

介孔有机硅中空纳米球固定尿酸酶 用于尿酸检测

纪赫鸣^{1,2}, 张宇航¹, 苗婷婷¹, 王怡倩¹, 于笑蕊¹, 王春艳¹, 王润伟²

(1. 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021;

2. 吉林大学无机合成与制备化学国家重点实验室, 长春 130012)

摘要 采用一步生长诱导腐蚀法合成了介孔有机硅中空纳米球(MONs), 并用其固定尿酸酶(Uricase), 形成了介孔有机硅中空纳米球固定化的尿酸酶(MONs-uricase). 采用扫描电子显微镜、透射电子显微镜、红外光谱、氮气吸附-脱附测试和热重分析对 MONs 和 MONs-uricase 进行了表征. 结果显示, 尿酸酶被固定于 MONs 的介孔结构中, 固定率超过 90%. MONs 具有介孔通道和空心结构, 吸附性能良好. MONs-uricase 的热稳定性和 pH 稳定性均比游离尿酸酶高. 在血清尿酸(UA)检测中, 在 0.01~1.00 mg/mL 范围内 MONs-uricase 的吸光度与浓度具有良好的线性关系, 且特异性良好. MONs-uricase 可通过离心回收, 在重复使用 20 次后仍具有约 50% 的活性, 具有良好的可重复利用性. MONs 在生物酶的固定化和循环利用方面有较好的应用前景.

关键词 介孔有机硅中空纳米球; 尿酸酶固定; 尿酸检测

中图分类号 O613; R115

文献标志码 A

doi: 10.7503/ejcu20240346

Mesoporous Organosilicon Hollow Nanospheres Immobilized Uricase for the Determination of Uric Acid

Ji Heming^{1,2}, Zhang Yuhang¹, Miao Tingting¹, Wang Yiqian¹, Yu Xiaorui¹,
Wang Chunyan^{1*}, Wang Runwei^{2*}

(1. School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. State Key Laboratory of Inorganic Synthesis and Preparative Chemistry, Jilin University,
Changchun 130012, China)

Abstract Mesoporous organosilicon hollow nanospheres (MONs) were synthesized through a one-step growth-induced etching method, and then uricase was successfully immobilized onto MONs, forming MONs-uricase. Comprehensive characterizations of MONs and MONs-uricase were performed using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy, N₂ adsorption-desorption measurements, and thermogravimetric analysis (TGA). The results indicated that uricase was successfully immobilized within the mesoporous structure of MONs, with an immobilization efficiency exceeding 90%. MONs possessed excellent adsorption properties due to their mesoporous channels and hollow structures. Compared to free uricase, MONs-uricase exhibited enhanced thermal and pH stability. In the detection of serum uric acid (UA), MONs-uricase demonstrated a good linear relationship within the UA concentration range of 0.01–1.00 mg/mL, along with high specificity. MONs-uricase could be readily recovered through centrifugation, and the recovered MONs-uricase maintained high

收稿日期: 2024-07-10. 网络首发日期: 2024-09-09.

联系人简介: 王春艳, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米材料合成与检测方面的研究. E-mail: chunyan@jlu.edu.cn

王润伟, 男, 博士, 教授, 主要从事纳米材料合成与应用方面的研究. E-mail: rwwang@jlu.edu.cn

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(批准号: 20210204008YY, 20240101180JC)资助.

Supported by the Science and Technology Development Plan Project of Jilin Province, China(Nos.20210204008YY, 20240101180JC).

enzymatic activity after multiple cycles of use, retaining 50% enzymatic activity even after 20 cycles, indicating its excellent reusability. MONs offered promising application prospects in the immobilization and recycling of biological enzymes.

