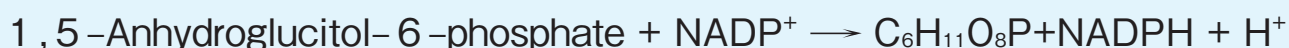


1,5-ANHYDROGLUCITOL-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE [AG6PDH II]

from *Escherichia coli*



Preparation and Specification

Appearance : White amorphous powder, lyophilized

Specific activity : More than 20 U/mg solid

Properties

Substrate specificity	: See Table 1	
Molecular weight	: 78 kDa (TSK gel G 3000 SW _{XL} gel filtration)	
	40 kDa (SDS-PAGE)	
Isoelectric point	: pH 4.7	
Michaelis constants	: 1,5-Anhydroglucitol-6-phosphate 25 mM (pH 10.0)	
	NADP 0.09 mM (pH 10.0)	
Optimum pH	: 9.0–10.0	Figure 1
pH stability	: 7.0–9.0 (50°C, 30 min)	Figure 2
Optimum temperature	: 37–50°C	Figure 3
Thermal stability	: Stable at 42°C and below	Figure 4

Applications for Diagnostic Test

This enzyme is useful for enzymatic determination of 1,5-AG.

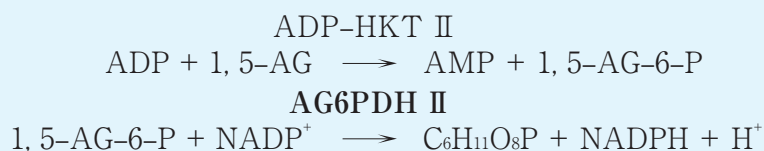


Table 1. Substrate specificity

Substrate (5mM)	Relative activity (%)
1,5-Anhydroglucitol-6-phosphate	100
Glucose-6-phosphate	8
Fructose-6-phosphate	0
Galactose-6-phosphate	0
Mannose-6-phosphate	0
Sorbitol-6-phosphate	0
Glucose-1-phosphate	0
Glucose-1, 6-diphosphate	0
1,5-Anhydroglucitol	0
Glucose	0
Sorbitol	0
myo-Inositol	0

Table 2. Effect of various chemicals on AG6PDH activity

Additives	Concentration	Relative activity (%)
None	–	100
KCl	100mM	142
NaCl	250mM	113
CaCl ₂	1mM	114
MgCl ₂	1mM	118
MnCl ₂	1mM	138
NH ₄ Cl	1mM	97
MgSO ₄	1mM	113
EDTA	1mM	111
Triton X-100	0.1%	99
Sodium Deoxycholate	0.01%	107

