

核糖核酸酶在 DAB- 环己烷反胶束溶液中的活性

黄 文 李晓峰* 顾惕人

(北京航空航天大学化学教研室, 北京 100083)

关键词: 核糖核酸酶, 表面活性剂, 反胶束, 十二胺丁酸盐, 环己烷

表面活性剂在有机溶剂中形成的反胶束可以增溶大量的水分子, 很多水溶性的物质又可溶解在反胶束的核心水团当中, 这些都已是公认的事实^[1]. 酶在反胶束中的溶解对蛋白质的萃取分离, 生物合成等方面有着十分广阔的应用前景, 已引起了广泛的注意, 文献逐年增加^[2-4]. 核糖核酸酶 A(RNaseA) 分子量较小, 性质稳定, 活性的测定简便易行, 很适于作为反胶束-酶体系的研究对象. 但大部分研究集中在阴离子表面活性剂 Aerosol T(AOT) 的反胶束体系上, 而对其它表面活性剂反胶束-酶体系的研究很少^[5,6]. Papadimitriou 等曾发现, 糜蛋白酶和胰蛋白酶在 AOT 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 反胶束中的性质有着很大的差别^[7]. 因此系统研究不同类型的表面活性剂反胶束对酶活性的影响对酶化学的发展可能具有十分重要的意义. 本文选用表面活性剂十二胺丁酸盐 (DAB) 作为溶解 RNaseA 的反胶束, 研究了其对底物胞苷 2',3'-环单磷酸酯 (CP) 的催化水解能力, 发现 RNaseA 在 DAB 反胶束中的活性较水溶液中有很大的提高. 对于酶活性的研究, 这一结果可能为我们提供了一些新的机会.

1 实验部分

表面活性剂 DAB 参照文献 [8] 合成, 用石油醚两次重结晶, 熔点 39-41 °C, 与文献 [8] 值完全一致. RNaseA 和 CP 是 Sigma 公司的产品. 环己烷在使用前经脱水蒸馏. 其余试剂均为分析纯或化学纯试剂, 所用的水为去离子水. 紫外吸收光谱用北京光学仪器厂的 752 型分光光度计测定.

以 0.05mol·dm⁻³ 的 Tris 缓冲液 (pH 为 7.01) 配制浓度为 8mg·cm⁻³ 的 RNaseA 水溶液和 10mg·cm⁻³ 的 CP 水溶液. 将一定量的 (5-15μL)CP 水溶液以微量进样器加到 2mL 的 DAB 浓度为 0.08mol·dm⁻³ 的环己烷溶液中, 再加缓冲液至所需水量 (0.3-1.5v/v%), 然后再加入 1 或 2μL 的 RNaseA 水溶液, 振荡数秒后即可得到澄清透明的反胶束溶液. 以含有同量缓冲液和酶的 DAB 环己烷溶液为空白, 在 290nm 处测定不同时间底物 CP 对光吸收值的改变 (ΔA). 实验温度为 15 °C.

1995-04-19 收到初稿, 1995-05-08 收到修改稿. 联系人: 黄文. * 中国科学院生物物理研究所

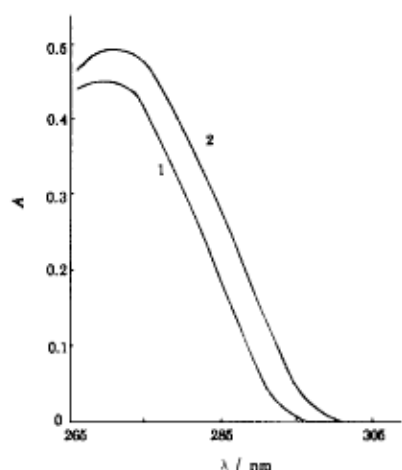


图 1 CP 和水解产物在 DAB 环己烷溶液中的紫外吸收光谱

Fig.1 Absorbance spectra of CP and the product obtained from it by the action of ribonuclease

DAB: $0.08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ water content: 1.1% v/v CP: $8.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
1) CP, 2) hydrolysis product

