

反胶束体系的光密度与酶活性测定

张东方, 初志战, 黄卓烈, 何勇虎, 朱磊

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:以正庚烷-正丁醇-大豆卵磷脂配制反胶束,做了增溶不同量 Tris-HCl 缓冲液的试验. 结果表明:增溶不同水量的反胶束体系稳定性不一样,每 3 mL 增溶 40~90 μL 缓冲液的反胶束体系光密度在 0~300 s 内不断变化,透明澄清的稳定反胶束体系分布在每 3 mL 增溶 0~40 μL 及 90~130 μL 2 个区间. 增溶水量较少时,反胶束增溶含蛋白质与不含蛋白质水相的体系之间存在差别. 在水-正庚烷-正丁醇-大豆卵磷脂反胶束体系中未发现核糖核酸酶 A1(RNase A1)的超活性.

关键词:反胶束;微乳;卵磷脂;核糖核酸酶 A1

中图分类号:Q55, O647. 11

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2005)04-0088-04

Optical density and enzyme activity in reverse micelles

ZHANG Dong-fang, CHU Zhi-zhan, HUANG Zhuo-lie, HE Yong-hu, ZHU Lei

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Different amount of Tris-HCl buffer were solubilized in the reverse micelles made from heptane-butanol-lecithin. The optical densities of reverse micelles with 40~90 μL aqueous phase per 3 mL were altering in 0~300 s. Clarified reverse micelles were stable with 0~40 μL and 90~130 μL aqueous phase per 3 mL. The reverse micelles with protein was different from that with buffer at low aqueous phase. There was no "superactivity" of ribonuclease A1 (RNase A1) in the reverse micelles of water-heptane-butanol-lecithin.

Key words: reverse micelles; micro emulsion; lecithin; ribonuclease A1

国内外对反胶束酶、微乳酶有不少研究,缪炜等^[1]报道了 β -葡萄糖苷酶在反胶束体系中的活性是在缓冲液中的 11.8 倍,黄文等^[2]报道了核糖核酸酶 A1(RNase A1)在反胶束体系中的活性比在缓冲液中高 1 个数量级,还有文章对反胶束酶做了综合报道并对酶在反胶束体系中的作用机理进行阐述^[3~5]. 这么高的酶活性对酶的应用将是极有价值的. 本试验测定了反胶束增溶水体系中的酶活性,结果发现,增溶不同水量的反胶束体系稳定性不一样,不稳定的反胶束体系光密度不断变化,光密度变化幅度甚至远超出在缓冲液中酶活性测定的光密度变化;在水-正庚烷-正丁醇-卵磷脂反胶束体系中,依照前人的方法测定了 RNase A1 的活性,结果表明,酶的超活性不存在. 这一结果,可为反胶束酶、微乳酶研究工作提供数据.

1 材料与方法

1.1 供试酶

供试酶 RNase A1 为杭州维特洁公司产品,胞苷 2',3'-环磷酸钠(CP)为 Sigma 公司产品.

1.2 RNase A1 的配制

RNase A1 用 50 mmol/L、pH7.01 的 Tris-HCl 缓冲液溶解,内含体积分数为 50% 的甘油. 酶的质量浓度为 100 mg/mL.

1.3 反胶束溶液的配制

称取 1.0 g 大豆卵磷脂直接溶于 100 mL 正庚烷和 100 mL 正丁醇混合液中,得到含 5 mg/mL 卵磷脂的微黄色的透明澄清溶液.

1.4 反胶束体系的光密度变化测定

1.4.1 增溶不同水量反胶束体系的光密度变化测

定 取 1.3 所配的反胶束溶液 3.0 mL 置于石英比色杯中,分别加入 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 和 200 μL 的 50 mmol/L、pH7.01 的 Tris-HCl 缓冲液(以下所用的 Tris-HCl 缓冲液均为 50 mmol/L、pH7.01),振荡后立即以 5 s 为间隔测定 $D_{290\text{ nm}}$ 的变化. 以 1.3 所配的反胶束溶液作对照.

