

CHOLESTEROL ESTERASE [CEBP-M]

from *Microorganism*
(Sterol-ester acylhydrolase, EC 3.1.1.13)
(Sterol esterase)



★ Advantage
High liquid stability

Preparation and Specification

Appearance : White to light brownish amorphous powder, lyophilized
Specific activity : More than 10 U/mg solid

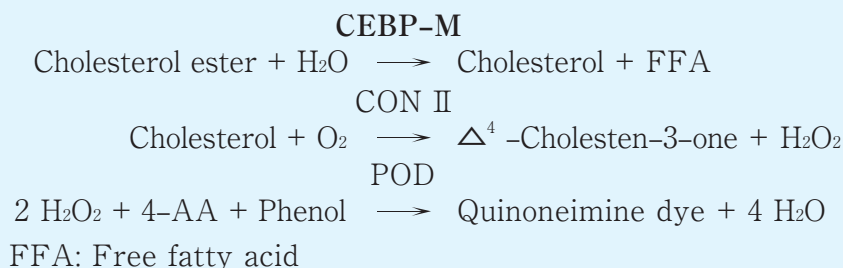
Properties

Substrate specificity : See Table 1
Molecular weight : 87 kDa (gel filtration)
62 kDa (SDS-PAGE)
Isoelectric point : pH 5.0 ± 0.2
Optimum pH : 7.0 Figure 1
pH stability : 5.0-8.0 (37°C, 60 min) Figure 2
Optimum temperature : 45°C (Phosphate buffer) Figure 3
Thermal stability : Stable at 55°C and below (pH7.5, 10 min) Figure 4
Liquid stability : See Figure 5
Effect of metal ions : See Table 2
Effect of detergents : See Table 3

Applications for Diagnostic Test

This enzyme is useful for enzymatic determination of **total cholesterol** when coupled with cholesteryl oxidase (T-84 and T-101).

This enzyme is suitable for assembling in liquid reagents.



2. Enzyme dilution buffer
10mM KH₂PO₄-NaOH buffer pH 7.5 containing 0.1% (W/V) BSA.
3. Reagents
Triton X-100: The Dow Chemical Company
CO: Asahi Kasei Pharma Corporation
Calf serum: GIBCO Co. (USA)
BSA: Millipore Fraction V pH5.2 #81-053
4-AA: NACALAI TESQUE, INC. Special grade #01907-52
POD: Sigma Chemical Co. Type II #P-8250

■ 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 0.30-0.50 U/ml.

■ Procedure

- Pipette accurately 3.0 ml of reaction mixture into a small test tube and preincubate it at 37°C.
- After 10 min, add 50 μl of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C.
※ In the case of a test blank, add 50 μl of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution.
- After starting the reaction, measure the rate of increase per minute in absorbance at 493 nm. The rate must be measured within the linear portion of the absorbance curve.

$$\begin{aligned} \text{Absorbance sample} &: \text{As/min} \\ \text{blank} &: \text{Ab/min} \\ \Delta A/\text{min} &= (\text{As/min} - \text{Ab/min}) \leq 0.040 \text{ Abs/min} \end{aligned}$$

■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg of powder)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{12.0 \times 1/2} \times \frac{3.05}{0.05} \times \frac{1}{X}$$

- 12.0 : millimolar extinction coefficient of quinoneimine dye at 493 nm (cm²/ μmole)
1/2 : a multiplier derived from the fact that 2 mole of H₂O₂ produce 1 mole of quinoneimine dye
3.05 : final volume (ml)
0.05 : 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

- Bradford, M. B., (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P.C. (1974) Clin. Chem., **20**, 470-475.
- Kameno, Y., Nakano, N. and Baba, S. (1976) Jap. J. Clin. Path., **24**, 650.

CEBP-M 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

- 反応試薬混合液

0.2M KH ₂ PO ₄ -NaOH 緩衝液 pH6.8	0.60 ml
0.35% 4-AA 溶液	0.30 ml
0.2% (W/V) フェノール溶液	0.30 ml
100U/ml POD 溶液 ¹⁾	0.30 ml
3% (W/V) トリトン X-100 溶液	0.30 ml
10U/ml CO 溶液 ²⁾	0.60 ml
基質溶液 ³⁾	0.30 ml
精製水	0.30 ml

 - 100U/ml POD 溶液
POD1,000 単位 (PPU) を精製水 10ml で溶解する。
 - 10U/ml CO 溶液
CO 100 単位 (U) を CO 溶解用液^{※)}10ml で溶解する。
※): CO 溶解用液
0.05% (W/V) トリトン X-100 を含む 0.1M KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 緩衝液 pH7.0
 - 基質溶液
仔牛血清液
- 酵素溶解希釈用液
0.1% (W/V) BSA を含む 10mM KH₂PO₄-NaOH 緩衝液 pH7.5
- 試薬
トリトン X-100 : Dow Chemical 社製
CO (コレステロール酸化酵素) : 旭化成ファーマ製
仔牛血清液 (Calf serum) : GIBCO (USA) 社製
BSA: Millipore 社製 Fraction V pH5.2 #81-053
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

II. 酵素試料液

検品約 20mg を精密に量り、酵素溶解希釈用液に溶解して全容 20ml とする。
その液を酵素溶解希釈用液で 0.30~0.50U/ml 濃度となるように適宜希釈する。

III. 測定操作法

- 小試験管に反応試薬混合液を 3.0ml 正確に分注して 37°C で予備加温する。
- 10 分経過後、酵素試料液 50 μl 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 50 μl を加える。
- 反応開始後、493nm における吸光度を測定して直線的に反応している 1 分間当たりの吸光度変化を求め、求められた吸光度変化を試料液は As/min、盲検液は Ab/min とする。

$$\Delta A/\text{min} = (\text{As/min} - \text{Ab/min}) \leq 0.040 \text{ Abs/min}$$

IV. 計算

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{12.0 \times 1/2} \times \frac{3.05}{0.05} \times \frac{1}{X}$$

- 12.0 : キノンイミン色素の 493nm におけるミリモル分子吸光数 (cm²/ μmole)
1/2 : H₂O₂ 2 モルからキノンイミン色素 1 モルが生成することによる係数
3.05 : 反応総液量 (ml)
0.05 : 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)