

# D-セリン定量キット (比色法)

2019年2月14日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。

アミノ酸の光学異性体の一つである「L-アミノ酸」は、タンパク質を構築するほかシグナル分子等としても重要な生理的役割を担っています。一方、もう一つの光学異性体である「D-アミノ酸」については、細菌の細胞壁ペプチドグリカンの構成成分など極わずかな例を除けば生理作用は知られておらず、特に真核生物での役割は存在しないものと考えられていました。しかし近年の分析技術の進展により、哺乳類をはじめとする真核生物にも D-セリンや D-アスパラギン酸、D-アラニンなど様々な遊離 D-アミノ酸が存在し、これらが特定の生理機能を有することが明らかにされてきました。

その一つである「D-セリン」は、脳内に遊離の状態で存在し、記憶や学習など脳の高次機能に関わる N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体のコアゴニストとして作用します。そのため、D-セリンの動態は様々な神経疾患と関連することが示唆されています。例えばアルツハイマー病患者の血液や筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の脊髄中の D-セリン濃度は、健常者と比べて有意な差があると報告されています。また生理的意義は未だ解明されていませんが、尿中にも高濃度の D-セリンが含まれていることが知られています。

D-アミノ酸の定量は、従来ジアステレオマーへ誘導体化した後に高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーで分析するのが一般的でした。しかし、これらの方法は高価な機器類と煩雑な操作を必要とするため、多検体の同時解析を行うのに適したものではありませんでした。

本製品は、名古屋大学大学院 吉村教授らによって同定された D-セリンに特異的に作用する新規酵素 D-Serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae* (DsdSC)を使用して、尿サンプル等を対象に比色法にて簡便に D-セリンを定量するキットです。

この測定方法の特徴は以下の通りです。

- ・酵素反応による測定法のため、マイクロプレートリーダー(波長 340nm)で測定可能。
- ・多検体を同時に定量することが可能。
- ・0.01mM~1mM の範囲内で D-セリンを定量できる。

本製品は、名古屋大学大学院 生命農学研究科 吉村教授からのライセンス品です。

## 測定原理

D-セリンは、D-Serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae* (DsdSC)によってピルビン酸を産生します。産生されたピルビン酸を Lactate dehydrogenase (LDH)によって乳酸へと変換し、その反応で NADH が酸化して NAD に変化します。NADH の減少を波長 340nm における吸光度の低下を測定し、検量線から D-セリン濃度を求めます。

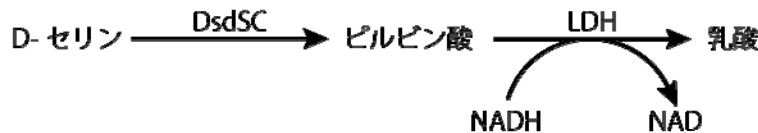


図1. 測定原理

## 測定対象試料

- ・尿

## 《 I. キット構成 》

内 容	容量	本数	保存温度	危険表記および取扱上の注意
緩衝液 ( Assay Buffer )	11 mL	2 本	-20°C (遮光保存)	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
LDH 希釈液 ( LDH Diluent Buffer )	3 mL	2 本		
10mM D-セリン ( 10mM D-Serine Solution )	2 mL	2 本		
NADH 溶液 ※緑キャップ	200 μL	2 本		
DsdSC 溶液 ※赤キャップ	110 μL	1 本		
LDH 原液 ※青キャップ	220 μL	1 本		
マイクロプレート	96 ウェル	1 枚	常温	-

※本キットで 50 検体を測定することができます。

※波長 340nm および 40D まで測定できるマイクロプレートリーダーが必要です。

※マイクロプレートは、greiner bio-one 社製 code No.655801 です(2015 年 12 月にプレートタイプを変更しました)。

※DsdSC: D-Serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*

## 《 II. 尿サンプルの調製 前処理 》

尿は希釈せずに原液を冷却遠心(10,000 x g, 5 分間)して上清を回収し、回収した上清を《IV. 測定方法》の試料とします。尿の保管は、短期間は冷蔵、長期間は-20°Cで遮光保管してください。