Keywords Mesoporous organosilicon hollow nanospheres; Immobilization of uricase; Determination of uric acid

尿酸(UA)是人类嘌呤和核酸的代谢产物,在人体内的总量约为1200 mg^[1-3]。当尿酸排泄受阻时,会在体内积累,导致高尿酸血症甚至痛风^[4,5]。重症痛风患者可能伴随有关节功能障碍、肾功能不全、腹部肥胖、心血管疾病和高脂血症等疾病^[6]。因此,及时准确地检测和监控血清中UA的含量对人体健康和疾病防治具有重要意义。尿酸的检测方法包括伏安法、毛细管电泳法、磷钨酸还原法、高效液相色谱(HPLC)法、同位素稀释质谱(IDMS)法和尿酸酶(Uricase)检测法^[7-11]。其中,伏安法、毛细管电泳法和磷钨酸还原法适用于常规实验室操作,HPLC法和IDMS法需依赖高成本仪器与试剂^[12]。尿酸酶检测法具有较高的灵敏度和准确度,常用于临床生物样品的检测。尿酸酶紫外检测法特异性较强、操作简单,且无需进行蛋白质沉淀处理。但尿酸酶较敏感,易受到反应体系的pH值和温度等影响,且尿酸酶首次使用后虽仍有活性,但与底物无法分离,难以回收,易造成资源浪费。

为了克服尿酸酶检测法的上述局限性,开发了尿酸酶固定化技术。但目前用于固定尿酸酶的传统载体材料通常存在吸附容量低、结合力弱和抑制尿酸酶活性的缺点,不利于尿酸酶对UA的重复检测。因此,开发具有高固定率且可维持酶活性的载体材料成为研究热点。Fang等^[13]报道了以介孔有机硅为载体的新材料。研究发现,与传统载体,如天然高分子材料(如壳聚糖)、合成聚合物材料(如树脂)和离子液体材料等^[14-19]相比,介孔有机硅材料具有热稳定性高、毒性低、易于表面修饰、生物相容性优异和孔径可调等优点,在生物医学领域得到了广泛的应用^[20-24]。此外,通过修饰空心结构的多孔纳米材料外壳和引入功能化修饰的内核至空腔中可形成具有两种甚至多种功能基团的核壳结构材料,在多个领域中具有应用潜力^[25,26]。我们^[27]曾采用单分散纳米SiO₂球为硬模板,利用一步生长诱导腐蚀的合成策略,以具有二硅氧基团的有机硅源为基元模块,在碱性环境中,利用其和逐步腐蚀溶解的无机硅源的缩合聚合反应合成了具有双亲性骨架的介孔中空纳米球。合成的纳米球孔道有序且孔径均一,内部具有中空空腔。

本文使用1,2-双(三乙氧基甲氧基硅基)乙烷(BTEE)为前驱体制备了中空介孔有机硅纳米球(MONs),并用于固定尿酸酶,研究了固定条件和酶学性质。建立了一种介孔有机硅中空纳米球固定尿酸酶(MONs-uricase)检测血清中UA的方法,克服了游离尿酸酶不能重复检测的缺点,提升了酶的热稳定性和pH稳定性。该材料易回收,且具有良好的重复使用性,可降低检测成本。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸乙酯(TEOS)、浓氨水(NH₃·H₂O,质量分数28%)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、无水乙醇、氢氧化钾(KOH)和浓盐酸(质量分数38%)均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;1,2-双(三乙氧基甲氧基硅基)乙烷(BTEE),分析纯,美国Sigma-Aldrich公司;尿酸酶(Uricase,分子量约为35000,活性12 U/mg),分析纯,北京索莱宝生物技术有限公司;尿酸(UA)标准品,分析纯,上海阿拉丁生物技术有限公司。

Tecnai G2 F20s-twin D573型场发射透射电子显微镜(TEM),美国FEI公司;VERTEX 80v型傅里叶变换红外光谱仪,美国Bruker公司;ASAP 2010型多用气体吸附仪,美国Micromeritics公司;JSM-6700F型场发射扫描电子显微镜(SEM),日本JEOL公司;UV-2450型紫外-可见分光光度计,日本Shimadzu公司;STA 449C型差热-热重分析仪,德国Netzsch公司;KQ-250DE型超声仪,上海精密仪器有限公司;HC-2518型高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 实验过程

