

BIOCHEMICAL RESEARCH TECHNIQUES  
A Practical Introduction

# バイオテクノロジー

## —— 研究技法と実際 ——

JOHN M. WRIGGLESWORTH 編／理学博士 太田次郎 監訳

Y LABELS-MONOCLONAL ANTIBODIES-  
SORBANCE SPECTROSCOPY-HIGH PER  
FORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
ELECTRON MICROSCOPY-FLUORESCENCE  
SPECTROSCOPY-CELL CULTURE-SPECTRO  
Y LABELS-MONOCLONAL ANTIBODIES-

オーム社

BIOCHEMICAL RESEARCH TECHNIQUES  
A Practical Introduction

# バイオテクノロジー

—— 研究技法と実際 ——

JOHN M. WRIGGLESWORTH 編

理学博士 太田次郎 監訳

理学博士 太田次郎

理学博士 室伏 擴 共訳

医学博士 室伏きみ子

オーム社

# 監訳者・訳者略歴

太田 次郎

昭和23年 東京大学理学部植物学科  
卒業

昭和35年 理学博士

現 在 お茶の水女子大学理学部  
教授

室伏 擴

昭和45年 東京大学理学部生物化学  
科卒業

昭和50年 東京大学大学院理学系研  
究科博士課程修了  
理学博士

現 在 東京大学理学部講師

室伏きみ子

昭和45年 お茶の水女子大学理学部  
生物学科卒業

昭和51年 東京大学大学院医学系研  
究科博士課程修了  
医学博士

現 在 お茶の水女子大学理学部助手

バイオテクノロジー

——研究技法と実際——

太田 次郎  
室伏 擴 1985  
室伏きみ子

昭和60年1月20日 第1版第1刷発行

OHM・OHM・OHM・OHM・OHM  
訳者承認  
検印省略  
OHM・OHM・OHM・OHM・OHM

訳者

太田 次郎  
室伏 擴  
室伏 きみ子

発行者

株式会社 オーム社  
代表者 種田 則一

発行所

株式会社 オーム社  
郵便番号 101  
東京都千代田区神田錦町3-1  
振替 東京6-20018  
電話 03(233)0641(大代)

Printed in Japan

印刷 日東紙工 製本 大進堂  
落丁・乱丁本はお取替えいたします

ISBN4-274-02087-8

## 編者はしがき

この本の主な目的は、今まで採用できなかった技術を使えるようにすることで、研究する学生たちを助けたいということである。また、1人前の研究者たちにとっても、その専門外の技術をよく知るようになることは有用なことである。研究者たちにとって、実際に未知の技術が特定の問題を解決するのに役立つかどうかを判定するのは、大変な努力をしない限り、しばしば困難である。研究には必ず技術的な細かい点が関係するし、研究論文や総説は、普通、技術的に熟練した経験をもつことを前提としている。

この本で扱う個々の技術に関しては、専門家による多くの総説があるが、それらの大部分は、実際上有効な導入を与えるには詳しすぎる。そのため、個々の著者は、必要な原理を含め、簡潔で、概括的な総説を記すことを要求された。さらに、その技術が読者自身の研究に有用な情報をもたらすか否かを判定できるような、実際上の細かい点(試料の作成法や信号処理など)についてもまとめている。各章の最後には、関連した詳細なテキストとともに、その技術の範囲が説明されている。

生化学を研究する学生たちには、多様な実験技術をある程度知っていることが期待される。1冊の本にそのすべてを含めることは、実際上不可能であるので、この本では編者の興味に基づいて選択を行った。題目は、原子(吸光分光法)から分子(スピラベル法とクロマトグラフィー)をへて、細胞(単クローン抗体と細胞培養)に至る広い分野を含んでいるが、それらは生命科学や薬学の多くの研究室で共通に関心をもつ分野を網羅するように選んでいる。また、専門家が、どうすれば最良の結果を引き出せるかを助言している正しい実験方法から、将来の

