

不同因素对泡囊水溶液中磷脂酶 A_2 活性的影响

郑碧云¹, 冯玉英², 许久辰¹, 张英华¹, 安学勤¹

(1. 南京师范大学化学与环境科学学院 210097, 江苏, 南京)

(2. 南京师范大学分析测试中心 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 首次在泡囊水溶液中研究磷脂酶 A_2 催化水解卵磷脂并考察了各种因素对该反应的影响. 研究结果表明: 在泡囊水溶液中磷脂酶 A_2 水解卵磷脂的最佳温度为 50℃.

[关键词] 泡囊水溶液, 磷脂酶 A_2 , 卵磷脂, 水解

[中图分类号] O614.33, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)01-0077-03

The Effect of Different Factors on the Specific Activity of PL A_2 in Vesicle Solution

Zheng Biyun¹, Feng Yuying², Xu Jiuchen¹, Zhang Yinghua¹, An Xueqin¹

(1. School of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Analysis and Test Center, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract The hydrolysis of lecithin by phospholipase A_2 was firstly studied in vesicle solution and the influence of relevant parameters was investigated. The result shown that the optimum temperature is 50℃ for the hydrolysis of lecithin by PLA₂ in vesicle solution.

Key words Vesicle solution, phospholipase A_2 , lecithin, hydrolysis

0 引言

磷脂酶 A_2 (PLA₂) 是一类催化磷脂二位酰基水解的脂肪酶, 广泛存在于动、植物和细菌体内. 在生物介质中 PLA₂ 水解卵磷脂生成溶血性卵磷脂和游离脂肪酸, 有介导急、慢性炎症的作用^[1]. 大多数酶催化反应采用缓冲溶液作为反应介质, 但缓冲溶液不能很好地模拟天然生物体系. 近年来的研究表明微乳液能够长时间保持酶活性, 甚至可能使酶具有超活性. 我们前期工作研究了磷脂酶 A_2 在油包水型(W/O) 微乳液中的水解反应^[2], 然而, 因为生物体中的介质绝大多数是亲水的, W/O 型微乳液仍然不能很好地模拟生物体内的微环境. 水包油型(O/W) 微乳液和泡囊水溶液能够很好地模拟生物体介质, 在泡囊水溶液中的酶催化反应未见文献报道. 本文采用卵磷脂/十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)/庚烷/水形成的泡囊水溶液作为 PLA₂ 水解反应的介质, 研究 PLA₂ 水解蛋黄卵磷脂的催化反应, 考察 PLA₂ 浓度、钙离子浓度、温度等各种因素对该反应的影响.

1 实验

仪器: 紫外-可见分光光度计(U-3400 Spectrophotometer HITACHI).

试剂: 磷脂酶 A_2 (购置于 SIGMA 公司)、卵磷脂、正庚烷、十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)、三羟甲基氨基甲烷 Tri(hydroxymethyl) aminomethane], 浓盐酸、酚红等为国产试剂, 纯度均高于 98%.

根据研究需要, 配制含 $CaCl_2$ 、卵磷脂、酚红、磷脂酶 A_2 的泡囊水溶液作为 PLA₂ 水解卵磷脂的反应介

收稿日期: 2004-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金(20273032, 29873020), 教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目.

作者简介: 郑碧云, 女, 1978—, 硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究. E-mail: zbytexlu@163.com

通讯联系人: 安学勤, 女, 1951—, 教授, 博士生导师, 主要从事物理化学的教学与研究. E-mail: anxueqin@njnu.edu.cn

质. 分别考察了各种变量对酶活性和反应速率的影响, 获得各变量的最佳浓度. 采用最佳实验条件, 用分光光度法研究磷脂酶 A_2 水解卵磷脂的反应. 磷脂酶 A_2 水解卵磷脂产生游离脂肪酸, 在体系的 pH 值为 8.5 时, 该脂肪酸可与酚红作用生成络合物^[3], 在 559 nm 处产生特征吸收. 本实验在 559 nm 处检测吸光度随反应时间变化的规律, 根据标准曲线, 将吸光度转化为游离脂肪酸的浓度, 根据游离脂肪酸浓度随时间的变化, 得到酶活性和反应速率. 分光光度计检测的参比采用除了磷脂酶 A_2 以外的所有物质的混合液, 这样可以减少由于反应复杂而引起的不必要的误差.

