

基礎生化学実験法 6

阿南功一
組野邦夫
田村善藏
松橋通生
松本重一郎
編

生化学的測定

基礎生化学実験法 6

生化学的測定

阿南功一
紺野邦夫
田村善藏
松橋通生
松本重一郎
編

(内部交流)

丸善株式会社

基礎生化学実験法 6
生化学的測定

¥ 3,300

昭和 51 年 3 月 25 日 発行

©1976

編者 阿南 功一 紺野 邦夫
田村 善藏 松橋 通生
松本 重一郎

発行者 飯 泉 新 吾

発行所 丸 善 株 式 会 社

郵便番号 103 東京都中央区日本橋二丁目3番10号

印刷 富士美術印刷株式会社・製本 株式会社 星共社

3347-2104-7924

「基礎生化学実験法」発刊にあたって

今日の生化学の進歩はまことに著しいものがあるが、これらの研究の成果はその研究方法、技術等の発展に負うところが多い。

過去10~15年の間に生化学研究法はますます専門化され、複雑化されてきており、その分野はまことに広範囲に亘っている。そこで初めて生化学の研究に進まれる方々、あるいは自分の専門分野以外に研究の範囲を広げようとする方々等には適切な実験法の指導書が望まれるが、これに充分に応え得るようなものはなかなか見当たらないようである。そこで編者らはこの要望に応えるため、医学・薬学・農学・理学等に亘る生化学の研究者、技術者の座右の書として、信頼し、常時使用できる標準的且つ実用的な生化学の実験方法を提供する本シリーズ、「基礎生化学実験法」を編集した次第である。

本実験法各巻の割振りは「読者が生体を構成しているある成分または物質について研究しようとする時」を想定して、内容を6巻にまとめた。

すなわち、生物材料の取扱い方(1巻)、抽出・分離・精製(2巻)、物理化学的測定(3, 4巻)、化学的測定(5巻)、生化学的測定(6巻)の順を辿っている。

各実験方法については、その方法を実際に利用し研究に活躍されている方々が執筆され、特に次の4点に留意されている。

- 1) 理論的なことは必要最少限にとどめ簡潔に記述し、
- 2) 実験計画をたてる上で必要な考え方といったものに触れ、
- 3) 実験操作のこつ、初心者への陥り易い誤り、注意事項について親身に助言し、
- 4) 以上を実験例によって示す、

ということであり、できるだけわかりやすく述べて頂いた。

ii 「基礎生化学実験法」発刊にあたって

従ってこの種の実験書を求めておられる方々の要望には充分、応え得るもの
とと思う。

今日、生化学の基礎的分野のみならず、環境、食糧、医薬、工業などライフ
サイエンスのあらゆる応用分野で生化学的研究がますます必要なものとなり、
生化学実験が日常化されてきている。

本シリーズに述べられていることは生化学実験の基礎であって、ライフサイ
エンスのあらゆる分野における生化学実験は、この基礎の上になって行なうこ
とができると信ずる。本シリーズがこれらの研究分野の人達のよりどころとな
るならば、編者らの喜びこれにすぎるものはない。

昭和 49 年 6 月

基礎生化学実験法編集委員会

まえがき

本シリーズ最後の第6巻は生化学的測定である。

第1章 酵素による測定法、第2章 酵素を用いる増幅測定法および第3章 免疫学的反応を用いる測定法はいずれも極めて特異性の高い測定法であるばかりでなく、極端に微量の試料を測定することができる方法であって、将来、生化学の分野において多くの人が日常的に用いることになるであろう。

これらの方法の特異性は説明を加える必要もないが、極微量の試料を測定できること、操作自体をマイクロのスケールに落すことができる点は、実験法の改良という意味に留まらず、将来、試料を節約し、廃棄物を減らし、下水および空気の汚染を少なくするという社会の要請にも答えるものであり、実験者が進んでこれらの方法を採用されるのが望ましいと思う。

酵素による測定法および増幅測定法は特に微量化および超微量化の方法を詳細に記している。この方面の開拓者である O.H. Lowry の薫陶を受けた執筆者がこれらの章を分担した。

免疫学的反応を用いる測定法は最も大きな将来性をもった分野であり、本章に記された基本的な方法はほとんどそのまま、あらゆる各個の場合に応用することができるであろう。こういう点で今までの巻と異なり、第6巻は実験者の創意が大いに働かざる余地があるといえよう。

