

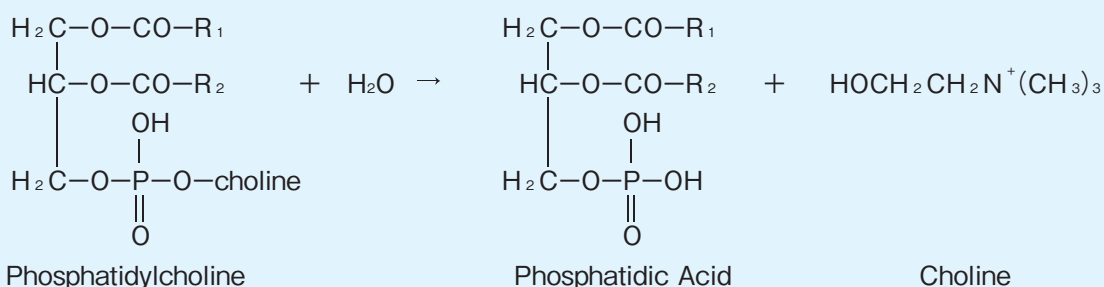
# PHOSPHOLIPASE D

## [PLDP (T-39), PLDPV (T-138)]

(Glycerophospholipid specific)

from *Streptomyces* sp.

(Phosphatidyl choline phosphatidohydrolase, EC 3.1.4.4)



### Preparation and Specification

#### PLDP (T-39)

Appearance : Light brownish amorphous powder, lyophilized  
 Specific activity : More than 100 U/mg solid

#### PLDPV (T-138)

Appearance : White to brownish lyophilized powder  
 Specific activity : More than 30 U/mg solid  
 ※ Animal derived material free.

### Properties

Substrate specificity	: See Table 1	
Molecular weight	: 46 kDa (gel filtration)	
Isoelectric point	: pH 4.2	
Optimum pH	: 5.5	Figure 1
pH stability	: 4.2–8.5 (37°C, 60 min, 0.05% BSA)	Figure 2
Storage stability	: At least one year at –20°C	Figure 3
Effect of various chemicals	: See Table 2 and Table 3	

### Transphosphatidylaton Catalyzed by Phospholipase D

Figure 4  
 Figure 5  
 Figure 6  
 Figure 7

Table 1. Substrate specificity

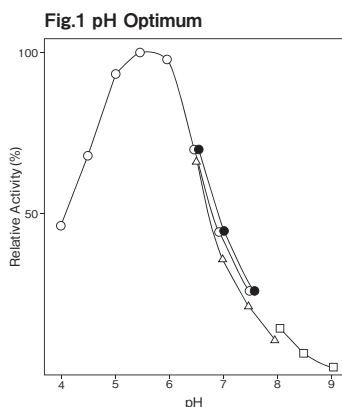
Substrate	Relative activity (%)
Lecithin	100
Lysolecithin	3.4
Sphingomyelin	0.03

Table 2. Effect of detergents on PLDP activity

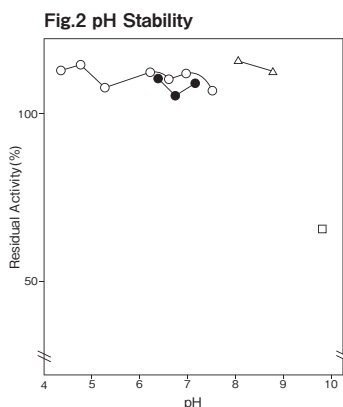
Additive	Concentration (%)	Relative activity
None	0	0
Triton X-100	0.1	28
	0.5	100
	1.0	78
	1.0	15
SDS	0.1	8

Table 3. Effect of metal ions on PLDP activity

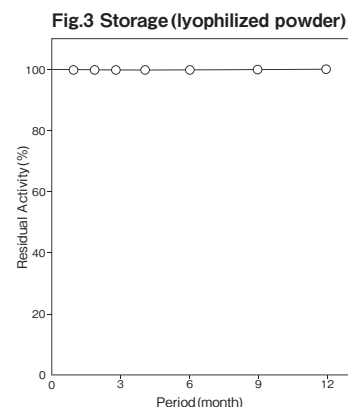
Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
CaCl <sub>2</sub>	10	99
MgCl <sub>2</sub>	10	101
MnCl <sub>2</sub>	10	132
ZnCl <sub>2</sub>	1	99
CoCl <sub>2</sub>	1	106
BaCl <sub>2</sub>	1	101
CuCl <sub>2</sub>	1	65
EDTA	1	99
EDTA	10	100



