

目 次

測定法シリーズ刊行にあたって i

本文を読む前に iii

I 章 蛍光法で何がわかるか 御橋廣真 1

I. 1 蛍光の基本的なパラメーターとその意味	2
1) 光の吸収から発光までのプロセス——蛍光寿命の意味	2
a) 光の吸収——電子状態の励起	2
b) 分子内緩和	2
c) 発 光——再び基底状態へ	4
2) 吸収スペクトルと発光スペクトル	5
3) 蛍光の強さ	6
4) 蛍光の偏光	7
a) 光選択の原理	7
b) 蛍光の偏光と蛍光強度の関係	8
c) 蛍光の偏光解消を起させる3つの因子	11
d) 回転ブラウン運動による偏光解消——剛体球近似による解析の意味	16
5) 定常光励起法で観測した蛍光の異方性——ペラン・ウェーバーのプロ ットから得られる知見	18
6) 蛍光の消光現象——蛍光消光法の原理	20
7) 励起エネルギー移動	22
I. 2 理解をさらに深めるために	24
1) 多成分系の取扱い方	24
a) 蛍光強度の減衰曲線に現れる多成分	24

b)	蛍光の異方性の減衰曲線に現れる多成分	25
c)	多成分系のペラン・ウェーバープロット	27
2)	剛体球近似以外のモデルによる偏光解消の解析法	28
a)	回転楕円体近似	28
b)	膜内に二次元状に分布した巨大分子の非等方性の運動(あるいは長い円柱の回転)	29
c)	やわらかい棒状巨大分子の振れ運動	30
3)	コンフォメーション変化と構造のゆらぎ	31
a)	蛍光強度と蛍光の異方性の温度依存性	31
b)	蛍光消光法による構造のゆらぎの解析	33
4)	いわゆる「溶媒緩和」の現象	35
I. 3	まとめと補足	36
1)	巨大分子の何を知らうとするか	36
2)	特殊な蛍光測定法	40
3)	その他のキーワード	41
	文献	42
II 章	定常光励起蛍光光度計	神山 勉 45
II. 1	定常光励起蛍光光度計の種類	45
II. 2	蛍光光度計の基本的な構成	46
1)	光源	47
2)	波長選択器	48
a)	分光フィルター	48
b)	分光器	50
3)	光検出器	51
4)	試料室	52
5)	試料セル	54
II. 3	蛍光スペクトルの測定	54

1) 分光蛍光光度計の使い方	54
2) 盲蛍光成分について	55
II. 4 「見かけ」の蛍光スペクトルと「真」の蛍光スペクトル	59
1) 蛍光強度と測光方式	59
2) 蛍光(励起・発光)スペクトルと内部遮蔽効果	62
3) 装置の「個性」に関する補正	63
a) 励起スペクトルの補正	63
b) 励起スペクトルの自動補正	66
c) 発光スペクトルの補正	67
II. 5 蛍光量子収率の測定	70
1) 相対測定法	71
2) 絶対測定法	74
a) 標準光拡散板を用いる方法	74
b) 標準光散乱溶液を用いる方法	75
II. 6 蛍光異方性の測定	78
1) 測定原理	78
2) 蛍光異方性スペクトルの測定	79
3) 変形ペランプロットによる分子体積の見積り	81
4) 蛍光異方性は正確に測定されているか	82
a) 不完全なコリメーション	82
b) 偏光素子の特性およびその設置状態	83
c) 光検出系で生ずる「見かけ」の蛍光異方性	83
d) 盲蛍光成分の補正	85
e) 光散乱の影響	85
f) 蛍光の再吸収によって生ずる偏光解消	86
g) 標準蛍光物質	87
II. 7 その他の注意事項	87
1) 純水の調製, 器具の洗浄	87
2) 光化学分解反応	88

3) 溶存酸素	88
4) 蛍光微分スペクトルの測定	89
II. 8 実際の測定例	89
1) ペランプロットから蛋白質の大きさを決める	89
2) 蛍光励起エネルギー移動法	92
文献	96
III章 ナノ秒蛍光法	木下一彦 99
III. 1 はじめに	99
1) ナノ秒蛍光法とは	99
2) どんな情報が得られるか	100
III. 2 いかにも測るか——単一光子計数法	103
1) 単一光子計数法の原理	103
2) 単一光子計数法の特徴	105
a) 感度	105
b) 時間分解能	105
c) ダイナミックレンジ	106
d) 測定時間	106
3) その他の測定法	107
III. 3 これから始めるなら	108
1) ナノ秒蛍光法の役割と限界	108
a) 定常光励起による測定との相補性	108
b) 解釈の曖昧さ	109
2) 装置を買う前に	111
a) 単一光子計数法の装置	111
b) まず測ってみる	113
c) データ解析が終わってはじめて測定が終了する	113
III. 4 装置の構成	115
1) 光源	115

a) パルス放電管の原理	116
b) ガス	117
c) 発光強度, 発光頻度の設定	119
d) 問題点	120
2) 光学系	121
a) 分光器かフィルターか	121
b) 分光器の選択	123
c) 集光レンズ	124
d) フィルター	125
e) 試料ホルダー	125
f) 偏光素子	126
g) 定常励起光源	127
h) あると便利な小道具	128
3) 電気系	130
a) 光電子増倍管	130
b) 増幅器, ディスクリミネーター, TAC	134
c) 波高分析器, カウンター	134
d) 光子数弁別回路	134
e) ケーブル類	135
4) 雑音・ドリフト対策	135
a) 光源からの雑音	135
b) 外来雑音	138
c) ドリフト	138
III. 5 測定	139
1) 装置の組立て, 調整, 較正	139
a) 組立て	139
b) 増幅器, ディスクリミネーターの調整	140
c) TAC の使用時間領域	143
d) 時間軸の較正	144
e) 正常動作の確認	145
f) 標準物質の測定	146

