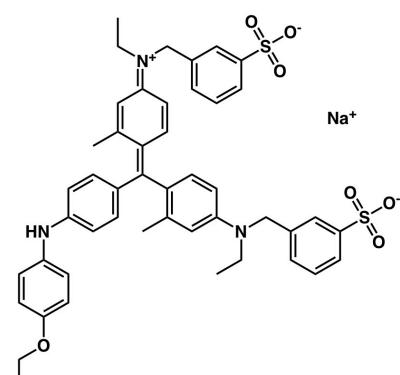
sfGFP 溶出液の UV-Vis 吸収スペクトルの測定例を図に示す。280 nm を λ_{\max} とする吸収が見られるが、これが Tyr や Trp 残基の吸収となる。また、488 nm を λ_{\max} とする吸収は、GFP の蛍光団の吸収である。



sfGFP 溶液の UV-Vis スペクトル測定例

プラッドフォード法によるタンパク質の定量

プラッドフォード法は、Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250 : 構造を下図に示す) の吸収変化を利用したタンパク質濃度測定法である。CBB G-250 は酸性条件下で、主にタンパク質の塩基性アミノ酸残基に結合し、吸収極大波長が、465 nm から 595 nm ヘシフトする。この性質を利用し、タンパク質添加による CBB G-250 の 595 nm の吸収 (A_{595}) の変化を分光光



度計で測定する。吸光度は、タンパク質に結合した CBB G-250 の濃度と比例関係にある。CBB G-250 の結合量は、(タンパク質のアミノ酸組成にもよるが) タンパク質残基数によつ

て決まるため、タンパク質のモル濃度ではなく、重量濃度に比例する。結局、吸光度 A_{595} と、添加したタンパク質の重量濃度が比例することになる。

CBB G-250 の構造を示す。

sfGFP-H の電気泳動(SDS-PAGE)による解析

電気泳動とは、水溶液に電流を流した時、電荷を持つ粒子が電場に従って移動する現象である。また、この現象での移動度の差を利用し、電荷を持つ粒子を分離する手法の名称もある。本実験では、その一手法であり、タンパク質の分離に頻繁に用いられる、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-poly acrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)を行う。アクリルアミドゲル作製に用いられる市販のアクリルアミド溶液は、アクリルアミドと N, N'-メチレンビスアクリルアミドの混合物であり、過硫酸アンモニウム、TEMED の添加により重合し、網目構造を持ったゲルを形成することができる。この網目構造が、ゲル内でのタンパク質の自由な移動を妨げる。残基数の多いタンパク質は、網目構造の影響を大きく受け、移動速度が大きく低下する。一方、残基数の少ないタンパク質が受ける移動速度の低下は僅かである。これにより、分子量に従ったタンパク質の分離が可能になる。

SDS-PAGE では、loading buffer に界面活性剤である SDS と還元剤 DTT を添加し、またゲルにも SDS を添加している。DTT の作用により、タンパク質内部の Cys 残基間のジスルフィド結合による架橋が切断されることで、タンパク質の立体構造が破壊される。さらに、SDS は疎水性相互作用を切断することにより、タンパク質を直鎖状に伸ばすとともに、タンパク質の疎水面に負電荷を持った SDS が大量に結合することで、タンパク質に大量の負電荷を付与する。これにより、全てのタンパク質は、プラス電極方向へ移動するようになり、ゲルの分子篩効果によって、分子量に従って分離されることになる。

使用試薬

zyp: f.c. 0.8% Glycerol, 0.015% Glucose, 0.5% Lactose

1x SDS-PAGE 用 loading buffer: 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS, 10 mM DTT, 少量 BPB

SDS-PAGE 用泳動 buffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycine

CBB 染色液: CBB-stain one (nacalai tesque)

略語

SDS: ラウリル硫酸ナトリウム

DTT: ジチオスレイトール

KCl: 塩化カリウム

操作手順

1日目（117 実験室で実施）

sfGFP-H のアフィニティクロマトグラフィ精製

- 大腸菌による **sfGFP-H** の発現（この手順については、既にスタッフが行なったサンプルを使用する。よって、ここでは概要のみ述べる。）

sfGFP-H の配列を持つプラスミド(pQsfGFPH)を、タンパク質発現用大腸菌(BL21(DE3)LysS)に形質転換した。この大腸菌を大量培養し、**zyp** によって **sfGFP-H** の発現誘導を行った。菌体を回収した後、超音波破碎を行い、遠心分離とフィルタをかけることで、細胞の断片や、生きたままの大腸菌を除去した。こうして得られたサンプルを 1 班に 1 本ずつ配布して実習を開始する。