可能性について助言が与えられている新しいいくつかの実験技術までも含めている。

John M. Wrigglesworth

1982

### 原 著 者 一 覧

- |                       |                                                                                                                    |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GHEORGHE BENGHA       | <i>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Medical and Pharmaceutical Institute, Cluj-Napoca, Romania</i> |
| ALAN H. BITTLES       | <i>Department of Human Biology, Chelsea College, University of London, London SW3 6LX, UK</i>                      |
| ROBERT F. G. BOOTH    | <i>Biology Department, Searle Research &amp; Development, High Wycombe, Bucks. HP12 4HL, UK</i>                    |
| PETER NICHOLLS        | <i>Department of Biological Sciences, Brock University, St. Catharines, Ontario L2S 3A1, Canada</i>                |
| PETER J. QUINN        | <i>Department of Biochemistry, Chelsea College, University of London, London SW3 6LX, UK</i>                       |
| NORMAN A. STAINES     | <i>Immunology Section, Chelsea College, University of London, London SW3 6LX, UK</i>                               |
| W. PATRICK WILLIAMS   | <i>Department of Biophysics and Bioengineering, Chelsea College, University of London, London SW3 6LX, UK</i>      |
| JOHN M. WRIGGLESWORTH | <i>Department of Biochemistry, Chelsea College, University of London, London SW3 6LX, UK</i>                       |

## 監訳者はしがき

現代は生命科学の応用の時代といわれる。生化学・生物物理学・分子生物学などの分野で得られた成果をもとにして、その技術的応用を目指すバイオテクノロジーが未来産業の重要な分野の1つとして注目されている。このことを反映して、生命科学やバイオテクノロジーに関連する書物は多く刊行されているが、それらの大部分は研究の現状や未来予測を記したもので、その発展のもとになった技術はあまり取り扱われていない。

生命科学の基礎となる技術を解説した本もいくつか出版されているが、1つの技術を詳しく紹介した本や、大部の叢書や全集のようなものが多いようで、1冊の本で、多くの技術を簡潔にまとめ、新しく研究を志す人の入門書となるような本は、従来あまり見かけなかった。

そんなとき、この本を手にした。内容は、原子・分子・細胞に及ぶ広い範囲の技術をカバーしていて、しかも1つ1つの項目に技術の裏づけとなる理論が記され、さらに詳しい文献まで付されている。したがって、この本こそ、生化学のみならず、生命科学、さらにバイオテクノロジーの技術の入門書として格好なものであると考え、訳出することにした。

編者と大部分の著者は英国人であり、その気質を反映してか、原文は重厚で、がっちりまとめられている。翻訳に当たっては、原文の調子をくずさずに、できるだけ平易な文にするように努力した。

本書がバイオテクノロジーを目指す人々、実際にその研究に従事している人々にとって、新しい技術を身につけるためのガイドブックとして役立てば幸いと考えている。

なお、翻訳は1～3章を室伏擴が、5章を太田次郎が、4、

6～7章を室伏きみ子が分担した。終わりに、本書の出版に当たりお世話になったオーム社出版部のみなさまに謝意を表する。

1984年11月

太 田 次 郎

# 目 次

## 1. 吸 光 分 光 法

|       |                    |    |
|-------|--------------------|----|
| 1・1   | 序 説 .....          | 1  |
| 1・2   | 原理および技術 .....      | 2  |
| 1・3   | 装置および部品 .....      | 6  |
| 1・3・1 | 光 源 .....          | 6  |
| 1・3・2 | モノクロメーター .....     | 6  |
| 1・3・3 | 試料室 .....          | 7  |
| 1・3・4 | 検出器 .....          | 8  |
| 1・3・5 | レコーダーおよび増幅器 .....  | 8  |
| 1・4   | 測 定 の 方 法 .....    | 9  |
| 1・4・1 | 透明溶液 .....         | 9  |
| 1・4・2 | 不透明溶液 .....        | 15 |
| 1・4・3 | 微分スペクトル .....      | 20 |
| 1・4・4 | 低温スペクトル .....      | 21 |
| 1・4・5 | 溶媒および環境 .....      | 23 |
| 1・4・6 | 吸収強度と位置 .....      | 26 |
| 1・4・7 | 反応速度論的測定 .....     | 29 |
| 1・5   | 生物学的実例 .....       | 35 |
| 1・5・1 | 呼吸小器官 .....        | 35 |
| 1・5・2 | タンパク質およびアミノ酸 ..... | 38 |
| 1・5・3 | 核酸およびヌクレオチド .....  | 42 |
| 1・5・4 | 補酵素 .....          | 42 |
| 1・5・5 | ヘモグロビン .....       | 44 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 謝 | 辞 | 48 |
| 文 | 献 | 49 |