## 《 III. 各溶液の調製 》

使用する前に融解し、よく混合してください。

融解した各溶液は、使用するまで氷上で遮光保管してください。

使用後の各溶液は、-20°Cに再凍結してください。

### 標準液の調製

・標準液は、10mM D-セリンを超純水で希釈します。

・0mM D-セリンから 1mM D-セリンの範囲内で複数の濃度の標準液を用意します(用時調製)。

### 反応液 A の調製

・1 反応あたり反応液 A は 160 μL 使用します

・10 反応分の反応液 A の調製は、下表のように混合してください(用時調製、使用時まで遮光下で氷上保管)。

緩衝液	2,000 μL
NADH 溶液 ※チューブのキャップは緑色	30 μL
DsdSC 溶液 ※チューブのキャップは赤色	20 μL

※DsdSC 溶液および NADH 溶液のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※調製後の反応液 A は、溶液が均一になるように混合して下さい。

### 反応液 B の調製

・1 反応あたり反応液 B は 160 μL 使用します

・10 検体分の反応液 B の調製は、下表のように混合してください(用時調製、使用時まで遮光下で氷上保管)。

緩衝液	2,000 μL
NADH 溶液 ※チューブのキャップは緑色	30 μL

※NADH 溶液のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※調製後の反応液 B は、溶液が均一になるように混合して下さい。

## LDH 溶液の調製

- ・1 反応あたり LDH 溶液は 10  $\mu$ L 使用します。
- ・10 反応分の LDH 溶液の調製は、下表のように混合してください(用時調製、使用時まで遮光下で氷上保管)。

LDH 希釈液	500 $\mu$ L
LDH 原液 ※チューブのキャップは青色	20 $\mu$ L

※LDH 溶液のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。  
※調製後の LDH 溶液は、溶液が均一になるように混合して下さい。

## 《IV. 測定方法》

測定をおこなう前に下記の注意事項を読んでください。

- ・壁面に試薬が付着した状態で操作を続けた場合、測定結果に大きな誤差が生じますのでご注意ください。
- ・溶液の添加後および測定前は、マイクロプレートミキサー等で十分に混合してください。

下記の液量は 1 ウェルあたりの添加量を記載しています。

- (1) 標準液または試料 80  $\mu$ L に**反応液 A** 160  $\mu$ L を十分に混合してください。  
試料blankとして試料 80  $\mu$ L に**反応液 B** 160  $\mu$ L を混合してください(試料ごとに試料blankを調製してください)。
- (2) 37°Cで 45 分間保温してください。  
※この間に LDH 溶液を調製してください。
- (3) マイクロプレートミキサー等で十分に混合後、ウェル底面に汚れ、溶液中に気泡がないことを確認し、マイクロプレートリーダーを使用して波長 340nm における吸光度(S1、A1、B1)を測定してください。
- (4) 全てのウェルに LDH 溶液を 10  $\mu$ L 加えて、十分に混合してください。
- (5) 37°Cで 45 分間保温してください。
- (6) マイクロプレートミキサー等で十分に混合後、ウェル底面に汚れ、溶液中に気泡がないことを確認し、マイクロプレートリーダーを使用して波長 340nm における吸光度(S2、A2、B2)を測定してください。