- アフィニティクロマトグラフィに使用する溶液について

アフィニティクロマトグラフィに使用する溶液は次の 3 種類である：**IMAC B1 buffer**（平衡化バッファ）、**IMAC B2 buffer**（洗浄バッファ）、**IMAC B3 buffer**（溶出バッファ）。

使用する溶液		
平衡化：IMAC B1	洗浄：IMAC B2	溶出：IMAC B3
IMAC B1 buffer	IMAC B2 buffer	IMAC B3 buffer
300 mM KCl	300 mM KCl	300 mM KCl
20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)	20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)	20 mM Hepes-KOH (pH 7.8)
5 mM Imidazole (pH7.8)	10 mM Imidazole (pH7.8)	250 mM Imidazole (pH7.8)
0.2 mM DTT	0.2 mM DTT	0.2 mM DTT

- アフィニティクロマトグラフィによる **sfGFP-H** の精製

精製開始前に、電気泳動用に大腸菌破碎液 100 μ L を分注しておく。

アフィニティクロマトグラフィ担体が詰められたカラムを配布する (BioRad 社から購入した Bio-Scale Mini Profinity IMAC カートリッジ、1 本当たり 5000 円と高価なので、下記の手順通りに丁寧に扱うこと)。このカラムに、下表のように順次溶液を打ち込む。打ち込む際は、まず、プランジャーを抜いたシリンジを、カラムに装着する。シリンジ内に溶液をピペットで加え、プランジャーをゆっくり押してカラムに送液する。その速度は、カラムから排出される水滴が 1 秒に 2 滴程度になるように調節する。空気が入る前に打ち込みをやめる。打ち込む溶液を交換する際は、プランジャーを戻さず、一旦カラムからシリンジを外してからプランジャーを抜く。このような手順を踏まないと、溶液が逆流し、気泡がカラムに入ることで担体や精製するタンパク質にダメージを与えるため、注意する。カラム下部から排出される溶液は、下表に指定されたチューブで受ける。タンパク質溶出については、下表で指定された容量 (目

視)ごとにチューブを交換し、溶出液を分取する。得られた各溶液は、全て氷上で保存する。使用したカラムは、乾かないように、上下の蓋をしておくこと、後に TA が回収する。

タンパク質精製				
使用buffer	ステップ	分取 (mL)	使用チューブ (mL)	
IMAC B1 buffer	8 mL	カラム平衡化	8	15
		↓		
大腸菌破碎液	2 mL	タンパク質結合	2	15
		↓		
IMAC B2 buffer	20 mL	カラム洗浄	20	50
		↓		
IMAC B3 buffer	4 mL	タンパク質溶出	0.5 × 8本	1.5

紫外可視分光法によるタンパク質の濃度決定

- ・測定に用いるタンパク質の調製

溶出画分のうち、目視で最も濃い 1 本を選び、今後これを溶出液として扱う（基本的には 2 または 3 本目になるはず）。1.5 mL チューブに、溶出液 100 μ L を取り、900 μ L の IMAC B3 buffer を加えることで 1/10 倍に希釈する。

- ・分光光度計による吸光度の測定

調製した 1/10x 溶出液を、泡が入らないようにキュベットに移動し、吸光度の測定を、分光光度計を用いて行う。

測定条件は以下のよう：

測定波長：280, 488, 600 nm

測定手順は以下のよう：

- 1) IMAC B3 (溶出) バッファをセルに入れ、ベースラインを取る。この操作は、本来、測定前に行う必要があるが、本実習では、スタッフが予め行った。
- 2) 実際の測定試料を入れたキュベットをセットする。
- 3) 上記の条件でデータ取得を行う。

なお、吸光度は、透過度 T として、 $\log(1/T)$ で表されるから、吸光度が 1 であれば透過率は 10%、2 であれば 1% となり、吸光度が 1.5 より大きな場合は定量的信頼性が下がる。280 nm での吸光度(A280)が 1.5 を越えた場合は、適宜希釈して再度測定する。