1.2.1 二氧化硅纳米球的制备 采用优化的Stöber法合成单分散二氧化硅纳米球。将1.6 mL NH₃·H₂O

和 3.0 mL TEOS 依次加入至 37.0 mL 无水乙醇和 5.0 mL 去离子水的混合溶液中, 在室温下搅拌 2 h; 以 12000 r/min 的转速离心 3 min, 弃去上层清液, 收集沉淀, 用去离子水和无水乙醇洗涤以去除杂质, 再以 12000 r/min 的转速离心后, 于室温下干燥、研磨, 得到二氧化硅纳米球。

1.2.2 介孔有机硅中空纳米球的制备 将 1.2.1 节中制备的 100.0 mg 单分散二氧化硅纳米球加入至 22.0 mL 去离子水和 11.0 mL 无水乙醇的混合溶液中, 超声 30 min; 加入 120.0 mg CTAB 和 2.0 mL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 在室温下搅拌至 CTAB 完全溶解后, 逐滴滴加 0.22 mL BTEE, 在室温下搅拌 2 h; 将上述混合物放入反应釜中, 置于 100 °C 烘箱中反应 24 h; 待反应釜冷却至室温后, 将釜内混合物以 12000 r/min 的转速离心 3 min, 用去离子水和无水乙醇清洗后烘干; 加入少量无水乙醇进行超声, 再加入 65.0 mL 乙醇和 2.0 mL 浓盐酸进行萃取, 以 12000 r/min 的转速离心 3 min 后, 用无水乙醇清洗沉淀 3 次, 于烘箱中干燥后研磨, 得到介孔有机硅中空纳米球(MONs)^[28]。

1.2.3 MONs 固定尿酸酶 将 2.0 mL 尿酸酶溶液(1.0 mg/mL)稀释 10 倍后与 10.0 mg MONs 混和, 在 4 °C 冰浴下匀速搅拌 8 h 进行尿酸酶固定, 混悬液经离心和冷冻干燥后, 得到介孔有机硅中空纳米球固定化尿酸酶(MONs-uricase), 置于 4 °C 冰箱中备用。采用 Bradford 法测定上层清液中蛋白浓度。分别改变酶固定化过程中的固定时间(2, 4, 6, 8 和 10 h)与尿酸酶溶液的加入量(1.0, 2.0, 3.0, 4.0 和 5.0 mL), 在 4 °C 下, 其它条件不变, 对比不同固定时间和不同尿酸酶溶液体积对 MONs-uricase 蛋白负载量和固定化率的影响。

1.2.4 MONs 和 MONs-uricase 的表征 采用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察 MONs 和 MONs-uricase 的形貌结构; 采用差热-热重分析仪分析 MONs 的热稳定性, 以 10 °C/min 的升温速率, 将样品从室温加热至 900 °C 进行热重分析(TGA); 利用氮气吸附-脱附实验对 MONs 和 MONs-uricase 进行表征, 样品的比表面积采用 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法计算, 孔体积按照相对压力 $p/p_0=0.995$ 时的吸附量进行计算。样品的孔径分布采用 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 法计算; 为了验证尿酸酶是否固定在 MONs 上, 采用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行表征。

1.2.5 MONs-uricase 酶学性质的测定 对 MONs-uricase 和游离尿酸酶的最适温度、最适 pH 值、热稳定性和 pH 稳定性进行比较, 以评估温度和 pH 值对 MONs-uricase 和游离尿酸酶活性的影响。尿酸酶与尿酸的反应产物为尿囊素, 其在 290 nm 处有特征吸收峰, 测定尿酸酶活性的方法如下: (1) 将 0.5 mL 去离子水和 2.0 mL 0.05 mg/mL UA 标准溶液混合, 于 40 °C 水浴加热 5 min, 分别加入一定体积的 MONs-uricase 和游离尿酸酶溶液, 反应 5 min 后加入 0.2 mL 2% (质量分数) KOH 溶液以停止反应, 测试在 290 nm 处的吸光度值(A_{test}); (2) 向空白对照组中先加入 0.2 mL 2% (质量分数) KOH 溶液, 其它步骤同(1), 测试在 290 nm 处的吸光度值(A_{blank}); (3) 采用如下公式计算尿酸酶活性(U/mL):

$$\text{Activity} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}) V_t f_d}{12.04 b V_s t C}$$

