

UV-1200 “カインेटックス” “タイムコース” ソフトによる酵素反応測定

Measurement of Enzyme Reaction by UV-1200 with "Kinetics" and "Time-course" Software

新製品UV-1200は、小形で低価格のパーソナル分光光度計です。フォトメトリック（固定波長における吸光度あるいは透過率の測定）を基本機能とし、カード化された応用ソフトを差込めば、ユーザーの必要とする機能を追加することができます。

ここでは、応用ソフトのうち、固定波長における測光値の経時変化曲線の測定ができる“タイムコース・プログラムパック”と、吸光度変化率から酵素活性値などを求められる“カインेटックス・プログラムパック”の応用例を紹介します。

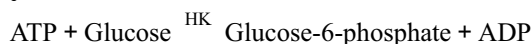
血清中のクレアチンキナーゼ活性値の測定 （“カインेटックス・プログラムパック”使用）

Activity Value of Creatinephosphokinase in Serum (With "Kinetics Programpack")

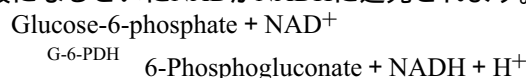
血清中のクレアチンキナーゼ（CK）は、クレアチンリン酸からクレアチンを生成するさい、共存するADPをリン酸化し、ATPとします。



このATPは、ヘキソキナーゼ（HK）の存在下でグルコースをグルコース-6-リン酸にリン酸化します。



生じたグルコース-6-リン酸が6-ホスホグルコン酸になるさいにNADがNADHに還元されます。



したがって、NADHの増加量を測定することにより、CK活性値を求めることができます。Fig.1, Table1は波長340nmにおける吸光度の変化を測定し、その増加率 $\Delta A/\text{min}$ に係数を乗じ、クレアチンキナーゼの活性値（IU/L）を求めたものです。

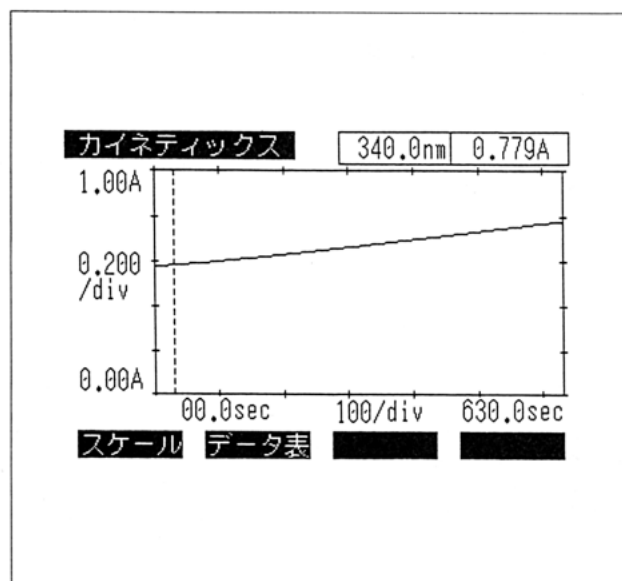


Fig. 1 血清中クレアチンキナーゼの反応曲線
Reaction Curve of Creatinephosphokinase in Serum

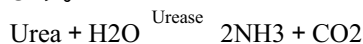
Table 1 血清中クレアチンキナーゼの活性値
Activity Values of Creatinephosphokinase in Serum

カインेटックス		340.0nm	0.786A
試料番号	初期値(Abs)	$\Delta A/\text{min}$	活性値
1	0.4901	0.0079	39.322
2	0.5215	0.0115	57.402
3	0.5753	0.0201	100.11
4			(IU/L)

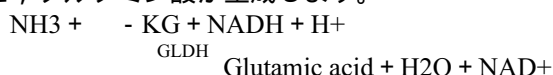
反応曲線 試料番号

血清中の尿素窒素の測定 (“カインेटックス・プログラムパック”使用) Measurement of Ureanitrogen in Serum (With "Kinetics Programpack")

尿素は蛋白質中の窒素の最終産物として生合成され、血中や尿中の尿素窒素値の測定は、腎機能を検査する目的で重要です。試料中の尿素をウレアーゼの作用により分解し、アンモニアを遊離させます。



これに α -ケトグルタル酸、NADHの存在下で、グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH) を作用させると、グルタミン酸が生成します。