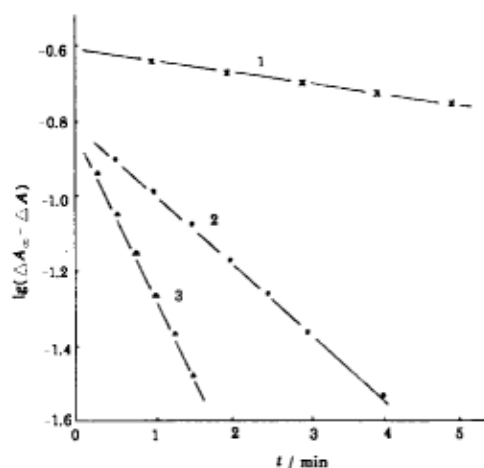


图 2 RNaseA 催化 CP 水解的动力学曲线

Fig.2 Plots used for the determination of the initial velocity of the hydrolysis of CP catalyzed by RNaseA

1) aqueous solution, RNaseA: $0.58 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, CP: $3.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
2) $0.08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DAB-cyclohexane solution RNaseA: $0.29 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, CP: $3.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, water content: 1.1 v/v% 3) $0.08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DAB-cyclohexane solution RNaseA: $0.58 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, CP: $3.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, water content: 1.1 v/v%

2 结果和讨论

有关 RNaseA 在水溶液中的活性已进行了大量的研究, 酶的活性可以它对底物 CP 的催化水解能力表示, 其催化反应为:

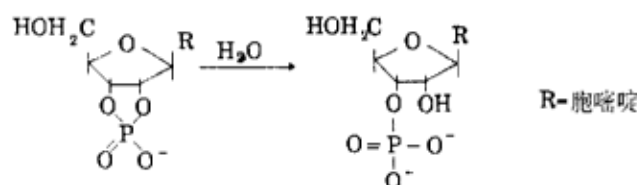


图 1 为底物 CP 和其水解产物在 DAB- 环己烷反胶束溶液中的紫外吸收光谱, 与 CP 和其水解产物 (3'-CMP) 在水溶液中的光谱^[9]十分接近, 可以认为反胶束中的酶催化反应同水溶液相似, 也就是说 CP 和其产物都增溶在反胶束核心水团当中. 在本实验中, 以 290nm 处光吸收的变化来测定反胶束中酶的活性^[9].

图 2 为 RNaseA 在水溶液中的催化活性同 DAB- 环己烷反胶束溶液中的催化活性的比较. 由图 2 可以看出, $\lg(\Delta A_\infty - \Delta A)$ 对时间 t 作图为一一直线, 其中 ΔA_∞ 为完全反应后吸光值的改变, ΔA 为在时间 t 时吸光值的改变. 由此可以得出在本实验范围内反胶束中 RNaseA 对 CP 的催化反应为一级反应, 即

$$-\frac{dS}{dt} = kES \quad (1)$$

式中 S 是时间 t 时底物的浓度, E 是酶的浓度, k 是速率常数. 对 (1) 式积分后得:

$$\ln \frac{\Delta A_{\infty}}{\Delta A_{\infty} - \Delta A} = kEt \quad (2)$$

实验结果与 (2) 式相符. 在酶浓度一定的情况下, 直线斜率也就代表了酶的催化能力. 由图 2 中的直线 1 和直线 3 或更清楚地由表 1 中 k 的数据可以看出, 反胶束溶液中 RNaseA 对 CP 的催化能力约比水溶液中提高了一个数量级. 实验还表明, 在不含酶的 DAB 反胶束溶液中, CP 的水解速度十分缓慢; 随着酶浓度的增加, CP 的水解速度也成正比的增加 (但 k 值不变), 这也与 (1) 式一致.

表 1 RNaseA 催化 CP 水解反应的速率常数
Table 1 Rate constant of RNaseA-catalyzed hydrolysis of CP*

reaction environment	aqueous solution	cyclohexane solution of DAB				
		[DAB]=0.08mol·dm ⁻³				
10 ⁶ [RNaseA]/mol·dm ⁻³	0.58	0.58	0.29	0.29	0.29	0.29
10 ⁴ [CP]/mol·dm ⁻³	3.3	3.3	3.3	1.6	1.6	1.6
water content/(v/v%)		1.1	1.1	0.3	0.75	1.5
10 ⁻³ k /mol ⁻¹ ·dm ³ ·s ⁻¹	2.2	25	24	26	26	22

