

Megazyme

D-グルコース-HK分析法 (HK/G6P-DH法)

D-GLUCOSE - HK

ASSAY PROCEDURE
(HK/G6P-DH FORMAT)

K-GLUHK-110A/K-GLUHK-220A 08/18

K-GLUHK -110A / -220A
(用手法 110/220 回分*)
(自動分析法 1000/2000 回分)
(マイクロプレート法 1100/2200 回分)

* 半量で分析すると検体数は2倍

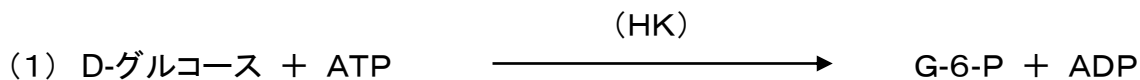
日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

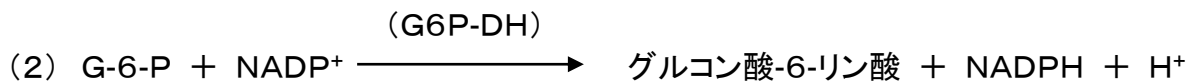
D-グルコースは多くの植物や食品に含まれています。植物材料では遊離糖としてだけでなく、二糖類、オリゴ糖類、さらには澱粉、 β -1,3:1,4-D-グルカン類やセルロースなどの多糖類などの形態で存在します。また蜂蜜、ワイン、ビールを初めとしてパンやパストリー、チョコレートやキャンディーなど様々な固形食品に著量含まれています。

原理 - PRINCIPLE -

D-グルコースはアデノシン-5'-三リン酸(ATP)存在下、酵素ヘキソキナーゼ(HK)によりリン酸化されてグルコース6リン酸(G-6-P)に変換され、同時にアデノシン-5'-二リン酸(ADP)が生成します(1)。



NADP⁺の存在下、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6P-DH)作用によりG-6-Pはグルコン酸-6-リン酸に酸化され、同時に還元型のNADPHが生成します(2)。



この反応で生成するNADPH量は、D-グルコース量と化学量論的に同一です。NADPHは340nmにおける吸光度増加により測定することができます(7ページ、図1)。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法はD-グルコースに対して特異性が高いです。

吸光度差の最小値は0.010です。これは最大サンプル量2.00mLを用いた場合、分析試料中のD-グルコース濃度0.332mg/Lに相当します。検出限界は分析試料濃度0.663mg/Lで、最大サンプル量2.00mLを用いた場合、吸光度差0.020に相当します。

この分析は4~80 μ gのD-グルコース間で直線性を示します。同一サンプルを2本1組で分析した場合、吸光度のバラつきは0.005~0.010の範囲で発生し、これは最大サンプル量2.00mLを用いた場合、およそそのD-グルコース濃度0.166~0.332mg/Lに相当します。

サンプル調製中にサンプルが希釈される場合、結果に希釈係数Fを掛ける必要があります。サンプル調製時、例えば10g/Lを秤量する場合、0.02~0.05g/100gの誤差が生じます。

阻害 - INTERFERENCE -

D-グルコースの変換が分析に規定された時間内(約5分)に完了している場合、一般に阻害が生じていないと結論付けることができます。また反応終了時のキュベットにD-グルコース(0.1mL中に約40 μ g)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に増加すれば、阻害が生じていないことを示します。

試料中の妨害物質の存在は、内部標準を加えることにより確認することができます。標準品の量的な回収が可能ははずです。サンプルの取り扱いおよび抽出におけるサンプルのロス回収実験を行うことにより、すなわち抽出工程の最初にサンプルにD-グルコースを添加することによって判定することができます。

安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。この製品の安全な使用および取扱いの詳細については日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

キット - KITS -

110/220 検体分析用キット(自動分析法では 1000/2000 検体、マイクロプレート法では 1100/2200 検体)を提供しております。キットには以下のものが含まれます。

110検体測定用キット (K-GLUHK-110A)

ボトル1: 緩衝液(25mL、pH 7.6)。保存剤として 0.02%(w/v)アジ化ナトリウム含有。4°Cで2年以上安定です。

ボトル2: NADP⁺とATP。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液 (2.25mL) 4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: D-グルコース標準液(5mL、0.4mg/mL)。4°Cで2年以上安定です。

220検体測定用キット (K-GLUHK-220A)