1.4.2 反胶束体系在不同波长的光密度变化测定

取 1.3 所配的反胶束溶液 3.0 mL 置于石英比色杯中,分别加入 40 和 70 μL Tris-HCl 缓冲液,振荡后,立即以 5 s 为间隔分别测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{400\text{ nm}}$ 和 $D_{600\text{ nm}}$ 的变化. 以 1.3 所配的反胶束溶液作对照.

1.5 RNase A1 在缓冲液中的活性测定

酶活性测定方法参照文献[6],3.0 mL Tris-HCl 缓冲液置于石英比色杯中,然后加入用 Tris-HCl 缓冲液配制的 10 mg/mL 的 CP 溶液 100 μL ,比色杯置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温约 10 min,再加入 100 mg/mL 的 RNase A1 溶液 5 μL ,摇匀后立即以 5 s 为间隔测定 $D_{290\text{ nm}}$ 的变化. 以不加酶、只加 3.0 mL Tris-HCl 缓冲液和 100 μL CP 的溶液作对照.

1.6 RNase A1 在反胶束体系中的活性测定

酶活性测定方法参照文献[1、2],稍做修改.

1.6.1 3.0 mL 反胶束溶液增溶 32 μL 水量体系中的酶活性测定 取预先经 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,1.3 所配的反胶束溶液 3.0 mL 置于石英比色杯中,然后加入预先经 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,用 Tris-HCl 缓冲液配制的 10 mg/mL 的 CP 溶液 30 μL ,再加入 100 mg/mL 的 RNase A1 溶液 2 μL ,CP 溶液和酶液均在比色杯的底部,轻轻摇动比色杯,让酶和底物混合,然后振荡数秒,立即以 5 s 为间隔测定 $D_{290\text{ nm}}$ 的变化. 以 1.3 所配的反胶束溶液作对照.

1.6.2 3.0 mL 反胶束溶液增溶 110 μL 水量体系中的酶活性测定 取预先经 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,1.3 所配置的反胶束溶液 3.0 mL 置于石英比色杯中,然后加入预先经 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的 Tris-HCl 缓冲液 57 μL 以及用 Tris-HCl 缓冲液配制的 10 mg/mL 的 CP 溶液 50 μL ,再加入 100 mg/mL 的 RNase A1 溶液 3 μL ,轻轻摇动比色杯,让酶和底物混合,然后振荡数秒,立即以 5 s 为间隔测定 $D_{290\text{ nm}}$ 的变化. 以 1.3 所配的反胶束溶液作对照.

1.7 增溶含牛血清蛋白水相反胶束体系的光密度变化测定

以 Tris-HCl 缓冲液配制的 90 mg/mL 的牛血清蛋白溶液代替 1.6 中的 RNase A1 溶液,其余试剂及操作与 1.6 相同.

2 结果与分析

2.1 增溶不同水量反胶束体系的光密度变化

反胶束溶液增溶不同量水相振荡后的光密度变化如图 1.

