

酵素的サイクリング法による自動分析装置の開発

東京大学小児科 鈴木 義之
東京大学脳研生化学 加藤 尚彦

酵素的サイクリングは、微量の NAD^+ (NADH), NADP^+ (NADPH), CoASH(アセチルCoA) を酵素サイクル反応により増幅し、定量する方法である。今回我々は、NAD サイクリング法によるガラクトース定量法を確立し、組織内ガラクトース含有量、酵素活性の測定に応用した。

ガラクトースは、ガラクトースデヒドロゲナーゼによりガラクトノラクトンとし、その際生成される NADH を、サイクリング反応にかけた。加熱により NAD^+ を除いた後、過剰のオキサロ酢酸、リンゴ酸デヒドロゲナーゼにより NADH を NAD^+ とし、次いでエタノール、アルコールデヒドロゲナーゼにより NADH にもどした。このサイクル反応が1回おこる毎に1分子のリンゴ酸が生成されるので、この反応生成物を NADH に再び変換して、蛍光測定をおこなった。

この方法は再現性があり、且つ微量のガラクトースを検出することができた。組織内濃度の場合、100 p mol/g 程度の濃度までは測定可能であった(実際の使用量は数mg)。

この方法を更に自動化するために、サイクリング反応以下の過程を工夫して、自動分析装置を試作し、現在検討中である。

図1. 反応の操作

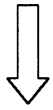
試料	+	ガラクトース定量試案 ^{a)}
	↓	38°C 30分
1N NaOH	(pH 11~12とする)	
	↓	70°C 30分
1~5 μl 反応液	+	サイクリング反応液 ^{b)}
	↓	25°C 60分
	↓	70°C 30分
指示試案添加 ^{c)}		
	↓	38°C 30分
蛍光測定(NADH)		

- a) ガラクトースデヒドロゲナーゼ, グルタチオン, NAD (pH 8.5)
b) エタノール, アルコールデヒドロゲナーゼ, オキサロ酢酸, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (pH 8.0)
c) 塩酸ヒドラジン, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ, NAD (pH 9.5)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



酵素的サイクリングは、微量の NAD^+ (NADH), NADP^+ (NADPH), CoASH (アセチル CoA) を酵素サイクル反応により増幅し、定量する方法である。今回我々は、 NAD サイクリング法によるガラクトース定量法を確立し、組織内ガラクトース含有量、酵素活性の測定に応用した。ガラクトースは、ガラクトースデヒドロゲナーゼによりガラクトノラクトンとし、その際生成される NADH を、サイクリング反応にかけた。加熱により NAD^+ を除いた後、過剰のオキサロ酢酸、リンゴ酸デヒドロゲナーゼにより NADH を NAD^+ とし、次いでエタノール、アルコールデヒドロゲナーゼにより NADH にもどした。このサイクル反応が1回おこる毎に1分子のリンゴ酸が生成されるので、この反応生成物を NADH に再び変換して、蛍光測定をおこなった。