

島津分光蛍光光度計RF-5000によるトリプシンの分析

Quantitative Analysis of Trypsin with Shimadzu Recording Spectrofluorophotometer RF-5000

トリプシンは膵臓から分泌されるタンパク質加水分解酵素の1つで、不活性のトリプシノーゲンとして分泌され、腸内に存在するトリプシン、エンテロペプチダーゼの作用で活性化されてトリプシンとなります。その働きは腸内における食物タンパク質の消化のほか、キモトリプシノーゲンなどの他の酵素前駆体の活性化などです。また、エンドペプチダーゼでもあり、ペプチド結合の加水分解を触媒する際に厳密な基質特異性をもつため、タンパク質のアミノ酸配列決定を目的とするポリペプチド鎖断片化に不可欠な道具として利用されています。類似した特異性をもつプロテアーゼは哺乳類以外にもザリガニ、ヒトデ、放線菌、カイコなど広範囲の生物に存在し、カイコのものはサナギが羽化に際して繭をやぶる働きをしておりコクナーゼとよばれます。また高等動物の血液凝固や線溶、炎症などに関与するトロンピン、プラスミン、カリクレインなどのプロテアーゼもトリプシンと密接な関連をもつことが知られています。

今回は、TAME (p-Tosyl ArginineMethyl Ester hydrochloride) を基質とした蛍光法によりトリプシンの測定を行いましたのでご紹介します。

