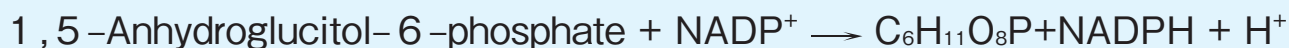


# 1,5-ANHYDROGLUCITOL-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE [AG6PDH II]

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 SWXL 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.

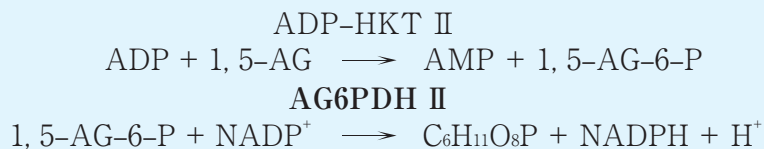


Table 1. Substrate specificity

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 <sub>2</sub>	1mM	114
MgCl <sub>2</sub>	1mM	118
MnCl <sub>2</sub>	1mM	138
NH <sub>4</sub> Cl	1mM	97
MgSO <sub>4</sub>	1mM	113
EDTA	1mM	111
Triton X-100	0.1%	99
Sodium Deoxycholate	0.01%	107

Fig.1 pH Optimum

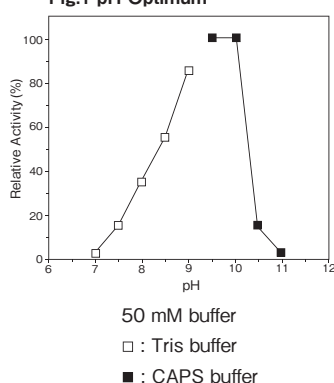


Fig.2 pH Stability

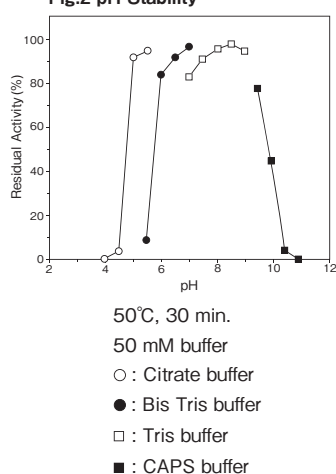


Fig.3 Optimum Temperature

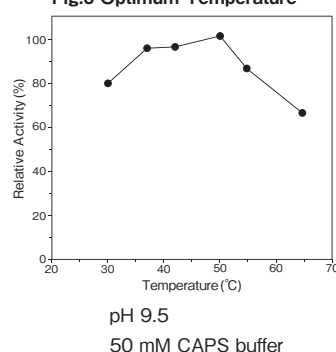
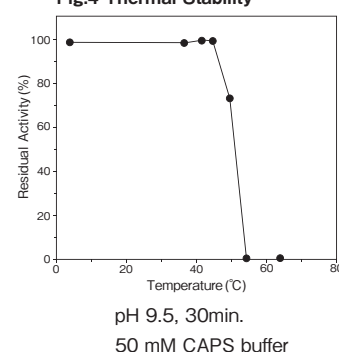
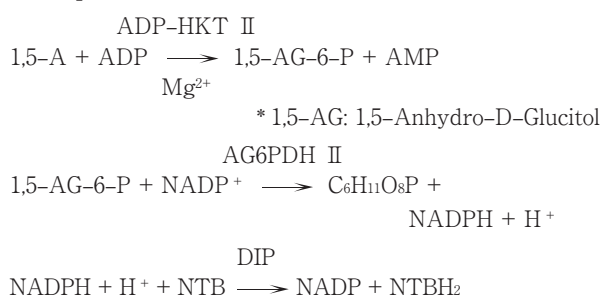


Fig.4 Thermal Stability



## Assay

### Principle



### Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which converts 1  $\mu$ mole of 1,5-AG-6-phosphate to C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>8</sub>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 <sub>2</sub> 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) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd. #012-13533  
EDTA · 2Na: KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd. #060-29133  
Glycine: Wako Pure Chemical Industries, Ltd #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) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.  
#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 at 0 °C 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

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

$$= \Delta A \times 0.3588 \div X$$

17.0 : millimolar extinction coefficient of NTB at 550nm  
( $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$ )

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  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  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:  
シグマ社製 #T-1503  
ADP (アデノシンニリン酸·2Na):  
オリエンタル酵母社製

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) : 和光純薬工業社製  
#012-13533

EDTA·2Na (エチレンジアミン四酢酸ニナトリウム)  
: キシダ化学社製 #060-29133

Glycine (グリシン) : 和光純薬工業社製 特級  
#077-00735

トリトン X-100 : Dow Chemical 社製

NTB (ニトロテトラゾリウムブルー) :

同仁化学工業社製 #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) : 和光純薬工業社製 #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/テストを正確に分注する。
2. 1,5-AG 基質液を 0.05ml/テスト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/テストを加える。  
※上記混合液は使用するまで水中に保存する。

3. 次に各々時間を定めて 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. 各々正確に 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。

$$\begin{aligned} \text{活性 (U/mg)} &= \frac{\Delta A}{17.0} \times \frac{3.05}{0.05} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{X} \\ &= \Delta A \times 0.3588 \div X \end{aligned}$$

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)