

## 溶胶-凝胶法制备的二氧化硅中肌红蛋白的苯胺羟化酶活性

王威 罗雪梅 黄炜 王金晔 朱龙根

(南京大学配位化学国家重点实验室, 配位化学研究所, 南京 210093)

用溶胶-凝胶制备了多孔透明的二氧化硅包埋肌红蛋白, 在还原辅酶 I 二钠盐(NADH)和黄素单核苷酸(FMN)的存在下, 用可见光谱法测定了肌红蛋白苯胺羟化反应的  $K_m$  和  $k_{cat}$ 。表明包埋在二氧化硅中的肌红蛋白保持了苯胺羟化酶活性。

关键词:

溶胶-凝胶

肌红蛋白

苯胺羟化酶

一百五十年前, Ebelmen<sup>[1]</sup>首次进行了二氧化硅溶胶-凝胶(sol-gel)合成, 但是真正的发展则是在一个世纪以后。Sol-gel 化学是在室温条件下溶液中进行的<sup>[2]</sup>。有机母体和无机母体混合在一起, 聚合后生成纳米级复合材料。这种有机-无机复合物在二十年中得到了很大发展<sup>[3]</sup>。而在用 sol-gel 制备的二氧化硅中包埋生物活性物质才刚刚兴起。Braun 等于 1990 年报道<sup>[4]</sup>, 将酶包埋多孔的氧化物基质中, 保持了酶的生物活性, 并由此可以制得生物催化剂和生物传感器。此后, 这方面的研究工作日益增多, 已扩展到许多生物活性物质, 诸如抗体乃至整个细胞等<sup>[5,6]</sup>。

用 sol-gel 制备多孔透明的二氧化硅包埋生物分子, 不仅可以保持生物分子的活性, 而且由于二氧化硅具有多孔性, 在固定生物大分子的同时, 能允许小的被分析物分子扩散到其中。此外, 二氧化硅自身的透明性, 使得我们方便地用光谱方法监测其中所进行的反应<sup>[7]</sup>。

本文报道利用半人工多酶体系: 还原辅酶 I 二钠盐(NADH)-黄素单核苷酸(FMN)-肌红蛋白(Mb), 研究 sol-gel 制备的多孔透明的二氧化硅包埋马心-肌红蛋白的苯胺羟化酶活性。

## 1 实验部分

## 1.1 仪器及试剂

722 型分光光度计(上海第三仪器厂); 高速离心机(上海医用仪器厂); 超声波清洗器(昆山市超声波仪器厂)。

马心-肌红蛋白(Mb), 黄素单核苷酸(FMN)Sigma 公司; 还原辅酶 I 二钠盐(NADH), 上海博奥公司; 其他试剂均为分析纯。

## 1.2 实验方法和原理

## 1.2.1 Sol-gel 方法制备包埋肌红蛋白的二氧化硅(Mb-sol-gel)

将 10 ml TMOS(原硅酸四甲酯)和 2.2 ml 重蒸馏水以及 0.14 ml 0.04 mol · L<sup>-1</sup>的盐酸混

收稿日期: 1997-07-18. 收修改稿日期: 1998-01-20.

国家自然科学基金资助项目.

通讯联系人.

第一作者: 王威, 男, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学.

合,超声波振荡 20 分钟,冷却至  $-10^{\circ}\text{C}$  后,取此溶液 2 mL 与 2 mL  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐的缓冲溶液 (pH 值为 6.24,  $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) 混合,加入  $20\ \mu\text{L}$ ,  $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Mb 溶液,磁力搅拌约 1 分钟,倒入容器中  $10\sim 20$  分钟胶凝,即得包埋 Mb 的二氧化硅 (Mb-sol-gel)<sup>[8]</sup>。于  $0\sim 4^{\circ}\text{C}$  密闭保存一天,然后浸入  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐的缓冲溶液 (pH 值为 7.0)。一部分样品在测试前三天从容器中取出,置于空气中  $0\sim 4^{\circ}\text{C}$  保存,这部分样品称作干放样品。

### 1.2.2 肌红蛋白的苯胺羟化酶活性

在半人工多酶体系 NADH-FMN-Mb 中, Mb 具有苯胺羟化酶活性。在此体系中, NADH 作为电子给体, FMN 作为电子中介体, 将 Mb 从高铁形式 (met-Mb Fe(III)) 经过还原, 和氧结合逐渐转变为含氧形式 (oxy-Mb)。这个电子传递过程可以通过测定体系的紫外-可见光谱加以确证<sup>[9]</sup>。含氧形式的 Mb 则将苯胺氧化为对-氨基苯酚<sup>[10]</sup>。

### 1.2.3 从 NADH 到 met-Mb 的电子传递速率的测定

配制 4 ml 组成为  $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Mb、 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FMN、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐的缓冲溶液 (pH 值为 7.0)。加入 4 mg NADH 后计时, 于  $37^{\circ}\text{C}$  测量 408 nm 处体系的吸光度随时间变化, 由此推算电子从 NAD 经由 FMN 传递到 met-Mb 的速率。