式中: A_{blank} 为空白对照组吸光度值; A_{test} 为 MONs-uricase 或游离尿酸酶吸光度值; V_t (mL) 为溶液总体积; V_s (mL) 为样品体积; f_d 为稀释倍数; t (min) 为反应时间; b (cm) 为比色皿孔径; 12.04 为尿酸吸光系数; C (mg/mL) 为酶浓度。

1.2.6 MONs-uricase 测定 UA 浓度 首先, 对检测条件进行优化, 以确定尿酸检测的最佳反应时间和载体酶的最佳用量, 单因素实验设计如下: 取 3.0 mg MONs-uricase 和 0.5 mL UA 标准溶液(1.00 mg/mL) 进行反应, 反应时间分别为 5, 10, 15, 20, 30 和 40 min, 测量 290 nm 处的吸光度值, 以确定 UA 完全降解所需的最佳反应时间; 分别取不同量的 MONs-uricase (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 和 5.0 mg) 与 0.5 mL UA 标准溶液(1.00 mg/mL) 进行反应, 反应时间为 20 min, 测量反应后 290 nm 处的吸光度值, 以确定 UA 完全降解所需 MONs-uricase 的最佳用量。

然后, 制备 0.001~1.500 mg/mL UA 标准样品, 利用 MONs-uricase 对其进行测定, 具体过程如下: 向管内加入 0.5 mL UA 标准溶液、3.0 mg MONs-uricase (空白对照组加入 3.0 mg MONs)、2.0 mL 甘氨酸缓冲溶液和 0.5 mL 去离子水, 在 40 °C 水浴中反应 20 min, 测定上层清液在 290 nm 处的吸光度, 并确

定 MONs-uricase 检测 UA 的线性范围. 将首次使用的 MONs-uricase 活性视为 100%, 每次反应结束后离心回收 MONs-uricase 并洗涤, 再进行重复测试, 以确定每次使用后 MONs-uricase 的保留活性.

1.2.7 MONs-uricase 测定血清中 UA 浓度及重复使用性 取 0.4 mL 血清样本, 加入 0.1 mL 不同浓度 (0.01~0.80 mg/mL) 的 UA 标准溶液. 按照表 1 列出的试剂用量, 分别将样品置于 40 °C 水浴中反应 20 min, 在 290 nm 处测量上层清液吸光度, 并计算出样品中 UA 浓度. 反应结束后离心并洗涤 MONs-uricase, 多次重复使用并测定 MONs-uricase 的血清保留活性. 采用上述方法, 分别使用游离尿酸酶和 MONs-uricase 测定血清样品并对比结果.

Table 1 Serum uric acid detection program

Sample	Serum sample	UA standard solution	MONs-uricase	MONs	Glycine buffer	Deionized water
Test	0.4 mL	0.1 mL	3.0 mg	0 mg	2.0 mL	0.5 mL
Control	0.4 mL	0 mL	3.0 mg	0 mg	2.1 mL	0.5 mL
Standard	0 mL	0.1 mL	3.0 mg	0 mg	2.4 mL	0.5 mL
Blank	0 mL	0 mL	0 mg	3.0 mg	2.5 mL	0.5 mL

2 结果与讨论

2.1 MONs 和 MONs-uricase 的表征

采用一步生长诱导腐蚀法合成了 MONs. 图 1(A) 和 (B) 显示, 二氧化硅纳米球和 MONs 呈球形且大小均匀. 由图 1(C) 可见, MONs 具有空心结构, 平均直径约为 380 nm, 其外部包裹着厚度约为 75 nm 的有机硅烷壳层. 由图 1(D) 可见, 固定尿酸酶后的 MONs 仍可维持其多孔结构的完整性. 上述结构特点使其在吸附、催化及其它相关领域具有较好的应用前景.