この反応のさいのNADHの減少速度を測定することにより、尿素窒素量を求めることができます。

Fig.2は血清中の尿素窒素量を求めるために、波長340nmにおける吸光度変化を測定したもので、Table2はその減少速度 $\Delta A/\text{min}$ から尿素窒素の濃度 (mg/dL) を計算させた例です。

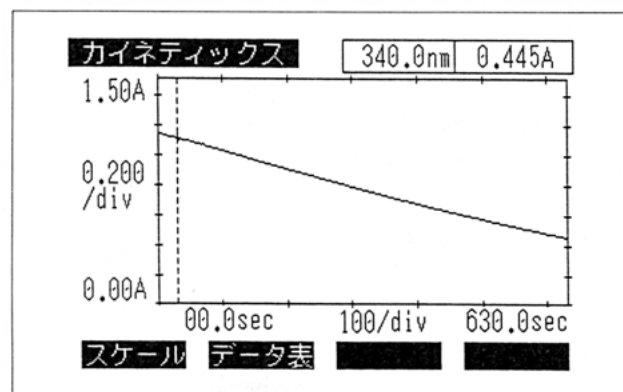


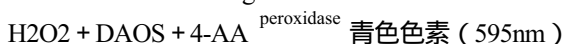
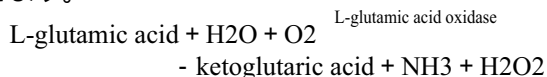
Fig. 2 血清中尿素窒素の反応曲線
 Reaction Curve of Creatinephosphokinase in Serum

Table 2 血清中尿素窒素の定量
 Quantitative Determination of Ureanitrogen in Serum

カインेटックス			
	340.0nm	0.970A	
試料番号	初期値(Abs)	$\Delta A/\text{min}$	活性値
1	1.1409	-0.0678	46.115
2	1.1379	-0.0232	15.785
3	1.1394	-0.0285	19.406
4	1.1279	-0.0148	10.039
			(mg/dL)

L-グルタミン酸の発色の時間経過測定 (“タイムコース・プログラムパック”使用) Time-course Measurement in Color Reaction of L-glutamic Acid (With "Time-course Programpack")

L-グルタミン酸をL-グルタミン酸オキシダーゼで酸化すると、過酸化水素が生成します。この過酸化水素を4-アミノピリン (4-AA) とDAOSを基質とするパーオキシダーゼ青色色素に導き、分光光度計で測定すれば、L-グルタミン酸の定量ができます。



このように試料を発色させて定量を行う場合には、色素が生成されるのに必要な時間と、生成した色素の安定性を、あらかじめ確認しておく必要があります。Fig.3は、発色操作後20分間の吸光度 (595nm) を測定し、時間経過を調べたものです。5分後には吸光度が一定になり、20分間でもほぼ安定した値を保っているのがわかりました。(試薬はヤマサ醤油株式会社よりご提供頂きました。)

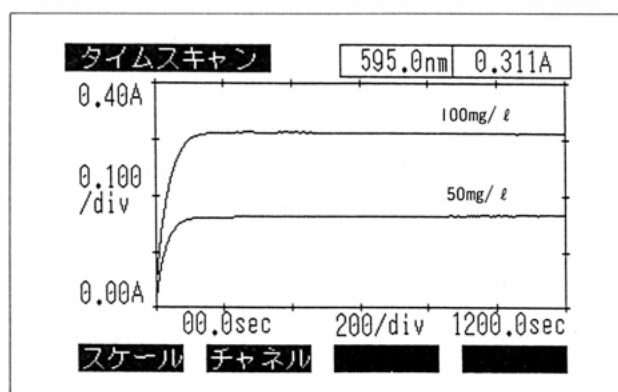


Fig. 3 L-グルタミン酸標準液の発色の時間経過
 Time-course Curves of Color Reaction of L-glutamic Acid

Table 3 測定条件
 Measurement Conditions

(Fig. 1, 2, Table 1, 2)	
Wavelength	: 340nm
Lag time	: 60sec
Rate time	: 600sec
Factor	: 4983.9 (for Table 1) -680 (for Table 2)
Temperature	: 25°C
(Fig. 3)	
Wavelength	: 595nm
Time	: 1200sec