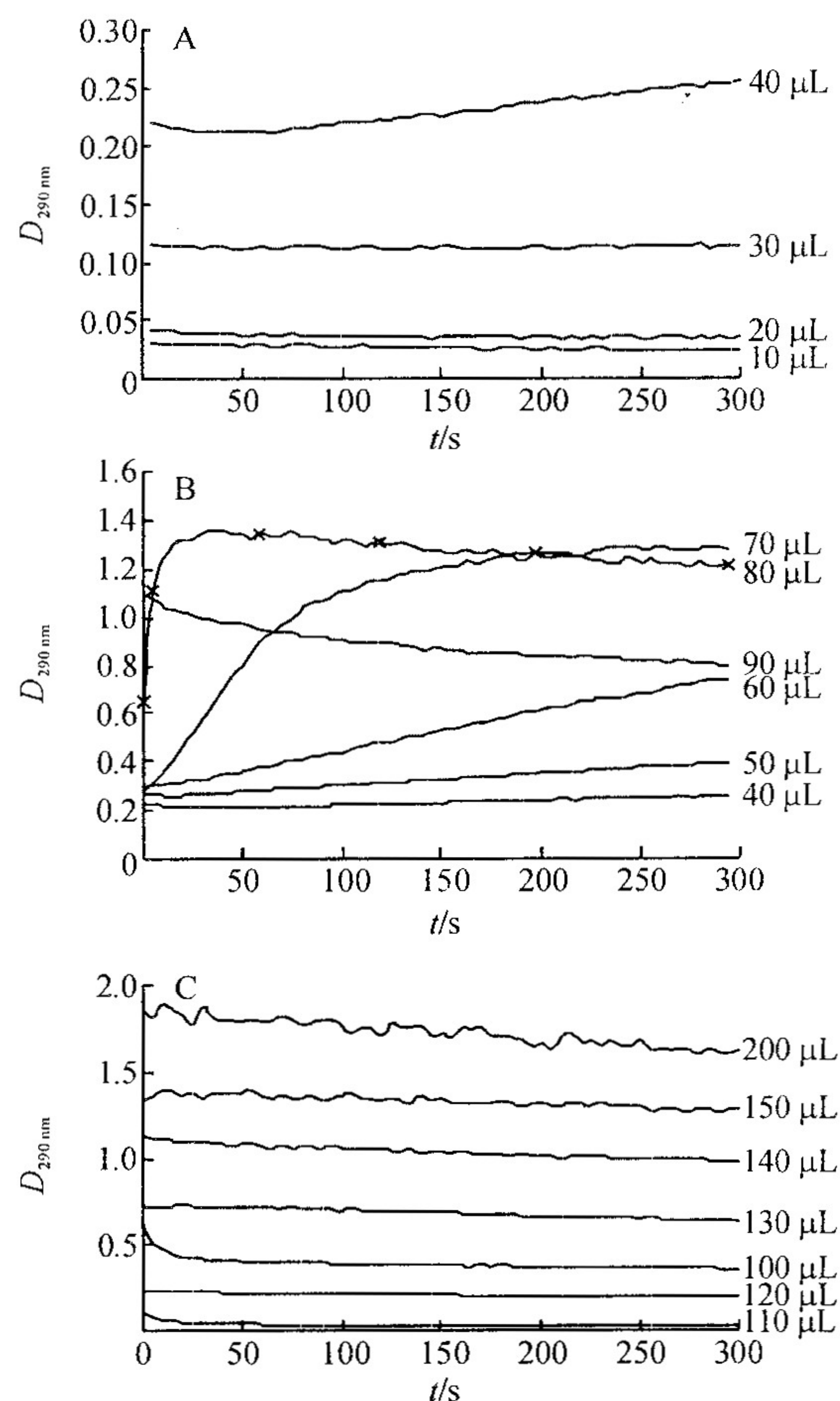


图 1 3 mL 反胶束溶液增溶不同水量体系的时间进程曲线
Fig.1 The time course curve with different aqueous phase in 3 mL reverse micelles

