

Megazyme

L-グルタミン、アンモニア分析法
(迅速法)

L-GLUTAMINE / AMMONIA

ASSAY PROCEDURE

(RAPID METHOD)

K-GLNAM 06/18

K-GLNAM

(用手法 50 回分*)

(マイクロプレート法 500 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 -

L-グルタミンは、ある種の細胞培養培地の必須成分です。但し、このアミノ酸を増殖培地に組み込むには2つの大きな問題があります。第一にL-グルタミンは不安定で、自然界で容易にL-グルタミン酸と遊離アンモニウムイオンに分解します。第二に、遊離したアンモニウムイオンは細胞に対して強い毒性があることです。そのため調整済みの増殖培地を有効期限内に厳密に使用するか、使用直前にL-グルタミンを添加します。何れの場合もL-グルタミンとアンモニアは培養前と培養中継続してモニタリングする必要があります。

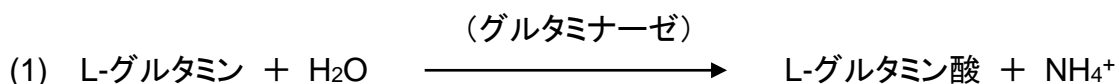
L-グルタミンとアンモニアを個別に測定するキットが上市されていますが、使用されている酵素の量的または性質面の問題で、これらの製品は反応が非常に遅い可能性があります。このような状況からメガザイムは最新の組換え酵素を採用し本キット(**K-GLNAM**)を開発しました。

本キットの反応は非常に高速(約15分)であり、両分析項目を簡単な方法で連続分析が可能です。キットは定量的なエンドポイントを採用しているため検量線は不要であり、効率良く分析できます。本ブックレットでは用手法(4ページの「A」参照)とマイクロプレート法(6ページの「B」参照)の両分析形式について説明しています。迅速な組織培養用分析キットとしてはこの他に、アンモニア(**K-AMIA**)、L-アスパラギン/アンモニア(**K-ASNAM**)、D-グルコース(**K-GLUHK**、**K-GLUC**)、およびL-乳酸(**K-LATE**)が販売されています。

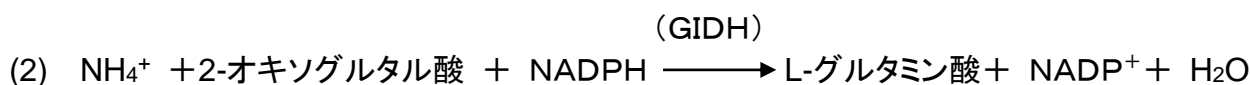
本キットは組織培養用以外の用途、例えば栄養補助食品や野菜など様々な試料中のグルタミン分析にもお使い頂けます。

原理 - PRINCIPLE -

L-グルタミンの定量は2つの高速かつ単純な反応で行なわれます。まず最初に、L-グルタミンは最初にグルタミナーゼにより脱アミノ化され、L-グルタミン酸とアンモニウムイオン(NH₄⁺)に変換されます(1)。



次に反応(1)により生成したアンモニアはサンプル由来のアンモニアと共にNADPHの存在下、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GIDH)により2-オキソグルタル酸と反応してL-グルタミン酸とNADP⁺を生成します(2)。



この反応で生じるNADP⁺量はグルタミンとアンモニア量と化学量論的に同一です。NADPHの消費は340nmの吸光度の減少により測定されます。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法はL-グルタミンおよび遊離アンモニアに対して特異性が高いです。D-型異性体や類似物質のL-アスパラギンには反応しません。

吸光度差の最小値は0.005です。これは最大サンプル量1.00mLを用いた場合、分析試料中の濃度0.271mg/Lに相当します。検出限界は最大サンプル量1.00mLを用いた場合、分析試料中の濃度0.543mg/Lで、吸光度差0.010に相当します。

この分析は、1~40 μg の L-グルタミン濃度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、これはサンプル量 1.00mL を用いた場合、L-グルタミン約 0.271~0.543 mg/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 -