2 or 3 日目：現地での実験（117 実験室で実施）

I群の方は、『2日目：現地 / 3日目：課題』、II群の方は、『2日目：課題 / 3日目：現地』です。間違いの無いよう、ガイダンス資料をご確認ください。

ブラッドフォード法によるタンパク質の定量

・タンパク質溶液の調製

タンパク質の標準サンプルとして濃度既知(8 mg/ mL (0.8%))の BSA (Bovine serum albumin : 牛血清アルブミン) 溶液 20 μL を配布する。この BSA 溶液を IMAC B3 buffer を用いて系列希釈し、0.8 mg/ mL, 0.4 mg/ mL, 0.2 mg/ mL, 0.1 mg/ mL, 0.05 mg/mL の 5 点の溶液、各 50 μL を、1.5 mL チューブに調製する。

また、溶出液 1 μL に 49 μL の IMAC B3 buffer を加えた、1/50x 溶出液も、1.5 mL チューブに調製する。また、50 μL B3 buffer についても、コントロールとして測定に使用する。

・ブラッドフォード溶液の混合

ブラッドフォード試薬を使用当日に予め調製したもの 2 mL を配布する。1.5 mL チューブ内で、50 μL のサンプルに 200 μL のブラッドフォード試薬を加え、一旦混合する。その後、750 μL の超純水を添加し、室温で 5 分間静置する。用いるサンプルは次の通り：系列希釈した BSA 溶液 5 本、溶出液 1 本、IMAC B3 buffer の合計 7 本。

・分光光度計による吸光度の測定

調製したブラッドフォード溶液の全量 1000 μL を用いて、吸光度の測定を、分光光度計を用いて行う。測定に当たっては、1 点測定で 595 nm の吸光度(A_{595})の測定値の読み取りを行う。濃度既知の BSA を用いた場合の、BSA 濃度(mg/mL)と吸光度の関係をグラフに表し、検量線とする。これを用いて溶出液の sfGFP 濃度を計算する。この際、sfGFP-H の分子量は 28180 [Da]を使用する。この解析の詳細は、4 日目の解析にて説明する。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-poly acrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)による sfGFP-H の解析

・使用するポリアクリルアミドゲルについて

本実験では、既製品のゲル ATTO 社 E-T12.5L ePAGE L 12.5% (14 様体) を使用する。実際の研究現場では、様々な泳動条件に対応するため、ゲルを自作する場合も多い。

・泳動サンプルの調製

下表のように、サンプルに 1x SDS-PAGE 用 loading buffer を添加し、混合した後、95°C で 2 分間加熱し、室温に 5 分以上静置する。

	サンプル	1x SDS-PAGE用loading buffer	
精製前	5 μL	+	45 uL
カラムの通過液	5 μL	+	45 uL
タンパク質溶出液(1/40)	2 μL	+	78 μL
タンパク質溶出液(1/200)	5 μL タンパク質溶出液(1/40)	+	20 μL

・ SDS-PAGE の実施

ゲルを泳動槽にセットし、SDS-PAGE 用泳動 buffer を添加する。スタッフがレーン 1~5 に標準試料を打つので、その方法をよく見た上で、各班のサンプルを 4 μL ずつ、ウェルに打ち込む。打ち込むウェルについては、下表の通りとする。ゲル 1 枚あたり 40 mA の条件で、青い色素(Bromophenol blue : BPB)がゲルの 9 割程度に到達するまで通電する (40 分程度)。

サンプル	分子量 標準	定量用標準BSA				1班				なし	2班			
		0.25 μg/μL	0.125 μg/μL	0.0625 μg/μL	0.03125 μg/μL	精製前	カラム通 過液	溶出液 (1/40)	溶出液 (1/200)		精製前	カラム通 過液	溶出液 (1/40)	溶出液 (1/200)
アプライ量 (uL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	4	4	4	4
レーン番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

・ ゲルの染色と観察

ゲルを取り出し、染色用の容器に移す。予め温めておいた超純水を容器の半分程度加え、電子レンジで数秒沸騰させた後、室温で 5 分静置する。超純水を交換し、同様の操作を計 3 回繰り返す。完全に水を切って、CBB 染色液 10 mL を加え、電子レンジで加熱し、沸騰するのが見えたたら直ちに止める。室温で 20 分程度静置し、バンドが染まったことを確認したら染色液を捨てる。この時の廃液は専用の廃液タンクへ回収する。超純水を半分程度加え、電子レンジで沸騰させた後、室温で 5 分静置する。超純水を交換し、同様の操作を計 2 回繰り返す。水を捨てた後、ゲルを撮影装置で撮影する。撮影装置は、担当研究室のものを使用し、得られた画像の TIFF ファイルを TACT 上で配布する。4 日目に行うデータ解析では、この画像を使用するので、データをダウンロードしておくこと。