### 1.2.4 肌红蛋白苯胺羟基化反应速率的测定

#### 1.2.4.1 肌红蛋白苯胺羟基化反应速率的测定

配制 3 ml 组成为  $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Mb、 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FMN、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐的缓冲溶液 (pH 值为 7.0) 6 份。分别加入  $1.5\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \mu\text{L}$ 、 $3\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$  的苯胺。恒温  $37^{\circ}\text{C}$ , 再分别加入 2.4 mg NADH 后反应开始, 1 小时后, 加入 0.9 mL 20% (W/V) 三氯乙酸终止反应。离心, 取出 3 ml 上清液, 加入 0.4 mL 5% (W/V) 苯酚/2.5 mol  $\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液和 0.8 mL  $1.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  碳酸钠溶液,  $37^{\circ}\text{C}$  恒温半小时, 630 nm 处测溶液吸光度, 从而求得对-氨基苯酚的浓度。在上述标准反应条件下, 对-氨基苯酚和苯酚反应转变为醌酚, 醌酚在 630 nm 处有最大吸收, 1 nmol 对-氨基苯酚产生的醌酚产物在 630 nm 处产生 0.0062 吸收值<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.4.2 Mb-sol-gel 苯胺羟基化反应速率的测定

配制 8 mL 组成为  $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Mb-sol-gel、 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FMN、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐的缓冲溶液 (pH 值为 7.0) 7 份。分别加入  $3\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \mu\text{L}$ 、 $7\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $30\ \mu\text{L}$ 、 $40\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \mu\text{L}$  的苯胺。恒温  $37^{\circ}\text{C}$ , 再分别加入 6.4 mg NADH 后反应开始, 1 小时后, 分别取出 3 mL 溶液, 加入 0.9 mL 20% (W/V) 三氯乙酸终止反应。此后步骤同 2.4.1。

## 2 结果和讨论

### 2.1 不同反应物组合下, 苯胺羟基化反应的相对活性

表 1 苯胺羟基化反应初始速率同反应组分的关系

Table 1 Dependence of Initial Rates of the Hydroxylation Reaction on Reaction Components

| system              | relative activity (%) | p-aminophenol ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}/\text{h}$ ) |
|---------------------|-----------------------|--|
| NADH-FMN-Mb         | 100                   | 23.6   |
| NADH-FMN-Mb-sol-gel | 30                    | 7.1  |
| NADH-Mb-sol-gel     | 10                    | 2.3  |
| FMN-Mb-sol-gel      | 0                     | 0  |

从表 1 可以看到,肌红蛋白包埋在 sol-gel 制备的多孔透明的二氧化硅中后,仍然显示苯胺羟化酶活性,但与溶液中相比较,其苯胺羟化反应速率降低了约 3 倍。并且可以看出 NADH 是该反应的电子来源,半人工多酶体系缺少了 NADH 后反应就不能进行;另外,FMN 在此半人工多酶体系中是作为电子中介体存在,加快反应的进行。这和溶液中情况一致<sup>[10]</sup>。

## 2.2 从 NADH 到 met-Mb 的电子传递速率

图 1 中的两条曲线表明,肌红蛋白包埋在 sol-gel 制备的多孔透明的二氧化硅基质中后,从 NADH 到肌红蛋白的电子传递速率要低于肌红蛋白在溶液中的传递速率。这是由于 NADH 要经过扩散运动才能进入到多孔透明的二氧化硅基质中缘故,并且在 Mb-sol-gel 曲线上观察到约 5 分钟的诱导期。

## 2.3 Mb 和 Mb-sol-gel 苯胺羟化反应的 $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) 和 $K_m$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 值

由图 2 的两条直线分别计算得到苯胺羟化反应的  $k_{cat}$  和  $K_m$ , 其中  $K_m$  和  $K'_m$  相近。这表明,将肌红蛋白包埋在 sol-gel 制备的多孔透明的二氧化硅中,能够保持肌红蛋白的苯胺羟化酶活性,只是因为二氧化硅阻碍苯胺分子同肌红蛋白接触,才使得  $k'_{cat} < k_{cat}$ , 亦即使反应速率降低。

## 2.4 老化不同时间、干放和未经干放的 Mb-sol-gel 的 $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) 和 $K_m$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 值

按 2.1 所述制备的 Mb-sol-gel, 老化不同时间, 且有部分经干放后, 经测定得到苯胺羟化反应的  $k_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) 和  $K_m$  ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 值。