第4章に微生物および高等動物を用いる分析法を載せた。生物を用いる測定法は酵素的および免疫学的測定法にだんだんって代わられてゆき、それが測定法の進歩であるといえるが、なお多くの物質の測定は生物的測定を必要とし、また生物的測定を必要とする新しい物質が登場しつつあることも事実である。

第5章に生化学的研究に用いられる緩衝液および細胞培養、臓器組織を用いて行なう実験に使用されるメディウム各種を記載した。

最後の第6章には毒物・爆発物の取扱いと実験廃棄物の処理に関して若干の指針を示した。

だいたい、薬学関係の人達は毒物・爆発物の取扱いの両方に親しんでいるが、医学関係の人達は毒物はよく知っていても爆発物を知らず、化学関係の人達は爆発物は知っているが毒物を知らない。また生物関係の人達は両方とも知らないで扱っていることが多いといえるであろう。

本シリーズの第1巻で病原微生物およびウイルスの危険性について、第4巻で放射性同位元素の危険性について述べてきたが、このような危険物の取扱いにおいて最も危険なことは、実験者がその“危険”を知らないことである。研究者がその危険を知らずに実験を実験補助者にまかせるようなことは許されるべきでない。しかし、知るにも限度があり、教えるのも必ずしも完全にはゆかない。第6章に記載した事柄は完全なインフォメーションにはあまりにもわずかではあるが、一覧の上、掲載の各種専門の成書を実験室に供えていただきたいと思う。

基礎生化学実験法シリーズはこれをもって終る。全6巻を通して、試料調製法、抽出・分離法、測定法を生化学実験の基礎と名づけたことは、全巻を読まれた方には理解していただけると思う。

研究法、物質、酵素またはオルガネラ等の各論は、現在の生化学においては膨大な量になるので企画からはずした。だが、ここしばらくの間、生化学がどんなに進歩しようとも、あるいは遺伝学や生物物理学、分子生物学等の分野の発展が生化学にどんなに影響しようとも、本シリーズに含まれる事柄が生化学実験の基礎であることは間違いない。すなわち本シリーズ6巻は基礎的方法の詳細な記述と、コンパクトネスの一つの接点として、使いやすいものといえるのではないかとと思われるものである。

本シリーズの企画に当たっては、編集委員だけでなく、女子栄養大学教授、

まえがき

吉川春寿先生および何人かの方々の示唆ないし協力を得た。また現在出版されている関連分野のシリーズとの調和にも、読者の立場に立った御忠告をいただいた。以上関係の方々に厚く御礼申し上げたい。

昭和51年2月

編者らしるす

編集委員および執筆者

(五十音順)

編集委員

阿南功一	筑波大学医学専門学群
紺野邦夫	昭和大学医学部
田村善藏	東京大学薬学部
松橋通生	東京大学応用微生物研究所
松本重一郎	上智大学理工学部

執筆者

阿南功一	筑波大学医学専門学群
岡本良平	東京医科歯科大学医学部
勝見允行	国際基督教大学教養学部
加藤尚彦	東京大学医学部
鎮目和夫	東京女子医科大学
高垣洋太郎	東京大学応用微生物研究所
松橋直	東京大学医科学研究所
松橋通生	東京大学応用微生物研究所
宮沢滋	三共株式会社醸酵研究所
山崎正一郎	国立予防衛生研究所

基礎生化学実験法 <A5判・全6巻> 編集委員会編

- | | |
|---------------|-----------|
| 1 生物材料の取扱い方 | 定価 3,500円 |
| 2 抽出・分離・精製 | 定価 3,800円 |
| 3 物理化学的測定(I) | 定価 3,800円 |
| 4 物理化学的測定(II) | 定価 4,300円 |
| 5 化学的測定 | 定価 4,300円 |
| 6 生化学的測定 | 定価 3,300円 |

