

島津自記分光光度計UV-3101PCによる酵素活性の測定

Kinetics Analysis with the UV-2101/3101PC Optional Kinetics Software Package

酵素は化学反応を触媒する高分子蛋白質で、基質特異性を備えさまざまな分野で利用されています。また、生体内にも数多くの酵素が存在し、物質の合成などで重要な役割を果たしています。

酵素の定量法にはHPLC法やTLC法をはじめとし

て数多くありますが、一般にクロマトグラフィーによる測定は物質としての定量です。しかし、酵素の役割から見ますとむしろ活性値の測定が重要です。ここでは、分光光度計を用いてGOTを測定した例を紹介します。

測定法

Principle

GOTは哺乳類のほとんどすべての臓器に存在しますが、とくに心筋に多く、肝炎や心筋梗塞などの診断に用いられています。その測定法の原理をFig.1に示します。

Fig.1の反応によって減少するNADHを測定し、その減少速度からGOT活性値を求めます。

試薬はKarmen準拠処方、MDH, LDH, NADH, L-アスパラギン酸およびα-ケトグルタル酸を含んでいます。また、吸光度の減少速度から活性値を算出するためのファクタはFig.2に示す反応を利用して求めました。ここでは500 μmol/Lピルビン酸を用いていますので、その吸光度変化量が500IU/Lのときの1分間の変化量に相当します。測定結果をFig.3に示します。吸光度差が0.076でしたのでファクタは6579となります。

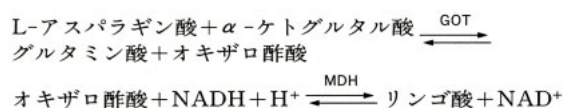


Fig.1 測定法の原理 (1)
Principle of Reaction for GOT Measurement

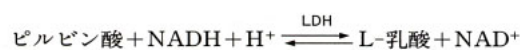


Fig.2 測定法の原理 (2)
Principle of Reaction for Calibration

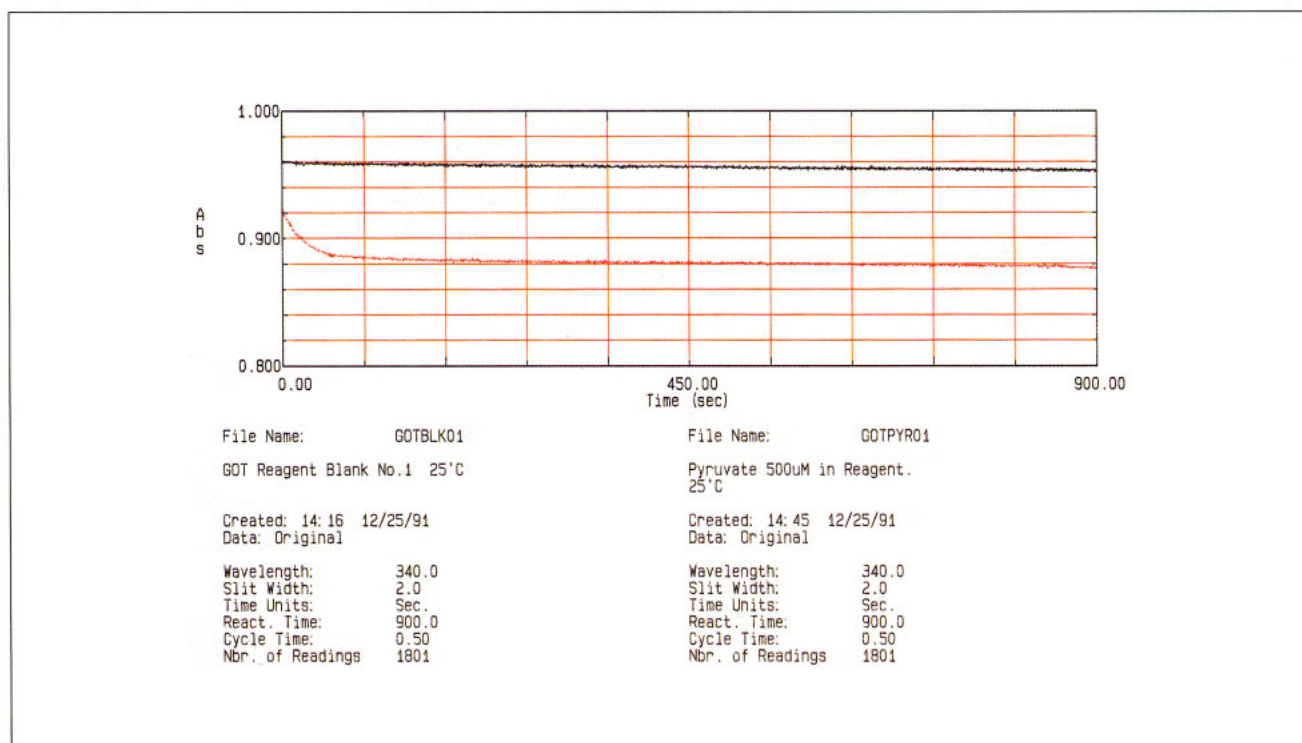


Fig.3 測定結果
Calibration Results

血清中のGOT活性の測定 GOT-Activity Measurement

ここではヒト血清ベースの市販コントロール血清を試料として、試料量を変えて測定した結果を示します。なお測定は恒温セルホルダーを用い、測定温度は37 としました。Fig.4に測定結果を示します。ここでASTBLKは試薬ブランクです。