110 検体用と同じ内容で、ボトル2とボトル3が夫々2本入っています。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. ボトル1をそのまま利用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を 12mL の蒸留水に溶解します。4°Cで1年以上、-10°C以下で2年以上安定です。冷凍保存の場合は凍結／融解の繰り返しを避けるため、ポリプロピレン試験管に小分けして保存して下さい。
220 検体用キットの場合、2本目のボトルは必要になるまでそのまま保管して下さい。
3. 付属のボトル3をそのまま使用して下さい。ゴム栓に酵素が付着している可能性があるため、最初に開封する前にボトルを振って下さい。その後、ボトルを直立して保管します。
使用前にボトルを軽く振り混ぜて内容物を混ぜて下さい。4°Cで2年以上安定です。
4. 付属のボトル4をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。

NOTE: D-グルコース標準液は、使われる分光光度計の精度やサンプル中の妨害物質による阻害が疑われる場合にのみ使用します。
D-グルコース濃度は、NADPHの吸光係数から直接算出します(3ページ)。

機器(推奨):

1. ガラス試験管(丸底; 16×100mm)
2. 使い捨てプラスチックキュベット(光路 1cm、3.0mL)。紫外部対応のもの
3. マイクロピペッター、20μL、100μL (例 Gilson Pipetman®)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペット、例 Eppendorf Multipette®
 - 5.0mL Combitip® (NADP⁺／ATP 0.1mL 分注用)
 - 25 mL Combitip® (蒸留水 2.0mL 分注用)
5. 分析用天秤

6. 分光光度計(340nm に設定)
7. ストップウォッチ(実験室用タイマー)
8. ワットマン No.1 (9cm) 濾紙

A. 分析法(用手法)

波長	340nm
キュベット	光路1cm (ガラスまたはプラスチック)
温度	約25℃
最終液量	2.32 mL
サンプル溶液	D-グルコース 4~80μg/キュベット(試料 0.10~2.00mL)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル
蒸留水 (約25℃)	2.10 mL	2.00 mL [†]
サンプル溶液	-	0.10 mL [†]
溶液1 (緩衝液)	0.10 mL	0.10 mL
溶液2 (NADP ⁺ /ATP)	0.10 mL	0.10 mL
混合*し、試薬添加の約3分後、反応液の吸光度測定(A ₁) 次に以下のものを添加し反応開始:		
懸濁液3 (HK/G6P-DH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。 反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。5分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。		

* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋または Parafilm®でキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

** 吸光度が増加し続ける場合、これは試料中の色素化合物や酵素の影響による可能性がある。これらの干渉物質は試料調製中に除去される可能性がある。

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能です(サンプル溶液参照)。

計算 - CALCULATION: -

ブランクとサンプルの吸光度(A₂-A₁)を測定し、サンプルの吸光度からブランクの吸光度を差し引くことにより吸光度差ΔAを得ます。

正確な結果を得るためには、ΔAは通常少なくとも吸光度も0.100は必要です。

D-グルコース濃度は以下の式で算出されます

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

V	= 最終反応液量 (mL)
MW	= D-グルコースの分子量
ε	= NADPHの 340nm における分子吸光係数 = 6300 (l/mol/cm)
d	= 光路 (cm)
v	= サンプル量 (mL)。標準は 0.10mL

この結果から D-グルコース濃度 (c) は

$$c = \frac{2.32 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.6634 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

サンプル添加量が 0.1mL 以外の場合は計算式を補正して下さい。
またサンプルが調製中に希釈されている場合には、結果に希釈係数 F を掛ける必要があります。

固体および半固体サンプルを分析する場合、秤量結果から以下のように含量 (g/100g) を算出します。

$$\text{D-グルコース含量} = \frac{\text{D-グルコース濃度 (g/L 試料液)}}{\text{サンプル重量 (g/L 試料液)}} \times 100 \text{ (g/100g)}$$

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Cal*™ を使用することで簡単に計算できます。

B. 分析手順 (自動分析法) - AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE -

NOTE:

1. D-グルコースの自動分析手順は、一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
2. 一点標準法または検量線で測定される D-グルコースの一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

