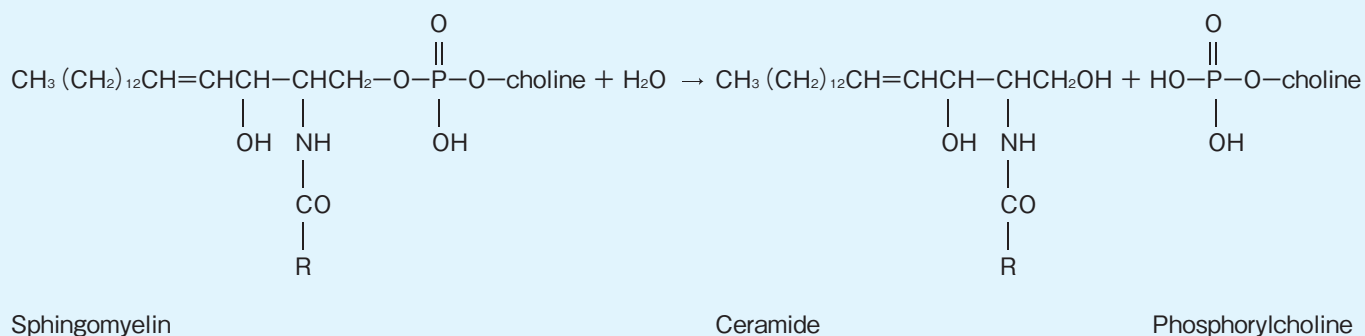


SPHINGOMYELINASE [SPC]

from *Streptomyces* sp.

(Sphingomyelin cholinephosphohydrolase, EC 3.1.4.12)



Preparation and Specification

Appearance : White to brownish amorphous powder, lyophilized

Properties

Substrate specificity : See Table 1
 Molecular weight : 37.5 kDa (SDS-PAGE)
 Isoelectric point : pH 8.6
 Michaelis constant : Sphingomyelin $0.45 \times 10^{-3}\text{M}$
 Optimum pH : 7.0-8.0
 pH stability : 5.0-8.0 (37°C, 60 min)
 Thermal stability : Stable at 40°C and below (pH7.2, 10 min)
 Storage stability : At least one year at -20°C
 Effect of detergents : See Table 2
 Effect of metal ions : See Table 3
 Stabilizer : Mg^{2+}
 Activators : Mg^{2+} , Mn^{2+} , Non-ionic detergents
 Inhibitor : EDTA

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Applications for Diagnostic Test

This enzyme is useful for enzymatic determination of **sphingomyelin** when coupled With alkaline phosphatase (T-08) and choline oxidase (T-05).

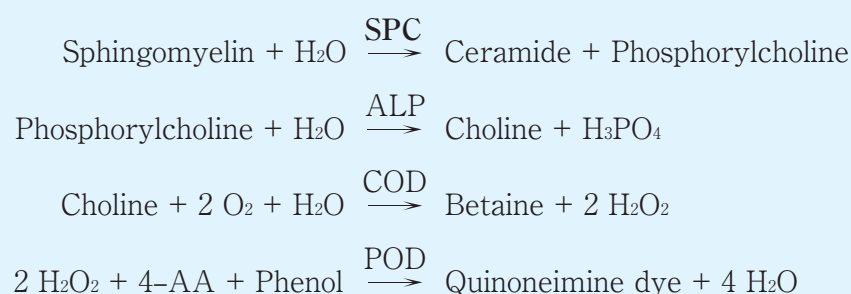


Table 1. Substrate specificity

Substrate	Relative activity (%)
Sphingomyelin	100
Lecithin	0
Lysolecithin	0
Phosphatidylethanolamine	0
Phosphatidylserine	0
Phosphatidylinositol	0

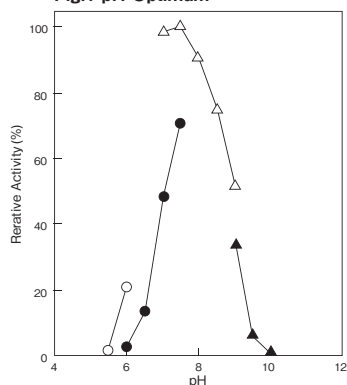
Table 3. Effect of metal ions on SPC activity

Metal (2 mM)	Relative Activity (%)
None	2
MgCl ₂	97
MgSO ₄	97
MnCl ₂	100
CoCl ₂	39
NiCl	6
CaCl ₂	3
Na ₂ MoO ₄	1
ZnSO ₄	1

