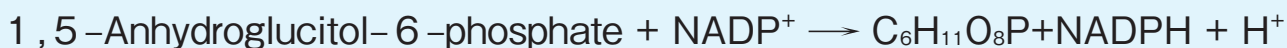


1,5-ANHYDROGLUCITOL-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE [AG6PDH II]

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.

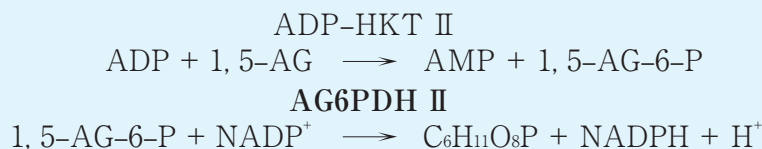


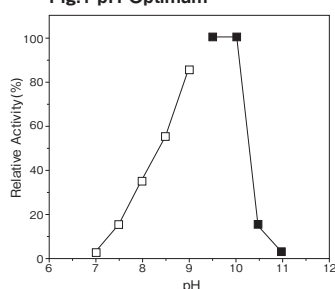
Table 1. Substrate specificity

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

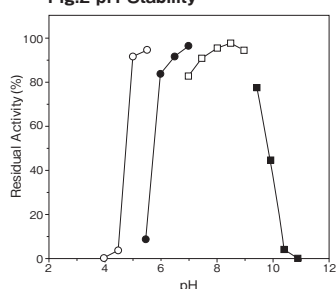
Additives	Concentration	Relative activity (%)
None	-	100
KCl	100mM	142
NaCl	250mM	113
CaCl ₂	1mM	114
MgCl ₂	1mM	118
MnCl ₂	1mM	138
NH ₄ Cl	1mM	97
MgSO ₄	1mM	113
EDTA	1mM	111
Triton X-100	0.1%	99
Sodium Deoxycholate	0.01%	107

Fig.1 pH Optimum



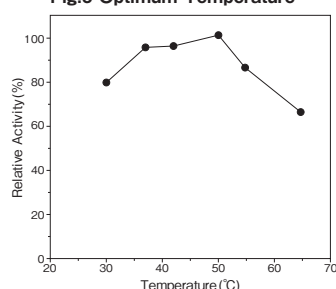
50 mM buffer
□ : Tris buffer
■ : CAPS buffer

Fig.2 pH Stability



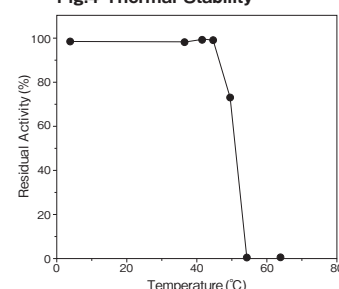
50°C, 30 min.
50 mM buffer
○ : Citrate buffer
● : Bis Tris buffer
□ : Tris buffer
■ : CAPS buffer

Fig.3 Optimum Temperature



pH 9.5
50 mM CAPS buffer

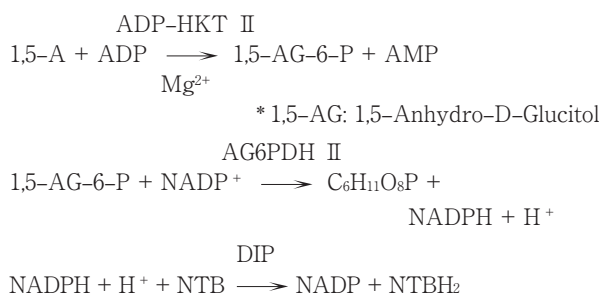
Fig.4 Thermal Stability



pH 9.5, 30min.
50 mM CAPS buffer

Assay

Principle



Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which converts 1 μ mole of 1,5-AG-6-phosphate to C₆H₁₁O₈P 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: Asahi Kasei Pharma Corporation #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) : Asahi Kasei Pharma Corporation #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

1. Pipette accurately 0.45 ml of reaction mixture- I into a small test tube.
2. 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.
3. Above the mixed solution incubate at 37 °C and after 15 min. add accurately 0.50 ml of reaction mixture- II at 37 °C.
4. After 5 min. add accurately 0.05 ml of enzyme solution and mix to start the reaction at 37 °C.
5. 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

1. 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
2. 基質溶液 (400mM 1,5-AG 溶液)
 1,5-AG 65.6mg を精製水 1.0ml で溶解。
3. 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
4. 酵素溶解希釈用液
 10mM トリス-HCl 緩衝液 pH9.0 (25°C)
5. 反応停止液
 0.1N HCl
6. 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 : 旭化成ファーマ製 #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)
 : キシダ化学製 #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): 旭化成ファーマ製 #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

1. 小試験管に反応試薬混合液 - I を 0.45ml を正確に分注する。
2. 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水中に保存する。

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)