分析法で指定された時間内(すなわち約5分)に L-グルタミンの定量的脱アミノ化が達成された場合、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。定量工程である反応(2)への阻害は、反応終了時のキュベットにアンモニア(0.1mL 中に約 4 μg)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に低下すれば、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ロス回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルに L-グルタミンを添加することによって確認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、SDS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 -

用手法 50 検体(マイクロプレート法 500 検体)分析用キット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。

ボトル1: 緩衝液(11mL、pH 4.9)。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:(×2) 緩衝液(25.5mL、pH 8.0)。保存剤として 2-オキソグルタル酸と 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3:(×2) NADPH。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル4: グルタミンナーゼ懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: グルタミン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(2.2mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル6: アンモニア標準液(5mL、0.04 mg/mL)。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7: L-グルタミン標準品粉末(約 2g)。4°Cで2年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

- 1,2. 付属のボトル1と2をそのまま使用して下さい。4℃で2年以上安定です。
3. ボトル3の内容物を蒸留水 12mL に溶解します。
4℃で約4週間安定または-10℃以下で2年以上安定です。
(凍結／融解の繰り返しを避けるため、ポリプロピレンチューブに小分けして凍結します)。
必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい。
- 4,5. 付属のボトル4, 5をそのまま使用して下さい。最初に開封する前に、ゴム栓に付着した可能性のある酵素を混合するためボトルを振って下さい。その後、ボトルを直立させて保管します。**使用前にボトルを軽く振り混ぜて下さい。**4℃で2年以上安定です。
6. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4℃で2年以上安定です。
7. L-グルタミン 0.30g を精秤し、1L メスフラスコに移します。蒸留水を加えて十分に溶解し1L に定容します。-10℃以下で約2ヶ月安定です

NOTE : L-グルタミン標準液は、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。L-グルタミンとアンモニア濃度は、NADPHの吸光係数から直接算出します(5ページ)。

機器(推奨):

1. メスフラスコ (50mL、100mL、500mL)
2. 使い捨てプラスチック製キュベット(光路 1cm、3.0mL)。紫外部対応のもの
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(200μL、1mL)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
- 5.0mL Combitip® [緩衝液1(溶液1)0.2mL 分注用]
- 25 mL Combitip® (蒸留水 1.5mL、溶液3 0.5mL 分注用)
5. 分析用天秤
6. 340nm に設定した分光光度計
7. ボルテックスミキサー
8. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
9. ワットマン#1 濾紙(9cm 径)

A. 分析手順（用手法） - MANUAL ASSAY PROCEDURE -

波長:	340nm
キュベット	光路 1cm（ガラスもしくはプラスチック）
反応温度	約 25°C
反応最終容量	2.34mL
サンプル溶液	アンモニア 0.4~7.0 µg、L-グルタミン 1~40 µg （サンプル液量を 0.10~1.0mL とした場合）

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	アンモニア		L-グルタミン	
	ブランク	サンプル	ブランク	サンプル
溶液1（緩衝液、pH 4.9）	-	-	0.20 mL	0.20 mL
サンプル溶液	-	0.10 mL [†]	-	0.10 mL [†]
懸濁液4（グルタミナーゼ）	-	-	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、室温で5分反応。次に以下のものを添加：				
蒸留水（約 25°C）	1.82 mL	1.72 mL [†]	1.60 mL	1.50 mL [†]
溶液2（緩衝液、pH 8.0）	0.30 mL	0.30 mL	0.30 mL	0.30 mL
溶液3（NADPH）	0.20 mL	0.20 mL	0.20 mL	0.20 mL
混合*し、試薬添加の約4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5（GIDH）	0.02 mL	0.02 mL	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、1分間の吸光度変化がなくなるまで1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パラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。
- † 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（サンプル溶液の項参照）