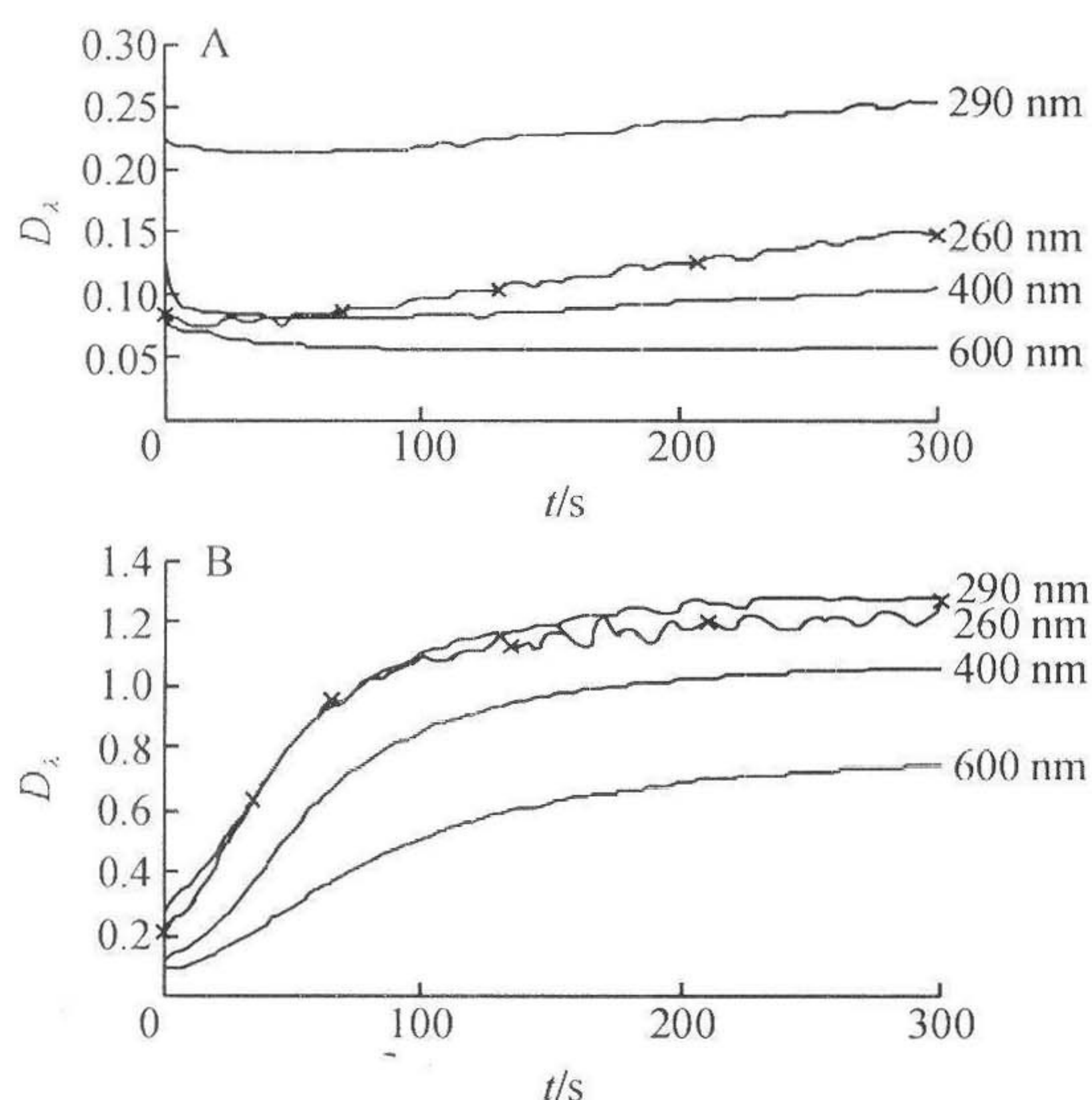
在 1.3 配置的 3.0 mL 反胶束溶液中,增溶 10 ~ 30 μL Tris-HCl 缓冲液,振荡后 300 s 内 $D_{290\text{ nm}}$ 没有明显变化;增溶 40 μL Tris-HCl 缓冲液,在振荡后 300 s 内, $D_{290\text{ nm}}$ 缓慢上升;增溶 50 ~ 60 μL 时, $D_{290\text{ nm}}$ 上升速度较快;增溶 70 μL 时,最初 $D_{290\text{ nm}}$ 上升速度很快,但到 100 s 左右就变得缓慢;增溶 80 μL 时, $D_{290\text{ nm}}$ 最初 10 s 左右上升很快,以后上升很慢,75 ~ 300 s 内, $D_{290\text{ nm}}$ 呈现下降;增溶 90 μL 时,0 ~ 300 s 内 $D_{290\text{ nm}}$ 均下降;增溶 100 ~ 110 μL 时,仅在前 15 s $D_{290\text{ nm}}$ 稍有下降,以后没有变化;增溶 120 μL 以上, $D_{290\text{ nm}}$ 都没有明显变化的趋势. 增溶 10 ~ 40 μL 及 100 ~ 120 μL 的体系,300 s 后从分光光度计取出比色杯时,体系是澄清透明的,而且除增溶 40 μL 的体系有稍微变化,其余都没有明显变化,可见是稳定的;增溶 50 ~ 90 μL 及 130 μL 以上的体系可见到混浊,读数越大

的体系越混浊. 只要保持操作的一致, 试验的重复性很好, 光密度变化的趋势是稳定的.