Table 2. Effect of detergents on SPC activity

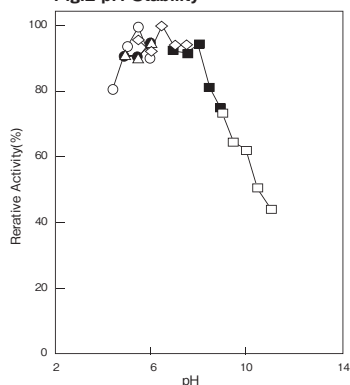
Detergent (0.1%)	Relative activity (%)
None	100
Adekator NP-700	335
Adekator PC-8	426
Adekator SO-145	367
Pluronic L-61	267
Triton X-100	358
Sodium deoxycholate	0
Sodium lauryl sulfate	0
Sodium lauryl benzene sulfonate	0

Fig.1 pH Optimum



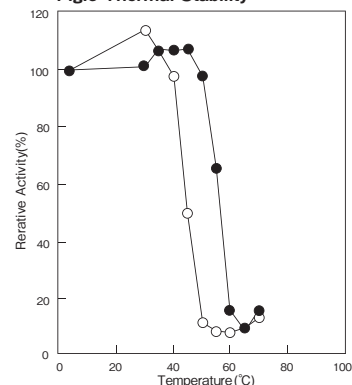
○ : Acetate buffer
 ● : Bis Tris-NaOH buffer
 △ : Tris-HCl buffer
 ▲ : Glycine-NaOH buffer

Fig.2 pH Stability



37°C, 60 min.
 ○ : Acetate buffer
 ● : 3,3-Dimethylglutarate-NaOH buffer
 △ : Citrate-NaOH buffer
 ◇ : Bis Tris-NaOH buffer
 ■ : Tris-HCl buffer
 □ : Gricine-NaOH buffer

Fig.3 Thermal Stability

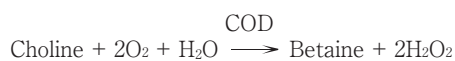
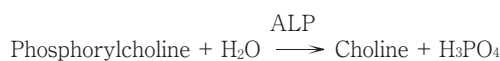
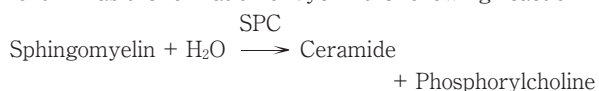


pH 7.2, 10 min.
 ○ : None
 ● : +50 mM MgCl₂

Assay

Principle

The assay is based on the increase in absorbance at 540 nm as the formation of dye in the following reaction



Unit definition

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

Reagents

1. Reaction mixture		
0.2 M Tris-HCl buffer	pH 8.0	0.25 ml
10 mM MgCl ₂ solution		0.20 ml
10 mM sphingomyelin solution	¹⁾	0.10 ml
500 U/ml ALP solution	²⁾	0.02 ml
120 U/ml COD solution	³⁾	0.084 ml
100 U/ml POD solution	⁴⁾	0.02 ml
0.2 % 4-AA solution		0.10 ml

0.2 % TODB solution	0.10 ml
1.0 M NaCl solution	0.01 ml
1 % (W/V) Triton X-100 solution	0.10 ml
Distilled water	0.016 ml

1): 10 mM sphingomyelin solution
Dissolve 75.3 mg of sphingomyelin with 10 ml of 5% (W/V) Triton X-100.

2): 500 U/ml ALP solution
Dissolve 5000 U of ALP with 10 ml of 10 mM Tris-HCl buffer pH 9.0.

3): 120 U/ml COD solution
Dissolve 1200 U of ALP with 10 ml of 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0.

4): 100 U/ml POD solution
Dissolve 1000 U of ALP with 10 ml of distilled water.

2. Enzyme dilution buffer
10mM Tris-HCl buffer pH 8.0 containing 0.1% (W/V) TritonX-100 and 10 mM NaCl.

3. Reaction stopper
1.0% (W/V) SDS solution
SDS: sodium dodecyl sulfate

4. Reagents:
Tris (hydroxymethyl) aminoethane: Sigma Chemical Co. # T-1503
MgCl₂·6H₂O: WaKo Pure Chemical Industries, Ltd. #131-00162

Sphingomyelin: Sigma Chemical Co. # S-7004
ALP: Asahi Kasei Pharma Corporation # T-08
COD: Asahi Kasei Pharma Corporation # T-05
POD: Sigma Chemical Co. Type II #P-8250
4-AA: NACALAI TESQUE, INC. Special grade #01907-52

TODB (N, N-Bis (4-sulfobutyl) -3-methylaniline, disodium salt) : Dojindo Laboratories #OC22

NaCl: WaKo Pure Chemical Industries, Ltd. #191-01665

Triton X-100: The Dow Chemical Company

SDS: NACALAI TESQUE, INC. #316-06

■ Enzyme solution

Weigh about 20 mg of test sample exactly and add enzyme dilution buffer to make a Total of 20 ml. Dilute it with enzyme dilution buffer as required.