また、撮影したゲルには、各レーンに打ったサンプル名、分子量等の情報を書き込んだ上でレポートに載せること。

・ sfGFP の濃度決定

電気泳動のバンド強度の解析は、フリーで使用でき、研究において画像処理で頻繁に用いられるソフトウェアである ImageJ を使用する。ImageJ でゲルの TIFF ファイルを開き、標準

用 BSA のバンド 4 本と、自分の班の $1/40\times$ タンパク質溶出液のバンドの、計 5 本のバンドについて、バンドの強度を定量する。濃度既知の BSA を用いた場合の、BSA 濃度(mg/mL)とバンド強度の関係をグラフに表し、検量線とする。これを用いて溶出液の sfGFP 濃度(mg/mL)及び μM)を計算する。この際、sfGFP-H の分子量は 28180 [Da]を使用する。この解析の詳細は、4 日目のデータ解析にて説明する。

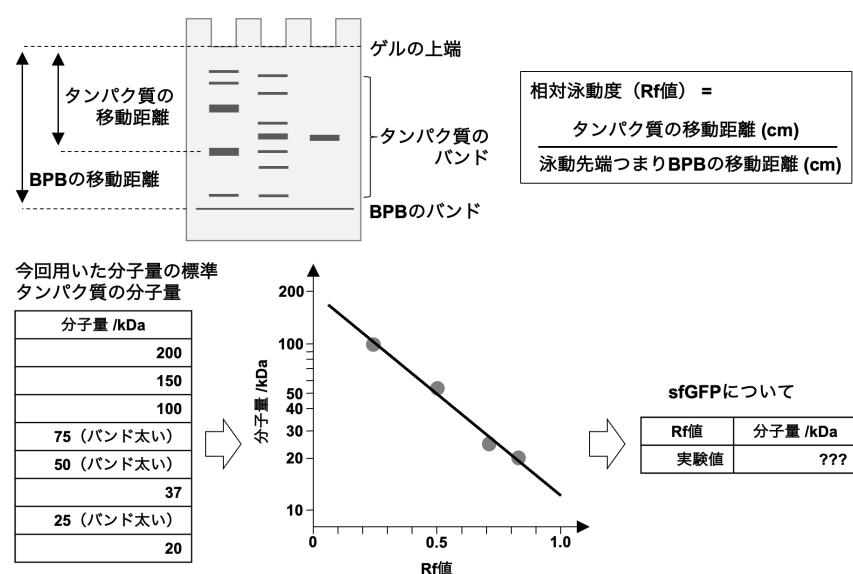
• sfGFP-H の分子量の決定

下図を参照し、sfGFP-H の分子量を決定する。分子量マーカーの各バンドと、BPB の泳動距離を定規で測定し、相対泳動度（Rf 値）を計算する。BPB の位置が分からぬ場合は、精製前サンプルの一番下のバンドの距離を 1 として計算する。分子量マーカーの分子量の対数と、

Rf 値をグラフにプロッ

トし、検量線を得る。自
分のサンプルについて
も、分子量マーカーと同
様に泳動距離を計測し、

Rf 値を計算する。検量線
を利用して、sfGFP-H の
分子量を計算し、理論値
(28.2 kDa)と一致するこ
とを確認する。この解析
の詳細は、4 日目のデータ
解析にて説明する。



2 or 3 日目：課題（各自で、自宅や図書館で実施）

I群の方は、『2日目：現地 / 3日目：課題』、II群の方は、『2日目：課題 / 3日目：現地』です。間違いの無いよう、ガイダンス資料をご確認ください。

以下の課題については、2または3日目に取り組み、その上で4日の解析に参加するようお願いします。

1. sfGFP の 280 nm における mol 吸光係数 ϵ_{280} の計算

本テキストで与えられた sfGFP-H をコードする DNA の配列情報から、今回発現したタンパク質の理論上の分子量と、理論上の mol 吸光係数(ϵ_{280})を計算せよ。なお、その過程をレポートに示すこと。計算を web サイトやアプリケーションで行った場合は、その情報もレポートに記すこと。

