

化学発光反応を用いる微量タンパク質のフローインジェクション分析法の改良

塚越 一彦, 紀本 英志, 原 正^{®*}

(1989年1月30日受理)

著者らが開発した微量タンパク質の FIA 法において, 装置を単純化すると共に, 操作法を迅速, 容易かつ簡便化した. 各試溶液の送液には, これまでの窒素ガス圧の代わりに無脈流送液ポンプを使い, 分析装置を極めて簡素化できた. 又各溶液は, 脈流を生じることなく送液され, それぞれの流量は迅速, 正確かつ低流量に調整できた. 化学発光強度の測定にフローセル部及び光電子増倍管部をそれぞれ温度制御できる化学発光検出器を用いることによって, 冷却チューブや恒温槽を使うことなく, 容易に, 安定した化学発光強度を測定できた. 又, 発光試薬 (1,10-フェナントロリン) と金属触媒 {銅(II)} をあらかじめ混合した溶液が使用できることを見だし, 送液流路数を減らすことができた. 本報の FIA 装置を使い, ウシ血清アルブミンを定量濃度範囲 $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$, 検出限界値 250 pg ($S/N = 3$) で測定できた. $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ ウシ血清アルブミンにおける相対標準偏差及び分析速度は, それぞれ 7.4% ($n=5$) 及び毎時 12 試料であった. ウシ血清アルブミンのピーク面積を 1.00 としたとき 9 種類のタンパク質の $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ 濃度における相対ピーク面積は 0.84~1.42 であった.

1 緒 言

著者らは, 化学発光 (CL) 反応に対して触媒活性を示す金属イオン又は金属錯体がタンパク質と共存すると金属-タンパク質錯体を生成し, それら金属種の触媒活性が低下する現象を見いだした. そして, この現象を利用する新しい微量タンパク質の FIA 法を確立した^{1)~3)}. この FIA 法は, 従来の吸光又は蛍光分析によるタンパク質量法と比較し約 $10^2 \sim 10^6$ 倍高感度であり, 分子排除クロマトカラム, 免疫アフィニティークロマトカラム, 又メタルキレートアフィニティークロマトカラムのポストカラム検出器としても利用できた^{4)~6)}.

既報^{1)~3)} の FIA 装置では, 金属触媒存在下で安定な CL 強度を測定するために, 各試薬溶液を窒素ガス圧を利用して脈流を生じることなく送液し, 又温度変化の CL 強度への影響を冷却チューブ及び恒温槽を用いて最小限にとどめた. その結果, 分析装置は, ガスボンベ, 調圧器, ニードルバルブ, フローメーター, 冷却チューブ, 恒温槽などを必要とするため, たいへん大がかりで複雑なものとなった. 更に, 測定を開始するまでに煩雑な操作手順を必要とし, 又各試薬溶液の流量が一定流量

に安定するまでに長時間を要した.

そこで, 今回 1,10-フェナントロリン (phen)-過酸化水素 (H_2O_2)-銅(II) {Cu(II)} CL 反応系を用いる FIA 装置²⁾ において, 各試薬溶液を送液するのに無脈流送液ポンプを, CL 強度の測定に各部の温度制御が可能な CL 検出器を用いて, 分析装置の単純化を種々検討した. その結果, 装置を著しく単純化でき, 操作法も迅速, 容易かつ簡便化できた.

2 実 験

2.1 試 薬

水はイオン交換水を蒸留して用い, 試薬はすべて市販特級品をそのまま使用した. H_2O_2 溶液 (R_1) は, 3.0 wt% H_2O_2 , $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 臭化エチルヘキサデシルジメチルアンモニウム, 及び $2.2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ テトラエチレンペンタミンを含むように調製した. phen-Cu(II) 混合溶液 (R_2) は, $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ phen と $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ Cu(II) を含む NaOH-NaCl 系緩衝溶液 (pH 13.0) として用いた. Cu(II) ストック溶液の調製はビウレット試薬の調製法に準じた. キャリヤー溶液 (R_3) は, NaOH-NaCl 系緩衝溶液 (pH 13.0) を用いた. 各種タンパク質試料溶液は, 各タンパク質を上記緩衝溶液に溶解, 希釈し, 所定濃度になるよ