## 2. 蛍 光

|       |                      |   |    |
|-------|----------------------|---|----|
| 2・1   | 序                    | 説 | 53 |
| 2・2   | 蛍光および蛍光のパラメーター       |   | 54 |
| 2・2・1 | 基礎理論                 |   | 54 |
| 2・2・2 | 蛍光のパラメーター            |   | 57 |
| 2・3   | 装                    | 置 | 61 |
| 2・3・1 | 定常状態測定装置             |   | 61 |
| 2・3・2 | 蛍光の寿命の測定             |   | 64 |
| 2・3・3 | リン光と生物発光の測定          |   | 65 |
| 2・4   | 測 定 の 問 題            |   | 67 |
| 2・4・1 | 測定方法の選択              |   | 67 |
| 2・4・2 | 励起光および放出光の波長の選択      |   | 68 |
| 2・4・3 | スリット幅の選択             |   | 69 |
| 2・4・4 | 散乱光                  |   | 69 |
| 2・4・5 | 内部フィルターと蛍光の再吸収の影響    |   | 72 |
| 2・5   | 応                    | 用 | 72 |
| 2・5・1 | 蛍光定量法                |   | 72 |
| 2・5・2 | 蛍光プローブ法              |   | 74 |
| 2・5・3 | 生物蛍光, 蛍光抗体法, 蛍光退色回復法 |   | 81 |
|       | 文                    | 献 | 82 |

## 3. スピンラベル法

|     |                   |   |    |
|-----|-------------------|---|----|
| 3・1 | 序                 | 説 | 85 |
| 3・2 | スピンラベル ESR の理論的基礎 |   | 87 |

|       |                              |     |
|-------|------------------------------|-----|
| 3・3   | スピンラベル法の実際                   | 90  |
| 3・3・1 | スピンラベルの化学                    | 90  |
| 3・3・2 | 生物試料の標識化の実際                  | 93  |
| 3・3・3 | 装置の概要                        | 95  |
| 3・3・4 | スペクトルの解釈と分析                  | 99  |
| 3・3・5 | ESR におけるコンピューターの利用           | 106 |
| 3・4   | 生物学への応用例                     | 107 |
| 3・4・1 | 核 酸                          | 108 |
| 3・4・2 | 可溶性タンパク質                     | 109 |
| 3・4・3 | 酵素学におけるスピンラベルの応用             | 110 |
| 3・4・4 | 人工膜系におけるスピンラベル法              | 113 |
| 3・4・5 | 生体膜についての研究                   | 117 |
| 3・4・6 | 医学への応用                       | 119 |
| 3・5   | ESR 分光法の生物学への応用に関する<br>最近の進歩 | 121 |
| 3・6   | スピンラベル法の長所および短所              | 122 |
|       | 付 表                          | 123 |
|       | 文 献                          | 124 |

#### 4. 高速液体クロマトグラフィーの原理と応用

|       |                  |     |
|-------|------------------|-----|
| 4・1   | 序 説              | 131 |
| 4・2   | HPLC の 原 理       | 132 |
| 4・2・1 | クロマトグラフィーのパラメーター | 132 |
| 4・2・2 | 液体クロマトグラフィーの分離様式 | 137 |
| 4・3   | HPLCの装置とその操作     | 142 |
| 4・3・1 | HPLC 装置          | 142 |
| 4・3・2 | ポンプと勾配溶出装置       | 143 |
| 4・3・3 | 注入器（試料導入部）       | 144 |
| 4・3・4 | カラムおよび充填剤        | 146 |

|       |                          |     |
|-------|--------------------------|-----|
| 4・3・5 | 検出器 .....                | 148 |
| 4・3・6 | 付属機器 .....               | 150 |
| 4・3・7 | カラム充填法 .....             | 151 |
| 4・4   | HPLC の応用 .....           | 153 |
| 4・4・1 | 薬品 .....                 | 153 |
| 4・4・2 | ステロイド .....              | 154 |
| 4・4・3 | 生体アミン .....              | 155 |
| 4・4・4 | ヌクレオチド, ヌクレオシド, 塩基 ..... | 156 |
| 4・4・5 | 脂質 .....                 | 156 |
| 4・4・6 | 炭水化物 .....               | 157 |
| 4・4・7 | アミノ酸, ペプチド, タンパク質 .....  | 157 |
| 4・4・8 | 環境毒 .....                | 158 |
| 4・5   | 結 論 .....                | 158 |
|       | 文 献 .....                | 159 |