Fig.1 ~ 5はマルチスペクトルの測定結果です。

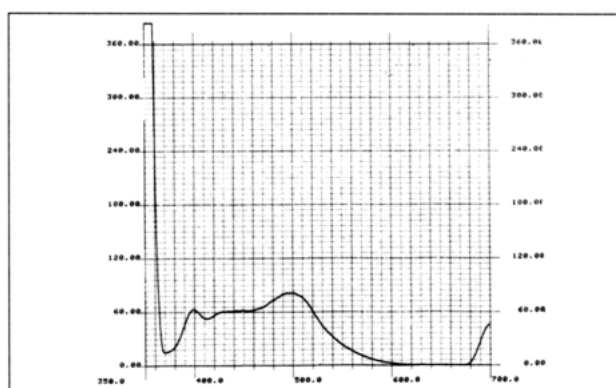


Fig.1 マルチスペクトル 1 (Ex: 350nm)
Multi-spectrum 1

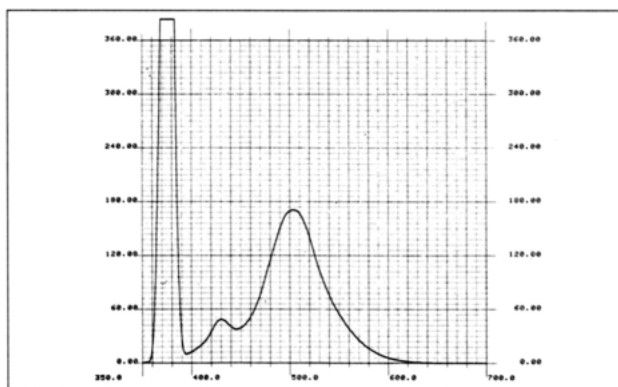


Fig.2 マルチスペクトル 2 (Ex: 375nm)
Multi-spectrum 2

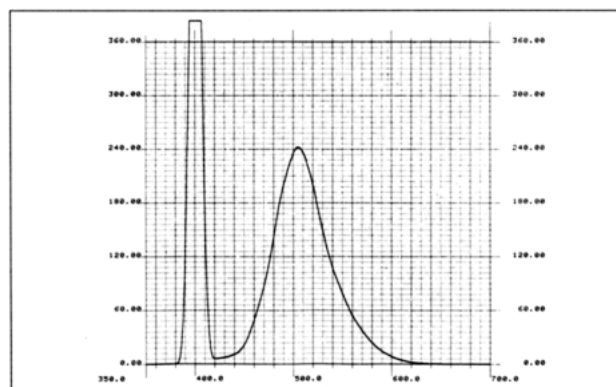


Fig.3 マルチスペクトル 3 (Ex: 400nm)
Multi-spectrum 3

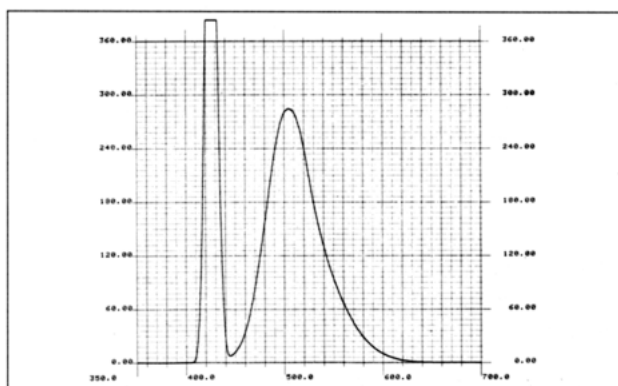


Fig.4 マルチスペクトル 4 (Ex: 425nm)
Multi-spectrum 4

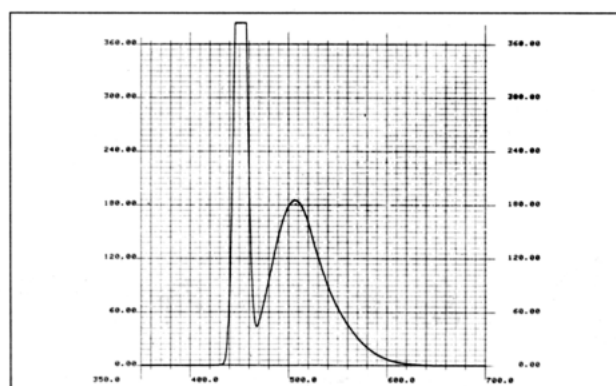


Fig.5 マルチスペクトル 5 (Ex: 450nm)
Multi-spectrum 5

このマルチスペクトル（励起波長を5段階に切換えて連続的に測定した蛍光スペクトル）の測定結果から、蛍光のピークは505nm付近にあることがわかります。RF-5000では約2分でこのような結果が得られます。

Fig.6は蛍光波長505nmでの励起スペクトル、Fig.7は励起波長425nmでの蛍光スペクトルです。

これらの結果より、トリプシンの定量の波長条件として励起波長425nm蛍光波長505nmが決まります。

Fig.8は検量線の測定結果です。Fig.9は未知試料の蛍光スペクトルで、ブランクを差し引いて検量線にあてはめることにより約0.2 μg/mLとなり、希釈倍数を乗ずることにより約5.2 μg/mLの結果が得られています。

