

BILIRUBIN OXIDASE (BOD II)

from : *Bacillus subtilis*
(bilirubin : oxygen oxidoreductase, EC 1.3.3.5)



Preparation and Reference

Appearance : Light blue to blue powder
Specific activity : More than 5.0U/mg

Properties

Substrate specificity : bilirubin, ditaurobilirubin, ABTS
Molecular weight : 60 kDa (SDS-PAGE)
Isoelectric point : 6.0
Optimum pH : pH 6.0-8.0 (bilirubin), pH 3.0-4.0 (ditaurobilirubin),
pH 4.0-5.0 (ABTS)
Thermal stability : ~80° C potassium phosphate buffer (pH 7.0)
Inhibitor : NaN₃

Applications for Diagnostic Test

Bilirubin or ditaurobilirubin determination

Fig.1 pH Optimum

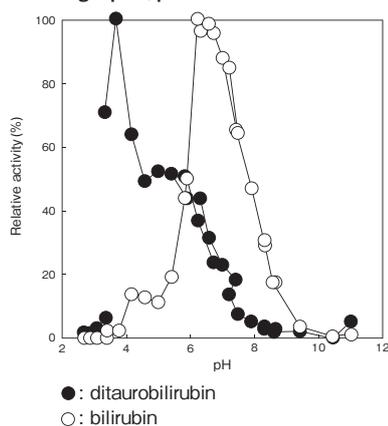
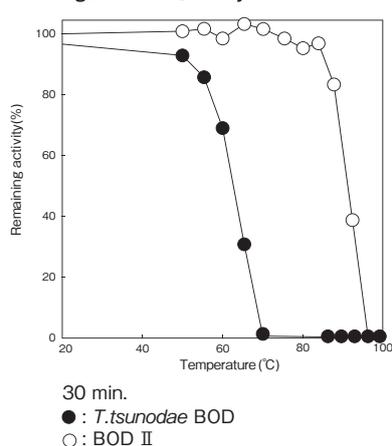


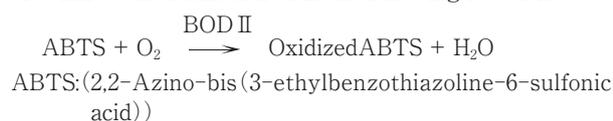
Fig.2 Thermal Stability



Assay

Principle

The assay is based on the increase in absorbance at 405 nm as the formation of in the following reactions:



Unit definition

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

Reagents

- Reaction mixture
Dissolve 274 mg of ABTS with 0.1 M Citric acid-trisodium Citrate Dihydrate pH 4.5 to make a total of 100 ml
- Enzyme dilution buffer
10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 containing 0.05 % (W/V) BSA
- Reagent
Citric acid·H₂O: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Special grade #035-03495
Tris (hydroxymethyl) aminomethane :
Sigma-Aldrich Co. #T1503
Trisodium Citrate Dihydrate:
Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Special grade
#191-01785
ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): Sigma Chemical Co. #A1888
BSA: Millipore Co. Fraction V pH5.2

Enzyme solution

Dilute with the enzyme dilution buffer to adjust the concentration to 0.05 U/ml

Procedure

- Pipette accurately 1.0 ml of reaction mixture into a small test tube and preincubate at 37°C.
- After 5min, add 20 μl of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C.
※ In the case of a test blank, add 20 μl of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution.
- After starting the reaction, measure the rate of increase per minutes in absorbance at 405 nm. The rate must be measured within the linear portion of the absorbance curve.

$$\begin{aligned} \text{Absorbance sample} &: \text{As/min} \\ \text{blank} &: \text{Ab/min} \\ \Delta A/\text{min} &= \text{As/min} - \text{Ab/min} \leq 0.20 \text{Abs.} \end{aligned}$$

Calculation

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{36 \times 3} \times \frac{1.02}{0.02} \times D$$

$$= \Delta A/\text{min} \times 0.47 \times D$$

36 : millimolar extinction coefficient of ABTS at 405 nm
($\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

3 : Coefficient of transformation when substrate is bilirubin.

1.02 : final volume (ml)

0.02 : volume of enzyme solution (ml)

D : times of dilution in enzyme solution

Storage

Storage at -20°C in the presence of a desiccant is recommended.

References

Sakasegawa, S., Ishikawa, H., Imamura, S., Sakuraba, H., Goda S., and Ohshima T. (2006) Appl. Environ. Microbiol., **72**, 972.

BOD II 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

- 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5
クエン酸 21.0g を精製水で全容 1L とする。クエン酸 Na 29.4g を精製水で全容 1L とする。
クエン酸溶液とクエン酸 Na 溶液を混合して、pH を 4.5 (25°C) に調製する。
- 試薬混合液
ABTS 274mg を 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5 で溶解し、全容 100ml とする。
- 酵素溶解希釈用液 (0.05% BSA を含む 10mM トリス-HCl 緩衝液 pH8.5)
BSA 0.50g を 10mM トリス-HCl 緩衝液 pH8.5 で溶解し、全容 1L とする。
- 試薬リスト
クエン酸 (Citric acid·H₂O) MW=210.14:
和光純薬工業製 特級 #035-03495
クエン酸三ナトリウム二水和物 (Trisodium Citrate Dihydrate) MW=294.10:
和光純薬工業製 特級 #191-01785
トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン MW=121.1:
シグマ社製 # T1503
ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) MW=548.7: シグマ社製 #A1888
BSA: MILLIPORE 社製 Fr V, pH5.2 #81-053

II. 酵素試料液

0.05U/ml になるように、酵素溶解希釈用液で溶解する。

III. 測定操作法

- 石英セルに試薬液を 1.0ml ずつ正確に分注して 37°C で予備加温する。

2. 5分経過後、酵素試料液 20 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 20 μl を加える。

- 反応開始後、405 nm における吸光度を測定して、3分目から5分目の1分間当たりの吸光度変化を求める。

求められた吸光度変化を

試料液については As/min

盲検液については Ab/min とする。

$\Delta A/\text{min} = A_s/\text{min} - A_b/\text{min} \leq 0.20 \text{Abs.}$

IV. 計算

$$\text{活性 (U/ml)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{36 \times 3} \times \frac{1.02}{0.02} \times D$$

$$= \Delta A/\text{min} \times 0.47 \times D$$

36 : ABTS のミリモル分子吸光係数 (cm²/ μmol)

3 : 基質をピリルビンにした値に合わせる為の係数

1.02 : 反応総液量 (ml)

0.02 : 反応に供した酵素試料液量 (ml)

D : 酵素試料液の調製希釈倍数

V. 注意点

- 本来の基質であるピリルビンを基質として活性測定が困難なので、ABTS を基質として活性測定し、ピリルビンを基質として活性値に合うように係数で調整した。
- 試薬混合液に使用の 0.1M クエン酸-クエン酸 Na pH4.5 について調製後の保存期間により活性値の上昇が認められたため用時調整とする。