

- SulfoBiotics - Sulfide dibimane

- SulfoBiotics - Sulfide dibimane(S34)

Technical Manual

はじめに

近年、硫化水素 (H₂S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く重要なシグナル分子として注目されています。硫化水素は、NO や CO と同様にガス状分子として認知されていますが、その pKa は約 7 であり生理的 pH では 80% 程度が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは、生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細に関して未だ不明であり硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています。

Monobromobimane を用いた分析法は、最も高感度で汎用性の高い硫化水素検出法として利用されています。Monobromobimane は、チオール特異的蛍光ラベル化剤であり、硫化水素 1 分子に対し、2 分子の Bimane が結合した化合物 (Sulfide dibimane) を生成します (Fig. 1)。Sulfide dibimane は、monobromobimane がグルタチオンやシステインなどのチオール化合物と反応した bimane 化合物との HPLC 分離が可能であり、また生成した化合物が蛍光を有するため、蛍光検出による高感度分析ができます^{1), 2), 3)}。最近では、Sulfide dibimane(S34) と質量分析装置 (MS) を併用することでさらなる高感度化と高選択性を達成した方法が報告され、硫化水素だけではなく、SH 基を有する種々の生体物質の詳細な解析法として確立されつつあります^{4), 5)}。

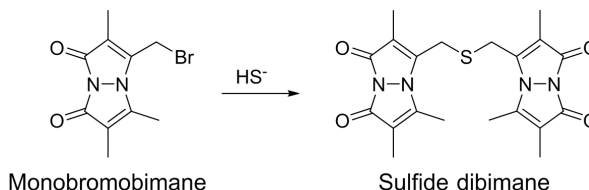


Fig. 1 Monobromobimane と硫化水素の反応

内容

SB15 -SulfoBiotics- Sulfide dibimane 10 nmol/tube x 5
 SB16 -SulfoBiotics- Sulfide dibimane(S34) 10 nmol/tube x 5
 注意 本品は 10 nmol/tube と極少量であるため、内容物が見え難くなっております。取扱いにご注意ください。

保存条件

遮光、0-5℃にて保存してください。
 注意 本品は光によって劣化します。アルミラミジップ開封後、光を避け保存し、溶解後はその日之内にご使用ください。

HPLC 実験例

測定サンプルの前処理例

- 1) 70 μl の 100 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 9.5, 0.1 mmol/l DTPA) を含むチューブにサンプル溶液を 30 μl 加える。
- 2) 10 mmol/l monobromobimane アセトニトリル溶液を 50 μl 加える。
- 3) 30 分間インキュベートする。
- 4) 50 μl の 200 mmol/l 5-sulfosalicylic acid を加える。
- 5) 上澄みを HPLC サンプルとする。

*詳細な定量方法 (monobromobimane 法) は、Methods Enzymol., 2015, 554, 31⁵⁾ をご参照ください。

検量線を用いた硫化水素定量の例

- 6) -SulfoBiotics- Sulfide dibimane (SB15) 10 nmol を含むチューブに 100 μl のアセトニトリルを加え、ピペティングにより溶解し、0.1 mmol/l Sulfide dibimane stock solution とする。
- 7) 0.1 mmol/l Sulfide dibimane stock solution を実験に応じてアセトニトリルにて段階希釈し、既知濃度溶液を作成する。
- 8) 7) の溶液を HPLC にそれぞれ 5 μl インジェクトし、得られた面積値から検量線を作成する (Fig. 2)。
- 9) 上記 5) で得られたサンプル 5 μl を HPLC にて分析し (Fig. 3)、Sulfide dibimane の面積値を算出する。
- 10) 検量線より、サンプル中の硫化水素イオン濃度を求める。

* Sulfide dibimane 溶液は光によって劣化します。各溶液はアルミホイル等でカバーし、光を避けてその日之内にご使用ください。

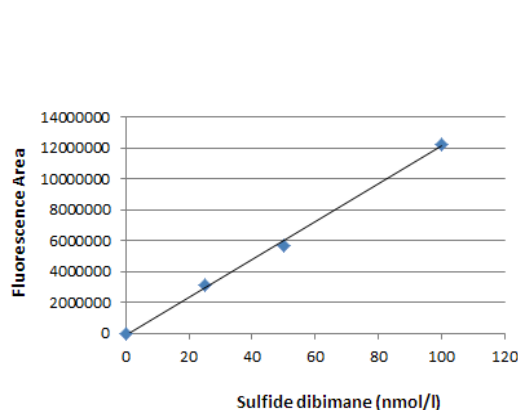
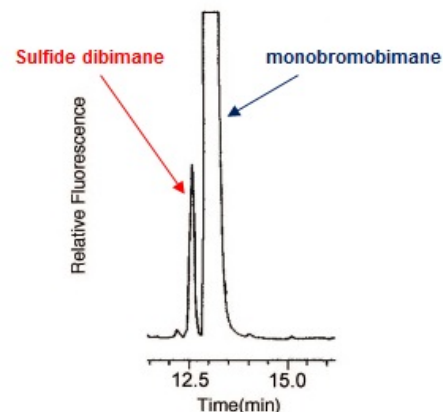


