

细胞色素 C 包裹在溶胶-凝胶中的构象变化*

华巍^{1,2} 李志宏¹ 吴自玉^{1,3;1)} 吴忠华¹ 黄宇营¹

1 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

2 (中国科学院研究生院 北京 100049)

3 (国家纳米中心 北京 100080)

摘要 利用溶胶-凝胶(Sol-Gel)法制备了包埋生物分子细胞色素c的生物无机杂化材料. 利用紫外可见吸收谱和同步辐射小角散射对其进行了表征. 通过细胞色素c吸收谱Soret band的位移, 得出基质包埋细胞色素c的界面效应对细胞色素c构象变化的影响. 利用同步辐射小角散射, 计算细胞色素c在凝胶样品中的尺度分布, 平均回转半径, 质量分形维数. 对小角散射研究结果和紫外可见吸收谱测试结果进行了比较和详细讨论.

关键词 溶胶-凝胶 细胞色素c 包埋 小角X射线散射

1 引言

Sol-Gel法是20世纪60年代发展起来的一种材料制备方法. 它是一个室温反应过程, 对热量的需求很少或者完全不需要, 因此其反应条件温和, 而生物分子的热稳定性差, 那么将Sol-Gel法应用于生物材料的制备, 即将生物分子包埋于无机基质中, 不会导致大部分被包埋的生物分子变性. 溶胶-凝胶(Sol-Gel)法是在材料化学中发展最快的领域之一, 它一方面可以制备陶瓷、玻璃和其它无机材料, 另一方面与生物活性分子联系起来, 成为一个新颖的制备生物材料的方法, 而且前景光明^[1].

Sol-Gel方法在生物分子固定化领域的研究和应用起源于1990年, Braun^[1]等人开始第一次尝试将碱性磷酸钙引入SiO₂基质中, 取得了具有一定活性的材料. Hench^[2]在1991年报导了某些组成的玻璃具有生物活性. Ellerby等^[3]于1992年宣布将铜锌超氧化物歧化酶、细胞色素c和肌血球素掺杂于SiO₂基质中, 这些酶的光谱性质与化学反应性质与酶在溶液中具有相似的行为. 从此, 低温Sol-Gel法成为把生物分子掺杂于Sol-Gel基质中, 固定生物分子的一种极具应用潜力的方法, 这种方法将使化学和生物传感器的发展进入

一个新的阶段. 有观点认为, Sol-Gel法成功包埋生物分子在无机化学和生物化学之间架起了一座桥梁^[4], 它将成为连接生物界和非生物界之间的纽带.

近年来又有很多文献报道^[5-8]应用Sol-Gel法成功制备包埋生物分子的材料, 但是这些材料的结构、性能及其形成机理, 到目前为止还不清楚. 事实上, 生物分子和无机基质间的相互作用在决定合成条件、形成容纳生物分子的孔和稳定生物分子的结构和功能方面是最为重要的因素. 加强这一方面的研究, 能使我们对生物无机杂化材料领域有进一步的认识. 本文应用Sol-Gel法成功制备了包埋细胞色素c的生物杂化材料, 并通过紫外可见吸收谱和同步辐射小角散射测量对此材料进行了初步的定性和半定量分析.

2 样品制备和实验方法

2.1 样品制备

文献中有很多关于细胞色素c的特性的研究^[9-11], 但是将细胞色素c生物分子掺杂于无机基质中制备的生物材料, 对其特性的研究却很少. 细胞色素c作为呼吸链中的一种重要的酶, 是含铁的血红素与肽链的共价结合体, 分子量约为1.3万, 每个细胞

* 国家杰出青年科学基金(10125523), 国家基础纳米重大研究计划(90206032), 科学院知识创新工程重要方向项目(KJCX2-SW-N11)和中国博士后科学基金(20040350101)

1) E-mail: wuzy@mail.ihep.ac.cn

色素 c 分子含一个铁原子, 可在临床上作为细胞呼吸激活剂, 用于组织缺氧的治疗和急救, 在生物氧化过程中, 是一个非常重要的电子传递体。

另外, SiO_2 体系容易合成, 具有良好的坚固性、抗磨性、化学惰性、光学透光性和低荧光性、低的体积变形性、高的热稳定性和光化学稳定性等性质, 因此我们选择硅基体系作为我们制备生物无机杂化材料的无机基质。

