

ルミノール-過酸化水素-ペルオキシダーゼ化学発光に及ぼすコスモトロピック効果

(一般社団法人 京都光科学研究所) ○柄谷 肇

Kosmotropic Effect on the Luminol-H₂O₂-Peroxidase Chemiluminescence (*Kyoto Luminous Science Laboratory*) ○Hajime Karatani

With the aim of applying to chemiluminescence enzyme immunoassay, the effect of kosmotropic ions on the chemiluminescence of luminol-hydrogen peroxide-horse radish peroxidase (HRP) has been studied. In a series of experiments, it has been found that the chemiluminescence is markedly intensified in the presence of high concentrations of ammonium sulfate as a kosmotropic salt. When its concentration was around 3.2 M and the pH was adjusted to 8.5 – 9 with proper alkaline reagent, sub-pM level of HRP was successfully determined. As is well known, the structure of water molecules is highly ordered in the presence of high concentrations of ammonium sulfate. This is possibly responsible for the intensification of chemiluminescence.

Keywords : Chemiluminescence; Luminol; Kosmotropic Ion, Ammonium Sulfate; Peroxidase

水溶液中において水の構造形成と関連するコスモトロピックイオンの効果¹⁾を応用することによって、標識酵素として汎用性が高い西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を触媒とするルミノール化学発光の強度が増大することを報告した²⁾。今回、さらなる発光強度の増大を目指すと共に、反応メカニズムにおける同効果について検討を進めた。コスモトロピック塩として、硫酸アンモニウムを用いた。実験では硫酸アンモニウムを適当な緩衝液に溶解し、6 M 水酸化ナトリウムで pH を 9 付近に調整した。この高濃度硫酸アンモニウム溶液に、ルミノールの水酸化ナトリウム溶液を添加し、ルミノール溶液 (5 mM) とした。ルミノール溶液は使用日毎に調製した。他方、H₂O₂ は、EDTA (2 mM) を溶解した高濃度硫酸アンモニウム溶液で希釈し、これを H₂O₂ 溶液 (~200 mM) とした。HRP ストック (sub-mM) はトリス緩衝液などを用いて調製し、使用時に pH を 7.5 付近に調整した高濃度硫酸アンモニウム溶液で希釈した。化学発光は、先ず 2 μ L の HRP 希釈液をマイクロセルに正確に取り、さらにルミノール溶液と H₂O₂ 溶液を等量ずつ混和した溶液 1 mL (pH 8.5~9) をセルに注入し、反応を開始した。その後、時間を変数として発光スペクトルを収集した。一連の実験から、反応溶液中の硫酸アンモニウム濃度を 3.2 M 近傍とすることにより発光は特に強められること、また sub-pM レベルの HRP を再現性よく定量できることが分かった。コスモトロピック効果は HRP の活性にも及ぶが、主に本化学発光系の反応メカニズム後半の非酵素反応過程を促進し、結果的に発光強度が増大したものと考えられる。

1) Effect of ions on the structure of water: structure making and breaking, Y. Marcus, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1346.

2) Luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence intensification by kosmotrope ammonium sulfate. H. Karatani, *Anal. Sci.* **2022**, *38*, 613.