ちなみに、mol 吸光係数 $\epsilon_{280} = 18910 [M^{-1} cm^{-1}]$ となるはずである。

2. 吸光度を用いた sfGFP 濃度の計算

上で計算した ϵ_{280} と、実測した 280 nm における吸光度 A_{280} の値を用いて、溶出液中の sfGFP 濃度 $c [\mu M]$ を計算せよ。その際には、Lambert-Beer の式 $A = \epsilon c l$ を用い、光路長 $l = 1 [cm]$ とせよ。

3. 解析ソフトウェア ImageJ の準備

ゲル画像の解析には、ImageJ を使用します。データ解析マニュアルの 1 ページ目の指示に従い、事前に、各自 ImageJ をインストールしておいてください。

なお、4日目に行うデータ解析では、その場で各自の PC を用いて解析を行ってもらうことを想定しています（詳細は4日目を参照）。

4日目：データ解析（117実験室で実施）

本実験の4日目に行うデータ解析では、その場で各自のPCを用いて解析を行ってもらいますので、PCを持参して下さい。

当日使用する資料は、TACT上で配布した解析用マニュアルです。

また、実験で取得した以下のデータを使用します。

- ・ブラッドフォード法のデータ：実験当日に各自が測定した数値をメモしたもの。
- ・SDS-PAGEのゲル画像データ：TAがゲルを専用の撮影装置で撮影し、その画像データを3日目の実験終了後にTACTで配布します。各自、自身の班のサンプルを含むゲルの画像を、事前にダウンロードしておいてください。

レポート用追加設問

レポートには、以下の設問への回答も含めること：

1. 本実験ではタンパク質の精製にHis-tagを利用した。His-tag以外の精製用ペプチドtagまたはタンパク質tagの例を2つ以上挙げ、その特徴を説明せよ。
2. 本実験では、3つの方法でタンパク質濃度を測定した。これらの方針以外のタンパク質濃度測定法を1つ挙げ、原理を説明せよ。また、本実験で用いた方法との違いについても述べよ。
3. 課題2で計算したsfGFPの濃度と、紫外可視分光法で測定した488 nmにおける吸光度A₄₈₈の値から、488 nmにおけるsfGFPのmol吸光係数ε₄₈₈を計算せよ。また、文献でsfGFPのε₄₈₈を調べて、値を比較せよ。その際、参考文献を示すこと。
4. 今回の実験に限らず一般的に、SDS-PAGEを用いてバンド移動度から計算したタンパク質の分子量は、そのタンパク質のアミノ酸配列から算出される理論上の分子量と一致しない場合ことが多い。その原因として、どのようなことが考えられるか述べよ。

紫外・可視分光法 (UV-Vis spectroscopy)

履修者の皆さんは、化学生命工学実験 1 の機器分析実験「電子スペクトル」で既に紫外・可視吸収スペクトルについて学んでいるが、本実験ではこの分光法をタンパク質の定量に応用する。

1. 原理

分子のエネルギーは量子化されており、回転エネルギー準位間の遷移エネルギーはマイクロ波領域、振動エネルギー準位間の遷移は赤外領域、分子軌道エネルギー間の遷移は紫外・可視領域(1 ~ 6 eV)に相当する。

紫外・可視分光法は、分子が測定光を吸収して分子軌道間の電子遷移を起こした際に吸収される光強度 (photon 数) の変化を測定光の波長、又は波数 (cm^{-1}) や eV 等のエネルギー比例単位に対してプロットすることにより、吸収波長(吸収エネルギー)より定性的に候補となる分子骨格が特定できる。