2) 測定	147
a) 測定条件の設定	147
b) 応答関数 $g(t)$ の測定条件	148
c) 測定手順	149
III. 6 解析	150
1) データ処理	150
a) TAC の数え落しの補正	150
b) 暗パルスの差し引き	150
c) 盲蛍光の差し引き	151
d) 偏光解消の場合	151
e) 規格化	151
2) 解析	152
a) 畳み込み積分の近似	152
b) 最小二乗法	153
c) プログラム作成上のヒント	154
d) 結果の評価	155
e) 信頼性	155
III. 7 測定手順のまとめ	156
文献	159
IV章 蛍光プローブ	161
IV. 1 蛍光プローブについて (総論)	関根隆光 161
1) 蛍光プローブと蛍光量モニター	161
2) 蛍光プローブの種類	162
a) 非共有結合性プローブ	163
b) 共有結合性プローブ	164
3) 蛍光プローブの使用上の注意	164
4) 蛍光プローブを用いて得た結果の解釈	165

IV. 2 蛍光プローブ各論	167
1) 諸パラメーターについて	168
2) 非共有結合性蛍光プローブ	上野 隆 170
a) アクリジンオレンジ	170
b) 9-アミノアクリジン	170
c) アテブリン(キナクリン)	171
d) アリルナフタレンスルホン酸類	172
d-1) 1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸 (ANS)	172
d-2) <i>N</i> -メチル-2-アニリノナフタレン-6-スルホン酸 (MANS)	174
d-3) 2- <i>p</i> -トルイジニルナフタレン-6-スルホン酸 (TNS)	174
e) アンスロイルオキシステアリン酸 (AS)	175
f) オーラミンO	175
g) クロロテトラサイクリン	176
h) シアニン色素	176
h-1) 1,1'-ジヘキシル-2,2'-オキサカルボシアニン [CC ₆ または di-O-C ₆ (3)]	177
h-2) 3,3'-ジプロピルチアジカルボシアニン [di-S-C ₃ (5)]	177
h-3) メロシアニン 540	178
i) ダンシルクロリド(DNS-Cl) 誘導体	178
i-1) ダンシルスルホンアミド(DANSA)	179
i-2) ダンシルアミノエチル-3-リン酸(ATP アナログ)	179
i-3) 1-ダンシルスルホンアミド-3- <i>N,N</i> -ジメチルアミノプロパン(コリンアナログ)	179
i-4) ダンシルコリン	179
i-5) ダンシルガラクトシド	179
i-6) ダンシルリジン	180
i-7) ダンシルホスファチジルエタノールアミン	180
j) ジフェニルヘキサトリエン(DPH)	180
k) エオシン	181
l) ϵ -アデノシン	181
m) エチジウムブロマイド	182
n) フルオレセイン	182

o)	フォーマイシン	183
p)	4-ペンゾイルアミド-4'-アミノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸 (MBAS)	183
q)	NBD-ホスファチジルコリン	183
r)	β -ナフチル-3-リン酸	184
s)	オキソノール色素	184
s-1)	オキソノール V (NK 2047)	184
s-2)	ビス [1,3-ジブチルバルビツル酸-(5)] ペンタメチンオキソ ノール [di-Ba-C ₄ (5)]	185
t)	パリナリン酸	185
t-1)	α -パリナリン酸 (<i>cis</i> -パリナリン酸)	185
t-2)	β -パリナリン酸 (<i>trans</i> -パリナリン酸)	186
u)	ベリレン	186
v)	<i>N</i> -フェニル-1-ナフチルアミン	187
w)	ピレン	187
x)	サフラニンO	187
3)	共有結合性蛍光プローブ	岡本 洋 188
A)	アミノ基指向試薬	188
a)	フルオレスカミン	188
b)	<i>o</i> -フタルアルデヒド	188
c)	ダンシルクロリド (DNS-Cl)	189
d)	フルオレseinイソチオシアネート (FITC)	190
e)	7-クロロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾル (NBD-Cl)	191
B)	チオール基指向試薬	191
a)	ダンシルアジリジン	191
b)	5-(γ -Dアセトアミドエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸 (1,5-I-AEDANS)	192
c)	5- γ -Dアセトアミドフルオレsein(5-IAF)	192
d)	<i>N</i> -(1-アニリノナフチル-4) マレイミド (ANM)	193
e)	<i>N</i> -(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリニル)マレイミド (DACM)	193
f)	<i>N</i> -(3-ピレン) マレイミド (NPM)	194
g)	エオシン-5- γ -Dアセトアミド (IAA-エオシン)	195
h)	フルオレseinマーキュリアセテート (FMA)	195

i) 2-[4'(2''-ヨードアセトアミド) フェニル] アミノナフタレン-6-スルホン 酸(IAANS)	196
文 献	196

V章 クロロフィル *a* の蛍光——光合成の内在的蛍光プローブ

加藤 栄 205

V. 1 クロロフィル <i>a</i> ——光合成の蛍光プローブ	205
V. 2 クロロフィル <i>a</i> の蛍光測定	206
V. 3 光合成の初期過程——クロロフィルの役割	207
V. 4 クロロフィルの蛍光	209
V. 5 光化学系2の量子収率	213
V. 6 系2の電子受容体数の測定	215
V. 7 系1のクロロフィル <i>a</i> の蛍光	217
V. 8 クロロフィル <i>a</i> の蛍光の励起スペクトルと発光スペクトル	218
V. 9 系1と系2の間の励起エネルギー移動	220
V. 10 蛍光の誘導期現象	221
文 献	224

索 引 227

蛍光色素英名索引 237

著 者 紹 介 240