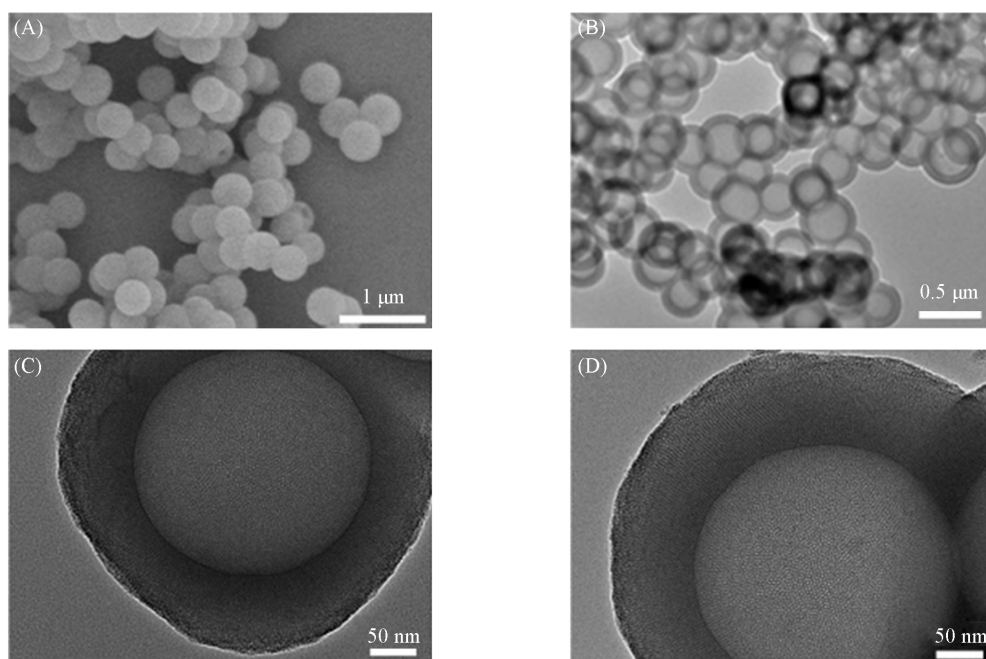


Fig. 1 SEM image of monodisperse silica nanospheres(A), TEM images of MONs(B, C) and MONs-uricase(D)

MONs 和 MONs-uricase 的氮气吸附-脱附等温线均属于 IV 型等温线 [图 2(A)], 在相对压力 $p/p_0=0.1\sim0.3$ 时表现出显著的毛细管凝聚现象, 在 $p/p_0=0.2\sim0.8$ 时出现明显的 H3 型滞后环. 上述结果表明, MONs 具有孔径均匀的介孔结构. MONs 的 BET 比表面积为 $592.1\text{ m}^2/\text{g}$, 总孔容为 $0.29\text{ cm}^3/\text{g}$; 而 MONs-uricase 的比表面积下降至 $47.89\text{ m}^2/\text{g}$, 总孔容减小至 $0.059\text{ cm}^3/\text{g}$. MONs-uricase 对氮气的吸附

量明显低于 MONs, BET 比表面积显著小于 MONs, 这可能是由于尿酸酶占据了 MONs 的内部空间所致. 实验结果表明, 尿酸酶已固定在 MONs 内部. 图 2(B) 和 (C) 分别示出了 MONs 和 MONs-uricase 的 BJH 孔径分布曲线, 表明两者均具有尺寸约为 2.0 nm 的介孔结构. 尿酸酶分子量约为 35000, 粒径约为 2.0 nm^[29], 可固定在 MONs 的介孔结构中, 这与 BET 分析结果一致, 说明尿酸酶已固定于 MONs 中.