2 结果与讨论

本实验考察了酶浓度对在泡囊水溶液中进行的 PLA_2 水解反应速率的影响. 研究结果显示: 当酶浓度较低时, 反应速率随着酶浓度的加大而直线增加, 但当酶的浓度加大时, 反应速率的增加减缓, 其原因可能是随着酶浓度的增加, 反应产物溶血性卵磷脂和游离脂肪酸的浓度迅速增加, 抑制了反应向生成溶血性卵磷脂和游离脂肪酸的方向进行. 如图 1 所示, 在泡囊水溶液中酶浓度对反应速率的影响远远大于在 W/O 型微乳液中的影响, 可能是因为泡囊水溶液中酶分子的总数大于 W/O 型微乳液体系酶的数目.

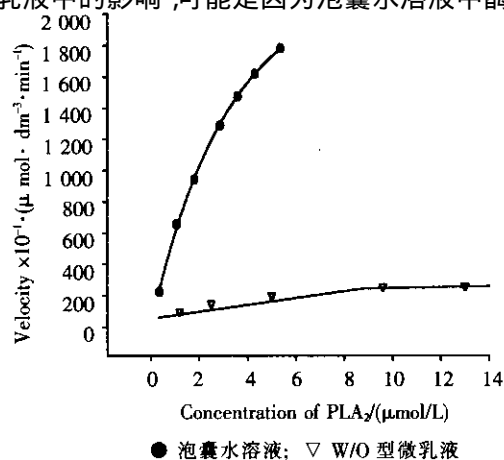


图 1 磷脂酶 A_2 浓度对水解磷脂速率的关系

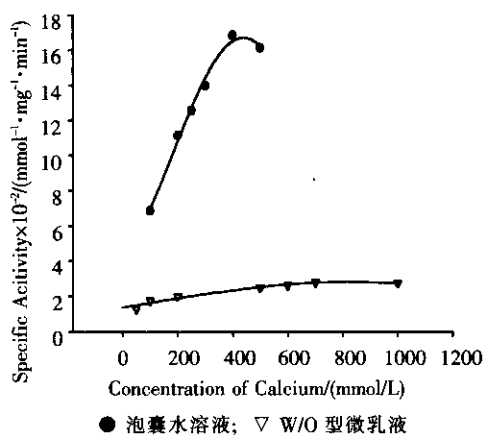


图 2 Ca^{2+} 浓度对磷脂酶 A_2 水解磷脂反应的作用

金属离子加入 W/O 型微乳液的反应体系后, 增加磷脂酶 A_2 的催化活性^[4,5]. 本实验考察了金属离子 Ca^{2+} 对在泡囊水溶液中磷脂酶 A_2 催化活性的影响. 研究表明: 在泡囊水溶液中磷脂酶 A_2 的催化活性与 Ca^{2+} 浓度密切相关, 随着 Ca^{2+} 浓度的增大, 酶活性急剧增加, 当 $[Ca^{2+}] = 400 \text{ mmol/L}$ 时, 酶的活性最大, 当 Ca^{2+} 浓度超过 400 mmol/L 后活性呈下降趋势, 如图 2 所示. 在 W/O 型微乳液体系中, Ca^{2+} 对磷脂酶 A_2 的催化反应呈现相似的促活作用^[4], 图 2 比较了在两种不同反应介质中 Ca^{2+} 对磷脂酶 A_2 催化反应的影响. Ca^{2+} 对磷脂酶 A_2 的催化反应促活的原因是:

Ca^{2+} 与酶的活性部位结合后, 可以维持酶活性部位空间结构, 增加酶活性^[4].