在 3.0 mL 反胶束溶液中, 增溶 40 ~ 90 μL 缓冲液, 振荡后形成的反胶束体系本身并不是一种稳定的结构, 光密度不断变化, 不适合在这样的体系中测定酶活性. 在 3.0 mL 反胶束溶液中, 增溶 130 μL 以上缓冲液时, 光密度读数太大, 也不适合测定酶活性. 只有在增溶 0 ~ 40 μL 及 90 ~ 130 μL 这 2 个区间能形成稳定的微乳状液, 可以测定酶活性.

2.2 反胶束体系在不同波长下的光密度变化

在按 1.3 配置的 3.0 mL 反胶束溶液中, 增溶 40 和 70 μL Tris-HCl 缓冲液, 分别测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{400\text{ nm}}$ 和 $D_{600\text{ nm}}$ 的变化, 结果如图 2. 对于增溶 40 和 70 μL 的 2 个体系, $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{290\text{ nm}}$ 、 $D_{400\text{ nm}}$ 和 $D_{600\text{ nm}}$ 在 0 ~ 300 s 内都在变化, 不同波长的光密度值大小不同, 但变化趋势相似.



A: 3 mL 反胶束溶液增溶 40 μL 水量;

B: 3 mL 反胶束溶液增溶 70 μL 水量

A: 40 μL aqueous phase in 3 mL reverse micelles;

B: 70 μL aqueous phase in 3 mL reverse micelles

图 2 反胶束体系在不同波长的时间进程曲线

Fig. 2 The time course curve of reverse micelles at different wavelength

2.3 缓冲液中 RNase A1 的活性

RNase A1 在 Tris-HCl 缓冲液中酶活性测定的时间进程曲线如图 3. 在前 150 s 酶反应进程曲线基本是直线, 每毫克酶每分钟 $D_{290\text{ nm}}$ 增加 0.2.

2.4 反胶束体系中 RNase A1 的活性

在每 3 mL 反胶束溶液增溶 0 ~ 40 μL 及 90 ~ 130 μL Tris-HCl 缓冲液这 2 个区间分别测定了 RNase A1 的活性, 结果如图 4. 2 个区间的酶活性测定时间进程曲线趋势线的斜率均小于相应的加入牛血清蛋白的时间进程曲线趋势线的斜率, 2 个区间的

RNase A1 均没有表现活性. 3 mL 反胶束溶液中加入 30 μL CP 和 2 μL 酶液(或 2 μL 牛血清蛋白), 测定 300 s 后, 从分光光度计取出比色杯, 可见轻微乳白色混浊; 加入 32 μL Tris-HCl 缓冲液, 测定 300 s 后, 从分光光度计取出比色杯, 比色杯内溶液则是完全透明澄清的; 通常蛋白质变性后的混浊程度会比此大很多, 轻微乳白色混浊可能是因为加入蛋白质后影响微乳状液的形成. 3 mL 反胶束溶液中加入 50 μL CP、57 μL 缓冲液和 3 μL 酶液(或 3 μL 牛血清蛋白), 测定 300 s 后, 从分光光度计取出比色杯, 比色杯内溶液都是完全透明澄清的, 酶(或蛋白质)没有变性, 可是也没有测出酶活性.