* All are the overall concentration

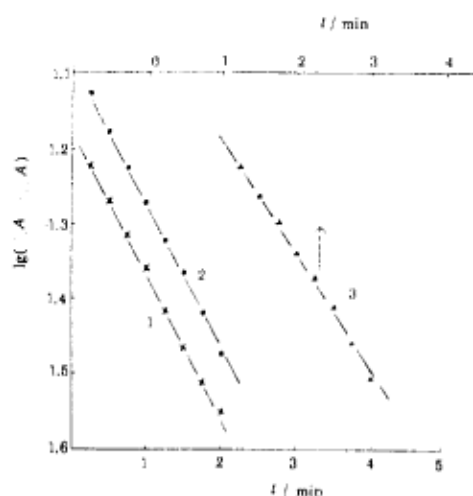


图 3 增溶水量对反胶束中 RNaseA 催化 CP 水解的影响

Fig.3 Effect of the amount of solubilization water on the activity of RNaseA in reverse micelle

DAB: 0.08mol·dm⁻³, RNaseA: 0.29×10⁻⁶mol·dm⁻³,

CP: 1.6×10⁻⁴mol·dm⁻³ water content(v/v): 1) 0.3%, 2) 0.75%, 3) 1.5%

图 3 为不同水量 (0.3–1.5%) 下, 反胶束溶液中 RNaseA 对 CP 催化水解的动力学曲线. 由图 3 和表 1 可以看出, 在实验范围内, 反胶束中水量的改变对酶的催化能力有一定的影响. 当增溶水量由 0.3% (体积%) 增至 1.5% 时, k 值由 26×10^3 降至 $22 \times 10^3 \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

从反胶束模型中可以计算出增溶不同水量时反胶束核心水团的大小 [10,11]. 在水和 DAB 的分子比为 7.6 (即表 1 中水量为 1.1%) 的实验中, 反胶束的聚集数为 77, 水分子数为 600, 核心水团的半径为 1.6nm, 自由核心水团的半径更小. 而 RNaseA 分子的半径为 1.8nm. 显然, 酶的增溶将导致形成以酶为核心的更大的反胶束, 这时表面活性剂夹在酶与有机相之间, 而增溶的水分子则与表面活性分子和酶分子的极性基相结合.

RNaseA 在反胶束中催化 CP 水解能力的增加, 其原因较为复杂, 如反胶束对水溶性底物的浓积作用, 酶的微环境和酶构象的改变等都可能影响酶的活性. 对这些问题我们正在研究, 以后将陆续报导.

参 考 文 献

- 1 Kitahara A. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1980, 12:109
- 2 Hilhorst R, Fijneman P, Heering D, et al. *Pure & Appl. Chem.*, 1992, 64:1765
- 3 Lavashov A V. *Pure & Appl. Chem.*, 1992, 64:1125
- 4 Martinek K, Lavashov A V, Klyachko N, et al. *Eur. J. Biochem.*, 1986, 155:453
- 5 Michel F, Pileni M P. *Langmuir*, 1994, 10:390
- 6 Wolf R, Luisi P L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 89:209
- 7 Papadimitriou V, Xenakis A, Evagelopoulous A E. *Colloids and Surfaces B*, 1993, 1:295
- 8 Kitahara A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1955, 28:234
- 9 Crook E W, Mathias A P, Rabin B R. *Biochem J.*, 1960, 74:234
- 10 Correll G D, Cheser R N, Nome F, et al. *J.A.C.S.*, 1978, 100:1254
- 11 黄文, 顾锡人. 化学学报, 待发表

Activity of RNaseA in Reverse Micelles Formed by Dodecylammonium Butyrate in Cyclohexane

Huang Wen Li Xiaofeng Gu Tiren

(Laboratory of Chemistry, Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100083)

Abstract The enzymatic activity of RNaseA solubilized in reverse micelles formed in cyclohexane by dodecylammonium butyrate(DAB) and water has been investigated with the use of cytidine 2', 3'- phosphate as the substrate. In the investigated concentration range, RNaseA exhibited a "superactivity" in the DAB reverse micelle.

Keywords: Ribonuclease, Surfactant, Reverse micelle, Dodecylammonium butyrate, Cyclohexane