温度对酶反应速率具有双重影响^[6]. 一方面温度升高, 增加分子的热运动, 反应速率加快; 另一方面, 温度升高, 酶容易失活变性, 导致反应速率下降. 我们研究了在泡囊水溶液中温度对反应的影响, 如图 3 所示. 温度上升, PLA_2 催化活性增大, 最大活性温度在 50°C , 当温度继续上升时, 酶开始失活, 其活性下降. 本实验研究 PLA_2 在泡囊水溶液中的反应的酶最佳活性温度与文献报道^[4]的水溶液中最优温度 (50°C) 相吻合.

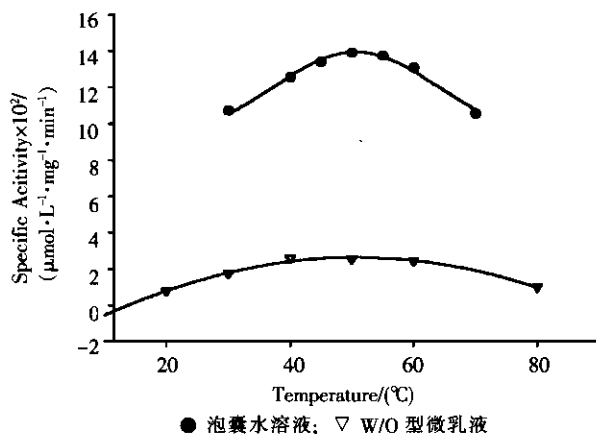


图 3 温度对磷脂酶 A_2 水解卵磷脂反应的影响

3 结论

本实验首次研究了在泡囊水溶液中磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应,考察了各种因素对该反应的影响. 研究表明,磷脂酶 A₂ 水解反应的最佳温度为 50℃,在泡囊中酶与微乳液体系中的磷脂酶 A₂ 水解反应受多种因素的影响:酶浓度增加,反应速率增加,钙离子浓度增加,酶活性增加.

[参考文献]

- [1] 陈莉延,梁标. 磷脂酶 A₂ 的研究进展[J]. 国外医学(生理病理学与临床分册), 2000, 20(6): 385—393.
- [2] 李严,安学勤. 微乳液中磷脂酶 A₂ 催化水解卵磷脂反应研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2003, 26(3): 44—46.
- [3] Peter Walde. A Colorimetric Determination of Fatty Acids as a New Assay of lipase in Reverse Micelles[J]. JAOCS, 1990, 67(2): 110—115.
- [4] Morgado M A P, Cabral J M S, Prazeres D M F. Hydrolysis of Lecithin by Phospholipase A₂ in Mixed Reversed Micelles of Lecithin and Sodium Dioctyl Sulphosuccinate[J]. J Chem Tech Biothechnol, 1995, 63(2): 181—189.
- [5] 张曼夫. 生物化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [6] 陈石根,周润琦. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1997.

[责任编辑: 孙德泉]

公 告

本刊先后加入中国学术期刊(光盘版)、万方数字化期刊群([www. periodicals. net. cn](http://www.periodicals.net.cn))、中国期刊网([http ://www. cnki. net](http://www.cnki.net))、中文科技期刊数据库([www. cqvip. com](http://www.cqvip.com))、龙源国际期刊网([www. qikan. net](http://www.qikan.net))、台湾地区的华艺 CEPS 中文电子期刊([www. ceps. com. tw](http://www.ceps.com.tw)). 在我刊向作者支付的稿酬中已包括上述机构使用作者作品时应支付的稿酬. 如作者不同意自己的文章被上述数据库收录, 请勿向本报投稿.

特此公告

南京师大学报(自然科学版)

2004 年 12 月 20 日