算出法（用手法）

ブランクとサンプルの吸光度差（A₁-A₂）を測定します。それぞれ対応するサンプルの吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いて、必要な分析対象の ΔA を以下のように求めます。

アンモニアの定量では：

$$\Delta A_{\text{NH}_4} = (A_1 - A_2)_{\text{NH}_4 \text{ 試料}} - (A_1 - A_2)_{\text{NH}_4 \text{ BL}}$$

L-グルタミンの定量では：

ΔA_{GLN} を算出するには、まず ΔA_{GLN+NH₄} を測定します。

$$\Delta A_{\text{GLN}+\text{NH}_4} = (A_1 - A_2)_{\text{GLN 試料}} - (A_1 - A_2)_{\text{GLN BL}}$$

次に以下の式で遊離アンモニアによる吸光度増加分を除外して ΔA_{GLN} を算出します

$$\Delta A_{\text{GLN}} = \Delta A_{\text{GLN}+\text{NH}_4} - \Delta A_{\text{NH}_4}$$

十分に正確な結果を得るには、ΔA_{NH₄}、ΔA_{GLN} はそれぞれ少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

アンモニア、L-グルタミンの濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

- V = 最終反応液量 (mL)
Mw = 測定対象物の分子量
 ϵ = 340nm におけるNADPHの分子吸光係数 = 6,300 (L/mol/cm)
d = 光路 (cm)
v = サンプル液量 (mL)
ここでは 0.1mL の例を示します。サンプル量により計算式に補正が必要です。

アンモニア濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.34 \times 17.03}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{NH_4} \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.06325 \times \Delta A_{NH_4} \quad [\text{g/L}]$$

L-グルタミン濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.34 \times 146.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{GLN} \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.5427 \times \Delta A_{GLN} \quad [\text{g/L}]$$

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。
固体および半固体サンプルを秤量後分析する場合、含有量(g/100g)は、秤量値から以下のように算出されます。

アンモニア含量

$$= \frac{\text{アンモニア濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

L-グルタミン含量

$$= \frac{\text{グルタミン濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

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-Calc*TM を使用することで簡単に計算できます。

B. 分析手順(マイクロプレート法) - MICROPLATE FORMAT -

分析法

波長:	340nm
マイクロプレート	96穴 (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	234μL
直線性	アンモニア 0.04~0.70 μg、L-グルタミン 0.1~4.0 μg (サンプル液量を 10μL とした場合)

ピペットでウェルに添加	アンモニア		L-グルタミン	
	ブランク	サンプル	ブランク	サンプル
溶液1 (緩衝液、pH 4.9)	-	-	20 μL	20 μL
サンプル溶液	-	10 μL [†]	-	10 μL [†]
懸濁液4 (グルタミナーゼ)	-	-	2 μL	2 μL
混合**し、室温で5分反応。次に以下のものを添加:				
蒸留水 (約 25℃)	182 μL	172 μL [†]	160 μL	150 μL [†]
溶液2 (緩衝液、pH 8.0)	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL
溶液3 (NADPH)	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL
混合**し、試薬添加の約4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5 (GIDH)	2 μL*	2 μL*	2 μL*	2 μL*
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 ₃)。 5分後も反応が終了していない場合、1分間の吸光度変化がなくなるまで1分間隔で吸光度を測定する。				

- * 必要に応じ、一連の分析に十分な酵素を蒸留水で 10 倍希釈し、20μL を加えることも可能です。その場合は蒸留水加水量を調整(つまり 18μL ずつ減じる)して、最終液量を合わせます。
- ** 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
- † 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)

光路長を 10mm に調整し、4~5ページに記載の方法で計算することができます。これは、プレートリーダーの自動補正機能を用いるか、マイクロプレート自体の光路長のまま測定し補正します(つまり、アンモニア標準液の「手法」分析と「マイクロプレート法」分析を実施し、それぞれの吸光度変化を用いて換算します)。または、マイクロプレートで検量線を用いれば簡単です。

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

サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

1. サンプル希釈(用手法)