## 5. 電子顕微鏡技術

|       |                               |     |
|-------|-------------------------------|-----|
| 5・1   | 序 説 .....                     | 161 |
| 5・2   | 電子プローブ解析法 .....               | 163 |
| 5・2・1 | 透過電子 .....                    | 163 |
| 5・2・2 | 後方散乱電子および2次電子 .....           | 169 |
| 5・2・3 | X線, オージェ電子および<br>陰性冷光分析 ..... | 171 |
| 5・3   | 試料作成法 .....                   | 174 |
| 5・3・1 | 薄い切片 .....                    | 175 |
| 5・3・2 | 負染色 .....                     | 181 |
| 5・3・3 | 重金属のシャドウイング .....             | 183 |
| 5・3・4 | フリーズフラクチャー .....              | 185 |
| 5・3・5 | 走査電子顕微鏡用の試料 .....             | 188 |
|       | 謝 辞 .....                     | 189 |

|   |   |     |
|---|---|-----|
| 文 | 献 | 189 |
|---|---|-----|

## 6. 単クローン抗体

|       |                                              |   |     |
|-------|----------------------------------------------|---|-----|
| 6・1   | 序                                            | 説 | 193 |
| 6・1・1 | 免疫応答におけるクローンの複雑性 .....194                    |   |     |
| 6・1・2 | 単クローン抗体 (MCA) 試薬 .....194                    |   |     |
| 6・1・3 | MCA の産生に必要な設備 .....195                       |   |     |
| 6・2   | MCA の作製法 .....197                            |   |     |
| 6・2・1 | 一般原理 .....197                                |   |     |
| 6・2・2 | 免疫感作と免疫リンパ球の形成 .....199                      |   |     |
| 6・2・3 | 雑種細胞形式のための骨髓腫細胞 .....203                     |   |     |
| 6・2・4 | 免疫リンパ球と骨髓腫細胞との融合 .....205                    |   |     |
| 6・2・5 | 雑種リンパ球の選別 .....208                           |   |     |
| 6・2・6 | 特異的な MCA を分泌する雑種細胞株<br>の分離 .....211          |   |     |
| 6・2・7 | 特異抗体を分泌する雑種細胞を同定する<br>ためのスクリーニングの方法 .....213 |   |     |
| 6・2・8 | 雑種細胞系の増殖と MCA の回収 .....216                   |   |     |
| 6・2・9 | MCA の標識 .....218                             |   |     |
| 6・3   | MCA の均一性と特異性 .....219                        |   |     |
| 6・4   | MCA の利用法 .....220                            |   |     |
|       | 謝                                            | 辞 | 222 |
|       | 付                                            | 録 | 222 |
|       | 文                                            | 献 | 226 |

## 7. 細胞培養

|     |   |   |     |
|-----|---|---|-----|
| 7・1 | 序 | 説 | 231 |
|-----|---|---|-----|

|       |         |     |
|-------|---------|-----|
| 7・2   | 必要な機器   | 236 |
| 7・3   | 細胞培養の実際 | 237 |
| 7・3・1 | 組織の調製   | 237 |
| 7・3・2 | 培養基質    | 238 |
| 7・3・3 | 培養方法    | 239 |
| 7・3・4 | 培養液     | 241 |
| 7・3・5 | 継代培養と採取 | 243 |
| 7・3・6 | 細胞破碎    | 244 |
| 7・3・7 | 細胞の保存   | 244 |
| 7・3・8 | 培養液の汚染  | 245 |
| 7・4   | 応用      | 246 |
| 7・5   | 長所と短所   | 247 |
|       | 付録 1    | 247 |
|       | 付録 2    | 248 |
|       | 文献      | 249 |
| 索 引   |         | 253 |

# 吸 光 分 光 法

PETER NICHOLLS

*Department of Biological Sciences, Brock University, St. Catharines,  
Ontario L2S 3A1, Canada*