2.1.1 参考溶液的制备

含有细胞色素 c 的参考溶液由甲醇-缓冲溶液按一定体积百分比混合而成。其中缓冲溶液的 pH 值分为 4.09 和 2.99 (见表 1), 甲醇来源于北京化学试剂公司, 马心细胞色素 c 来源于 Sigma Chemical (95%)。用二次去离子水将细胞色素 c 溶解, 细胞色素 c 的浓度为 $2.74 \times 10^{-3} \text{M/L}$, 取 $100 \mu\text{l}$ 细胞色素 c 溶液与甲醇-缓冲溶液混合, 最后溶液为 10ml 。细胞色素 c 在样品中的最后浓度为 $2.74 \times 10^{-5} \text{M/L}$ 。

2.1.2 包埋 Sol-Gel 样品的制备

正硅酸甲酯 (TMOS): 盐酸溶液 ($\text{pH} = 2.4$) 以 1:2 摩尔比混合后, 冰上超声波振荡 10min , 得到均匀透明的 TMOS-Sol。TMOS-Sol, 甲醇, 缓冲溶液三者按一定体积百分比混合 (具体比例见表 2), 缓冲溶液见表 1; TMOS 和盐酸来源于北京化学试剂公司。

凝胶样品的制备首先将一定量甲醇与 TMOS-Sol 混合为 A 液, $2.74 \times 10^{-3} \text{M/L}$ 细胞色素 c $20 \mu\text{l}$ 与一定量缓冲溶液混合为 B 液, 再将 B 液与 A 液彻底混合, 装入离心管封存。细胞色素 c 在样品中的最后浓度为 $2.74 \times 10^{-5} \text{M/L}$ 。所有样品保存在 4°C 。

表 1 用于制备生物杂化材料所用缓冲溶液

缓冲溶液	离子强度/(M/L)	pH
NaAc+HAc	0.01	4.09(2)
Na_2HPO_4 +柠檬酸	0.01	2.99(2)

表 2 样品表

样品编号	A. TMOS-Sol (%)	B. 甲醇 (%)	C. Buffer (%)	细胞色素 c/ μl
1	0	0	100($\text{pH}=2.99$)	200
2	40	0	60($\text{pH}=2.99$)	200
3	40	0	60($\text{pH}=4.09$)	200
4	45	0	55($\text{pH}=4.09$)	200
5	45	0	55($\text{pH}=2.99$)	200

2.2 紫外可见吸收谱和同步辐射小角散射测量

由于基底 SiO_2 从紫外 (约 300nm) 到可见整个波段内透明, 且无光降解现象, 因此紫外可见吸收谱对

于蛋白质的构象变化等特性的研究是一个非常敏感的特征手段, 通过监测 Soret band^[12, 13] 的吸收峰的强度、峰宽、还有峰的位移可以分析样品的构象变化。所用紫外可见分光光度计为 Beckman 的 DU640。

小角 X 射线散射 (SAXS) 是一种现代物理结构分析方法, 凡是存在纳米尺度的电子密度不均匀区的物质经 X 射线照射后在原光束附近零至几度范围内均会产生小角散射现象。通过对散射图形或散射曲线的分析, 可以解析散射体的几何结构。因此, SAXS 是研究蛋白质等生物大分子和无机纳米材料的理想工具。

本次实验是在北京同步辐射 4B9A 小角散射实验站完成的。所选波长为 1.54\AA , 样品到探测器距离 1539mm 。数据处理采用 Fit2d 程序处理。用含有细胞色素 c 的胶体的散射信号减去不含细胞色素 c 的胶体的散射信号, 进行归一化处理。

将包埋在凝胶样品中的细胞色素 c 的吸收谱与参考溶液 (Buffer $\text{pH} = 2.99$) 的吸收谱加以比较, 发现 Soret 吸收峰发生了位移, 如图 1 所示。从图 1(a) 看到, $\text{pH} = 2.99$ 时, 以 TMOS 为前驱体包埋细胞色素 c 的凝胶样品的紫外可见吸收谱和参考溶液的吸收谱相比, 向近紫外方向发生了大约 7nm 的位移。图 1(b) 这是两个不同 pH 值的包埋细胞色素 c 的凝胶样品的紫外可见吸收谱, 从此图中也可以看出, $\text{pH} = 2.99$ 的凝胶样品向近紫外方向发生了位移。