* 同志社大学工学部化学工学科: 602 京都府京都市上京区烏丸今出川

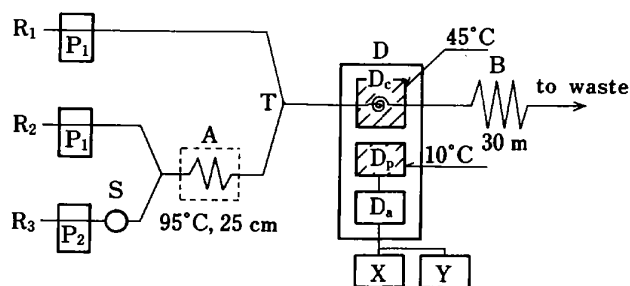


Fig. 1 Schematic diagram of FIA system

R₁: H₂O₂ solution; R₂: phen-Cu(II) solution; R₃: buffer solution; P₁, P₂: pump; S: sample injector (six-way cock and sampling loop); A: reaction tube; B: back pressure coil; D: detector (D_c: flow cell, D_p: photomultiplier, D_a: amplifier), X: recorder; Y: integrator

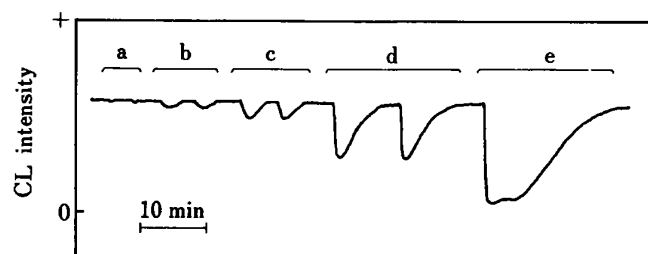


Fig. 2 Flow chart

a: blank value; b: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g dm}^{-3}$; c: $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$; d: $1.0 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$; e: $1.0 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ -bovine serum albumin

うに調製した。

ウシ血清アルブミン, ウシ血清 γ -グロブリン, ヒト血清 γ -グロブリン, オボアルブミン, ヒト α_2 -マクログロブリン, ウサギ IgG, 及びニワトリ卵リゾチームは Sigma Chemical 製を, アポフェリチンは ICN Pharmaceuticals 製を, ヒト血清アルブミンは Chemical Dynamics 製を使用した。

2.2 装置及び分析法

Fig. 1 に, 著者らが開発した FIA 装置の模式図を示した。チューブ及びコネクターはすべてテフロン製であった。試薬溶液 R₁, R₂, 及び R₃ は, 送液ポンプ P₁ (Pharmacia Fine Chemicals; PUMP P-500) 及び送液ポンプ P₂ (東ソー; コンピュータコントロールデュアルポンプ CCPD) を用いて, それぞれ流量 0.05, 0.10, 及び 0.10 ml min^{-1} で送られた。タンパク質試料溶液は, 六方コックとサンプリングループを用いて一定量 50 mm^3 がキャリアー溶液(R₃)の流路に注入された。注入された試料溶液は, phen-Cu(II) 混合溶液(R₂)と混合され, 反応チューブ(A)を通過し, 最後に H₂O₂ 溶液

(R₃)と混合された。その後の溶液の CL 強度を CL 検出器(D)(紀本電子工業; 液相化学発光分析装置 Model-CL-100 L)で測定した。CL 検出器のフローセル部(D_c)及び光電子増倍管部(D_p)は, それぞれ 45°C 及び 10°C に調節した。フローセルは, テフロンチューブ(内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm, 長さ 200 mm)を渦巻き状に巻いたものを使用した。タンパク質試料溶液注入点から T 点までのチューブ及び背圧コイルには内径 0.3 mm のテフロンチューブを, 他は内径 1.0 mm のテフロンチューブを用いた。