Fig.1 pH Optimum

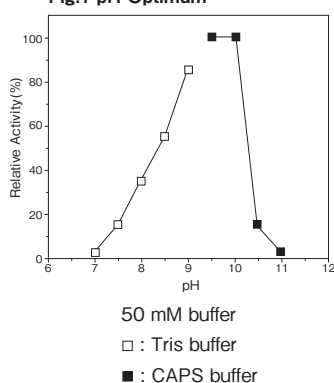


Fig.2 pH Stability

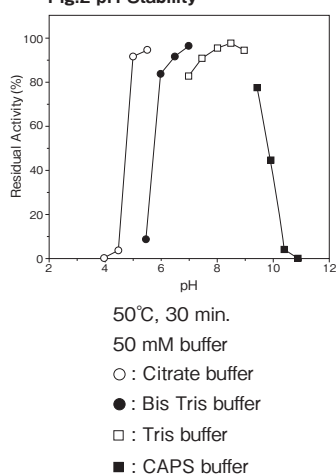


Fig.3 Optimum Temperature

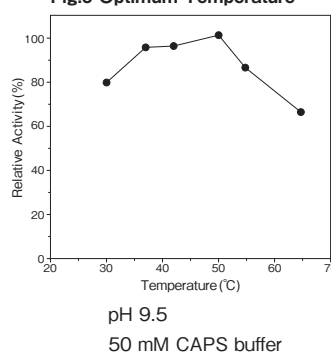
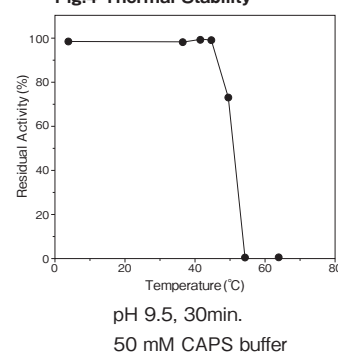
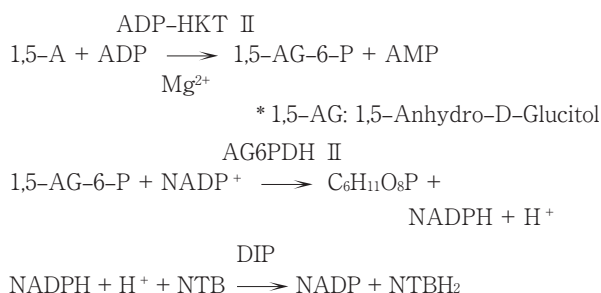


Fig.4 Thermal Stability



Assay

Principle



Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which converts 1 μmole of 1,5-AG-6-phosphate to $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P}$ per minute at 37 °C under the conditions specified in the assay procedure.

Reagents

- Reaction mixture- I

0.2M Tris-HCl buffer pH7.5	0.10 ml
0.4M ADP solution (pH7.5)	0.05 ml
0.4M MgCl ₂ solution	0.05 ml
200U/ml ADP-HKT II solution	0.10 ml
Distilled water	0.15 ml

- Substrate solution (400mM 1,5-AG Solution)

Dissolve 65.6mg of 1,5-AG with 1ml of distilled water.

- Reaction mixture- II

0.2M EDTA·2Na (pH10.0) solution	0.05 ml
1.0M Glycine-NaOH buffer pH10.0	0.10 ml
2.0% Triton X-100 solution	0.05 ml
0.5% NTB solution	0.05 ml
100U/ml DIP solution	0.05 ml
20mM NADP solution	0.10 ml
Distilled water	0.10 ml

- Enzyme dilution buffer

10mM Tris-HCl Buffer pH9.0 (25°C)

- Reaction Stopper

0.1N HCl

- Reagents

Tris (hydroxymethyl) aminomethane:

Sigma Chemical Co. #T-1503

ADP (Adenosine diphosphate·2Na): Oriental Yeast Co.Ltd.

ADP-HKT II: Nagase Diagnostics Co., Ltd. #T-93

1,5-Anhydro-D-Sorbitol (1,5-Anhydro-D-Glucitol):

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

#012-13533

EDTA·2Na: KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd.

#060-29133

Glycine: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

#077-00735

Triton X-100: The Dow Chemical Company

NTB (Nitrotetrazorium blue): Dohjindo Laboratories

#344-02033

DIP (Diaphorase) : Nagase Diagnostics Co., Ltd. #T-10
 NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form) :
 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation #308-50463

■ Enzyme solution

Accurately weigh about 10 mg of the sample and add enzyme dilution buffer to make a total of 10 ml. Dilute it with enzyme dilution buffer to adjust the concentration as required.

■ Procedure

- Pipette accurately 0.45 ml of reaction mixture- I into a small test tube.
- Add 0.05 ml of substrate solution.
 ※ In the case of a test blank, add 0.05 ml of distilled water in place of substrate solution.
 ※ above the mixed solution keep on ice until use.
- Above the mixed solution incubate at 37 °C and after 15 min. add accurately 0.50 ml of reaction mixture- II at 37 °C.
- After 5 min. add accurately 0.05 ml of enzyme solution and mix to start the reaction at 37 °C.
- At 10 min. after starting the reaction, add 2.0 ml of the

reaction stopper to stop the reaction.
 6. Measure the absorbance at 550 nm.
 Absorbance sample : As
 blank : Ab
 $\Delta A = (As - Ab) = 0.2-0.5 \text{ Abs.}$

■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg of powder)} = \frac{\Delta A}{17.0} \times \frac{3.05}{0.05} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{X}$$

17.0 : millimolar extinction coefficient of NTB at 550nm
 (cm²/ μmol)

3.05 : final volume (ml)

0.05 : volume of enzyme solution (ml)

10 : reaction time (min)

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

Storage

Storage at -80 °C in the presence of a desiccant is recommended.