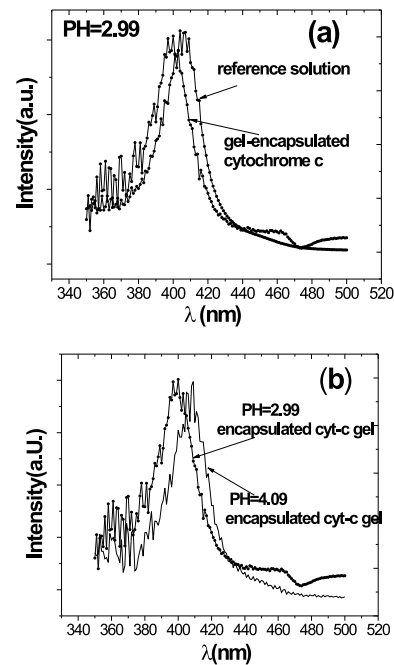


图 1 紫外可见吸收光谱

(a) reference solution 为 1 号样品, gel-encapsulated cytochrome c 为 2 号样品; (b) 2 号 ($\text{pH} = 2.99$)、3 号 ($\text{pH} = 4.09$) 均为 gel-encapsulated cytochrome c。

有文献报道, 细胞色素c在 $pH=1-14$ 范围内存在5个不同构象^[14], 每一个构象对应不同的Soret吸收峰. 在 $pH=2.9-7.0$ 范围内, 细胞色素c只存在一个构象, 而我们却从紫外可见吸收谱中看到细胞色素c的Soret吸收峰发生了位移, 位移后的位置与 $pH=2.5$ 时Soret吸收峰的位置基本一致^[12], 可知此法确实将蛋白质包埋于无机基质中, 同时看到蛋白质的构象发生了变化, 如图2所示, 用 $pH=2.99$ 的缓冲溶液制备的凝胶样品的Soret峰发生位移, 这个结果表明处于孔洞微环境中的蛋白质发生了构象变化. 可以判断, 在孔洞微环境中的 pH 值比凝胶样品合成过程中所用的缓冲溶液的 pH 低, 这可能是由于用于包埋细胞色素c的 SiO_2 基质与蛋白质之间存在界面效应, 正是由于这个界面效应引起蛋白质周围的微环境的 pH 值降低, 蛋白质构象发生变化. 而有关这种界面效应所引起的蛋白质构象变化的机制, 还有待于我们下一步进行分析研究.

到目前为止, 对生物分子处于溶液中的SAXS已有一些报道^[10, 15], 但是对无机生物杂化材料的SAXS研究国外鲜有报道, 国内还未见报道.

从图2看出4和5号样品的Kratky散射曲线在高散射矢量区的的变化趋势是不一致的^[7]. 4逐渐减小, 而5有所抬高, 并趋于水平. 这说明蛋白质聚集体由紧密堆积结构(4号)变得较为松散(5号), 即细胞色素c构象发生了变化. 这和紫外可见吸收光谱、分形和尺度分布的分析结果是一致的.

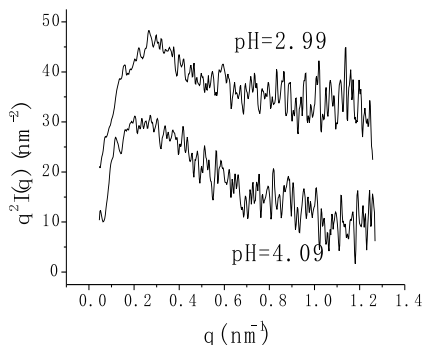


图2 Kratky图

4号($pH=4.09$), 5号($pH=2.99$).

分形是表征自相似结构的一种几何学, 分形维数定量描述分形结构自相似的程度、不规则程度. 分形通常可分为表面分形(面分形)、质量分形(体分形)和孔分形. 如果 $\ln[I(q)] \sim \ln q$ 图中有线性范围存在, 则表明分形的存在, 从其斜率可判断分形是否为表面分形, 且能得出其维数值, 但难以区分质量分形和孔分形(对于介孔材料而言). 图3(a), (b)是介孔中, 细胞色素c的 $\ln[I(q)] \sim \ln q$ 图, 其中(a)为4号样品; (b)为5

号样品. 从图中我们看到, 此曲线只有一个线性关系存在. 从有关小角X射线散射理论得到, 此斜率代表细胞色素c存在质量分形, 分形维数为 $D_m=2.77$ 和 $D_m=2.54$, 说明细胞色素c在孔中并不是单体, 而是聚集体, 其质量分布具有自相似性. pH 值高, 分形维数略有增加, 说明细胞色素c的团聚体是相对紧密的, 是比较大的团聚体.

从图3看出细胞色素c是多分散的, 即存在一定的分布. 我们得出4号样品的平均回转半径为1.82nm, 略大于5号样品的平均回转半径1.48nm. 此结果与紫外可见吸收谱、Kratky图和分形的分析结果是一致的.