- : 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

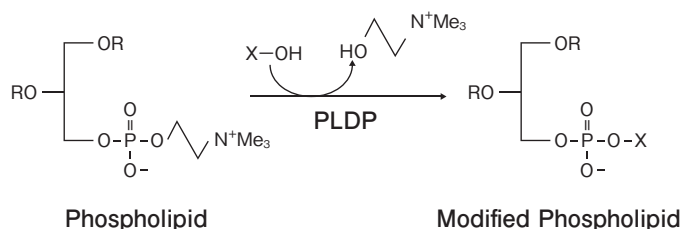
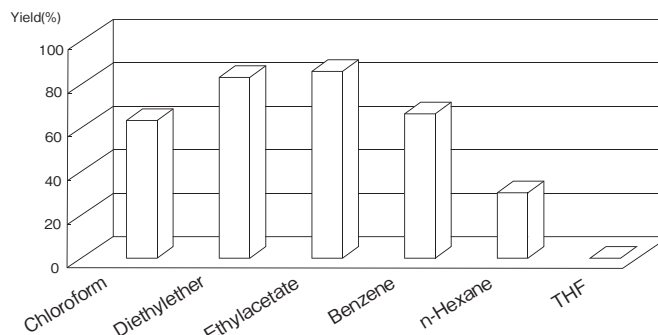


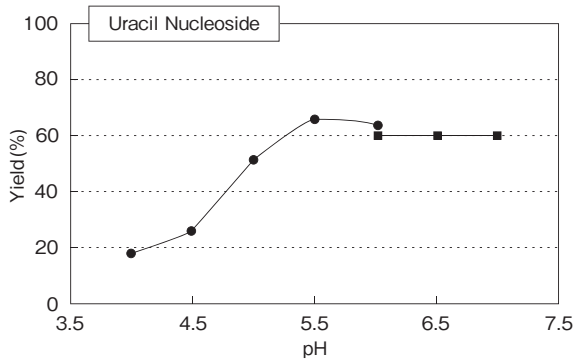
Fig.4 The Influence of Organic Solvents on the Yield of 5'-Phosphatidylcytidine by PLDP-Catalyzed Transphosphatidyltion



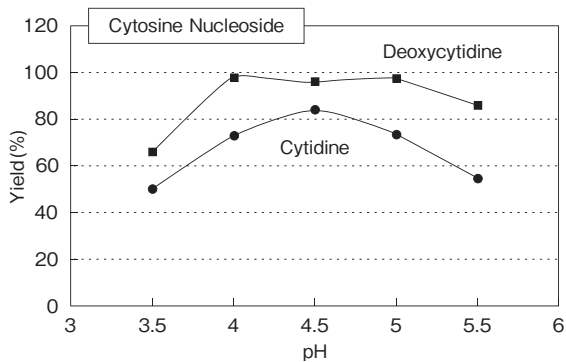
Organic phase : Solvent (0.5ml) Contained 1mg Dipalmitoylphosphatidylcholine  
 Aqueous phase : 0.25M Cytidine-HCl buffer pH4.5 (0.1ml) and 0.05ml of water contained 0.9 Unit of PLDP

Reaction Temp : 35°C, Reaction : 90 min.