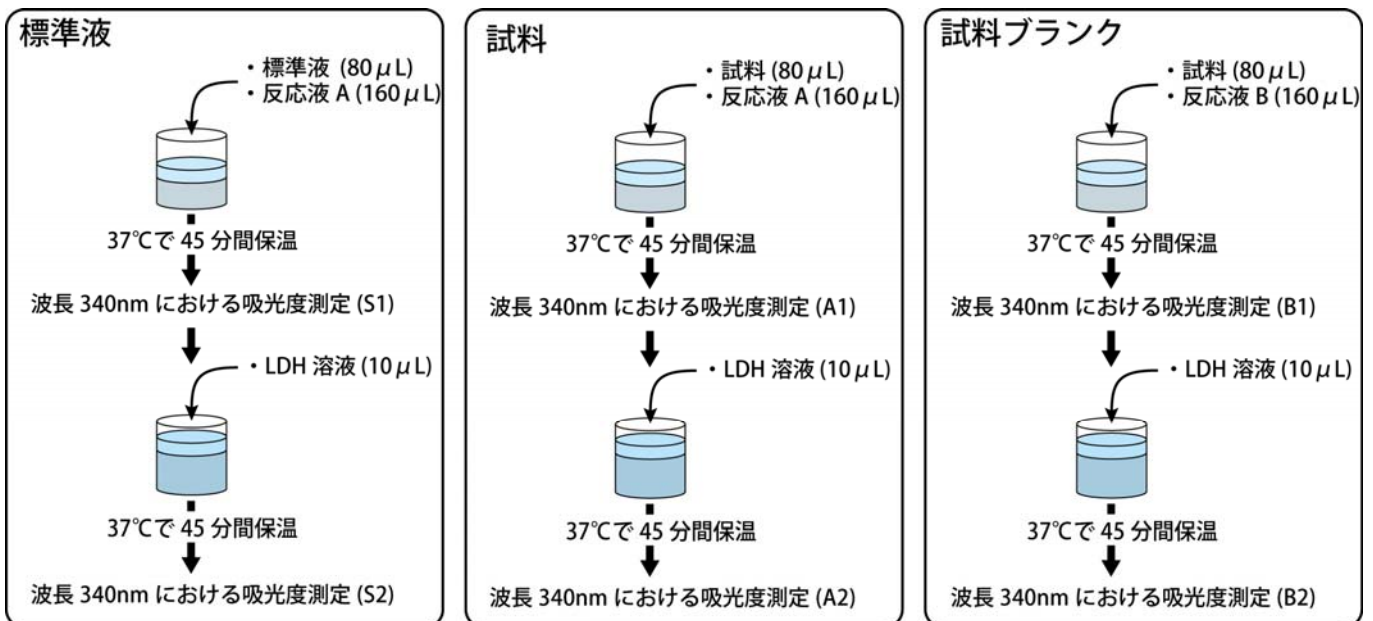


図 2. 測定操作

## 《V. D-セリン濃度の算出》

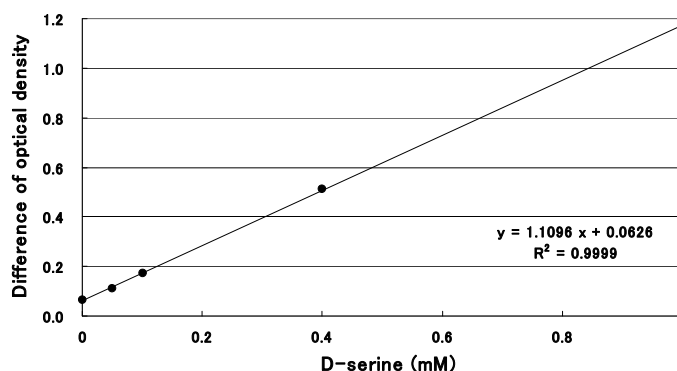
※下記の検量線は一例です。測定ごとに検量線を作成してください。

検量線は、表1の各標準液の吸光度の差(S1-S2)の値から図3のように作成します。

表1. 標準液での吸光度値

D-セリン濃度 (mM)	吸光度 (S1)	吸光度 (S2)	S1-S2
0	2.040	1.974	0.066
0.05	2.027	1.916	0.111
0.1	2.040	1.867	0.173
0.4	2.049	1.536	0.513
1	2.027	0.857	1.170

図3. 検量線



試料中のD-セリン濃度は、(A1-A2)-(B1-B2)の値を検量線に当てはめ、濃度を計算してください。

表2の測定値では、(A1-A2)-(B1-B2) = 0.281 となり、図3の検量線から試料中にD-セリンが0.197mM含まれています。

表2. 試料での吸光度値

	吸光度 (A1)	吸光度 (A2)
試料	2.602	2.211

	吸光度 (B1)	吸光度 (B2)
試料ブランク	2.678	2.568

## 《VI. 参考文献》

(1) Tomokazu Ito, Kei Takahashi, Tomoko Naka, Hisashi Hemmi, Tohru Yoshimura (2007)  
Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*  
Anal.Biochem., 371, 167-172.

(2) Tomokazu Ito, Hisashi Hemmi, Kunishige Kataoka, Yukio Mukai and Tohru Yoshimura(2008)  
A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*.  
Biochem J., 409, 399-406.



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620