

UV-1200 “蛋白質分析” “カイネティックス-2” ソフトによる測定例

Measurements by UV-1200 Spectrophotometer with "Protein Measurement" and "Kinetics-2" Software

UV-1200にの応用ソフトに、また、新しい仲間が加わりました。蛋白質分析プログラムパックとカイネティックス-2プログラムパックです。この蛋白質分析ソフトは、280nmでの吸光度の測定値と吸光係数から直接濃度を計算するUV吸収法と、発色試薬を使って蛋白質の濃度を検量線法により測定するLowry法、BCA法、CBB法、Biuret法の5つの代表的な定量法を1つのパッケージにまとめた

ものです。カイネティックス-2ソフトは、6個の試料を連続的に測定することが可能で、また、ラグタイム、レートタイムの測定後の再設定も可能です。ここでは、感度、再現性ともによく、もっとも一般的に使われるLowry法と、感度は高くないが迅速性と簡便さからよく使われるBiuret法の2つの蛋白質分析を、また、カイネティックス-2については、GOTの酵素活性の測定を行いました。

血清中のGOT活性値の測定

(カイネティックス-2・プログラムパック使用)
Activity Value of GOT in Serum(with "Kinetics-2 Programpack")

グルタミン酸-オキザル酢酸トランスアミラーゼ (GOT) はアミノ基転移反応を触媒する酵素の1つです。

- ケトグルタル酸 + L-アスパラギン酸 ^{GOT}
オキザル酢酸 + L-グルタミン酸
この反応にNADHとリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) を共存させると、生成するオキザル酢酸によってNADHは酸化されてNADになります。



NADHは340nmに吸収極大を示しますが、NADは340nmに吸収がないので反応に伴い340nmの吸収が減少します。したがってNADHの減少量を測定することにより、GOT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、その変化率 A/minに係数を乗じ、GOTの活性値 (Karmen単位) を求めたものです。

Table 1 血清中GOTの活性値
Activity of GOT in Serum

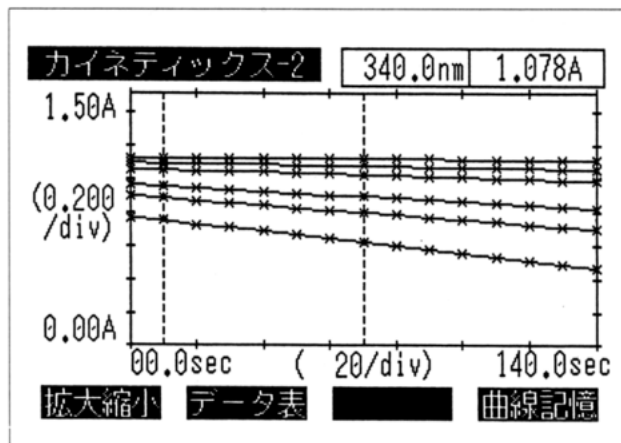


Fig.1 血清中GOTの反応曲線
Reaction Curve for GOT in Serum

カイネティックス-2		340.0nm		-0.352A	
セルNo.	初期値(Abs)	ΔA/min	活性値		
1	1.0774	-0.0186	1.6449		
2	0.9579	-0.0344	3.0466		
3	0.8608	-0.0525	4.6475		
4	0.7563	-0.0657	5.8175		
5	0.6218	-0.0858	7.5991		
6	0.5751	-0.0986	8.7344		

ラグタイム= 10秒 レートタイム= 60秒
再計算 反応曲線 印字出力

蛋白質分析 (Lowry法)

Protein Measurement using Lowry Method

蛋白質は、アルカリ性で Cu^{2+} と反応させると、赤紫色に発色します。これは、 Cu^{2+} がプロトンを持ったポリペプチド鎖中の窒素原子と結合して、錯体を形成することによって発色するものであり、ビュレット反応とよばれます。この色の波長540nmの吸光度の測定を行い、検量線法で定量を行うのでビュレット法とよばれます。Fig.3, Table3は、牛血清アルブミンをサンプルとしたときの測定条件および検量線です。この方法はLowry法に比べると発色度はよくありませんが、蛋白質の種類の違いによる発色率の差が少ないです。

蛋白質分析 (Biuret法)

Protein Measurement using Biuret Method

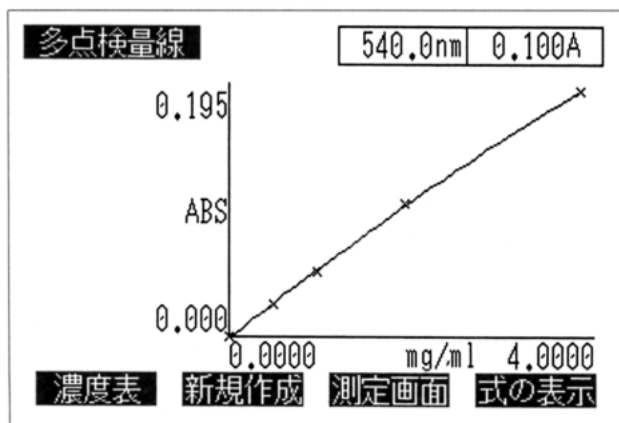
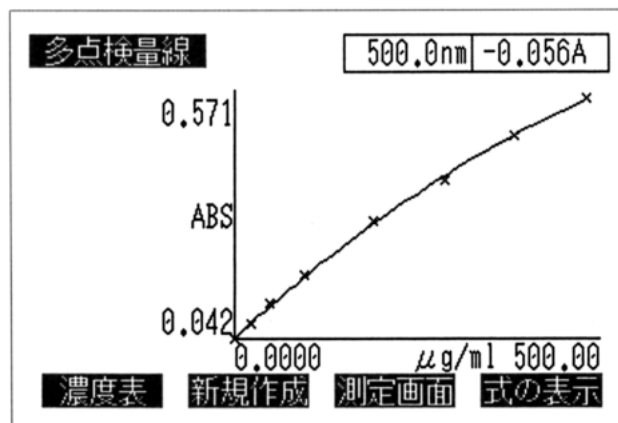
蛋白質中のペプチド結合がアルカリ性で Cu^{2+} と反応して赤紫色の錯体をつくる性質を利用したビュレット法と、チロシン、トリプトファン、システインなどの蛋白質とフェノール試薬が反応して深青色を呈する反応とを組合せたものをLowry法と呼びます。この反応では、希蛋白質の場合は750nm、濃厚な場合は500nmで吸光度の測定を行い、検量線法により定量を行います。Fig.2は、牛血清アルブミンをサンプルとした測定結果で、Table2はその分析条件です。

Table 2 測定条件
Measurement Conditions

定量条件	540.0nm	0.098A
Biuret法		
1. 検量線:	多点検量線(2次) 標準試料数 = 5	
2. 波長:	540.0 nm	
3. 繰り返し回数:	1	
4. 単位:	mg/ml	
START キーで測定可能です。 (条件の変更は、番号を入力して下さい。)		
検量線	試料制御	測定画面
条件記憶		

Table 3 測定条件
Measurement Conditions

定量条件	500.0nm	0.000A
Lowry法		
1. 検量線:	多点検量線(2次) 標準試料数 = 8	
2. 波長:	500.0 nm	
3. 繰り返し回数:	1	
4. 単位:	$\mu\text{g/ml}$	
検量線を START キーで作成して下さい。 (条件の変更は、番号を入力して下さい。)		
試料制御		条件記憶

Fig.2 牛血清アルブミンの検量線
Calibration Curve for Bovine Serum AlbuminFig.3 牛血清アルブミンの検量線
Calibration Curve for Bovine Serum Albumin