

抽出

試薬

- ・抽出液：0.1M Tris-HCl (pH8.0) with 0.5M sucrose and 1mM DTT
- ・0.1 M PMSF メタノール溶液

方法

約200mgFWの根端または葉を1mLの冷抽出液を用いて氷上の乳鉢でペースト状になるまで粉碎。石英砂を少量加え。[ペースト状にした後、PMSF (0.1M in methanol) を10 μ L加えたほうがいい]

ペーストをエッペンチューブに移し、4度、10000gで10分遠心。上澄みを回収→粗酵素液(測定前に要フィルター過)

CS活性の測定→本法では *Melastoma* のCSは測定不可

試薬

- ・1M Tris-HCl (pH8.0)
- ・0.1M Tris-HCl (pH8.0)
- ・1mM DTNB：19.5mgのDTNBを50mLの1M Tris-HClに溶かす。(直前に作成)
- ・10mM Acetyl-CoA (809.6)：25mgのAcetyl-CoAを3mLの水に溶かす。(直前に作成)
- ・10mM Oxalacetic acid：4mgのOAAを3mLの0.1M Tris-HClに溶かす。(直前に作成)

方法

セル容量の少ない場合：セルに0.1mLのDTNB溶液、0.03mLのAcetyl-CoA溶液、0.05mLの粗酵素溶液を加え、0.77mLの水を加える。Acetyl-CoA deacylase活性の測定のため、412nmにおける3分間の吸光度変化を見る。その後、0.05mLのオキサロ酢酸溶液を加え、反応を開始する。直線的な反応は3分は持続する。【3mLのAcetyl-CoAで100本測定可能】

セル容量の多い場合：セルに0.25mLのDTNB溶液、0.075mLのAcetyl-CoA溶液、0.125mLの粗酵素溶液を加え、1.925mLの水を加える。Acetyl-CoA deacylase活性の測定のため、412nmにおける3分間の吸光度変化を見る。その後、0.125mLのオキサロ酢酸溶液を加え、反応を開始する。直線的な反応は3分は持続する。【3mLのAcetyl-CoAで40本測定可能】

基質を加える前に、吸光度を安定化させるか、ブランク(基質の代わりにバッファーのみを加える)も同時に測る。

(注意) DTTもDTNBと反応するため、注意が必要。DTT量以下の量のDTNBだとダメのようだ。この理由からか、Hayes & Ma (2003)はDTTを抽出時に入れていないようだ。

DTNB は時間と共に分解して黄色くなる。試薬作成は測定直前で。

計算

3分における濃度変化=吸光度/13600 [mol/L]となる。根重あたりとタンパクあたりで活性を出す。タンパクの測定はブラッドフォードで。

CS 活性の測定 (別法、Watt&Evans, 1999) →Melastoma の場合はこれで

試薬

・反応溶液：100mM トリエタノールアミン、3.5mM リンゴ酸 (L型) を作成、pH8.5 に合わせておく。0.3mM 分の 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (酸化型) を添加し、15unit/mL になるように MDH を添加する (全て混合するのは良くないような気がする。少なくとも MDH はセル内で混合したほうがいいのではないか→全部混合してても結局うまくいった)。

・10mM Acetyl-CoA (以前に作った溶液を凍結しておいたやつを使ったが問題なし)

・100mM トリエタノールアミン：1.33mL を水 80mL に加え、1N HCl で pH あわせる。

下のリンゴ酸を入れてからの方がよいが。100mL にメスアップ

・リンゴ酸：47mg を上記 100mL に溶かす。60mL なら 28mg

・MDH：10000U/mL (5000U/mL) の場合、0.15mL を上記 100mL に。60mL なら 0.09mL

・APAD+：22mg を上記 100mL に。60mL なら 13mg

・10mM Acetyl-CoA (809.6)：25mg の Acetyl-CoA を 3mL の水に溶かす。(直前に作成、冷凍保存もある程度可のようだ)

方法

100 μ L の酵素サンプル溶液に 2.0mL の反応溶液をセルに加え、365nm の吸高度が安定するのを待つ (15分ぐらい)。待っている間 (セルに調整し始めてから 5分後ぐらいに) 2mL エッペンに次のサンプル溶液と反応溶液を入れ、次の準備もしておく。その後、15 μ L の Acetyl-CoA 溶液を添加し、反応を開始する。反応開始直後は吸光度の上昇は緩やかなので、少したってからのほうがいいかもしれない。2分間 (または 3分間) の 365nm の吸光度上昇を読む。AcPyAD+ → AcPyADH で吸光度上昇があるようだ。AcPyADH のモル吸光係数 (363nm) は 9100。反応は 25°C で。

・トリエタノールアミン 分子量 149.19、比重 1.12g/mL (20°C) (100mL なら 1.33mL 必要)

・リンゴ酸 分子量 134.09 (100mL なら 47mg 必要)

・MDH 10000 u/ml (100mL なら 0.15mL 必要)

・APAD+ 91.6%、分子量 662.44 (100mL なら 22mg 必要)

実際は、1.33mLのトリエタノールアミン、47mgのリンゴ酸を水に溶かし(<100mL)、pHを8.5に(前日までに作成してOK)。当日に0.15mLのMDH、22mgのAPAD+を加えて反応液完成。

タンパク濃度は上記と同様に測定。無くても根FWあたりで計算してよい。

参考

Hayes & Maの方法による他の酵素の測定(改)

PEPC

0.2 mLの抽出液を1.5mLの100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.2mM NADH、5mM MgCl₂、1mM G-6-P、2U MDHに加える。12.5mM PEP in 50mM Tris-HCl (pH8.0)を0.3mL加え、反応開始する。340nmの2分間の吸光度変化から活性を算出する。

MDH

50倍希釈した(?)抽出液100 μ Lを1.5mLの100mM Tris-HCl(pH8.0)、0.2mM NADH、0.5mM EDTA溶液に加え、0.3mLの5mM OAAを加え、反応開始する。340nmの2分間の吸光度変化から活性を算出する。

NADP-ICDHもあるけど、また今度