

蛍光法によるアンモニア定量におけるアミノ酸、蔗糖等共存物質の影響

菅原 潔, 小山文隆*, 大内 毅**

酵素反応液等の中に微量に存在するアンモニアをアミノ酸、蛋白質の共存下でも測定し得る蛍光法による定量法を先に報告した。¹⁾ この方法はジチオスレイトールとO-フタルアルデヒド(OPT)をアンモニアに反応させ、 $\lambda_{ex}=413\text{nm}$ および $\lambda_{em}=476\text{nm}$ により蛍光を測定する点にあるが、1級アミンおよびその誘導体は勿論OPTと反応性を有する。従って、その存在量等の条件如何によってその影響が推測される。この定量法は微量に存在する蛋白質およびアミノ酸の共存下でもアンモニアの微量定量が可能である点から、トランスグルタミナーゼ、あるいはペプチジルアルギニンデイミナーゼ²⁾などの酵素反応の測定にも応用し得る。以上のような観点から、これらの酵素反応に関連する物質のOPTとDTTによる蛍光法によるアンモニア定量に及ぼす影響について検討した。

実験方法

試薬：OPTおよびDTTは半井化学より購入し、アンモニアの標準物質としては硫酸アンモニウム(和光純薬特級)を用いた。試薬の溶解および緩衝液の調製には抵抗が $10\text{M}\Omega$ 以上の脱イオン水を使用した。

装置：蛍光測定は日本分光工業株式会社製の分光蛍光光度計FP-550型により行なった。

測定方法：以前に報告した方法¹⁾、すなわち試料溶液 $50\mu\text{l}$ ($1\sim 100\text{nmole}$ のアンモニアを含む)を 3ml の 50mM りん酸緩衝液に加え、次いで $100\mu\text{l}$ のOPT-DTT混液(エタノール中 $5\mu\text{mol}$ OPTおよび $5\mu\text{mol}$ のDTTを含む)を加えて2時間後、 $\lambda_{ex}=413\text{nm}$ によって発する $\lambda_{em}=476\text{nm}$ の蛍光強度を測定した。

結果および考察

$100\mu\text{mol}$ の NH_4^+ を含む水溶液 $50\mu\text{l}$ の種々の物質を加えて蛍光強度を測定し、無添加の場合を100として比較した。

表1 アミノ酸、蔗糖等の共存下におけるアンモニアの蛍光強度

共存物質	相対蛍光強度				
無添加	100%				
1) アミノ酸	(250nmol) (500nmol)				
Ser	89 86				
Glu	107 86				
Gln	93 81				
Pro	98 96				
Ile	94 90				
Lys	91 74				
Arg	89 86				
2) 牛血清アルブミン					
(0 μg) (20 μg) (50 μg) (100 μg) (200 μg)	100 98 96 88 85				
3) Tris	101 (500nmol =10mM) 96 (1 μmol =20mM)				
EDTA	100 (0.5 μmol =10mM) 97 (1 μmol =20mM)				
CBZ-Gln-Gly-O-Et	99 (200nmol) 98 (400nmol)				
4) 蔗糖	100 (5%) 98 (10%)				

* 現在 東北大学農学部生物化学研究室

** 現在 常磐学園短期大学

1. アミノ酸の共存：表1に示すように何れの場合も100 μmol の NH_3 に対して500 μmol を加えた場合には若干の抑制効果が見られた。Proが最も影響が少なく、アミノ基2個を有するLysの影響が強かった。250 μmol を加えた場合には何れの場合も影響が低かった。
2. 牛血清アルブミン：試料中の存在量が少ない場合は、その影響は極めて微弱であるが、存在量の増加と共に抑制効果が現われ、200 μg の存在下では無添加の85%の蛍光強度を示した。20 μg 以下の場合には実用上問題とならない。
3. Tris, EDTA及びCarbobenzoxyglutaminylo-glycine-o-ethylester (CBZ-Gln-Gly-O-Etと略記)：Tris, EDTA共に10mMでは全く影響が見られないが、20mMで僅少ではあるが阻害効果が現れた。Trisは第1級アミンではあるが、第1級アミンである α -アミノ基を有するアミノ酸に比較して極めて弱い影響を与えたのが注目された。 α -Cが3級であり、立体障害によりOPTと反応しにくいと考えられる。トランスグルタミナーゼの基質ともなるCBZ-Gln-Gly-O-Etは400nmolの存在下でもその影響は極めて微弱で実用上問題とならない。遊離のアミノ基が無いことから予測されたことであるが、グルタミン残基のアミド基の影響のないことも、これで確認された。
4. 蔗糖：5%の濃度では全く影響がなく、10%において98%の蛍光強度を示し、実用上ほとんど問題とならない程度の僅少さではあるが若干の抑制作用のある事が判った。

要 約

蛍光法によるアンモニアの微量定量法(O-フタルアルデヒドおよびDTTを使用)に対するアミノ酸などの共存の影響を調べた。試料50 μl 中100nmolのアンモニアを含む場合の蛍光強度を100とし、これに種々の物質を加えた場合の蛍光強度を測定した。

1. アミノ酸の共存は、低濃度では殆ど影響が無いが、250nmolの存在下ではアミノ酸によっては若干の阻害(11%以内)が見られ、500nmolではさらに阻害の増大が見られた。アミノ酸の種類別ではProが最も影響が少なく、Lysが最も阻害効果が大きかった。
2. 牛血清アルブミンは20 μg の存在以下では98%を示し、実用上問題ない。
3. Tris, EDTA何れも10mM以下では全く影響がなかったが、20mMでは極めて弱いながら影響が見られた。CBZ-Gln-Gly-O-Etは400nmolの存在下でも98%の蛍光強度を示し、影響は極めて少ない。
4. 蔗糖は5%では全く阻害はなく、10%では98%で、実用上問題とはならない程度であった。

文 献

- 1) Sugawara, K. and F. Oyama : J. Biochem. **89**, 771 (1981)
- 2) Fujisaki, M. and K. Sugawara : J. Biochem. **89**, 257 (1981)

Fluorometric Determination of Ammonia in the Presence of Amino Acid, Sucrose and Other Materials.

KIYOSHI SUGAWARA, FUMITAKA OYAMA and TAKESHI OUCHI

The influence of several biological materials such as amino acid, protein, sucrose and others on the fluorometric determination of ammonia using OPT and DTT was studied. The relative fluorescence intensity depending on ammonia (100 nmol in 50 μ l) was compared with that of ammonia solution containing additional material.

1. In the presence of 250 nmol of amino acid, the fluorescence intensity was slightly decreased (0~10% inhibition) and the inhibition was increased to 4~26% when amino acid was increased to 500 nmol. In any case, highest inhibitory effect was observed in the presence of lysine and proline showed lowest inhibition. 2. Very little inhibition was observed by the addition of 20 μ g of bovine serum albumin. 3. Tris(10 mM), EDTA(10 mM) and sucrose(5%) showed no influence on the fluorescence intensity.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.30, 39 ~ 41, 1982)