モル吸光係数がわかっている場合は、測定した吸光度を Lambert-Beer の法則に適用することにより、測定試料中のその分子の濃度を定量することができる。

2. 装置

紫外・可視分光装置は、光源、分光器、試料室、検出器、記録部（制御コンピューター）の 5 つの部分から構成される。

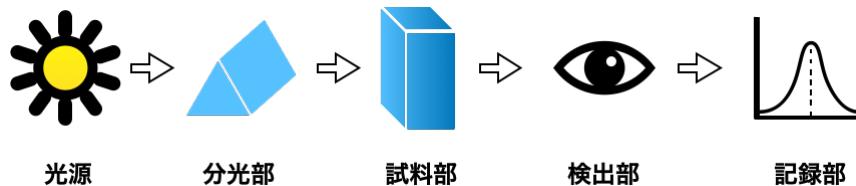


図 1 紫外・可視分光光度計の装置構成

2-1. 光源

多くの紫外可視分光光度計において、可視光から近赤外光 (320~3000 nm) の光源としてタングステンハロゲン(WH)ランプが (タングステンランプ内に微量のハロゲン化物を添加し、ハロゲンサイクルによって蒸発したタングステンをフィラメントに戻して長寿命化したランプ)、350 nm 以下の紫外域(180~400 nm)の光源として重水素のアーク発光を利用した重水素ランプが使われることが多い。これら 2 つの光源の発光強度は 300~350 nm 付近でほぼ等しくなるため、そのあたりの波長領域で光源が切り替えられる (UV-2400C では 350 nm で切替)。

2.2 分光器

光源の光は様々な波長の光を含む連続光（白色光）であるため、分光に用いる光は原則単波長化する必要がある*. この光を分ける素子は分光素子と呼ばれ、その代表的なものとしてはプリズムと回折格子(grating)がある。

UV-Vis 光用の回折格子は、鏡のような面に 1 mm あたり 600~1600 本の等間隔の溝が平行に彫られた板である(図 2)。格子面間隔 d の隣り合う回折格子面に角度 θ でそれぞれ入射する光が角度 ϕ で反射するとき、 $d(\sin \theta + \sin \phi)$ の光路差が生じ、 $d(\sin \theta + \sin \phi) = m\lambda$ (m は整数) の時のみ回折光は強めあう(回折現象)。回折格子を少しずつ回転させて連続光の入射角 θ を替えることにより、特定の波長の光を取り出すことができる。微細加工技術の進展並びに回転角制御が容易にできることにより、現在の分光器では、回折格子が分光素子の主流となっている。

2.3 試料部

試料部は試料溶液を設置する部分で、セルと呼ばれる容器とそれを保持するホルダーから構成される。

セルは試料溶液の光路長が 1 cm、ビーム入口側と出口側が合成石英ガラス製のものがよく使用される。合成石英を用いる理由としては、紫外外部においても光透過性が高いた

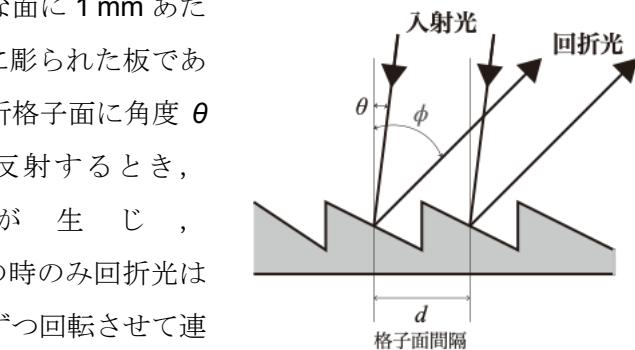


図 2 回折格子

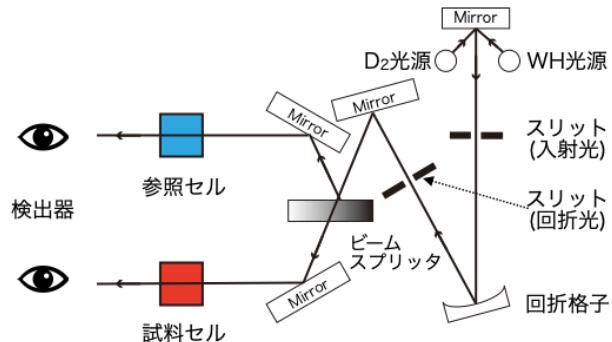


図 3 ダブルビーム型 紫外・可視分光装置の概略図

めであるが、可視領域の測定に限定される場合などはポリスチレン樹脂やアクリル樹脂製の安価なセルを用いることもある。石英の面を指で触ると、皮脂などが付着して紫外光透過を妨げる原因となるため、光路にあたる石英ガラス部分は手で触らないように注意しなくてはならない。また、合成石英製セルは高価であるので、落として破損しないよう、取扱には十分注意すること。