タンパク質の定量は, タンパク質試料溶液の注入によってベースライン(タンパク質試料溶液を含まないときの一定 CL 強度)から負に生じるピーク面積を測定することによって行った。

3 結果及び考察

3.1 分析装置の改良

著者らが開発した微量タンパク質の FIA 法では, 各試薬溶液を一定流量で送液し金属触媒存在下で十分安定な CL 強度を得ることが必要である。本報では, 各試薬溶液を送液するのに既報²⁾で利用した窒素ガス圧のかわりに, 無脈流送液ポンプ(P₁及びP₂)を用いた。その結果, ガスボンベ, 調圧器, ニードルバルブ, フローメーターなどを必要としない極めて単純化された分析装置を作製できた。各試薬溶液の流量は, 送液ポンプの流速制御機能によって迅速かつ正確に調整できた。又ガス圧使用時には, 流量を 1.0 ml min^{-1} 以下に設定するのが困難であったが, 送液ポンプの使用によって低流量調節が可能となった。ここでは, 将来本 FIA 装置を微量タンパク質の分離カラムに接続することを考え, キャリヤー溶液の流量を 0.10 ml min^{-1} に設定した。

一般に, CL 強度の測定には室温及び試料の液温が影響することが知られている。本装置では, フローセル部(D_c)及び光電子増倍管部(D_p)の温度制御が可能な CL 検出器(D)を使用しているので既報²⁾の冷却チューブや恒温槽を用いることなく, 安定した CL 強度を容易に測定できた。又, 背圧コイル(B)を用いることによって送液中の気泡発生を防いだ。

既報²⁾の送液流路は, H₂O₂ 溶液, phen 溶液, Cu(II) 溶液, 及びキャリアー溶液の 4 流路であった。今回, phen 溶液と Cu(II) 溶液もあらかじめ混合した溶液が使用できることを見だし, 送液流路数を 3 流路に減らすことができた。その結果, 装置はより単純化され, 又タンパク質試料の希釈も低減できた。

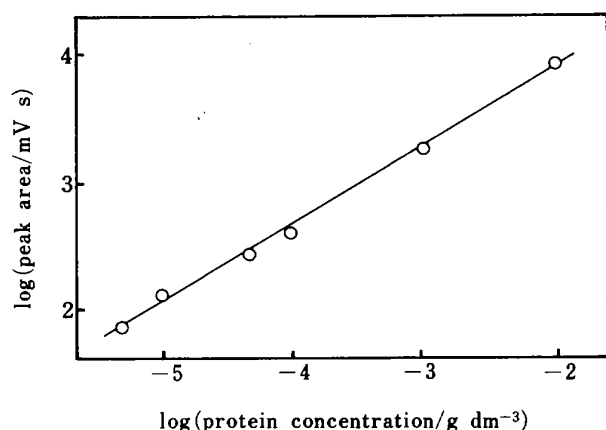


Fig. 3 Calibration curve for protein

Bovine serum albumin was used.

3・2 検量線

本 FIA 装置を用いてウシ血清アルブミンを測定したときのフローチャート及び検量線を、それぞれ Fig. 2 及び Fig. 3 に示した。ウシ血清アルブミンの定量濃度範囲は $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ 、検出限界値は 250 pg ($S/N=3$) であった。本 FIA 装置は、既報²⁾と同じ検出感度でタンパク質を定量できた。又 $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ ウシ血清アルブミンにおける相対標準偏差は 7.4% ($n=5$) で、分析速度は毎時 12 試料であった。

3・3 他のタンパク質 FIA 法との比較

近年、クマシーブリリアントブルーを用いる色素結合法⁷⁾、酸化ニッケル電極を用いる電極法⁸⁾、ビジニコチン酸を用いる分光光度法⁹⁾、Lowry 法¹⁰⁾などに基づいたタンパク質の各種 FIA 法が報告されている。本報とこれらとの比較を Table 1 に示した。本法は、検出限界値及び定量濃度範囲において非常に優れていることが分かった。

