

蛍光法を用いたガラクトカイネース測定法 (分担研究: ガラクトース血症の鑑別診断)

藤 村 有 信* 金 田 誠 一*
川 村 正 彦**

要約 アイソトープを使用しないで蛍光でもってガラクトカイネースの活性を精度よく、測定する方法を検討した。アイソトープ法¹⁾の利点は分解物である galactose 1 磷酸をイオン交換セルロースカラムで galactose から分別して、測定するので正確な定量が出来る。従来の蛍光法は共存酵素や共存する他の蛍光反応の妨害により、不安定の点があったので両方の利点を生かすことにより、アイソトープを使用出来ないスクリーニング施設でもガラクトカイネースを測定し欠損症を鑑別することが出来るシステムを開発した。

見出し語: Galactokinase, ガラクトース血症, 蛍光法, Gal-1-P

研究方法

方法は Shin-Buehring らの方法¹⁾を改良した。系 1 は Gal 100 nmol, MgCl₂ 1.6 μmol, NaF 0.8 μmol, ATP 1.5 μmol, saponin 0.2%, 血液 50 μl 計 200 μl, 系 2 と系 3 は blank で、予め 95 °C, 2 分血液のみ加熱失活させ、よく懸濁して他の組成を加える系 2 か、Gal のみ系 1 より除いた系 3 のいずれかを使う。反応液 37 °C, 2~4 h 間反応させ、系 1 と系 3 は 95 °C, 2 分加熱失活させ反応をとめ、ice bath 中でよく懸濁させ、200 μl の 0.01 M トリス (pH 8) buffer を入

れ、遠心分離を 3,000 r.p.m., 10 分行い上清の内 200 μl を DEAE-sephacel カラム (0.8 ml, φ 1 cm × 1 cm) にチャージする。まず蒸留水 8~10 ml で洗い流すと Gal が除去出来る。この場合 2 ml ずつ分取し、0.01 M トリス (pH 8) を加えて 3 ml とする。次いで 0.1 N HCl 8~10 ml で Gal-1-P を溶出させる。各 2 ml ずつ分取し、pH を 8 に合せ最終的に上記 buffer で 3 ml (pH 8) にする、あるいは一度に 8~10 ml 分画し、その内 2 ml につき NNaOH で pH 8 にし 0.01 M トリス pH 8.0 で 3 ml にする。これらの分画部に

* 名古屋市衛生研究所 (Nagoya City Health Research Institute)

** 名城病院小児科 (Dept. of Pediatrics, Meijo Hospital)

NAD 100 nmol, AP 4 U, β -Gal-DH 50 mU 混合液 30 μ l を入れ 37°C/h 間反応させ、日立蛍光光度計 650-10 S 型で ex 360 nm, em 450 nm で測定した。

結果

図 1 に示すように、実線が系 1、点線が系 2、斜線が系 3 である。Blank の系 2 と系 3 はほぼ同じ蛍光を示す。サポニンには蛍光があり、Gal-1-P 溶出部に溶出されてくるので、Blank をとることが必要となる。系 1-Blank から GK より分解された Gal-1-P を知ることが出来る。この時、標準物質 10 nmol の蛍光を測定することによって換算出来る。図 2 は反応時間と GK 活性を示す。4 時間まで Gal は直線的に減少し、Gal-1-P は直線的に生成する。通常は 2 h 間反応でよい。サポニンは通常の 0.2% を使うと活性は 20.0 nmol/min/gHb, であるが、0.01%

にすると蛍光は著しく減少させることは出来るが活性は $\frac{1}{2}$ となる。これは血球からの回収が悪くなるためと考えられる。

考察

従来 GK 活性の測定はアイソトープのある施設でしか測定出来ず、多くのスクリーニングセンターでは測定が困難であった。本法はこの点を解決し精度の高い方法として蛍光で測定することが出来る意義は大きいと思われる。イオン交換セルロースの分離に若干時間を用するので、次にこの点を解決したいと思っている。又、ガスリ沛紙血でも出来る系を検討してゆきたい。

文献

- 1) Y.S. Shin-Buehring et al. Clin. Chim. Acta, 74, 1-5 (1977).

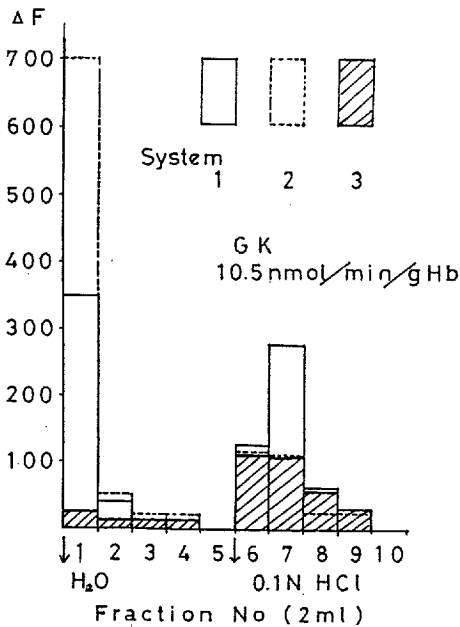


図 1

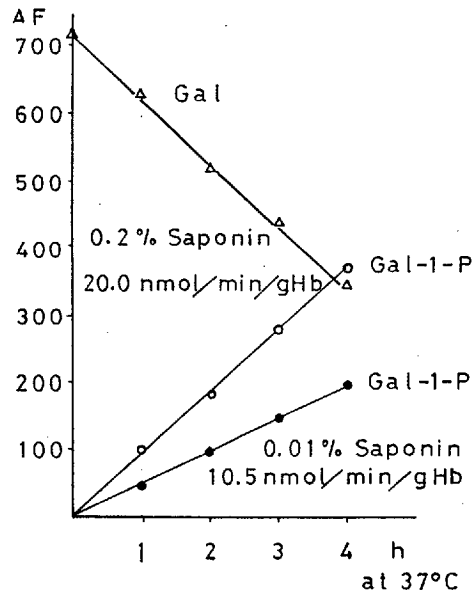


図 2



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



要約 アイソトープを使用しないで蛍光でもってガラクトカイネースの活性を精度よく、測定する方法を検討した。アイソトープ法¹⁾の利点は分解物である galactose1 燐酸をイオン交換セルロースカラムで galactose から分別して、測定するので正確な定量が出来る。従来の蛍光法は共存酵素や共存する他の蛍光反応の妨害により、不安定の点があったので両方の利点を生かすことにより、アイソトープを使用出来ないスクリーニング施設でもガラクトカイネースを測定し欠損症を鑑別することが出来るシステムを開発した。