

# 12 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase [12 $\alpha$ -HSD II ]

from: *Bacillus sphaericus*

(12  $\alpha$  -Hydroxysteroid: NAD<sup>+</sup>12  $\alpha$  -oxidoreductase, EC 1.1.1.176)



## Preparation and Reference

Appearance : White to light brownish amorphous powder, lyophilized

Specific activity : More than 100 U/mg solid

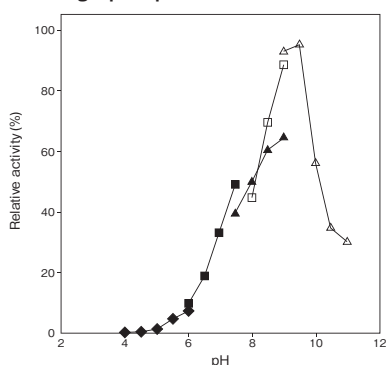
## Properties

Molecular weight	: 25 kDa (Superdex 200 HR 10/30) 78 kDa (SDS-PAGE)	
Isoelectric point	: pH 4.8	
Michaelis constant	: Cholic acid $4 \times 10^{-4}$ M	
Optimum pH	: pH 9.5	Figure 1
pH stability	: pH 7.0–8.5 (37°C, 60 min)	Figure 2
Thermal stability	: Stable at 40°C and below (pH 9.0, 10 min)	Figure 3
Thermal Optimum	: 45°C	Figure 4
Activators	: Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>	
Inhibitors	: Fe <sup>2+</sup> , EDTA,	
Storage stability	: At least one year at -20°C	
Effect of various chemicals	:	

Table 1. Effect of metal ions on 12  $\alpha$ -HSD II activity

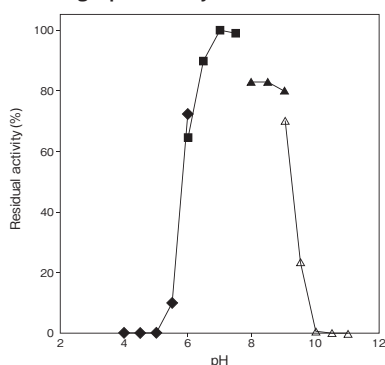
Metal ion	Concentration	Relative activity (%)
None	—	100.0
MgCl <sub>2</sub>	0.5mM	130.5
MnCl <sub>2</sub>	0.5mM	146.9
CaCl <sub>2</sub>	0.5mM	123.2
LiCl <sub>2</sub>	0.5mM	106.4
Ba(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0.5mM	125.4
NaCl	0.1M	129.7
CoCl <sub>2</sub>	0.5mM	104.8
FeCl <sub>2</sub>	0.5mM	73.8
KCl	0.1M	135.6
EDTA	1mM	77.9

Fig.1 pH Optimum



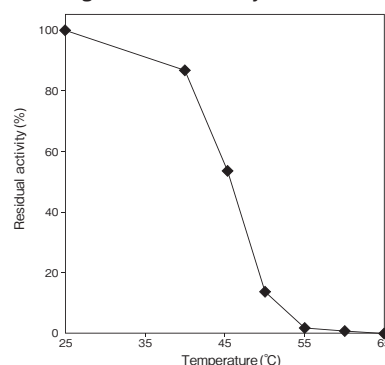
◆ : Acetate buffer  
 ■ : Phosphate buffer  
 ▲ : Tris-HCl buffer  
 □ : TAPS-NaOH buffer  
 △ : Carbonate buffer

Fig.2 pH Stability



37°C 1hr.  
 ◆ : Acetate buffer  
 ■ : Phosphate buffer  
 ▲ : TAPS-NaOH  
 △ : Carbonate buffer

Fig.3 Thermal Stability

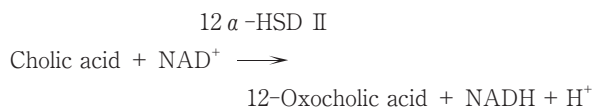


20 mM Carbonate Buffer  
 pH 9.0, 10 min

## Assay

### Principle

The assay is based on the increase in absorbance at 340 nm as the formation of NADH proceeds in the following reaction:



### Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which oxidizes 1  $\mu$ mole of Cholic acid to 12-Oxochoholic acid per minute at 37°C under the conditions specified in the assay procedure.