3・4 各種タンパク質の相対ピーク面積の比較

9 種類のタンパク質を本 FIA 装置で測定し、得られたピーク面積を比較した。ピーク面積は、ウシ血清アルブミンのピーク面積を 1.00 とした相対ピーク面積で表した (Table 2)。測定は、これまでの通常法では測定が不可能か又は困難な低濃度 ($1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$) タンパク質試料溶液を用いて行った。9 種類のタンパク質の相対ピーク面積は 0.84~1.42 であり、タンパク質間の差は比較的小さかった。

本研究は、昭和 63 年度科学研究費補助金交付によるものである。

Table 1 Comparison of the present method with the other FIA methods

Method	Detection limit [†] / ng	Determination range/ g dm^{-3}	Sampling volume/ mm^3
Present	0.25	$5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	50
Dyestuff-binding	40	$2.0 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-1}$	20
Electrode	120	$1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-1}$	40
Spectrophotometry	1000	$1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0$	10
Lowry	1000	$5.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	100

[†] As bovine serum albumin

Table 2 Relative peak area of proteins

Protein	Relative peak area
Apoferritin	1.36
Bovine serum albumin	1.00
Bovine serum γ -globulin	1.05
Human serum albumin	0.84
Human serum γ -globulin	0.95
Lysozyme	1.42
α_2 -Macroglobulin	0.84
Ovalbumin	0.89
Rabbit IgG	0.84

Each $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ protein solution was measured.

文 献

- 1) T. Hara, M. Toriyama, K. Tsukagoshi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1551 (1984).
- 2) T. Hara, T. Ebuchi, A. Arai, M. Imaki: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 1833 (1986).
- 3) T. Hara, K. Nakatsu, A. Arai, T. Yoshida, K. Tsukagoshi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2996 (1988).
- 4) T. Hara, M. Toriyama, T. Ebuchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 109 (1985).
- 5) T. Hara, K. Tsukagoshi, A. Arai, T. Iharada: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 301 (1988).
- 6) T. Hara, K. Tsukagoshi, T. Yoshida: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2779 (1988).
- 7) 首藤貴子, 古賀 実, 田中勇武, 秋山 高, 伊規須英輝: *分析化学*, **36**, 256 (1987).
- 8) C. J. Yaun, C. O. Huber: *Anal. Chem.*, **57**, 180 (1985).
- 9) L. C. Davis, G. A. Radke: *Anal. Biochem.*, **161**, 152 (1987).
- 10) R. A. Salerno, C. Odell, N. Cyanovich, B. P. Bubnis, W. Morges, A. Gray: *Anal. Biochem.*, **151**, 309 (1985).

☆

Improvement in FIA system for determining small amounts of proteins with chemiluminescence de-

tection. Kazuhiko TSUKAGOSHI, Hideshi KIMOTO and Tadashi HARA. (Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Doshisha University, Karasuma Imadegawa, Kamigyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 602)

The FIA of protein has been established by the authors by lowering the catalytic activity of the metal ion for the chemiluminescence reaction in the presence of protein. In the present study, the method was remarkably improved by simplifying the system and the measurement procedures by the combined use of irregular pulse-free pumps and a temperature-controlled chemiluminescence detector. According to the present improved method, bovine serum albumin could be easily

and rapidly determined in the concentration range of $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$, with a detection limit of 250 pg (injected sample volume 50 mm^3 , $S/N = 3$). The relative peak areas of nine kinds of proteins at $1.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ concentration were 0.84~1.42 relative to the peak area (1.00) of bovine serum albumin at the same concentration.

(Received January 30, 1989)

Keyword phrases

FIA of proteins; improvement in flow-injection system with chemiluminescence detection.