キュベット中に添加される L-グルタミンの量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、1~40 μg の範囲である必要があります。従って試料溶液の濃度が 0.01~0.40 g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 L-グルタミン濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.40	希釈不要	1
	0.40~4.0	1 + 9	10
	4.0~40	1 + 99	100
	> 40	1 + 999	1000

サンプル吸光度 ΔA_{NH_4} 、 ΔA_{GLN} 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 1.60mL (L-グルタミンの場合)、または 1.82mL (アンモニアの場合)となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 1.00mL 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

Carrez 試薬による清澄法は回収率が低いため、本法のサンプル調製には使用できません。代替法として過塩素酸またはトリクロロ酢酸を用います(分析例を参照)。

3. 一般的な注意事項

備考: 以下の注意事項は、食品や飲料などの複雑なサンプルの分析に関するものです。

細胞培養培地/上清の分析には必要ありません。8ページの「サンプル調製例a」を参照して下さい。

- 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。
- 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 7.4 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:** 反応液にGIDH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:** 脂肪を含む試料は、脂肪の融点より高い温度の熱水(例 60°C)で、100mL 容メスフラスコ中で抽出します。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。
- タンパク質を含有する試料:** 等容量の氷冷した 1M 過塩素酸を混合しながら加えて除タンパクします。1,500g で10分間遠心分離し、上清を 1M KOH で中和し上清を適宜希釈して分析に供します。

サンプルの調製例

(a) 細胞培養培地／上清中のアンモニア、L-グルタミンの定量

一般に、液体細胞培養培地／上清中のアンモニア、L-グルタミンの濃度はそのまま測定できます(必要に応じて、遠心分離／ろ過または希釈による清澄化を実施)。

通常、希釈や清澄化は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(b) 粉末栄養補助食品中のアンモニア、L-グルタミンの定量

一般に、医薬品グレードの L-グルタミンなどの栄養補助食品中のアンモニア、L-グルタミンの濃度は、以下のように測定します： 試料の標準的な部分約 5g を 100mL 容メスフラスコに入れます。約 60mL の蒸留水をの追加後、完全に溶解または懸濁するまで攪拌し、定容します。混合し、必要に応じてワットマン No.1 濾紙で濾過します。透明な濾液を必要に応じて希釈表に従って希釈し、分析に供します。通常、医薬品グレードの L-グルタミンの場合、さらに 1 : 100 に希釈し、サンプル量 0.1mL で十分です。

(c) スポーツ栄養品、ベーカリー製品(スナックバーなど)に含まれるアンモニア、L-グルタミンの定量

約 10g の材料をホモジナイズし、100mL メスフラスコに約 2g を精秤します。蒸留水 60mL を加え、60℃で5分間、または完全に懸濁するまで加温します。室温に戻し、蒸留水で定容します(脂肪層が標線の「上」にあり、水層が「標線上」にあることを確認します)。

濾過し、最初の 3～5 mL を廃棄し、濾液を分析に供します。

通常、これ以上希釈する必要はなく、サンプル量 0.1mL で十分です。

(d) 果物および野菜製品／調製品(ジャガイモジュースなど)中のアンモニア、L-グルタミンの定量

材料の平均的な部分約 10g を 100mL 容メジウム瓶に精秤し、1M 過塩素酸を 20mL 加え、Ultra-turrax®または Polytron®ホモジナイザー(または同等品)を使用して2分間ホモジナイズします。50mL 容ガラスビーカーに全量移し、2M KOH にて pH 約 8.0 に調整します。100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します(脂肪層が標線の「上」にあり、水層が「標線上」にあることを確認します)。氷上で20分間保持して過塩素酸カリウムを沈殿させ、脂肪を分離します。濾過して最初の 3～5mL を廃棄し、透明な濾液を分析に供します。

通常、これ以上の希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

文献 - REFERENCES -

Lund, P. (1990). L-Glutamine and L-Glutamate. *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VIII, p. 357-363, 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