

酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット操作説明書

1. 用意する器具、機器、試薬

		仕様	数
1	秤	10 g 測定用	1
2	シャーレ		試料数 × 1
3	三角フラスコ	150 mL 程度	試料数 × 2
4	ろ紙	No. 2	試料数 × 1
5	漏斗		試料数 × 1
6	メスシリンダー	50 mL 測定用	1
7	試験管		試料数 × 4 + 4
8	試験管たて		1
9	マイクロピペット	0.1~1mL 可変式のもの	1
10	マイクロピペット	1~5 mL 可変式のもの	1
11	分光光度計	測定波長 (460 nm)	1
12	恒温槽	使用温度 (37 °C)	1
13	試験管ミキサー		1
13	抽出用緩衝液	0.5 % NaCl ・ 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)	
15	希釈液 (*)	0.5 % NaCl ・ 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)	
16	蒸留水		

(*) 希釈液は、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) または、蒸留水でも代用可能です。

その他

- 1 試薬保存用冷蔵庫
- 2 ストップウォッチまたは、タイマー
- 3 酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット

2. 主な機器の説明

恒温槽



恒温槽は、反応液の温度を一定に保つための装置です。キットでは 37°C にて使用します。

マイクロピペット



マイクロピペットは、試料や試薬を一定量採取するために使用します。プラスチック製のチップを先端に取り付けて利用します。

* ガラス製のピペットは誤って液を吸い込む恐れがあるので使用しないでください。

分光光度計



分光光度計は色の濃さを測定する器械です。各メーカーにより、様々なタイプのものがあります。

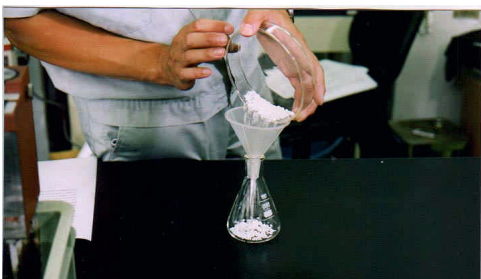
キットでは、460nm の波長の光を測定できる機器を使用します。

3. 米麴抽出方法

(第 4 回改正 国税庁所定分析法注解より)



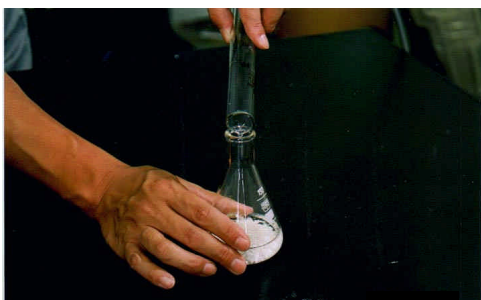
- ①米麴を 10 g 用意します。
(米麴抽出液の作製方法は第 4 回改正
国税庁所定分析法注解に従っています。)



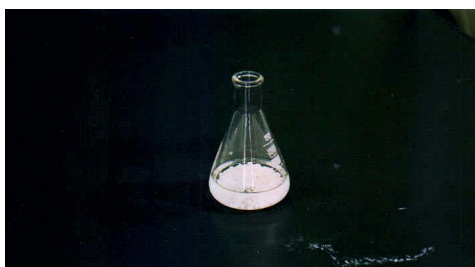
- ②三角フラスコ(150 mL 程度)に米麴
10 g を入れます。



- ③三角フラスコに米麴を入れた状態。



- ④ここに抽出用緩衝液を 50 mL 入れま
す。
※緩衝液は、0.5%の NaCl を含む 10 mM
酢酸緩衝液(pH 5.0)を用います。



⑤抽出は、(1)室温(15–20℃)で3時間と
きどき振りまぜながら行う方法、(2)5℃以
下で一夜放置して行う方法、の2とおりが
あります。



⑥抽出後、ろ紙を用いて濾過し、抽出液を
得ます。

【作業終了後の注意】

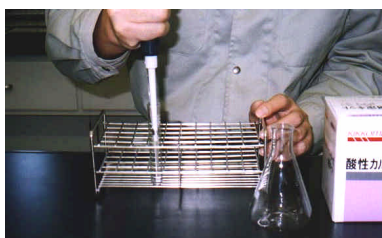


- (1) 使用後の器具を洗浄する際は、手袋を使用して下さい。
- (2) 排水後は、配水管に残留しないように十分量の水で洗い流して下さい。
- (3) キットに含まれる試薬溶液、反応液試薬溶液を口に入れたり、直接手で触れたりしないで下さい。
- (4) 食品類への混入がないよう充分ご注意下さい。排水排出の際は、地下水及び上水道へ混入しないよう注意して下さい。

4. 測定方法



①酸性カルボキシペプチダーゼ測定キットには「基質溶液」、「反応停止液」、「定量用酵素液」、「定量用発色液」、「標準液」が入っています。



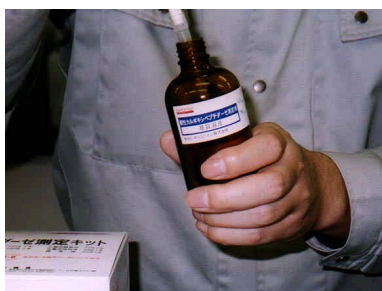
②米麴の抽出液をピペットで 0.1mL とります。



③希釈液を 0.4mL 加えて 5 倍に希釈します。



④希釈した抽出液をよく攪拌します。これを測定用の試料とします。



⑤試験管を 8 本用意します。

⑥恒温槽に入れ 37°C で約 5 分間加温します。

写真のようなストップウォッチやタイマーを利用して時間を計って下さい。



⑦約 5 分加温したら、8 本の試験管のうち
3 本に試料を 0.1mL ずつ入れます。
5 本はそのまま加温します。



⑧よく攪拌します。



⑨攪拌後、37°Cで**正確に 10 分間**加温しま
す。



⑩ピペットで反応停止液を 2mL とります。
正確に 10 分経過したら反応停止液を全て
(8 本)の試験管に入れます。



⑪ピペットで標準液を 0.1mL とり、⑦で試料を入れなかった試験管のうち、3本の試験管に入れます。

残り1本には、検体ブランクとして、試料液 0.1mL を試験管に加えます。もう1本は、発色ブランクとして、蒸留水 0.1mL を試験管に加えます。



⑫ピペットで定量用酵素液を 0.1mL ずつ全ての試験管に入れます。



⑬約 20 分経過したらピペットで定量用発色液を 0.1mL ずつ全ての試験管に入れます。



⑭約 10 分経過したら、分光光度計を用いて橙色の濃さを測定します。



⑩セル(ガラスまたはプラスチック製の測定専用容器)に橙色に着色した反応液を入れます。分光光度計を用いて橙色の濃さ(460 nmの吸光度)を測定します。



⑪分光光度計のパネルに表示された数値を読み取ります。

(機械パネル表示のうち、上の数値が測定波長 460 nm を、下の数値が吸光度(色の濃さ)を示しています)

ここで得られた結果を使い活性値を求めます。

なお、得られた酸性カルボキシペプチダーゼ活性は取扱説明書P 2 記載の通り、所定法の値に簡単に換算することができます。