ハーバー・生化学

原書14版 B5判 定価 5,800円

H.A. Harper 著
三浦 義 彰 監訳

医科生理学展望

原書6版 B5判 定価 6,200円

W.F. Ganong 著
松菅 田, 市岡, 東
野, 佐藤 監訳

実験生化学

A5判 定価 1,200円

J.M. Clark, Jr. 編
手塚 統 夫 訳

細胞内の機能分化

A5判 定価 2,500円

G.H. Bourne 著
江 上, 中 沢 監訳

突然変異の分子生物学

A5判 定価 2,200円

J.W. Drake 著
鈴 木 學 之 監訳

DNAと染色体

A5判 定価 2,800円

E.J. DuPraw 著
田 中, 黒 岩, 渡 部 訳

定価を変更することがありますのでご了承下さい。

基础生物化学实验方法 第6卷 《生物化学测定法》

本书介绍用酶测定法、用酶放大测定法、用免疫学反应测定法和用生物测定法等方法的原理和实验操作,另外也介绍毒物、易爆物和实验废物的处理。可供生物化学的科研及教学工作者参考。

目次: ①用酶测定法: 包括测定用器具及使用的方法,试剂和酶,辅酶A及其测定法,酶测定中必要的酶动力学,用酶测定中间代谢物,酶的测定等。②用酶放大测定法: 包括酶的循环反应原理,循环反应的特征,萤光测定法,测定样品,微吸管、小试管等,各种酶的循环反应原理。③用免疫学的反应测定法: 包括抗血清制备法,免疫球蛋白以及抗体的分离精制法,各种标记的方法,免疫学测定法。④用生物测定法: 包括微生物分析法,动物分析法,植物分析法。⑤生物化学研究中应用的各种溶液。⑥毒物、易爆物的管理与实验废弃物的处理。

目 次

1. 酵素による測定法	1
1.1 はじめに	(松橋 通生) 1
1.2 測定用器具とその使い方	(松橋 通生) 5
constriction type のマイクロピペット(6) 小試験管と小試験管立て・湯浴(13) 秤(15) 光度計とキューベット(16) 遠心機(16)	
1.3 試薬および酵素	(松橋 通生) 17
1.4 ニコチンアミド-アデニンヌクレオチドとその測定法	(松橋 通生) 19
酸・アルカリにおける安定性(19) 貯蔵(21) 分光光度計を用いた NAD(P), NAD(P)H の測定(22) けい光による NAD(P)H の測定(30) アルカリによる NAD(P) と NAD(P)H のけい光物質への転化(33)	
1.5 酵素的測定に必要な酵素キネティックス	(松橋 通生) 35
非酵素的反応のキネティックス(35) 酵素キネティックス(37)	
1.6 中間代謝物質の酵素による測定	(松橋 通生) 42
NAD(P)H の生成に共役した単数の酵素反応による測定(47)	
NAD(P)H の減少に共役した単数の酵素反応による測定(52)	
複数の酵素反応の組み合わせによる測定(55)	
1.7 酵素の測定	(松橋 通生) 59
粗酵素と精製酵素(59) イソクエン酸脱水素酵素—NADPH 生成の測定(65) グリセロリン酸脱水素酵素—NADH 減少または NAD 生成の測定(67) ホスホグルコムターゼ—NADPH を生成する酵素反応と共役させた測定法(70) 全酵素タンパクの分離(73)	

X 目 次

〔付〕 酵素を用いる物質の測定法一覧

..... (松橋通生, 高垣洋太郎)	74
2. 酵素を用いる増幅測定法..... (加藤 尚彦)	101
2.1 酵素的サイクリングの原理.....	101
2.2 サイクリング反応の特徴.....	103
2.3 けい光測定法.....	105
2.4 測定試料.....	108
抽出試料 (108) 転換反応試料 (109) 酵素活性測定試料(111)	
ホモジネート・凍結乾燥組織 (112)	
2.5 ミクロピペット・小試験管など.....	112
ミクロピペット (113) 小試験管 (114) 試験管立てとピペット	
置き (114)	
2.6 各種の酵素的サイクリング.....	115
NAD サイクリング (115) NADP サイクリング (126) CoA	
サイクリング (130) アデニレートサイクリング (139) グアニ	
レートサイクリング (143)	
3. 免疫学的反応を用いる測定法..... (松橋 直, 鎮目和夫)	147
3.1 抗血清の作り方.....	147
使用する動物 (148) 免疫のための抗原 (148) アジュバントに	
ついて (153) 抗原の注射法 (155) 抗血清の採取と保存(157)	
抗体の検定法 (158)	
3.2 免疫グロブリンおよび抗体の分離・精製法.....	159
免疫グロブリンの分離精製法 (159) 特異的抗体の精製法 (161)	
3.3 各種標識法.....	162
放射性物質の標識法 (162) 酵素の標識 (166) けい光物質の標	
識法 (167) フェリチンの標識法 (168)	
3.4 免疫学的測定法.....	169
ラジオイムノアッセイ (169) 沈降反応 (198)	

4. 生物を用いる分析法	215
4・1 微生物を用いる分析法	215
ビタミン	(宮沢 滋) 215
抗菌性物質	(山崎 正郎) 227
4・2 動物を用いる分析法	(岡本 良平) 236
FSH (236) LH (238) プロラクチン (239) GH (243)	
ACTH (245) TSH (247) バソプレッシン, オキシトシン	
(250) エストロゲン (253) プロゲステロン (255) アンド	
ロゲン (257)	
4・3 植物を用いる分析法	(勝見 允行) 258
一般的注意 (258) オーキシンの検定法 (261) ジベレリンお	
よびその関連物質の検定法 (264) サイトカイニンおよび関連物質	
の検定法 (267) その他 (269)	
5. 生化学研究用諸溶液	(阿南 功一) 271
5・1 生化学実験に用いられる緩衝液	271
5・2 生化学実験に用いられる諸種メディウム	285
6. 毒物・爆発物の取扱いと実験廃棄物の処理	(阿南 功一) 295
索引	311

酵素による測定法

1.1 はじめに

本章においては酵素測定を中心とした実験を扱う。本来は酵素を用いての物質の定量法を述べるのが目的であるが、それに関連して酵素自体の測定法や、酵素的測定法を中心とする実験法の全般にわたって若干の説明を加えるのが、必要であろうと思われるからである。酵素を用いた代謝物質の定量法については、H. U. Bergmeyer の "Methods of Enzymatic Analysis", 第3版 (英語第2版), 全4巻 (Verlag Chemie-Academic Press, 1974) が最も克明かつ親切であり、大方はこれを参照すれば充分である。酵素を用いた代謝物質の測定法および酵素の測定法について、ほかにも "Methods in Enzymology" (Academic Press, 1955年より現在まで全43巻) にほとんど網羅されているが、これはその折の年代に知られていた酵素の精製、性質、測定法を詳細に記したものであるから、用いられる酵素はほとんど執筆者が自分で精製したものであって市販品として一般性があるものではない。現在、本書の読者が酵素による代謝物質の測定を行なう場合は十中八九、市販の酵素標品を用いるであろうから、いちばん手軽に個別的な知識を得る方法は、まず酵素メーカーのカタログをみることである。Boehringer-Mannheim-山之内社 (Boehringer と略す) が出しているカタログは、酵素標品および基質1個につき、1枚ずつのルーズリーフ状になっており、表に性質など、裏に測定法のアウトラインと測定のための試薬の割合がかかっている。Boehringer 社の酵素標品は信頼がおける上に入手しやすいので使用に最も手頃であるが酵素の種類はそれほど多くない。米国の Sigma 社 (Missouri 州 Saint Louis 市), Worthington 社 (New Jersey 州 Freehold 市) などそれぞれ特徴ある酵素標品を提供するが、試薬はともかくとして酵素標品の入手は Bohringer 社ほど

手軽でない。しかし、そこで出しているカタログはなかなか見事なもので、生化学試薬と合わせ、さながら生きた生化学の教科書の感がある。そこで、まずメーカーのカタログを見、ついで Bergmeyer の本を見れば酵素的測定はできないわけではないが、前者は個々についてはやや簡単すぎ、後者はぼう大で端から端まで目を通すわけにいかないで、両者の中間をとって、通読もできれば個々のインフォメーションも学問的にはカタログ以上に得られるようなものを本章に志したわけである。

しかし、ページの大部分は一般的な説明とごく少数の実施例に使用した。それは酵素的測定法のきわめて重要な部分はニコチンアミド-アデニンスクレオチドの酸化還元に関する事柄とマイクロの測定のテクニックを含んでおり、これについては詳細に説明する必要があった。この方面ではタンパク質の定量などで著名な O.H. Lowry とその共同研究者らが他人の追従を許さない貢献をしており、しかも彼らによりきわめて有用でユニークな著書：“A Flexible System of Enzymatic Analysis”, Academic Press (1972) が出版されたので、本章のその部分ではぜひぶん参考にさせていただいた。一方、個別的なインフォメーションについては章末に一覧表を設けたので、ある程度役に立てると思う。しかし、特定の1つ1つの測定を実施するについては、やはり Bergmeyer を見ていただかなければならないであろう。章末の表では適用される酵素の選択および測定の実用範囲までは示されているので、もし Bergmeyer が入手できない場合でも、Boehringer のカタログに加えて P.D. Boyer の“The Enzymes”, 第2版, 全8巻(1959~1963)および第3版, 全10巻(1970~1974, Academic Press), または“Methods in Enzymology”を見れば測定を実施することができるはずである。

物質の酵素的測定は反応の基質、特異性に特徴があり、測定の迅速さと合わせて最も使いやすい方法の1つである。酵素の基質特異性は多くの場合、極めて厳密で、1つの酵素による測定だけで定量と同定が完全に行なわれえることがあるが、一方また多くの酵素は2つ以上の基質に同様に働く。たとえば、ホスホフルクトキナーゼはフルクトース-6-リン酸とセドヘプテロース-7-リン酸をリン酸化する。このような場合、酵素的測定の結果はフルクトース-6-リン酸とセドヘプテロース-7-リン酸の総和がわかるだけであり、個別的にはさらに別の酵素を用いなければならない。CDP-D-グルコースオキシダクターゼは CDP-D-グルコースばかりでなく dCDP-D-グルコースにも働くが、後者は天然に存在しないので無視してよい。アセチル CoA-カルボキシラーゼはプロピオニル CoA-カルボキシラーゼにも働くが、後者に対する活性は弱いので (V_{max} が小さく、 K_m が大きい) 無視してよいし、また前者の反応の生成物のマロニル CoA に特異的な脂肪酸合成酵

素を作用させて脂肪酸合成に伴う NADPH の消費をはかり、後者を除外した定量を行なうことができる。このような酵素的測定は、酵素の名称をうのみにして用いると危険であるが、章末の表のはかに前記の書物やカタログなどを読み、酵素の組み合わせ方や、キネティックスの利用法に頭を働かせると、これに勝る測定法は少ないといえる。

酵素反応は遠い昔は、数十 ml のビーカーやフラスコ中で行なつたものであるが、高価で貴重な試薬、酵素やあるいは放射性同位元素が使われるようになって、だんだんと小さいスケールで行なわれるようになった。それでも通常の試験管や 0.1 ml 以上のメスベッコトや通常の光学的測定のキューベットを用いると、反応に加える試薬の量にして 0.005 ml (5 μ l) が一応、正確に測りとれる限界であり、反応液あるいは測定液の総量は 0.5 ml 以下にはできない。

マイクロ法は最初、M. Levy (1963)¹⁾ により記載された constriction 型 (くびれ型) ミクロベッコトを基本にして前述の Lowry らが、容量、重量、光学的測定感度の 3 つをマイクロスケールにそろえたもので、測定する試薬の容量の下限は、一応、1 μ l で、反応液は 10 μ l 以上である。秤量はきわめて細くひきのばした石英繊維のたわみを利用して、細筒 1 個の重さを秤量するといわれるが、生化学の通常の酵素的測定に使う機会はずくない。測定感度は酵素反応を NADH または NADPH (NAD(P)H と記す) の増減に結びつけて 340 nm の紫外線吸収で測定した場合、性能のよい分光光度計 (たとえば Zeiss 製の) のスリットにピンホールを用い、石英キューベットとして内径の幅 2 mm、奥行 1 cm のものをを用いても、測定容量は最小 50 μ l であり、NAD(P)H にして測定可能最小濃度は 10 μ M (10^{-5} M) であるから NAD(P)H のモル数として、最小は 0.5 nmol (0.5×10^{-9} mol) ということになる。これで大方の測定には充分であるが、分光光度計のかわりにけい光光度計を用いると測定可能最小 NAD(P)H 濃度はさらに 0.1 μ M (10^{-7} M) になり、容量 1 μ l の測定で、モル数にして 0.1 nmol (10^{-10} mol) ぐらいになる。この濃度になると、ためておいた蒸留水や試薬溶液の中にいる細菌が測定をじゃますることまで注意しなければならぬ。

これよりさらに測定スケールを下げるには、アルカリによる NAD(P) のけい光測定、さらには、化学的増幅 (chemical amplification) を用いる超マイクロ法があり、化学的増幅も 2 段階組み合わせることによって最終的には 1 個の動物細胞の中の物質や酵素を測定することができるといわれる (本書 2 章参照)。

1) M. Levy: C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim., 21, 101 (1936).