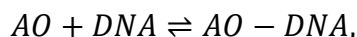


問題 24. アクリジンオレンジ/DNA 結合相互作用

アクリジンオレンジ(AO)は挿入的結合を介して DNA に結合する蛍光色素である。AO は DNA の塩基対の間に入り込むことができる。AO のような挿入剤の DNA に対する相互作用は広く研究されてきており、DNA と色素の割合を変化させる分光滴定によって複合体形成を追跡することができる。DNA の保存溶液は分光光度的に標準化することができる。(DNA 塩基対によって表される C_{DNA} 、すなわち DNA のモル濃度について、260 nm において、 $\epsilon = 13,200 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^{-3} \text{ cm}^{-1}$ である)

24.1. DNA を含む溶液の UV スペクトル測定により、260 nm における吸光度測定から純 DNA 濃度を計算するための式を答えよ(石英セルの長さ : 1.0 cm)。

DNA と AO が AO-DNA 複合体を形成する相互作用は、次の反応で表される。



この平衡定数は、[DNA]と[AO]、[AO-DNA]を平衡濃度とすると、

$$K = \frac{[AO-DNA]}{[AO][DNA]} \quad (1)$$

である。

24.2. 平衡状態における AO の全濃度 (C_{AO})に関する物質収支の式を示せ。

AO の DNA に対する結合は、蛍光強度(F)を記録することで追跡することができる。AO と AO-DNA 複合体のどちらも、 $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ において最大の発光強度を示す。希薄溶液においては、濃度は F に比例する。ゆえに、F を用いることによって、複合体形成の量を見積もることができる。 φ_i が蛍光定数、 C_i が i の濃度だとすると、

$$F = \varphi_i \times C_i$$

が成り立つ。

24.3. 平衡状態における ϕ と AO の濃度、DNA の濃度を用いて、全体の F を表す式を示せ。

最初は、測定セルの中で $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ において蛍光を示すのは AO だけであり、最終的に、平衡状態においては、AO と AO-DNA 複合体がともに同じ波長において蛍光を示すことを考慮せよ。 $F - \phi_{AO} C_{AO} = \Delta F$ そして $\phi_{AO-DNA} \phi_{AO} = \Delta\phi$ とする。

24.4. $\Delta F = [AO - DNA]\Delta\phi$ であることを示せ。

AO の DNA に対する挿入の結合平衡定数 (AO の自己会合と二量化は無視せよ) は、下の式によって与えられる：

$$\frac{C_{AO}}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta\phi} + \frac{1}{\Delta\phi K [DNA]} \quad (2)$$

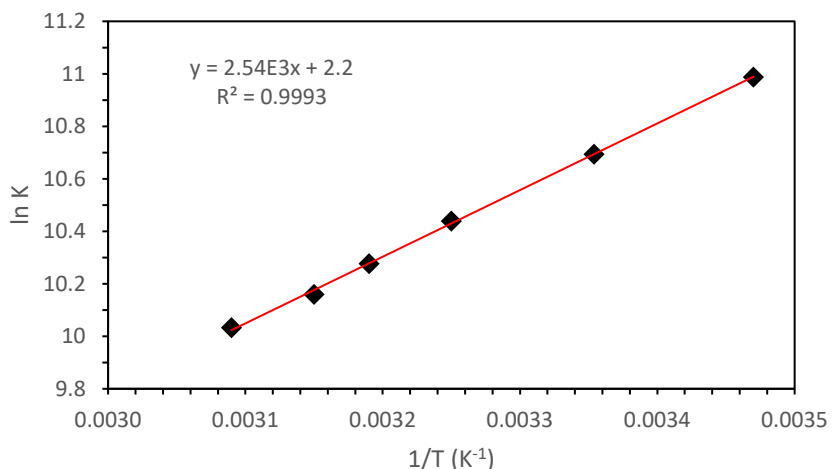
24.5. 等式(1)から等式(2)を導け。

分光蛍光滴定は、AO を含むセルに直接 DNA を加えていくことによって行われる。DNA が加えられるたびに、結合していない AO と結合した AO だけが蛍光を示す $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ における蛍光強度が記録される。

$C_{AO} (\text{mol dm}^{-3})$	$C_{DNA} (\text{mol dm}^{-3})$	$F_{520} (\text{a.u.})^*$
1.857×10^{-7}	6.535×10^{-6}	162
1.832×10^{-7}	1.032×10^{-5}	188
1.800×10^{-7}	1.521×10^{-5}	210
1.725×10^{-7}	2.671×10^{-5}	240
1.604×10^{-7}	4.516×10^{-5}	260

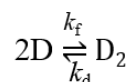
* a.u. は任意単位である。

24.6. 上の表に示されたデータを用いて、AO-DNA の結合平衡定数を計算せよ。AO の自己会合と二量化は起こっていないと仮定せよ。 $\phi_{AO} = 5.00 \times 10^8 \text{ mol dm}^{-3}$ 、 $[DNA] \cong C_{DNA}$ を用いよ。



24.7. 関係式 $K = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}}$ と上のプロットを用いて、AO が 25 °C において DNA に対して複合体形成するときの ΔrH° と ΔrS° 、 ΔrG° の値を計算せよ。(ΔrH° と ΔrS° は温度によって変化しないと仮定せよ。)

AO はより高い濃度においては、自己会合(二量化)を起こすことがある。二量化の定量分析は下の式のように表される。



ここでは、D は AO のモノマーを表し、 D_2 は AO の二量体を表す。 k_f と k_d はそれぞれ、二量体形成と二量体解離の速度定数である。この反応によると、急激な変化を起こしたときに、反応系が新しい平衡に達するまでにかかる時間である、 τ 、すなわち緩和時間に対する AO 濃度依存性は、下の関係式で表される。

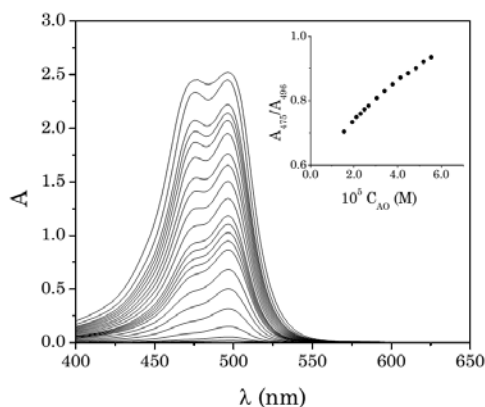
$$\frac{1}{\tau} = k_d + 4k_f C_{AO}$$

25 °C における AO の二量化に関するデータは下の表に与えられている。

$10^6 C_{AO}$ (mol dm ⁻³)	10^5 緩和時間, τ (s)
2.50	2.32
4.50	2.27
8.00	2.18
11.0	2.11

24.8. k_d と k_f の値を計算せよ。

水溶液中のいろいろな濃度 (0 から $7.3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) における AO 誘導体の吸光スペクトルが下の図に示されている。スペクトルは、2 つの吸光ピークが存在することを示す：1 つは 496 nm に、もう一つは 475 nm に存在する。挿入図は AO の濃度に対する吸光ピークの比 (A_{475}/A_{496}) の関係を表している。



24.9. AO 誘導体の吸光スペクトルに関して正しい記述 (複数の場合もある) を選べ。

- 496 nm において観察されるバンドは、単量体の形に帰属される。
- もし単量体型しか存在しないならば、吸光ピークの比 (A_{475}/A_{496}) は一定になる。
- 二量化を減らすためには、AO の濃度を減らす必要がある。

24.10. AO の初期濃度が $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ であったとき、平衡状態における二量体の割合を計算せよ。