## 1・1 序 説

可視および紫外吸光分光法は、生化学において各種分光法の中で最も広くかつ手軽に利用されている。現在の分光器は 19 世紀に開発された 2 種の分光器——ハンドスペクトロスコープ（ミクロスペクトロスコープともいう）および直視比色計から発達してきた。1860 年代には、定性的あるいは半定量的手動分光器を利用した Hoppe-Seyler や、Stokes によるヘモグロビンの種々の状態や複雑な植物色素の組成についての記述がなされた (Keilin (1966) 参照)。白色光を利用した単純な濃度比較測定器から始まった比色計には、モノクロメーターや光電管が導入され、精巧なものになってきた。初期のヘムタンパク質のスペクトルは、カメラ付きのミクロスペクトロスコープによって撮られた (1936 年の Kurt Stern によるカタラーゼ-過酸化水素複合体の存在の証明、これは酵素-基質複合体の存在についての初めての証明である)。あるいはまた、モノクロメーターを利用した比較比色計によって測定された (Keilin と Hartree による 1945 年の Hilger-Nutting 型分光比色計を用いたカタラーゼのスペクトルの研究)。著者 Nicholls もまた、分光比色計を利用してかなり正確なシトクローム *c* の可視スペクトルを求めたことがある。ただし、この分光器の利用には限界がある。すなわち、少しずつ吸収波長が

異なる着色した一連の視野を用い、この半分を手動で動かし、肉眼で明るさを同じに調整することによって測定を行うため、眼が非常に疲れることである(Keilin もまた、長時間、分光比色計を使用していて、一時的な視野狭窄に陥ったと述べている)。その後、光電管とモノクロメーターを組み合わせた Beckman 社の分光計の出現により、肉眼での分光測定は時代遅れのものとなった。ただし、初期の Beckman DU および Hilger Uvispek 社の分光器は、依然として、各波長ごとに、対照セルに対して、電氣的に零点補償を行う必要があった(著者の 1959 年の学位論文などは、分光学的および反応速度論的データのすべてを零点補償法によって得た最後の論文の一つではなかろうか)。この場合、5 秒間隔で反応を追うためある種の器用さが必要であった。ただし、不安定な値を測定者の眼によってフィードバックして、滑らかなスペクトルを描くことができたが、光電子増倍管をもった分光器がそれを自動的にやってくれるようになったのは、ごく最近のことである。

光電管の代わりに高感度光電子増倍管が使われ、また自動ダブルビーム装置や、ベースライン補正装置が取り入れられることによって、分光光度計は高度なものになった。それに従って、カメラ付きのミクロスペクトロスコープは姿を消した。しかし、この装置のスペクトル全域にわたって、短時間でデータを取ることができるといふ潜在能力だけは現在でも否定できない。最近になって、高速でデータを得ることが要求されるようになり、また、フィルム上ではなく、コンピューターメモリーに多量のデータを貯えることができるようになって、ミクロスペクトロスコープの原理が見直されてきている。すなわち、1つの光電子増倍管とレコーダーを使ってスキanningする代わりに、試料に白色光を当てて、個々の波長における吸収変化を一連のフォトダイオードで同時に測定し、記憶させるというやり方である。モノクロメーターを用いた自記分光光度計、および白色光と一連のフォトダイオードを用いた分光光度計による測定の例を次に述べる。

## 1・2 原理および技術

生体物質の光吸収の原理に関しては、2章「蛍光」を参照されたい。蛍光分光光度計が蛍光を測定するのに対し、吸光分光光度計では透過光を測定するという

点で異なるが、基本的な構造においては類似が見られる(以下の図1・1～1・4と2章の図2・4～2・7を比較されたい)。

図1・1は、標準的な分光光度計の原理を示すものである。図1・1Aにおいて、aは光源、bはモノクロメーター、cは試料室、dは検出器、eは増幅器、そしてfはレコーダーである。1950年代に確立した通常のシングルビーム分光光度計では、ある波長における対照の透過光を100%に合わせた後、同じ波長における試料の透過光を測定する。1960年ごろ確立したスプリットビーム(ダブルビーム)分光光