Fig. 2 検量線例



< HPLC 条件例 >
 Column: Inertsil ODS-3
 Mobile Phase: A) 0.1% TFA/H₂O, B) 0.1% TFA/Acetonitrile (TFA: trifluoroacetic acid)
 B conc.: 5% to 35% (0 to 5 min.), 35% to 55% (5 to 16 min.),
 55% to 70% (16 to 23 min.)
 Detection: Fluorescence (Ex: 390 nm, Em: 475 nm)
 Flow Rate: 1 ml/min
 Column Temp: 40 °C

Fig. 3 HPLC チャート例

測定サンプルの分析例

- 1) 70 μl の 100 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 9.5, 0.1 mmol/l DTPA) を含むチューブにサンプル溶液を 30 μl 加える。
 - 2) 10 mmol/l monobromobimane アセトニトリル溶液を 50 μl 加える。
 - 3) 30 分間インキュベートする。
 - 4) 50 μl の 200 mmol/l 5-sulfosalicylic acid を加える。
 - 5) 上澄みを 30 μl 採取し、267 μl の 50% アセトニトリル水溶液にて希釈する。
 - 6) 既知濃度の Sulfide dibimane(S34) 溶液 3 μl (下記参照) を 5) の溶液に添加し、LC-MS にて分析を行う。
 - 7) 既知濃度の Sulfide dibimane(S34) から得られた面積より、サンプル中の硫化水素濃度を算出する。
- ※ 詳細な定量方法 (monobromobimane 法) は、*Methods Enzymol.*, **2015**, 554, 31⁵⁾ をご参照ください。

既知濃度の Sulfide dibimane(S34) 溶液の調製法

- 1) -SulfoBiotics- Sulfide dibimane(S34) 10 nmol を含むチューブに 100 μl のアセトニトリルを加え、ピペティングにより溶解し、0.1 mmol/l Sulfide dibimane stock solution とする。
- 2) 0.1 mmol/l Sulfide dibimane(S34) stock solution を実験に応じてアセトニトリルにて希釈し、既知濃度溶液を作成する。

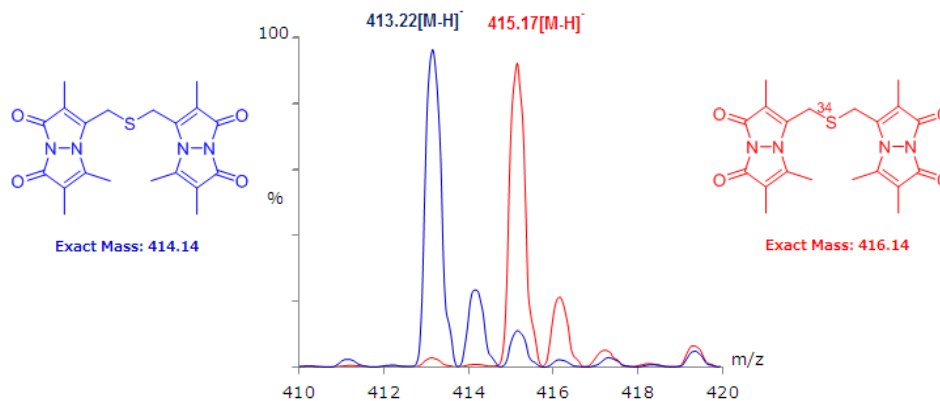


Fig. 4 Sulfide dibimane の MS 解析例

参考文献

- 1) G. L. Newton, R. Dorian and R. C. Fahey, *Anal. Biochem.*, **1981**, 114, 383.
- 2) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. Vanden Ekart, C. F. Toombs and C. Szabo, *Br. J. Pharmacology*, **2010**, 160, 941.
- 3) X. Shen, C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil, *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, 50, 1021.
- 4) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, A. van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714.
- 5) X. Shen, G. P. Kolluru, S. Yuan and C. Kevil, *Methods Enzymol.*, **2015**, 554, 31.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650