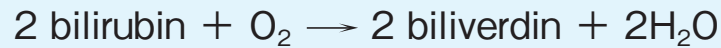


(Diagnostic Reagent Grade)

T-188

BILIRUBIN OXIDASE [BOD II]

from *Bacillus subtilis*
(bilirubin : oxygen oxidoreductase, EC 1.3.3.5)



Preparation and Reference

Appearance : Light blue to blue powder
Specific activity : More than 5.0U/mg

Properties

Molecular weight	: 63 kDa (SDS-PAGE) 46 kDa (Superdex 200)	
Isoelectric point	: 4.6	
Optimum pH	: 7.0-8.0 (Bilirubin F) 5.5-6.0 (Bilirubin C) 4.5-5.0 (Ditaurobilirubin) 4.5-5.0 (ABTS)	Figure 1 Figure 2 Figure 3 Figure 4
pH stability	: 4.5-11.0 (37 °C, 60 min.)	Figure 5
Optimum temperature	: 55-65 °C (pH4.5, Citrate buffer, ABTS)	Figure 6
Thermal stability	: Stable at 80 °C and below (pH 7.0, 30 min.)	Figure 7
Effect of metal ions	: See Table 1	
Effect of detergents	: See Table 2	

Applications for Diagnostic Test

This enzyme is useful for enzymatic determination of **bilirubin** or **ditaurobilirubin**.



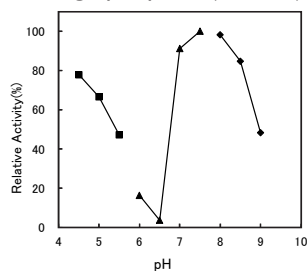
Table 1. Effect of metal ion on BOD II activity (ABTS)

Metal ion	Relative activity (%)
None	100
1mM NiCl ₂	90
1mM BaCl ₂	91
1mM MnCl ₂	84
1mM CuCl ₂	97
1mM ZnCl ₂	89
1mM CoCl ₂	88
1mM MgCl ₂	86
1mM CaCl ₂	92
1mM Ba(CH ₃ COO) ₂	104
1mM FeCl ₃	0
1mM FeSO ₄	0
1mM LiCl ₂	98
1mM NH ₄ Cl	98
1mM ZnSO ₄	101
1mM NaN ₃	14
10mM KCl	13
0.1M NaCl	17
1mM EDTA	91

Table 2. Effect of detergents on BOD II activity (ABTS)

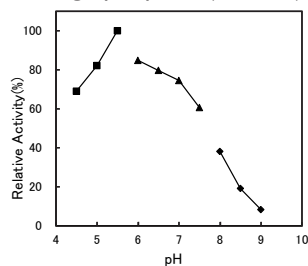
Detergent (0.1%)	Relative activity (%)
None	100
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	67
Tween 80	99
Adekato PC-8	106
NP-690	74
LO-7	86
Nikkol MYL-10	104
Cetylpyridinium chloride	75
Sodium laurylbenzene sulfonate	2
Cholic acid	86

Fig.1 pH Optimum (Bilirubin F)



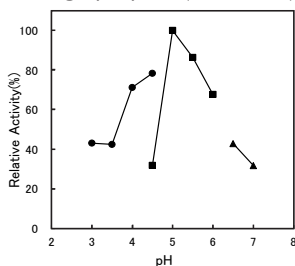
■ : Acetate buffer
 ▲ : Phosphate buffer
 ● : Tris-HCl buffer

Fig.2 pH Optimum (Bilirubin C)



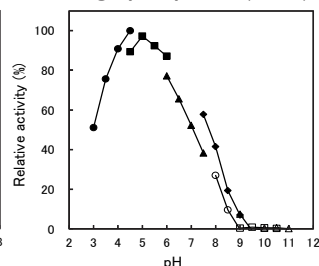
■ : Acetate buffer
 ▲ : Phosphate buffer
 ● : Tris-HCl buffer

Fig.3 pH Optimum (Ditaurobilirubin)



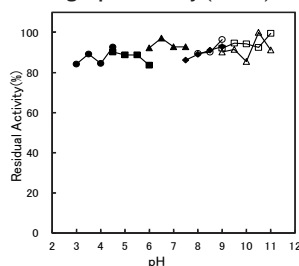
● : Citrate buffer
 ■ : Acetate buffer
 ▲ : Phosphate buffer

Fig.4 pH Optimum (ABTS)



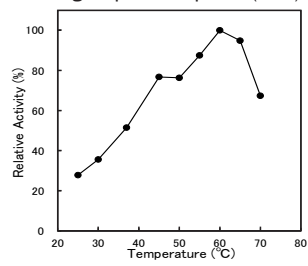
● : Citrate buffer
 ■ : Acetate buffer
 ▲ : Phosphate buffer
 ◆ : Tris-HCl buffer
 ○ : TAPS buffer
 □ : Carbonate buffer
 △ : Glycine-NaOH buffer

Fig.5 pH Stability (ABTS)



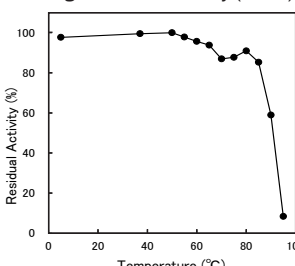
37°C, 60 min.
 ● : Citrate buffer
 ■ : Acetate buffer
 ▲ : Phosphate buffer
 ◆ : Tris-HCl buffer
 ○ : TAPS buffer
 □ : Carbonate buffer
 △ : Glycine-NaOH buffer

Fig.6 Optimum Temperature (ABTS)



pH4.5
 0.1M Citrate Buffer

Fig.7 Thermal Stability (ABTS)

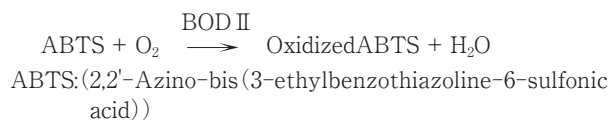


pH7.0, 30min.
 50mM Phosphate Buffer

Assay

■ Principle

The assay is based on the increase in absorbance at 405 nm as the formation of in the following reaction:



■ Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme, which converts 1 μmole of oxidABTS per minute 37°C under the conditions specified in the assay procedure.