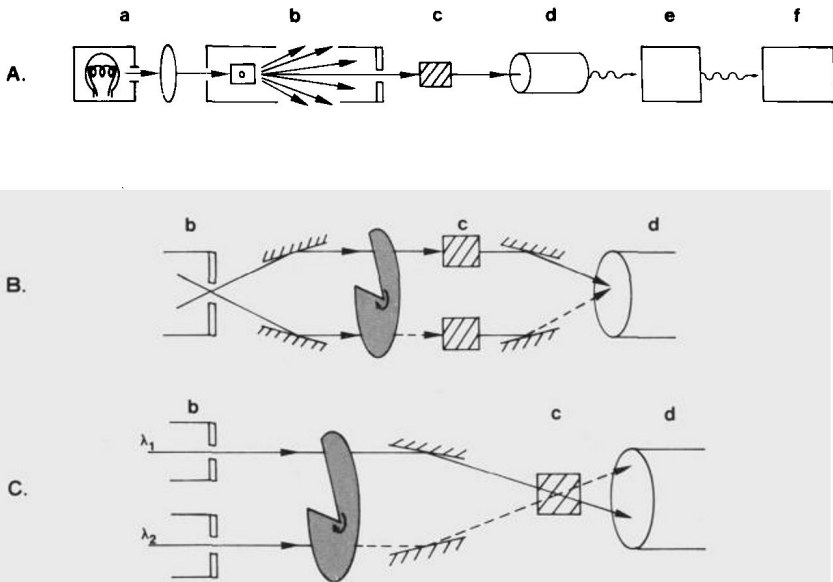


図1・1 標準的な分光光度計の構造の模式図

A. シングルビーム分光光度計：a、光源；b、モノクロメーター；c、試料室；d、検出器；e、増幅器；f、レコーダー。

B. スプリットビーム(ダブルビーム)分光光度計(bからdはA. のbからdに相当する)：b、モノクロメーターを通過して光は2本のビームに分けられ、2本のビームを交互に通すチョッパーを通る；c、試料および対照セル室内で、2本のビームはおのおの試料および対照セルを通過する；d、検出器は2本のビームの強度を検出する。

C. 2波長分光光度計(bからdはA. およびB. のbからdに相当する)：b、2つのモノクロメーターによって作られた、相異なる波長をもった2本のビームは、B. と同様チョッパーを通過する；c、試料セルには2種の波長の光が交互に通過する；d、2本のビームの強度の差を検出するエンドオン型検出器。

度計では、光が試料と対照を交互に通過し（図 1・1B）、両者の透過光の差を検出器と増幅器が測定するようになっている。この分光光度計で自動波長スキャンニングを行う場合には、測定する波長全域にわたって、機械的あるいは電氣的にベースラインをそろえる必要がある。2 波長分光光度計（図 1・1C）は Britton Chance によって考案され、1965 年ごろから市販されるようになった。この種の分光光度計では、2 つのモノクロメーターから出た光が同一の試料を交互に通過し、吸光度の差が図 1・1B のようにして測定される。

一連のフォトダイオードを用いたもう一つの装置を図 1・2 に示す。この装置では、試料室（c）に続いて、回折格子（b）があり、波長に従って分散させられた光は、一連のフォトダイオード（d）で検出される。補正装置（e）は非常に複雑なものとなる。しかしながら、この装置では、たとえば全長 400 nm に及ぶスペクトルも数秒以内にとることができる。

標準的な分光光度計を用いた場合、高速でデータが取れるのは単一波長あるいは 2 波長の場合のみである。この場合、問題となるのは、試料の化学反応をいかに急速に開始させるかである。Hartridge と Roughton (1923) の連続フロー法の発明に始まり、各種の急速混合法が開発されてきた。図 1・3 に最も標準的な方法、すなわち、ストップフロー法の概略を示す。非化学的な反応の開始方法には、温度ジャンプや電氣的ジャンプ法、光化学的な反応の場合にはフラッシュ法（図 1・4）などがある。速い酵素反応およびそれを研究するために必要な技術に関する明らかな総説が Hiromi [広海啓太郎] (1979) によって書かれている。

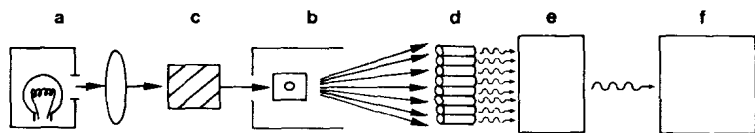


図 1・2 デイオード列分光光度計の模式図

a, 光源；b, 回折格子；c, 試料室；d, 一連のフォトダイオード；e, 増幅器および記憶装置；f, レコーダー（オシロスコープまたはプリンタープロッター）。