UV-2400C 装置では、スリット(回折光)を通過した光はビームスプリッタで二本の光束に分離され、試料セルと参照セルを通過して検出器へと入る(図 3)。スリット幅は装置の設定で変更できる。スリット幅が広いと光量は増えるが单色性が下がる。スリット幅が狭い場合、单色性は上がるが光量が低下するために検出時の S/N が低くなる。スペクトルの分解能と S/N を考慮してスリット幅を選ぶことが望ましい。

試料の測定に入る前に、試料側と参照側に測定試料の溶媒を入れたセルをセットし、ベースラインを取る事によって、試料側と参照側の検出器の感度を補正しておくことが望ましい。

2.4 検出部

UV-2400C 装置では、光強度の測定に光電子増倍管(photomultiplier tube, PMT)が使用されている。PMT は光電面に光が当たると光電子が放出される現象を利用した検出器で、多段に

組まれた電子増倍電極（ダイノード）を用いて発生した光電子量を大幅に增幅できるため、少ない光量でも光を定量検出できるのが特徴である。PMT 以外では、安価で耐久性の高いシリコンフォトダイオードを検出器に用いている分光器もある。

光強度はこれら検出器で電気強度に変換され、検出器の感度の波長依存性をコンピューターで処理することにより、各測定波長における吸光度（あるいは透過率）が得られ、光吸収スペクトルが得られる。

3. Lambert-Beer の法則を適用した GFP タンパク質の定量

3.1 透過度・透過率・吸光度の定義、Lambert-Beer の法則

ある波長の入射光強度 I_0 の光が、試料セルを透過後、透過光強度が I になったとする。その時、透過度 (T : transmittance) は

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

透過度を百分率で表した透過率 ($T\%$) は、

$$T \% = \frac{I}{I_0} \times 100 = 100T \quad (2)$$

で定義される。

入射光が距離 dx を進む間に減少する光強度 I との間には

$$-\frac{dI}{dx} = k_1 I \quad (3)$$

が成り立つ。セル長を l として式(3)を積分すると、

$$\begin{aligned} - \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} &= k_1 \int_0^l dx \\ -\ln \frac{I}{I_0} &= k_1 l \end{aligned} \quad (4)$$

となる。式(4)を常用対数に書き直すと、

$$-\log_{10} \frac{I}{I_0} = 2.303 k_1 l = k'_1 l \quad (5)$$

となる。ここで吸光度(A : absorbance)を次のように定義する。

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log_{10} \frac{1}{T} \quad (6)$$

従って、式(5)は

$$A = k'_1 l$$

となり、吸光度は光路長に比例することが導かれる。これを **Lambert の法則** という。

セルが矩形型であるとして、光路長を 2 倍にして溶液の体積も 2 倍にしたとき、光路長間の吸収物質の量は 2 倍になる。一方、光路長はそのままで濃度を 2 倍にしても同じことになる。溶液の濃度を c とした場合、式(3)と同様に、

$$-\frac{dI}{dx} = k_2 c$$

であるから、

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = 2.303 k_2 c = k'_2 c \quad (7)$$

となり、吸光度は溶液の濃度 c にも比例する。これを **Beer の法則** という。

吸光度は光路長 l と溶液の濃度 c の両方に比例するから、この 2 つの法則をまとめると、

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = k l c \quad (8)$$

となる。これを **Lambert-Beer の法則** と呼ぶ。

$l = 1 \text{ cm}$, $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ の場合の k を ϵ で表し、

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon l c \quad (9)$$

としたときの ϵ はモル吸光係数(molar absorption coefficient)と呼ばれ、測定波長・温度などによって決まる物質固有の定数である。吸光度 A は無次元であるから、履修者はモル吸光係数の単位を簡単に得られる。

モル吸光係数は光を吸収する分子骨格の振動子強度に依存するため、吸光度が等しければ濃度も等しいということにはならないことに注意が必要である。

3.2 測定時の注意

吸光度は $\log(1/T)$ であるから、吸光度が 1 であれば透過率は 10%, 2 であれば 1% となり、吸光度が 1.5 より大きな場合は定量的信頼性が下がる。吸光度(A_{280})が 1.5 を越えた場合は、適宜希釈して測定する必要がある。

<参考文献>

- エキスパート応用化学テキストシリーズ 機器分析 大谷 肇 編、講談社サイエンティフィック。
- 第 5 版実験化学講座 分析化学、分子分光分析 丸善。