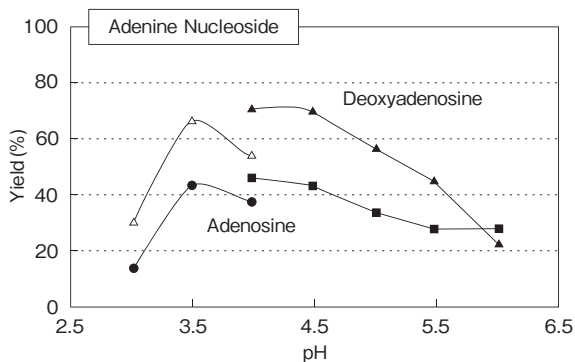
**Fig.5 Optimum pH of PLDP-Catalyzed**



Donor : Uridine 250 mM  
 pH4-6 : Acetate buffer  
 pH6-7 : MES-NaOH buffer



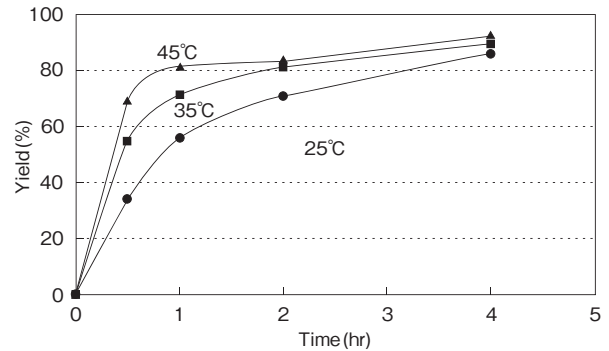
pH3.5-4 : Glycine-HCL  
 pH4-5.5 : Acetate buffer  
 Cytidine, Deoxycytidine : 250mM



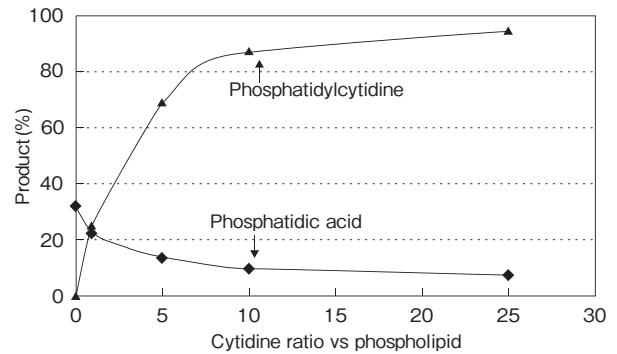
pH3-4 : Glycine-HCL  
 pH4-6 : Acetate buffer  
 Adenosine : 50mM  
 Deoxyadenosine : 50mM

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**

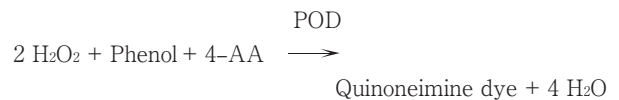
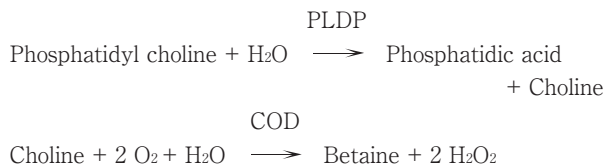


Organic solvent : 10 mM Dipalmitoylphosphatidylcholine in Chloroform (1ml)  
 Aqueous solvent : 0.1 M Glycine-HCl (pH4.5) 0.5ml containing 1.8 Units of PLDP  
 Reaction : at 35°C, with continuous stirring, for 180min.

## 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:



COD: Choline oxidase

### 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/PLDPV 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 <sup>1)</sup>	0.10 ml
精製水	0.15 ml

1): 10mM 基質溶液 (フォスファチジルコリン、ジオレオイル溶液)  
L- $\alpha$ -フォスファチジルコリン、ジオレオイル 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 <sup>2)</sup>	0.05 ml
50U/ml COD 溶液 <sup>3)</sup>	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% Triton 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 社製

L- $\alpha$ -フォスファチジルコリン, ジオレオイル (C18:1, [Cis]-9): シグマ社製 #P-6354

EDTA (エチレンジアミン四酢酸 $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O): キシダ化学社製 #060-29133

COD (コリン酸化酵素): 旭化成ファーマ製 #T-05

4-AA: ナカライテスク社製 特級 #01907-52

塩化セチルトリメチルアンモニウム:

和光純薬工業製 #087-06032

POD: シグマ社製 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°C で予備加温する。

2. 5分経過後、酵素試料液 50  $\mu$ l を正確に加えて混和し、37°C 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  $\mu$ 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°C 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/min、盲検液は Ab/min とする。

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

### 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 (cm<sup>2</sup> /  $\mu$ mole)

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

1/2: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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)