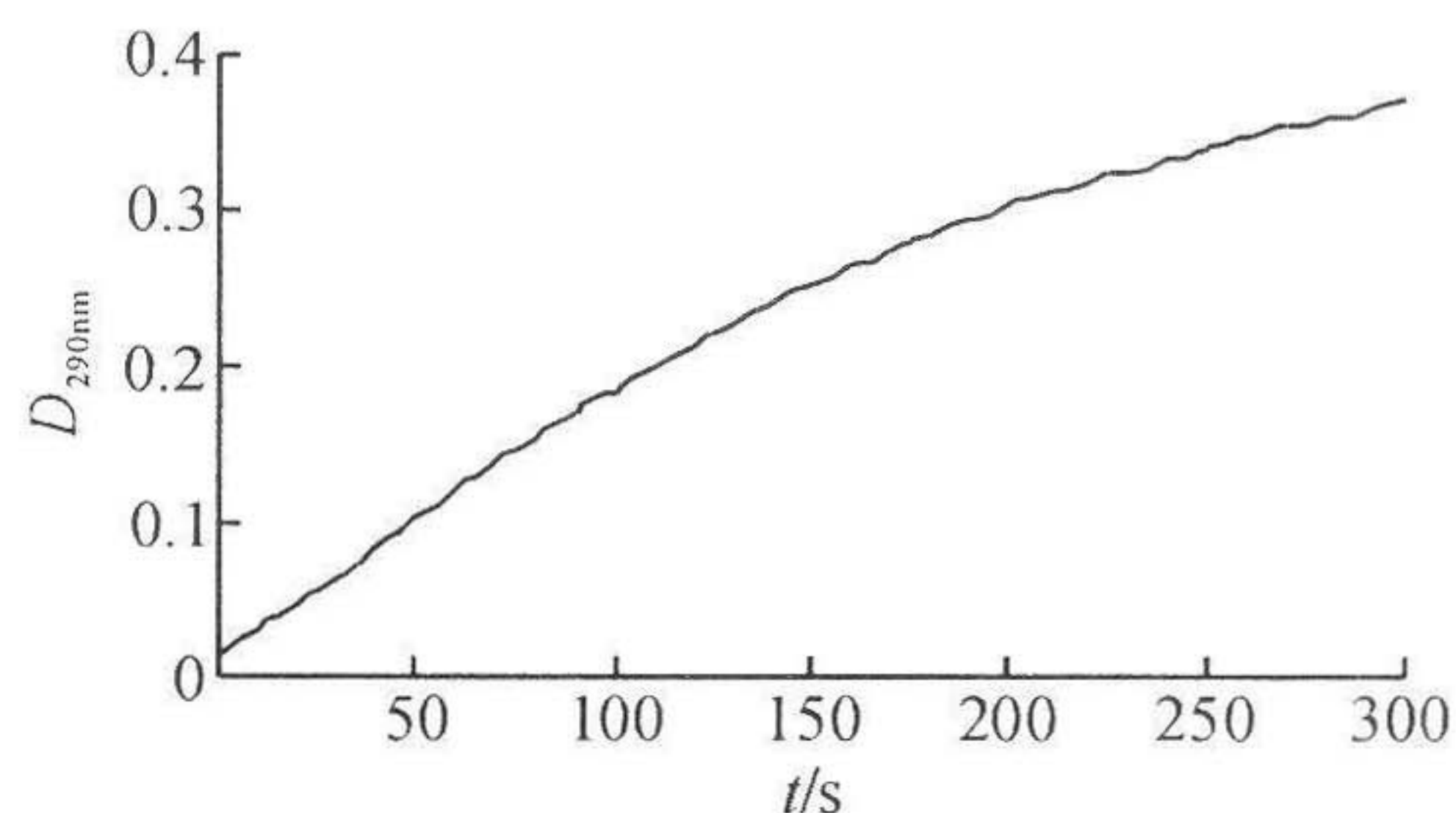