■ Reagents

1. Reaction mixture
Dissolve 274 mg of ABTS with 0.1 M Citric acid-trisodium Citrate Dihydrate pH 4.5 to make a total of 100 ml
2. Enzyme dilution buffer
10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 containing 0.05 % (W/V) BSA
3. Reagent
Citric acid $\cdot \text{H}_2\text{O}$:
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
Special grade #035-03495
Tris (hydroxymethyl) aminomethane :
Sigma-Aldrich Co. #T1503
Trisodium Citrate Dihydrate:
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
Special grade #191-01785
ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): Sigma Chemical Co. #A1888
BSA: Millipore Co. Fraction V pH5.2

■ Enzyme solution

Accurately weigh about 20 mg of the sample and add enzyme dilution buffer to make a total of 20 ml. Dilute it with enzyme dilution buffer to adjust the concentration to within 0.05 U/ml.

■ Procedure

1. Pipette accurately 1.0 ml of reaction mixture into a small test tube and preincubate at 37°C.
2. After 5min, add 20 μl of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C.
※ In the case of a test blank, add 20 μl of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution.
3. After starting the reaction, measure the rate of increase per minutes in absorbance at 405 nm. The rate must be measured within the linear portion of the absorbance curve.

Absorbance sample : As/min
blank : Ab/min

$$\Delta A/\text{min} = A_s/\text{min} - A_b/\text{min} \leq 0.20 \text{ Abs}$$

■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{36 \times 3} \times \frac{1.02}{0.02} \times \frac{1}{X}$$

36 : millimolar extinction coefficient of ABTS at 405 nm
($\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

3 : Coefficient of transformation when substrate is bilirubin.

1.02 : final volume (ml)

0.02 : volume of enzyme solution (ml)

X : concentration of the sample in enzyme solution
(mg/ml)

Storage

Storage at -20°C in the presence of a desiccant is recommended.

References

Sakasegawa, S., Ishikawa, H., Imamura, S., Sakuraba, H., Goda S., and Ohshima T. (2006) Appl. Environ. Microbiol., 72, 972.

BODⅡ 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

- 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5
クエン酸 21.0g を精製水で全容 1L とする。クエン酸 Na 29.4g を精製水で全容 1L とする。
クエン酸溶液とクエン酸 Na 溶液を混合して、pH を 4.5 (25℃) に調製する。
- 試薬混合液
ABTS 274mg を 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5 で溶解し、全容 100ml とする。
- 酵素溶解希釈用液 (0.05% BSA を含む 10mM トリス-HCl 緩衝液 pH8.5)
BSA 0.50g を 10mM トリス-HCl 緩衝液 pH8.5 で溶解し、全容 1L とする。
- 試薬リスト
クエン酸 (Citric acid・H₂O):
富士フイルム和光純薬製 特級 #035-03495
クエン酸三ナトリウム二水和物 (Trisodium Citrate Dihydrate):
富士フイルム和光純薬製 特級 #191-01785
トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン:
シグマ製 # T1503
ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid):シグマ製 #A1888
BSA: Millipore 製 Fr V, pH5.2 #81-053

II. 酵素試料液

検品約 20mg を精密に量り、酵素溶解希釈用液で溶解して全容 20ml とする。その液を酵素溶解希釈用液で 0.05U/ml 濃度となるように適宜希釈する。

III. 測定操作法

- 石英セルに試薬液を 1.0ml ずつ正確に分注して 37℃ で予備加温する。
- 5 分経過後、酵素試料液 20 μl を正確に加えて混和し、37℃ で反応を開始する。
※盲検は酵素試料液の代わりに酵素溶解希釈用液 20 μl を加える。
- 反応開始後、405 nm における吸光度を測定して、3 分目から 5 分目の 1 分間当たりの吸光度変化を求める。
求められた吸光度変化を
試料液については As/min
盲検液については Ab/min とする。
 $\Delta A/\text{min} = A_s/\text{min} - A_b/\text{min} \leq 0.20 \text{ Abs.}$

IV. 計算

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{36 \times 3} \times \frac{1.02}{0.02} \times \frac{1}{X}$$

36 : ABTS のミリモル分子吸光係数 (cm²/ μmol)

3 : 基質をビリルビンにした値に合わせる為の係数

1.02: 反応総液量 (ml)

0.02: 反応に供した酵素試料液量 (ml)

X : 酵素試料液中の検品濃度 (mg/ml)

V. 注意点

- 本来の基質であるビリルビンを基質として活性測定が困難なので、ABTS を基質として活性測定し、ビリルビンを基質として活性値に合うように係数で調整した。
- 試薬混合液に使用の 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5 について調製後の保存期間により活性値の上昇が認められたため用時調整とする。