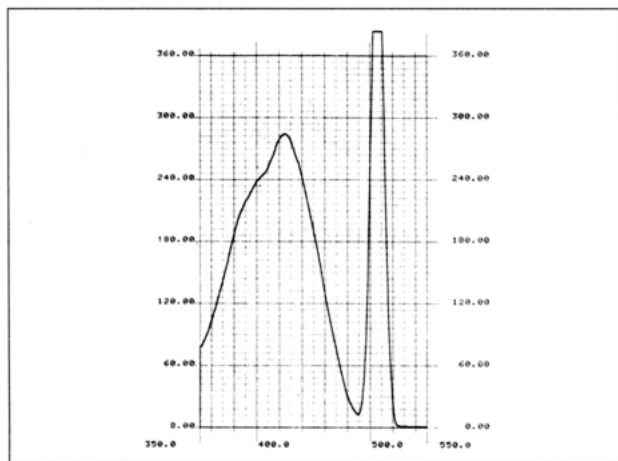


Fig.6 励起スペクトル (Em: 505nm)
Ex Spectrum

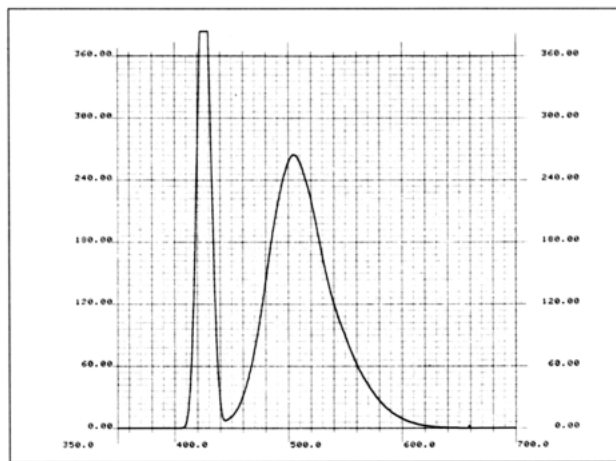


Fig.7 蛍光スペクトル (Ex: 425nm)
Em Spectrum

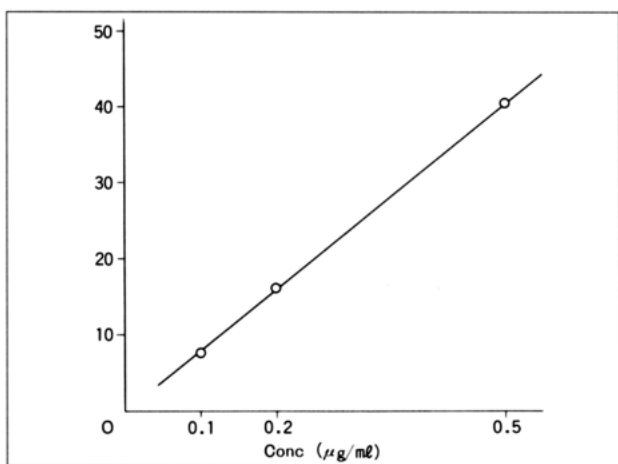


Fig.8 検量線
Calibration Curve

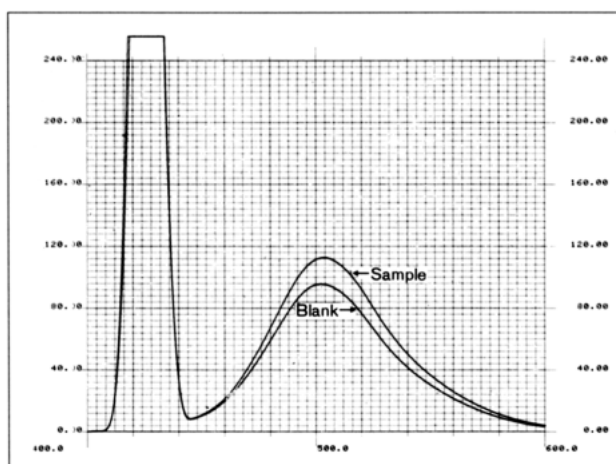


Fig.9 未知試料の蛍光スペクトル
Em Spectra of Unknown Sample

| *** MULTI-SPECTRA PARAMS *** | |
|------------------------------|----------------------|
| EX λ (nm) | 350.0 |
| EX RANGE (nm) | 350.0 - 700.0 |
| EM RANGE (nm) | 350.0 - 700.0 |
| EM SCALE | x 1 |
| INPUT GRAB NO. | 1 |
| REMARKS: TEST SAMPLE | |
| ANALYST: KISHIMOTO, MANABU | DATE: 08/04/19 15:07 |

Table 1 マルチスペクトルの分析条件
Multi-spectrum Parameters

| *** PARAMETER LIST *** | |
|------------------------|-----------------------|
| SCAN MODE: SPECT | SELECT MODE: EX |
| λ (nm) | 425.0 |
| λ RANGE (nm) | 350.0 - 550.0 |
| SCAN SPEED: SUPER | RESPONSE (sec): AUTO |
| BAND WIDTH (nm) | REPEAT: OFF |
| | SENSITIVITY: HIGH |
| FILE RES.: FINE | SHUTTER CONT.: MANUAL |

Table 2 励起スペクトルの分析条件
Analytical Conditions (Ex Spectrum)

| *** PARAMETER LIST *** | |
|------------------------|-----------------------|
| SCAN MODE: SPECT | SELECT MODE: EM |
| λ (nm) | 425.0 |
| λ RANGE (nm) | 350.0 - 700.0 |
| SCAN SPEED: SUPER | RESPONSE (sec): AUTO |
| BAND WIDTH (nm) | REPEAT: OFF |
| | SENSITIVITY: HIGH |
| FILE RES.: FINE | SHUTTER CONT.: MANUAL |

Table 3 蛍光スペクトルの分析条件
Analytical Conditions (Em Spectrum)

| *** CALIB CURVE PARAMS *** | | |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| λ MODE: FIXED | EX λ (nm) 425.0 | EM λ (nm) 505.0 |
| FACTOR 1 | 10.0 | 10.0 |
| NO. OF MEASUREMENTS: 4 | RESPONSE (sec): AUTO | |
| X-AXIS: LINEAR | Y-AXIS: LINEAR | |
| SENSITIVITY: HIGH | DEGREE: 1 | |

Table 4 検量線の分析条件
Analytical Conditions (Calibration Curve)