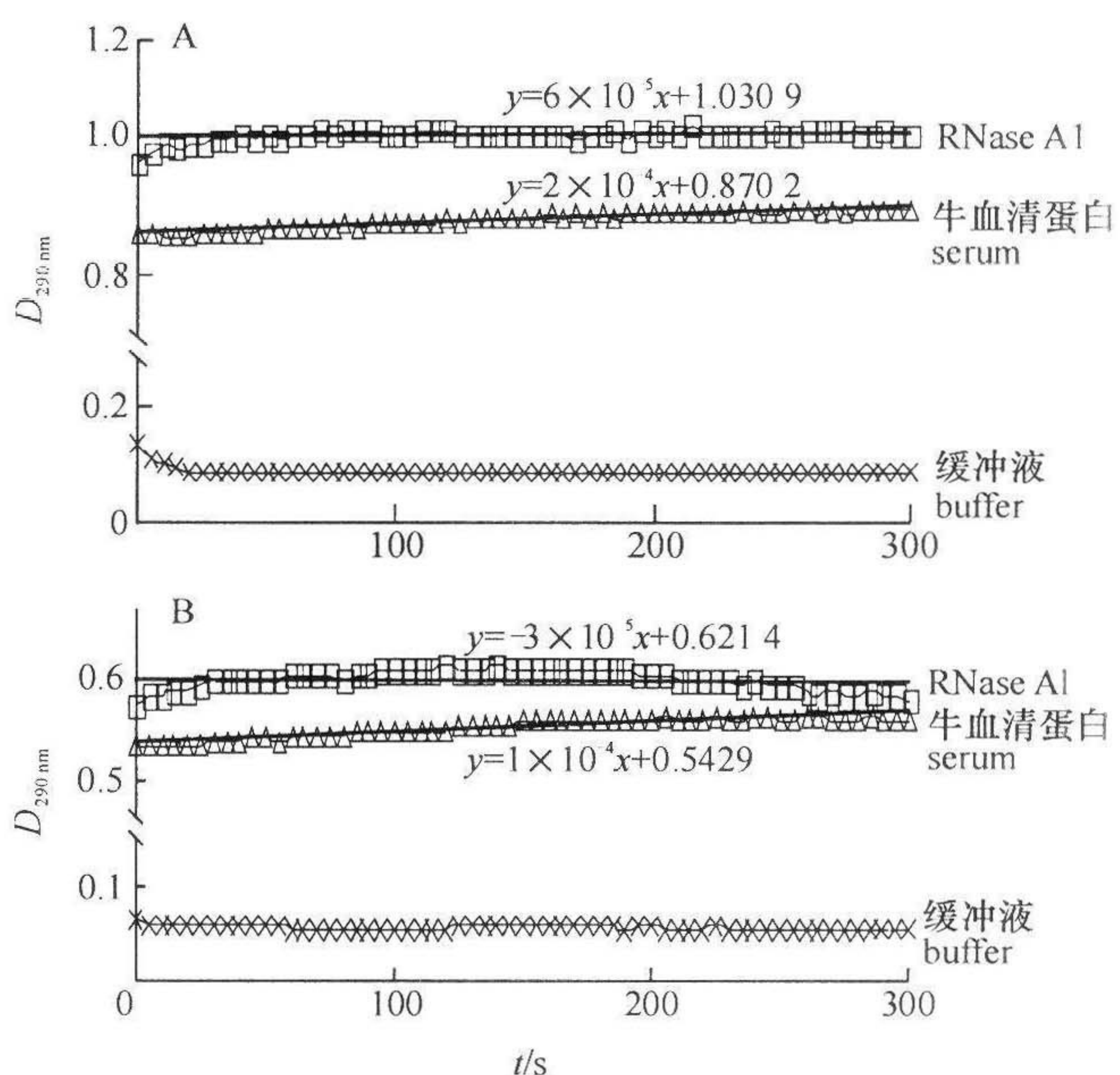