### Reagents

- Reaction mixture
 

1 M Diethanolamine-HCl buffer pH 9.5	0.12 ml
50 mM Cholic acid sodium salt solution	0.06 ml
20 mM NAD solution	0.45 ml
1 % Triton solution	0.60 ml
Distilled water	0.60 ml

### 2. Enzyme dilution buffer

10 mM PIPES<sup>1</sup>-NaOH buffer pH 8 containing 0.1 % (W/V) BSA

1): PIPES: [Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid) ]

### 3. Reagent

PIPES: Dojindo Laboratories #345-02225

Triton X-100: The Dow Chemical Company

Diethanolamine: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Special grade #093-03115

Sodium cholate: Tokyo Kasei Koryo Co., Ltd. Special grade

#C 0325

NAD: NACALAI TESQUE, INC. #24334-84

BSA: Millipore FractionV pH 5.2 #81-053

### 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 as required.

## ■ Procedure

1. Pipette accurately 3.0 ml of reaction mixture into a small test tube and Preincubate at 37°C.
2. After 5 min. add accurately 60  $\mu$ l of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C.  
※ In the case of a test blank add 60  $\mu$ l of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution.
3. After starting the reaction, measure the rate of increase per minutes in absorbance at 340 nm. The rate must be measured within the linear portion of the absorbance curve.

Absorbance sample : As/min

blank : Ab/min

$$\Delta A/\text{min} = (\text{As}/\text{min} - \text{Ab}/\text{min}) \leq 0.050 \text{ Abs}/\text{min}$$

## ■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.22} \times \frac{3.06}{0.06} \times \frac{1}{X}$$

6.22 : millimolar extinction coefficient of NADPH at 340nm  
( $\text{cm}^2 / \mu\text{mole}$ )

3.06 : final volume (ml)

0.06 : volume of enzyme solution (ml)

X : concentration of the sample in enzyme solution

## Storage

Storage at  $-30^\circ\text{C}$  in the presence of adesiccant is recommended

## References

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

## 12 $\alpha$ -HSD II 活性測定法 (Japanese)

### I. 試薬液

1. 1M ジエタノールアミン-HCl 緩衝液 pH9.5  
ジエタノールアミン 10.51g を精製水 80ml に溶解した後、Conc. HCl で pH9.5 (25°C) に調整し、精製水で全容 100ml とする。
2. 50mM コール酸ナトリウム溶液  
コール酸ナトリウム 1.08g を精製水で溶解して全容 50ml とする。
3. 20mM NAD 溶液  
NAD 143mg を精製水 10ml で溶解する。
4. 1% トリトン X-100 溶液  
トリトン X-100 溶液を w/w% にて 1% となるよう、50-100mL 調製する。
5. 反応試薬混合液  

1M ジエタノールアミン-HCl 緩衝液 pH9.5	0.12 ml
50mM コール酸ナトリウム溶液	0.06 ml
20mM NAD 溶液	0.45 ml
1% トリトン X-100 溶液	0.60 ml
精製水	1.77 ml
6. 酵素溶解希釈用液 (10mM PIPES pH8.0, 0.1%BSA)  
PIPES 0.3g を精製水 80ml に溶解した後、1N NaOH で pH8.0 (25°C) に調整し、BSA を 0.1g 添加して完全に溶解した後、精製水で全容 100ml とする。
7. 試薬リスト  
 ジエタノールアミン MW=105.14:  
和光純薬工業製 特級 #093-03115  
 コール酸ナトリウム MW=430.56:  
東京化成製 #C 0325  
 NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド・酸化型):ナカライテスク社製 #24334-84

トリトン X-100:Dow Chemical 社製

PIPES MW=302.37:同仁化学製 #345-02225

BSA:Millipore 社製 Fraction V pH5.2 #81-053

### 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 3.0ml ずつを正確に分注し、37°C で予備加温する。
2. 5分経過後、酵素試料液 60  $\mu$ 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 60  $\mu$ l を加える。
3. 反応開始後、340nm 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らる。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。

※吸光度範囲

$$\Delta A/\text{min} = (\text{As}/\text{min} - \text{Ab}/\text{min}) \leq 0.050 \text{ Abs}/\text{min}$$

### IV. 計算

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.22} \times \frac{3.06}{0.06} \times \frac{1}{X}$$

6.22 : NADPH の 340nm におけるミリモル分子吸光係数 ( $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$ )

3.06 : 反応総液量 (ml)

0.06 : 反応に供した酵素試料液量 (ml)

X : 酵素試料液の検品濃度