■ Procedure

- Pipette accurately 1.0 ml of reaction mixture into a small test tube and preincubate at 37°C.
- After 3 min, add 40 μl of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C.
※ In the case of a test blank add 40 μl of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution.
- At 10 min after starting the reaction, add 2.0 ml of the reaction stopper to stop the reaction.
- Measure the absorbance at 546 nm.
Absorbance sample : As/min
blank : Ab/min
 $0.070\text{Abs/min} \leq \Delta A/\text{min} = \text{As/min} - \text{Ab/min} \leq 0.450\text{Abs/min}$

■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/10}{16.0 \times 1/2} \times \frac{1}{2} \times \frac{3.04}{0.04} \times \frac{1}{X}$$

16 : millimolar extinction coefficient of TODB at 546 nm (cm²/μmole)

1/2 : a multiplier derived from the fact that 2 mole of H₂O₂ produces 1 mole of dye

2 : a multiplier derived from the fact that 1 mole of sphingomyelin produces 2 mole of dye

10 : reaction time (min)

3.04 : final volume (ml)

0.04 : 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

- Schneider, P. B. and Kennedy, E. P. (1967) J. Lipids Res., 8, 202-209.
- Yamaguchi, S. and Suzuki, K. (1977) J. Biol. Chem., 252, 3805-3813.
- Ikezawa, H., Mori, M., Ohyabu, T. and Taguchi, R. (1978) Biochem. Biophys. Acta, 528, 247-256.
- Pentchev, P. G., Brady, R. O., Gal, A. E. and Hibbert, S. R. (1977) Biochem. Biophys. Acta, 488, 312-321.

SPC 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

1. 反応試薬混合液	
0.2M トリス - HCl buffer pH8.0	0.25 ml
10mM 塩化マグネシウム溶液	0.20 ml
10mM スフィンゴミエリン溶液 ¹⁾	0.10 ml
500U/ml ALP 溶液 ²⁾	0.02 ml
120U/ml COD 溶液 ³⁾	0.084 ml
100U/ml POD 溶液 ⁴⁾	0.02 ml
0.2% 4-AA 溶液	0.10 ml
0.2% TODB 溶液	0.10 ml
1.0M 塩化ナトリウム溶液	0.01 ml

1% (W/V) トリトン X-100 溶液	0.10 ml
精製水	0.016 ml

- 1): 10mM スフィンゴミエリン溶液
スフィンゴミエリン 75.3mg を 5% (W/V) トリトン X-100 溶液 10ml で溶解する。
- 2): 500U/ml ALP 溶液
ALP 5,000 単位 (U) を 10mM トリス - HCl 緩衝液 pH9.0 10ml で溶解する。
- 3): 120U/ml COD 溶液
COD 1,200 単位 (U) を 10mM トリス - HCl 緩衝液 pH8.0 10ml で溶解する。
- 4): 100U/ml POD 溶液
POD 1,000 単位 (PPU) を精製水 10ml で溶解する。

2. 反応停止液

1.0% (W/V) SDS 溶液

SDS: ドデシル硫酸ナトリウム

3. 酵素溶解希釈用液

0.1% TritonX-100 と 10mM NaCl を含む 10mM

トリス-HCl 緩衝液 pH8.0

4. 試薬

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン:

シグマ社製 #T-1503

塩化マグネシウム: 和光純薬工業製 #131-00162

スフィンゴミエリン: シグマ社製 #S-7004

ALP: 旭化成ファーマ製 #T-08

COD: 旭化成ファーマ製 #T-05

POD: シグマ社製 Type II #P-8250

4-AA: ナカライテスク社製 特級 #01907-52

TODB (N,N-Bis (4-sulfobutyl) -3-methylaniline, disodium salt): 同仁化学研究所 #OC22

塩化ナトリウム: 和光純薬工業製 #191-01665

Triton X-100: Dow Chemical 社製

SDS: ナカライテスク社製 #316-06

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全容 20ml 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

1. 小試験管に反応試薬混合液 1.0ml ずつを正確に分注し、37°C で予備加温する。

2. 3分経過後、酵素試料液 40 μ l を正確に加えて混和し、37°C 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 40 μ l を加える。

3. 10分経過後、反応停止液 2.0ml を加えて混和し、反応を停止する。

4. 546nm における吸光度を測定する。

求められた吸光度を試料液については As

盲検液については Ab とする。

$0.070 \text{ Abs./min} \leq \Delta A = (As - Ab) \leq 0.450 \text{ Abs./min}$

IV. 計算

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A / 10}{16.0 \times 1/2} \times \frac{1}{2} \times \frac{3.04}{0.04} \times \frac{1}{X}$$

16 : TODB の 546nm におけるミリモル分子吸光係数
($\text{cm}^2 / \mu\text{mole}$)

1/2 : H₂O₂ 2モルから 色素 1モルが生成することによる係数

2 : スフィンゴミエリン 1モルから H₂O₂ 2モルが生成することによる係数

10 : 反応時間 (min)

3.04 : 反応総液量 (ml)

0.04 : 反応に供した酵素試料液量 (ml)

X : 酵素試料液の検品濃度 (mg/ml)