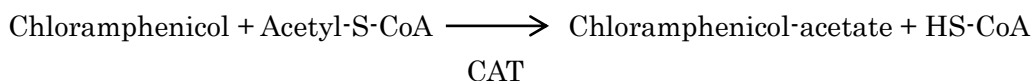


<CAT 活性定量を用いた CAT 合成量定量法の原理>



クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)はクロラムフェニコール(Cm)にアセチルコエンザイム A (AcCoA)のアセチル基を転移する酵素です。この反応の結果生じた HS-CoA の量より CAT タンパク質の活性を定量します。HS-CoA はエルマン試薬(Ellman's reagent, DTNB)を用いて発色定量します。(参考文献 1)

<材料>

分光光度計 (412 nm の吸光度が測定できるもの)

ウォーターバス (37°C)

1.25 M Tris-HCl pH 7.8

4 mg/mL DTNB (要時調製、使い切る量を 1 M Tris-HCl pH 7.8 で溶解)

5 mM Acetyl CoA (AcCoA) (100~500  $\mu$ L 程度に分注して-80°C保存、毎回使い切る)

5 mM Chloramphenicol (Cm) (50% v/v Ethanol で溶解し、-20°C保存)

Polyethylene glycol 8000 (PEG8000)

80% w/v Glycerol

50 mM Dithiothreitol (DTT) (50  $\mu$ L に分注して-20°C保存、毎回使い切る)

#### (10x) CAT dilution buffer stock solution (-DTT)

試薬	終濃度	分量
1.25 M Tris-HCl pH 7.8	1 M	80 mL
PEG 8000	1 % w/v	1 g
80% w/v Glycerol	10 %	12.5 mL
超純水		Fill up
合計		100 mL

※4°Cで長期保存可能。

#### CAT dilution buffer

試薬	終濃度	分量
(10x) CAT dilution buffer stock solution (-DTT)	100mM Tris-HCl pH 7.8 0.1% PEG 1% glycerol	1 mL
50 mM DTT	0.05 mM DTT	10 $\mu$ L
超純水		Fill up

合計	10 mL
----	-------

※要時調製、使い切る。

### Coloring reagent

試薬	終濃度	分量
4 mg/mL DTNB in 1 M Tris-HCl pH 7.8	0.4 mg/mL	1 mL
5 mM AcCoA	0.1 mM	0.2 mL
超純水		8.6 mL
5 mM Cm in 50% Ethanol	0.1 mM	0.2 mL
合計		10 mL

※要時調製、室温保存、使い切る。

#### <実験手順>

- 1 CAT dilution buffer と Coloring reagent を調製します。
- 2 無細胞くんを用いて調製した CAT 合成反応液を CAT dilution buffer で 3 段階希釈します。まず、CAT dilution buffer を下表のように分注し、分注液は氷上で冷やしておきます。次いで無細胞くん反応液を逐次希釈します。

#### 無細胞くん Quick (バッチ法) の場合 (1000 倍希釈)

希釈段階	希釈元水溶液	CAT dilution buffer
第 1 希釈	Quick 反応液 10 $\mu$ L	90 $\mu$ L
第 2 希釈	第 1 希釈液 10 $\mu$ L	90 $\mu$ L
第 3 希釈	第 2 希釈液 10 $\mu$ L	90 $\mu$ L

#### 無細胞くん SI (透析法) の場合 (5000 倍希釈)

希釈段階	希釈元水溶液	CAT dilution buffer
第 1 希釈	SI 反応液 10 $\mu$ L	490 $\mu$ L
第 2 希釈	第 1 希釈液 10 $\mu$ L	90 $\mu$ L
第 3 希釈	第 2 希釈液 10 $\mu$ L	90 $\mu$ L

※希釈液の CAT は放置すると徐々に活性が低下します。速やかに次の発色工程に進めてください。

- 3 Coloring reagent 400  $\mu$  L をチューブに分注しておきます。2. で調製した CAT 希釈液 3  $\mu$  L を発色液に加えます。ブランクサンプルとして CAT dilution buffer 3  $\mu$  L を発色液に加えたものを用います。
- 4 直ちに 37 度のウォーターバスで 30 分の発色反応を行います。

※多数のサンプルを測定する場合、時間差をつけて 37°C のインキュベーションを開始することでサンプル間でインキュベーション開始から吸光度測定までの時間をできるかぎりそろえてください。

- 5 直ちに分光光度計にて波長 412 nm の吸光度 ( $A_{412}$ ,  $A_{412 \text{ blk}}$ ) を測定します。
- 6 下記手順にて CAT 合成量を計算します。もしくは、弊社サイトにて CAT 合成量計算シート (リンク) を公開しています。 $A_{412}$ ,  $A_{412 \text{ blk}}$  を入力することで計算できますのでご利用ください。

**発色液中の CAT 活性：**

$$\text{CAT [U/mL]} = (A_{412} - A_{412 \text{ blk}}) \times 1000 \times 1000 / \epsilon_{412} / L / T$$

**発色液中における CAT 濃度：**

$$\text{CAT} [\mu \text{ g/mL assay mix}] = \text{CAT [U/mL]} / \alpha$$

**無細胞くん反応液中における CAT 合成量：**

$$\text{CAT} [\mu \text{ g/mL reaction mix}] = \text{CAT} [\mu \text{ g/mL assay mix}] / S \times V \times D$$

$A_{412}$ :	サンプルの吸光度
$A_{412 \text{ blk}}$ :	ブランクサンプルの吸光度
$\epsilon_{412} [\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}]$ :	DTNB が還元されて生じる TNB のモル吸光係数 ( $13,600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) (参考文献 1)
L [cm] :	分光計のセルの光路長 (1 cm)
T [min] :	発色反応の時間 (30 min)
$\alpha$ [U/ $\mu$ g] :	CAT タンパク質の非活性 ( $150 \text{ U}/\mu \text{ g}$ ) (参考文献 1)
V [ $\mu$ L] :	発色液の液量 ( $400 \mu \text{ L}$ )
S [ $\mu$ L] :	発色に用いた希釈サンプルの液量 ( $3 \mu \text{ L}$ )
D :	サンプルの希釈率 (Quick の場合は 1000、SI の場合は 5000)

(参考文献 1) W. V. Shaw. (1975), *Methods Enzymol.*, 43, 737-755