图 3 RNase A1 在缓冲液中的反应进程曲线

Fig. 3 The time course curve for RNase A1 in buffer



A: 3 mL 反胶束溶液增溶 32 μL 水量;

B: 3 mL 反胶束溶液增溶 110 μL 水量

A: 32 μL aqueous phase in 3 mL reverse micelles;

B: 110 μL aqueous phase in 3 mL reverse micelles

图 4 RNase A1 在反胶束体系中的反应进程曲线

Fig. 4 The time course curve of RNase A1 in reverse micelles

3 讨论

本研究的结果表明, 增溶不同水量的卵磷脂反胶束体系稳定性不一样. 不稳定的反胶束体系光密

度不断变化,光密度值变化幅度超出在缓冲液中酶活性测定的光密度变化,不能把反胶束体系的光密度算作酶活性.在本研究所用的正庚烷-正丁醇-大豆卵磷脂反胶束增溶水体系中未发现 RNase A1 的超活性,甚至没有测出活性.本试验 3 mL 反胶束溶液增溶 0~100 μL 水量的体系 300 s 的最后读数若列在一个图则呈现钟形曲线,如果算作酶活性,就会得出超活性的结果.

在达到浊点之前,不是所有有机相/水相比比例的反胶束体系都是透明澄清的,肉眼看不到混浊、透明澄清的稳定反胶束体系分布在 2 个区间,这一结果对反胶束或微乳液研究有一定参考价值.在 3 mL 反胶束溶液增溶 32 μL 水量体系中加入蛋白质与没加蛋白质之间存在差别,但在增溶 110 μL 水量反胶束体系中加入蛋白质后同样形成透明澄清的稳定体系,增溶水量较少时,加入蛋白质与没加蛋白质的反胶束体系存在差别.

别的表面活性剂、助表面活性剂、有机相组成的反胶束体系是否也存在本文报道的现象,有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 缪 炜,姚松年.卵磷脂反胶束体系中 β -1,4 葡萄糖苷酶的研究[J].物理化学学报,1999,15(10):931-937.
- [2] 黄 文,李晓峰,顾惕人.核糖核酸酶在 DAB-环己烷反胶束溶液中的活性[J].物理化学学报,1995,11(7):579-582.
- [3] 朱 浩,施 翥,范映辛,等.反胶束体系中的酶学研究[J].生物化学与生物物理进展,1998,25(3):204-210.
- [4] SANCHEZ-FERRER A, CARCIA-CARMONA F. Biocatalysis in reverse self-assembling structures: Reverse micelles and reverse vesicles[J]. Enzyme Microb Technol, 1994,16:409-415.
- [5] 夏仕文,俞耀庭,童明容.反胶束中的酶催化研究进展[J].化学通报,1998,2:8-13.
- [6] CROOK E W, MATHIAS A P, RABIN B R. Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2',3'-phosphate[J]. Biochem J, 1960,74:234-238.

【责任编辑 李晓卉】

(上接 87 页)

- [9] 林益明,柯莉娜,王湛昌,等.深圳福田红树林区 7 种红树植物叶热值的季节变化[J].海南学报,2002,24(3):112-118.
- [10] 梁士楚.广西红树植物群落特征的初步研究[J].广西科学,2000,7(3):210-216.
- [11] 王伯荪,余世孝,胡玉佳.深圳宝安盐灶的银叶树林[A].黄玉山,谭凤仪.广东红树林研究[C].广州:华南理工大学出版社,1995.33-35.
- [12] 谢晋阳.建立森林植物生命表的一种方法[J].江西大学学报(自然科学版),1992,16(4):383-385.
- [13] 葛 颂.遗传多样性[A].蒋志刚,马克平,韩兴国.保护生物学[C].杭州:浙江科学技术出版社,1997.11-19.
- [14] 张文辉,祖元刚,刘国彬.十种濒危植物的种群生态学

特征及致危因素分析[J].生态学报,2002,22(9):1512-1520.

- [15] FARNSWORTH E J, ELLISON A M. The global conservation status of mangroves[J]. AMBIO, 1998,26:328-334.
- [16] 张大勇,姜新华.遗传多样性与濒危植物保护生物学研究进展[J].生物多样性,1999,7(1):31-37.
- [17] SHAPCOTT A. The patterns of genetic diversity in *Carpentaria acuminata* (Arecaeae), and rainforest in northern Australia[J]. Molecular Ecology, 1998,7(7):833-847.

【责任编辑 李晓卉】