AG6PDH II 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

- 反応試薬混合液 - I

0.2M トリス-HCl 緩衝液 pH7.5	0.10 ml
0.4M ADP 溶液 (pH7.5)	0.05 ml
0.4M 塩化マグネシウム溶液	0.05 ml
200U/ml ADP-HKT II 溶液	0.10 ml
精製水	0.15 ml
- 基質溶液 (400mM 1,5-AG 溶液)

1,5-AG 65.6mg を精製水 1.0ml で溶解。
- 反応試薬混合液 - II

0.2M EDTA・2Na (pH10.0) 溶液	0.05 ml
1.0M Glycine-NaOH 緩衝液 pH10.0	0.10 ml
2.0% トリトン X-100 溶液	0.05 ml
0.5% NTB 溶液	0.05 ml
100U/ml DIP 溶液	0.05 ml
20mM NADP 溶液	0.10 ml
精製水	0.10 ml
- 酵素溶解希釈用液

10mM トリス-HCl 緩衝液 pH9.0 (25°C)
- 反応停止液

0.1N HCl
- 試薬

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン:
 シグマ製 #T-1503
 ADP (アデノシンニリン酸・2Na):
 オリエンタル酵母製

ADP-HKT II : ナガセダイアグノスティックス製 #T-93
 1,5-Anhydro-D-Sorbitol
 (1,5-Anhydro-D-Glucitol と同):
 富士フィルム和光純薬製 #012-13533
 EDTA・2Na (エチレンジアミン四酢酸ニナトリウム)
 : キンダ化学製 #060-29133
 Glycine (グリシン):
 富士フィルム和光純薬製 特級 #077-00735
 トリトン X-100 : Dow Chemical 製
 NTB (ニトロテトラゾリウムブルー):
 同仁化学工業製 #344-02033
 DIP (ジアフォラーゼ) : ナガセダイアグノスティックス製 #T-10
 NADP (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド・リン酸化型):
 富士フィルム和光純薬製 #308-50463

II. 酵素試料液

検品約 10mg を精密に量り、酵素溶解希釈用液で溶解して全容 10.0ml とする。
 その液を酵素溶解希釈用液で適宜希釈する。

III. 測定操作法

- 小試験管に反応試薬混合液 - I を 0.45ml を正確に分注する。
- 1,5-AG 基質液を 0.05ml を正確に加えて混和する。
 ※盲検は 1,5-AG 基質液の代わりに精製水 0.05ml を加える。
 ※上記混合液は使用するまで氷中に保存する。

3. 次に 37℃ で第一反応を開始し、15 分後反応試薬混合液 - II を 0.5ml ずつ正確に加えて混和し、更に 37℃ で 5 分間放置する。
4. 5 分経過後、酵素試料液 0.05ml を正確に加えて混和し、37℃ で反応を開始する。
5. 10 分間酵素反応を行った後、反応停止液 (0.1N HCl) 2.0ml を加えて混和し、反応を停止する。
反応を停止後、550nm における吸光度を測定する。
求められた吸光度変化を
試料液については A_s
盲検液については A_b とする。
※吸光度範囲： $\Delta A = (A_s - A_b)$; 0.2~0.5Abs
の範囲とする。

Ⅳ. 計算

以下の計算式に従い、活性 (U/mg) を計算する。

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A}{17.0} \times \frac{3.05}{0.05} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{X}$$

17.0 : NTB の 550nm におけるミリモル分子吸光係数
($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

3.05 : 反応総液量 (ml)

0.05 : 反応に供した酵素試料液量 (ml)

10 : 酵素反応時間 (min)

X : 酵素試料液中の検品濃度 (mg/ml)