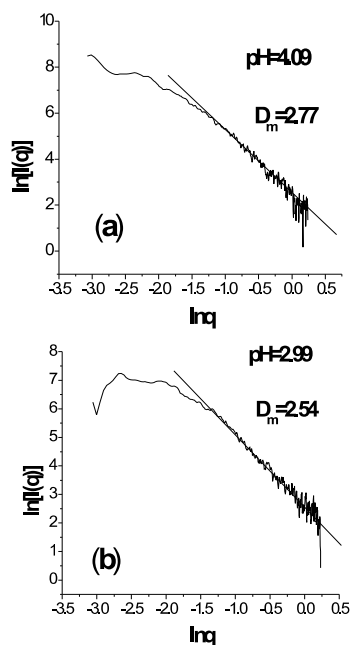


图3 细胞色素c的 $\ln[I(q)] \sim \ln q$ 曲线
(a) 4号样品; (b) 5号样品.

3 结论

以TMOS为前驱体, 制备了包埋细胞色素c的生物活性材料, 它是一种有效的制备生物活性材料的方法. 因此, 还可以用此方法制备包埋其它蛋白质甚至是细胞等生物组分的生物活性材料. 另外, 也可以采用不同无机基质为前驱体, 制备包埋生物分子的活性材料.

通过紫外可见吸收峰的位移和小角X射线散射Kratky曲线、分形维数和尺度的变化分析了蛋白质在无机基质中的性质变化, 发现蛋白质所在的Sol-Gel中的微环境 pH 值降低. 说明紫外吸收光谱和小角X射线散射是研究生物活性材料的有利工具.

SiO_2 凝胶网络可以为酶提供较低 pH 值的微环境, 可能与 SiO_2 凝胶网络这种无机界面的效应有关.

参考文献(References)

- 1 Braun S et al. *Mater. Lett.*, 1990, **10**: 1
- 2 Hench L L, *Bioceramics from Concept to Clinic*, J. Am. Ceram. Soc., 1991, **74**(7): 1487
- 3 Ellerby L M, Nishida C R, Nishida F et al. *Science*, 1992, **255**: 1113—1115
- 4 David Avnir, Sergei Braun et al. *Chem. Mater.*, 1994, **6**: 1605—1614
- 5 Lan E H, Dunn, Zink J I. *Chem. Mater.*, 2000, **12**: 1874—1878
- 6 Kevyn Smith, Nathan J. Silvernail et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**: 4250
- 7 Dorothy T Nguyen, Mark Smit, Bruce Dunn et al. *Chem. Mater.*, 2002, **14**: 4300—4306
- 8 Jorge A Cruz-Aguado, Yang Chen, Zheng Zhang et al. *Anal. Chem.*, 2004, **76**: 4182—4188
- 9 Shuji Akiyama, Satoshi Takahashi, Tetsunari Kimura et al. *Biophysics*, 2002, **99**: 1331
- 10 Daniel J Segel, Anthony L Fink et al. *Biochemistry*, 1998, **37**: 12443—12451
- 11 Lois Pollack, Mark W Tate et al. *Biophysics*, 1999, **96**: 10115—10117
- 12 Miller J M et al. *J. Non-Crystalline Solids*, 1996, **202**: 279—289
- 13 Bertini I et al. *Bioinorganic Chemistry* (University Science Book, Mill Valley, CA, 1994) p 611
- 14 Theorell H et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, **63**
- 15 Stefania Cinelli, Francesco Spinozzi et al. *Biophys J*, 2001, **81**: 3522—3533

Conformational Changes of Encapsulated Cytochrome c in SiO₂ Sol-Gel Materials *

HUA Wei^{1,2} LI Zhi-Hong¹ WU Zi-Yu^{1:1)} WU Zhong-Hua¹ HUANG Yu-Ying¹

1 (Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

2 (Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

Abstract Encapsulated cytochrome c Sol-Gel materials was synthesis and studied by UV-vis absorption spectra and SAXS. It was illuminated that exist a lower effective pH within TMOS-derived sgel by monitoring wavelengh shifts in the peak absorption of the Soret band. The gyration radius of encapsulated cytochrome c within gel was calculation by SAXS.

Key words Sol-Gel, cytochrome c, encapsulation, SAXS

*Supported by National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar (10125523), Key Important Nano-Research Project (90206032) of National Natural Science Foundation of China, Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (KJCX2-SW-N11) and China Postdoctoral Science Foundation (20040350101)

1) E-mail: wuzy@mail.ihep.ac.cn