試薬の調製法は以下の通りです。

R1 試薬調製

組成	液量
蒸留水	53.2 mL
溶液1 (緩衝液)	3.0 mL
溶液2 (NADP ⁺ /ATP)	3.0 mL
総液量	59.2 mL

R2 試薬調製

組成	液量
蒸留水	6.25 mL
懸濁液3 (HK/G6P-DH)	0.55 mL
総液量	6.8 mL

分析法

- R1: 0.200 mL
試料 ~ 0.01 mL
R2: 0.025 mL
反応温度と時間 37°C 反応で約5分

波長	340nm
調製試薬の安定性	冷蔵にて2日間以上
定量法	エンドポイント法
反応方向	増加
直線性	サンプル量 0.01mL 時、D-グルコース約 0.810g/L まで

C. 分析手順(マイクロプレート法) - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE -

NOTE :

1. D-グルコースのマイクロプレート分析手順は、一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
2. 一点標準法または検量線で測定される D-グルコースの一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

分析法

波長:	340nm
マイクロプレート	96穴 (ガラスまたはプラスチック製の底が平らなもの)
反応温度	約25℃
最終反応液量	0.232 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、 D-グルコースで 0.1~8 μg/ウェル

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル	標準
蒸留水	0.210 mL	0.200 mL [†]	0.200 mL
サンプル溶液	-	0.010 mL [†]	-
標準液	-	-	0.010 mL
溶液1 (緩衝液)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
溶液2 (NADP ⁺ /ATP)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
混合*し、試薬添加の約3分後、反応液の吸光度測定(A ₁) 次に以下のものを添加し反応開始:			
懸濁液3 (HK/G6P-DH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 5分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。			

* マイクロプレートリーダーの自動攪拌機能を使用、もしくは 50~100μL のピペッティング

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合、試料の吸光度は懸濁液3の添加から外挿する

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(直線性の項参照)

算出法 (マイクロプレート法)

$$g/L = \frac{\Delta A_{\text{試料}}}{\Delta A_{\text{標準}}} \times \text{標準 [g/L]} \times F$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 F を乗じる必要があります。

サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

1. サンプル希釈

キュベット中に添加される D-グルコースの量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、4~80 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の D-グルコース濃度が 0.04~0.8g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 D-グルコース濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.8	希釈不要	1
	0.8~8.0	1 + 9	10
	8.0~80	1 + 99	100
	> 80	1 + 999	1000

サンプル吸光度 ΔA の値が低すぎる(例えば<0.100)場合、サンプル量を増やすか、希釈度を下げます。またはサンプルと蒸留水添加量の合計が 2.10mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 2.00mL まで増やし、計算式のサンプル量を変える方法もあります。

2. サンプルの清澄化

a. 試薬

Carrez I 溶液: ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム $\{K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$ (Sigma P9387 または同等品) 3.60g を 100mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

Carrez II 溶液: 硫酸亜鉛 $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$ (Sigma Z4750 または同等品) 7.20g を 100mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

水酸化ナトリウム(100mM NaOH): NaOH 4g を 1L の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

b. 手順

100mL 容メスフラスコに液状試料をピペットで添加、もしくはサンプルを適分量精秤します。蒸留水 60mL を加え、Carrez I 液 5mL、Carrez II 液 5mL および 100mM NaOH 溶液 10mL を順に注意深く加え、添加後にそれぞれ攪拌します。定容後混合し、濾過します。

3. 一般的な注意事項

- 液状試料:** 透明で僅かに着色した程度の、中性に近い液状試料はそのまま分析に使用できます。
- 酸性試料:** 酸性試料 0.1mL 以上を希釈なしで使用する場合(例 ワイン、果汁)は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.6 近くにまで上げ、室温で30分間放置する必要があります。
- 炭酸ガス:** ビールのように炭酸ガスを含む試料は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.6 近くにまで上げ、穏やかに攪拌するか、ガラス棒で攪拌して炭酸ガスを除きます。
- 着色した試料:** HK/G6P-DHを添加しない試料ブランクが必要な場合があります。
- 強く着色した試料:** 強く着色した試料をそのまま分析する場合は、試料 10mL にPVPP (ポリビニルポリピロリドン) 0.2g を添加して前処理します。試験管を5分間激しく振とうし、Whatman No.1 濾紙で濾過します。
- 固体試料:** 固体試料を蒸留水中でホモジナイズまたは粉碎し、必要に応じて濾過します。
- 脂肪を含む試料:** 試料を脂肪の融点より高い温度の熱水(例 60 $^{\circ}$ C)で、100mL 容メスフラスコ中で抽出し、室温に戻した後に定容します。氷上または冷蔵庫で15~30分間冷却し、