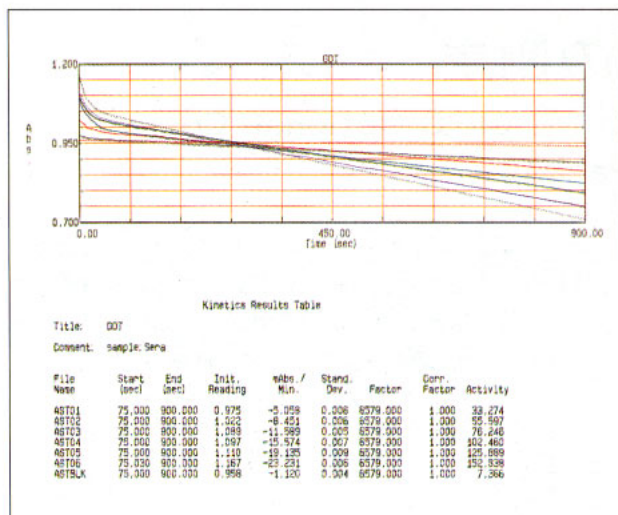


Fig.4 測定結果(補正前)
Result (Measured)

また、試薬ブランクおよび試料量の補正を行った結果をFig.5に示します。この結果から有効な補正が可能なのことがわかります。(Corr.Factor1.0はFig.3測定時の試料量に対応します。)

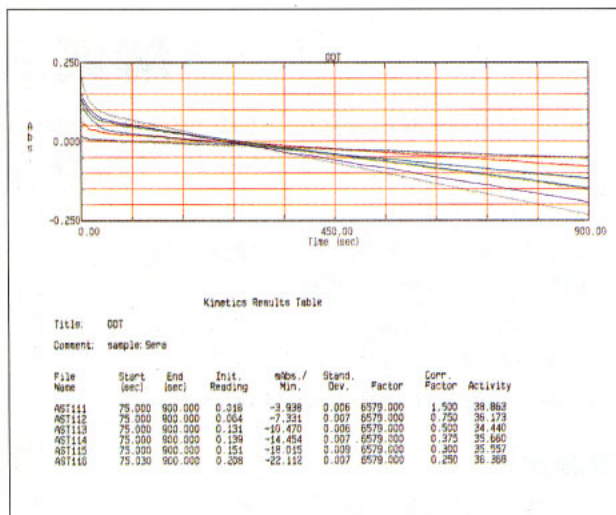


Fig.5 測定結果(補正後)
Result (Corrected)

Km値の測定 Km-Value Analysis

ここでは市販のヒトプール血清を用いて、GOTの -ケトグルタル酸に対するKm値を測定した結果を示します。反応試薬中のL-アスパラギン酸を約143mMとし、 -ケトグルタル酸濃度を3段階に変えて測定しています。Fig.6~7に測定結果を示します。なお測定温度は25 とし、Km値はLineweaver-Burkプロットにより算出しました。また今回用いたUV-3101PC用カイネティクス測定

ソフトウェアパッケージKPC-3101では、このほかにHanesプロット、Wolfプロット、Eadie-Hofsteeプロットも利用することができます。

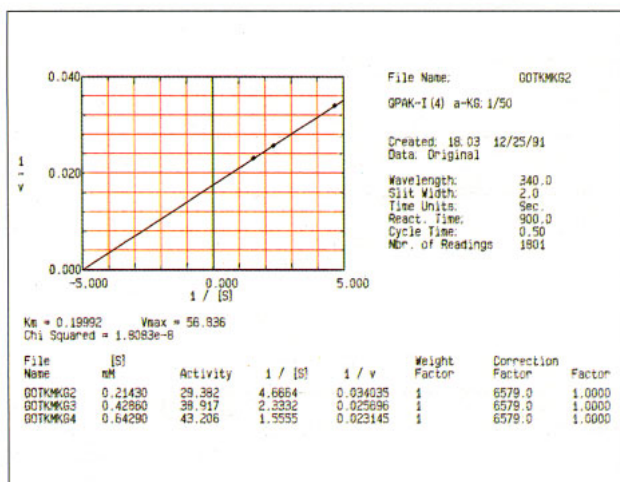


Fig.6 Km値 測定結果
Result of Km-Value Analysis

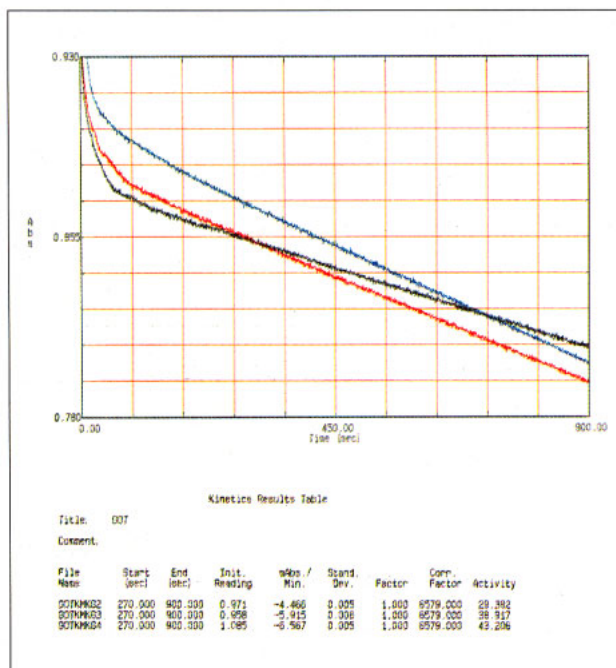


Fig.7 測定結果
Measurement for Km-Value Analysis

掲載データは薬事承認された装置で採取したものではありません。

島津分析コールセンター ●東京 ☎(03) 3219-1691
●京都 ☎(075) 813-1691