表 2 老化不同时间、干放和未经干放的 Mb-sol-gel 的  $k_{cat}$  和  $K_m$  值

Table 2  $k_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) and  $K_m$  ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Values of the Aged and Dried Mb-sol-gels

| processing time | $K_m$    |           | $k_{cat}$ |           |
|-----------------|----------|-----------|-----------|-----------|
|                 | aged gel | dried gel | aged gel  | dried gel |
| two weeks       | 10.3     |           | 0.013     |           |
| four weeks      | 22       | 31        | 0.008     | 0.005     |

in solution,  $K_m = 8.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $k_{cat} = 0.079 \text{ min}^{-1}$

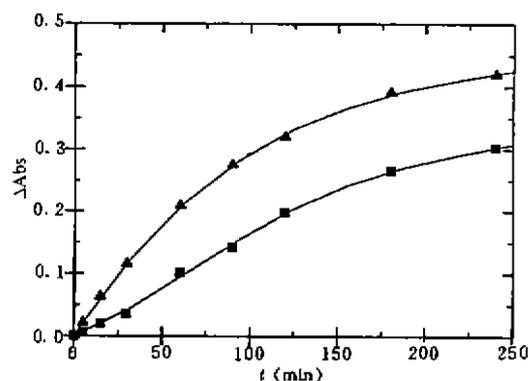


图 1 从 NADH 到 met-Mb 的电子传递速率  
Fig. 1 Electron injection rates from NADH to met-Mb via FMN

▲ Mb, ■ Mb-sol-gel

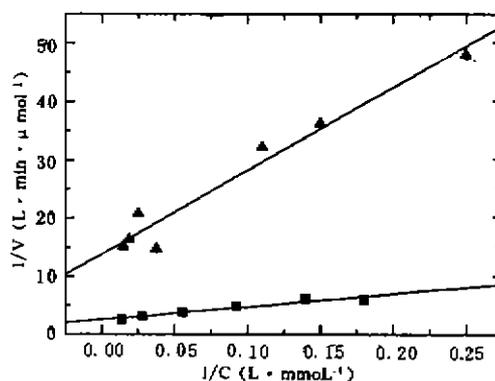


图 2 Mb 和 Mb-sol-gel 的苯胺羟化反应初始速率对苯胺浓度的双倒数图

Fig. 2 Double-reciprocal (Lineweaver-Burk) plots of the rates of hydroxylation reaction against aniline concentration

▲ Mb,  $K_m = 8.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $k_{cat} = 0.079 \text{ min}^{-1}$ ;

■ Mb-sol-gel,  $K'_m = 10.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $k'_{cat} = 0.013 \text{ min}^{-1}$

可见老化时间为四个星期的 Mb-sol-gel, 不论是未经过干放处理还是经过干放处理, 都依然有苯胺羟化酶活性。

本工作进一步证明用 sol-gel 制备的多孔透明的二氧化硅包埋肌红蛋白, 保持了它原有的生物活性, 这为光学生物传感器的发展提供了有利的条件。

### 参 考 文 献

- [1] Ebelmen, M. C. R. *Acad. Sci. Paris*, 1845, 21, 502.
- [2] Livage, J.; Henry, M.; Sanchez, C. *Progress in Solid State Chemistry*, 1988, 18, 259.
- [3] Sanchez, C.; Ribot, F. *New. J. Chem.*, 1994, 18, 1007.
- [4] Braun, S.; Rapport, S. et al *Mater. Lett.*, 1990, 10, 1.
- [5] Avnir, D.; Braun, S. et al *Chem. Mater.*, 1994, 6, 1605.
- [6] Dave, C.; Dunn, B. et al *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1120A.
- [7] Yamanak, S. A.; Dunn, B. et al *J. Am. Soc. Chem.*, 1995, 117, 9095.
- [8] Ellerby, L. M. et al *Science*, 1992, 255, 1113.
- [9] Tamura, M.; Asakura, T. et al *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, 295, 467.
- [10] Hamachi, I.; Fujita A.; Kunitake, T. *Chem. Lett.*, 1995, 8, 657.
- [11] Takikawa, O.; Yoshida, R. et al *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 6808.

## ANILINE-HYDROXYLASE ACTIVITY OF MYOGLOBIN ENCAPSULATED IN SILICATE SOL-GELS

Wang Wei Luo Xuemei Huang Wei Wang Jinxi Zhu Longgen

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Institute of Coordination Chemistry,  
Nanjing University, Nanjing 210093)

Using sol-gel procedures, we encapsulated myoglobin in the porous and transparent silicate glass. The transparency of sol-gel makes it feasible for us to monitor the hydroxylation reaction spectroscopically in the pore of the matrix. Thus the  $K_m$  and  $k_{cat}$  values of the hydroxylation reaction for Mb-sol-gel were determined to be  $10.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $0.013 \text{ min}^{-1}$ , respectively. It shows that the aniline-hydroxylase activity of myoglobin (Mb) encapsulated in silicate sol-gels is maintained and can be induced by a semi-artificial multienzyme system of NADH-FMN-Mb.

Keywords: sol-gel myoglobin aniline-hydroxylase