脂肪を分離させて濾過します。濾液は最初の数 mL は廃棄し、透明な上清(僅かに白濁していても良い)を分析に使用します。または Carrez 試薬を用いて清澄化します。

h) タンパク質を含有する試料: Carrez 試薬を用いて除タンパクします。

サンプルの調製例

(a) ジャム、その他野菜や果物製品中の D-グルコースの定量

試料約10gをミキサー等でホモジナイズします。約 0.5g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 50mL と混合して溶解させて定容後混合し、濾過します。濾液の最初の 5mL を捨て、分析には清澄濾液を使用します(0.1-2.0mL)。

(b) 牛乳中の D-グルコースの定量

ピペットを用い牛乳 20mL を 100mL 容メスフラスコに入れ、次に Carrez I 溶液 10mL、Carrez II 溶液 10mL、および NaOH 溶液(100mM) 20mL を順に加え、それぞれ添加後に攪拌します。蒸留水で定容後、混合して濾過します。分析には 1.00mL の濾液を用います。

(c) 発酵液および細胞培養液中の D-グルコースの定量

一定量(約 10mL)の溶液を約 90~95°C で10分間加熱して酵素活性を失活させます。遠心または濾過により得た清澄な上清を分析に使用します(必要に応じて希釈表に従って希釈)。または Carrez 試薬を用いて除タンパクします。

寒天培地の場合は培地を水でホモジナイズし、上記の処理を行いません。

(d) 固形食品

植物材料は粉碎し 0.5mm の篩を通します。パン、ペストリー、チョコレート菓子類、キャンディーなどの固形食品はミキサー、ミートグラインダー、乳鉢などでホモジナイズします。試料の平均的な部分を秤量し、水で抽出します(必要に応じて60°Cに加熱)。メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。混合し濾過後、清澄液を適切に希釈して分析に使用します。

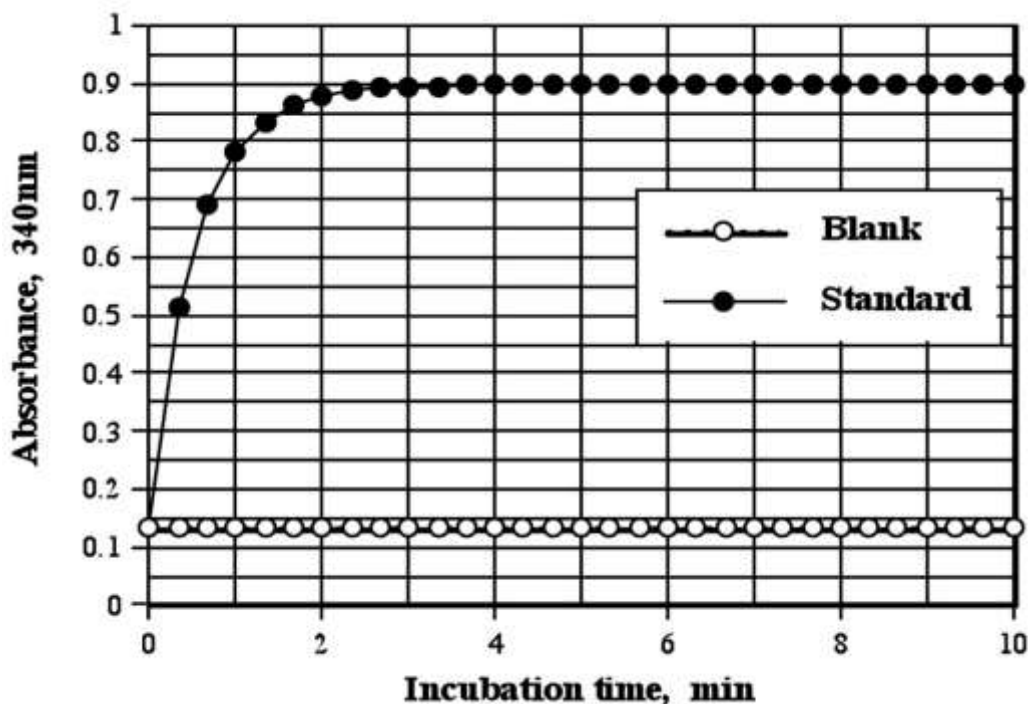


図1. D-グルコース 50µg に対する吸光度 340nm の経時変化
NADP⁺とATP存在下、ヘキソキナーゼ/グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼによる反応

文献

Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1988). D-Glucose. *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VI, pp. 163-172, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル

TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : bj-megazyme@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません