

(Diagnostic Reagent Grade)

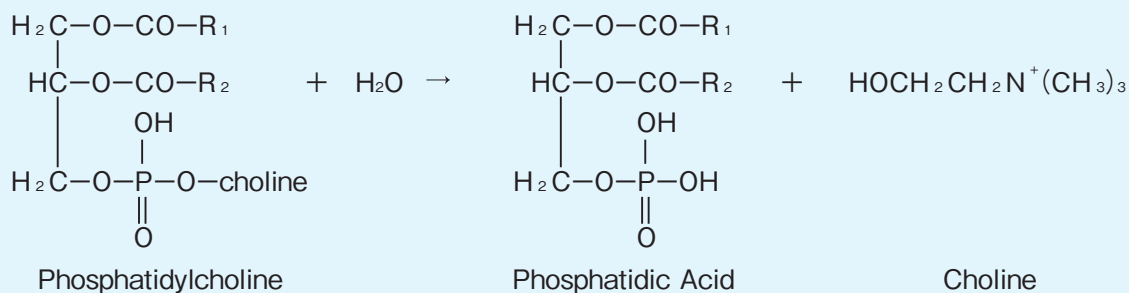
T-39

PHOSPHOLIPASE D [PLDP]

(Glycerophospholipid specific)

from *Streptomyces* sp.

(Phosphatidylcholine phosphatidohydrolase, EC 3.1.4.4)



Preparation and Specification

Appearance : Light brownish amorphous powder, lyophilized

Specific activity : More than 100 U/mg solid

Properties

Substrate specificity : See Table 1

Molecular weight : 46 kDa (gel filtration)

Isoelectric point : pH 4.2

Optimum pH : 5.5-6.0

pH stability : 4.2-8.5 (37°C, 60 min, 0.05% BSA)

Storage stability : At least one year at -20°C

Effect of various

chemicals : See Table 2 and Table 3

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Transphosphatidylation Catalyzed by Phospholipase D

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Table 1. Substrate specificity

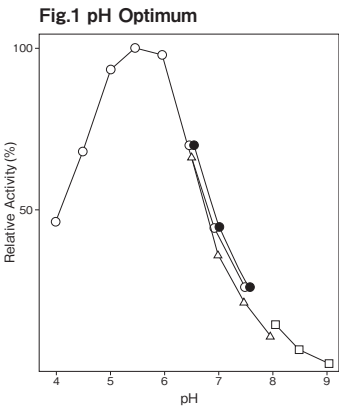
Substrate	Relative activity (%)
Lecithin	100
Lysolecithin	3.4
Sphingomyelin	0.03

Table 2. Effect of detergents on PLDP activity

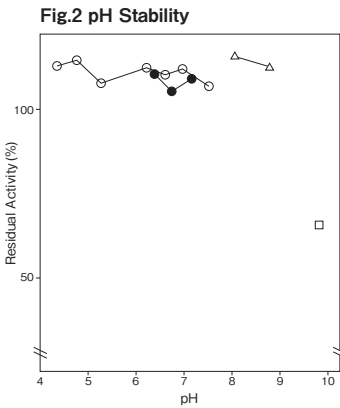
Additive	Concentration (%)	Relative activity (%)
None	0	0
Triton X-100	0.1	28
	0.5	100
	1.0	78
SDS	0.1	15
Deoxycholate	0.1	8

Table 3. Effect of metal ions on PLDP activity

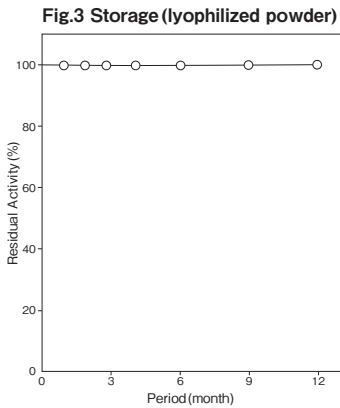
Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
CaCl ₂	10	99
MgCl ₂	10	101
MnCl ₂	10	132
ZnCl ₂	1	99
CoCl ₂	1	106
BaCl ₂	1	101
CuCl ₂	1	65
EDTA	1	99
EDTA	10	100



○ : 3,3-Dimethylglutarate-NaOH buffer
● : Phosphate buffer
△ : Tris-HCl buffer
□ : Glycine-NaOH buffer



37°C, 60 min.
○ : 3,3-Dimethylglutarate-NaOH buffer
● : Phosphate buffer
△ : Tris-HCl buffer
□ : Glycine-NaOH buffer



-20°C

Transphosphatidyltion Catalyzed by Phospholipase D

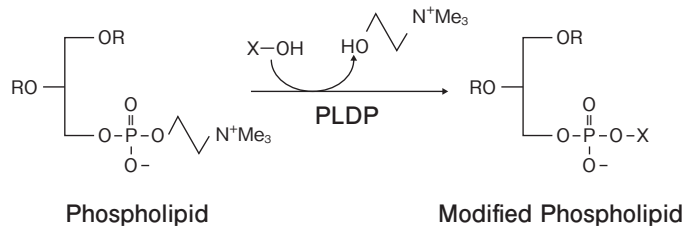
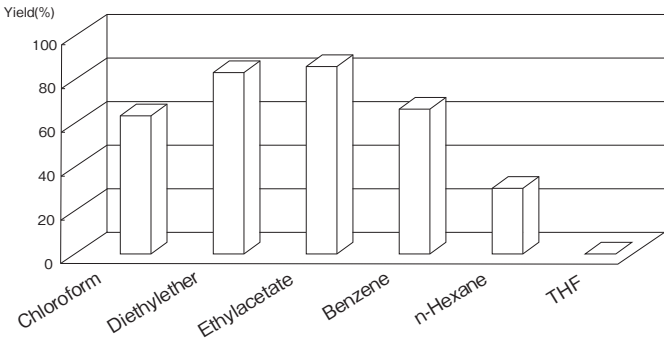
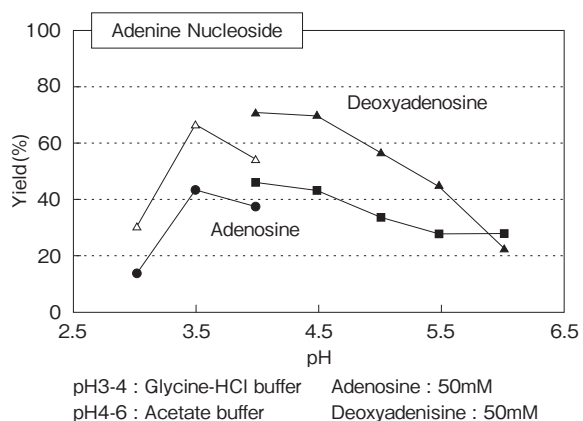
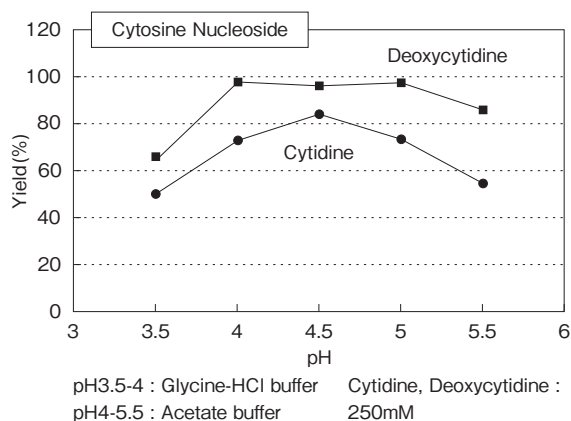
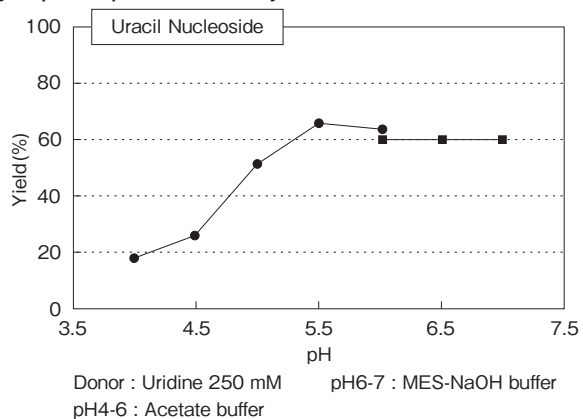


Fig.4 The Influence of Organic Solvents on the Yield of 5'-Phosphatidylcytidine by PLDP-Catalyzed Transphosphatidyltion



Organic phase : Solvent (0.5ml) Contained 1mg Dipalmitoylphosphatidylcholine
Aqueous phase : 0.25M Cytidine-HCl buffer pH4.5 (0.1ml) and 0.05ml of water contained 0.9 Unit of PLDP
Reaction Temp : 35°C, Reaction : 90 min.

Fig.5 Optimum pH of PLDP-Catalyzed



Phospholipid acceptor : Dipalmitoylphosphatidylcholine in Chloroform (1ml)
Buffer : 0.5ml contained 1.8 Units of PLDP
Reaction Temp : 35°C
Reaction period : 90 min.

Fig.6 The Influence of Reaction Temperature on the Yield of 5'-Phosphatidylcholine by PLDP-Catalyzed Transphosphatidylation
(Donor:dipalmitoylphosphatidylcholine, Acceptor: Cytidine, pH4.5)

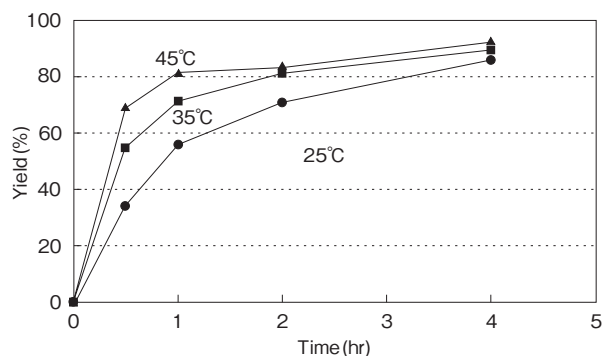
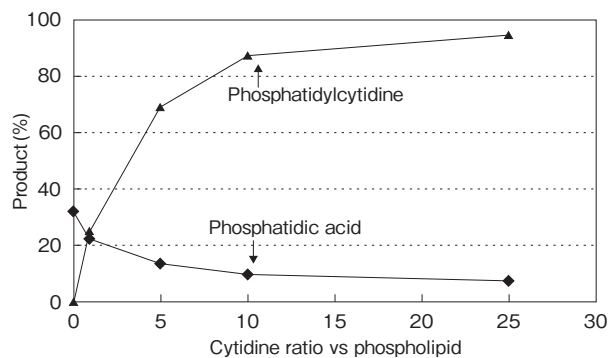


Fig.7 The Effect of Acceptor-Donor Ratio on the Yield of 5'-Phosphatidylcytidine by PLDP-Catalyzed Transphosphatidylation

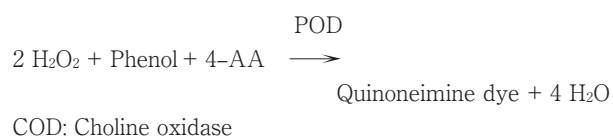
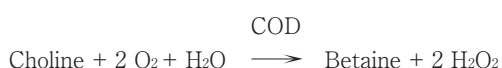
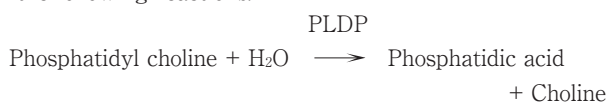


Organic solvent : 10 mM Dipalmitoylphosphatidylcholine in Chloroform (1ml)
Aqueous solvent : 0.1 M Glycine-HCl (pH4.5) 0.5ml containing 1.8 Units of PLDP
Reaction : at 35°C, with continuous stirring, for 180min.

Assay

Principle

The assay is based on the increase in absorbance at 500 nm as the formation of quinoneimine dye proceeds in the following reactions:



Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which hydrolyzes 1 μmole of phosphatidylcholine to phosphatidic acid and choline per minute at 37°C under the conditions specified in the assay procedure.

PLDP活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

1. 第一反応試薬混合液

0.2M DMG-NaOH 緩衝液 pH5.5	0.10 ml
10mM 塩化カルシウム溶液	0.05 ml
3% (W/V) トリトン X-100 溶液	0.05 ml
10mM 基質溶液 ¹⁾	0.10 ml
精製水	0.15 ml

1):10mM 基質溶液

1, 2 - ジオレオイル sn- グリセロ -3- ホスホコリン 78.6mg を 5% (W/V) トリトン X-100 溶液 10ml で溶解する。

2. 第二反応試薬混合液

15mM 4-AA 溶液	0.05 ml
0.2% (W/V) フェノール液	0.05 ml
1M トリス -HCl 緩衝液 pH8.0	0.05 ml
50U/ml POD 溶液 ²⁾	0.05 ml
50U/ml COD 溶液 ³⁾	0.05 ml
精製水	0.25 ml

2): 50U/ml POD 溶液

POD500 単位 (PPU) を精製水 10ml で溶解する。

3): 50U/ml COD 溶液

COD500 単位 (U) を 10mM トリス -HCl 緩衝液 pH8.0 10ml で溶解する。

3. 反応停止液

1% (W/V) 塩化セチルトリメチルアンモニウムと 10mM EDTA を含む 1M トリス -HCl 緩衝液 pH8.0

4. 反应用希釈液

1% (W/V) トリトン X-100 溶液

5. 酵素溶解希釈用液

0.1% トリトン X-100 を含む 10mM DMG-NaOH 緩衝液 pH5.5

6. 試薬

DMG (3,3- ジメチルグルタル酸): 東京化成製 #D1322
トリトン X-100: Dow Chemical 製
1,2- ジオレオイル sn- グリセロ -3- ホスホコリン: シグマ製 #P-6354
EDTA (エチレンジアミン四酢酸・2Na・2H₂O): キシダ化学製 #060-29133
COD (コリン酸化酵素): ナガセダイアグノスティックス製 #T-05
4-AA: ナカライテスク製 特級 #01907-52
塩化セチルトリメチルアンモニウム: 富士フイルム和光純薬製 #087-06032
POD: シグマ製 Type II #P-8250

II. 酵素試料液

検品約 20mg を精密に量り、酵素溶解希釈用液で全容 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. 小試験管に第一反応試薬混合液 0.45ml を正確に分注し、37℃で予備加温する。

2. 5 分経過後、酵素試料液 50 μ l を正確に加えて混和し、37℃で第一反応を開始する。

※盲検はこの時点で酵素試料液の代わりに酵素溶解希釈用液 50 μ l を加える。

3. 10 分経過後、反応停止液 0.50ml を加えて混和し、第一反応を停止すると共に、直ちに第二反応試薬混合液 0.50ml を加えて混和し、37℃で第二反応を開始する。

4. 20 分経過後、反应用希釈液 1.50ml を加えて混和する。

5. 10 分経過後、500nm における吸光度を測定する。求められた吸光度を試料液は As、盲検液は Ab とする。

$$\Delta A = (A_s - A_b) \leq 0.40 \text{ Abs}$$

IV. 計算

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A / 10}{12.2 \times 1/2} \times \frac{1}{2} \times \frac{3.00}{0.05} \times \frac{1}{X}$$

12.2: キノンイミン色素の 500nm におけるミリモル分子吸光係数 (cm² / μ mole)

2: フォスファチジルコリン 1 モルから H₂O₂ 2 モルが生成することによる係数

1/2: H₂O₂ 2 モルからキノンイミン色素 1 モルが生成することによる係数

10: 反応時間 (min)

3.00: 反応総液量 (ml)

0.05: 反応に供した酵素試料液量 (ml)

X: 酵素試料液の検品濃度 (mg/ml)