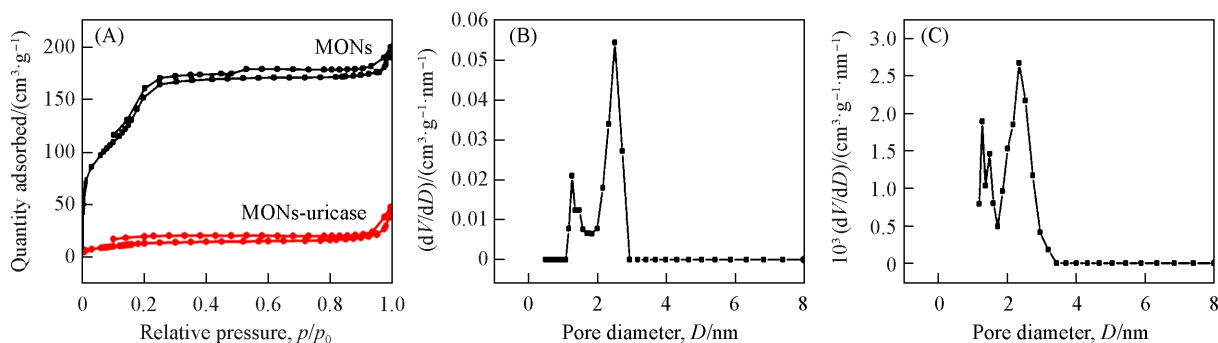


Fig. 2 N₂ adsorption-desorption isotherms of MONs and MONs-uricase(A), BJH curves of MONs(B) and MONs-uricase(C)

MONs 和 MONs-uricase 的热重曲线见图 3(A). 室温至 100 °C 的质量损失归因于材料中吸附的水分子的失去. 在 100~400 °C 范围内, MONs 的质量损失约为 3%, MONs-uricase 的质量损失约为 7%. 据文献^[30]报道, 酶在 25~200 °C 范围内会发生质量损失. 热重分析结果表明, 尿酸酶已固定在 MONs 内部. 当温度超过 400 °C 时, MONs 和 MONs-uricase 的质量损失迅速, 这归因于 MONs 中乙基基团(—Et—)的分解.

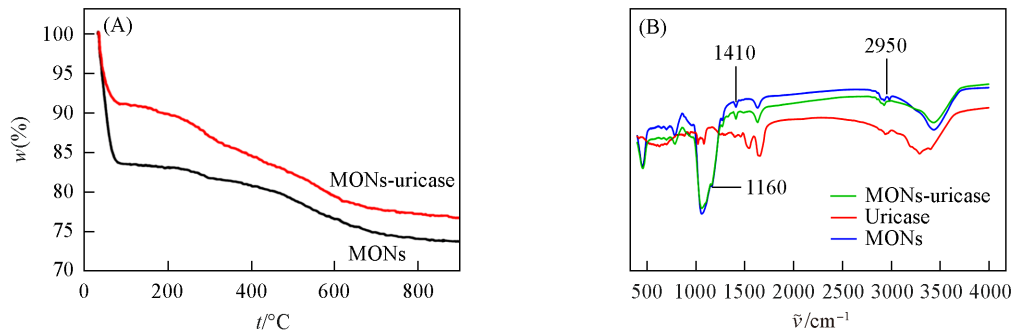


Fig. 3 TGA curves of MONs-uricase and MONs(A) and FTIR spectra of uricase, MONs and MONs-uricase(B)

BTEE 是含有双硅基基团的硅源, 利用 BTEE 将有机基团引入至骨架中, 可形成双亲性骨架. BTEE 和无机硅源缩合可形成纳米球形空心结构, 有利于尿酸酶结合至孔道之间. MONs 和 MONs-uricase 的红外光谱分析结果如图 3(B) 所示, 两者均在 1410 cm⁻¹ 处有 C—H 键吸收带, 在 1160 cm⁻¹ 处有 Si—C 键吸收带, 表明样品中存在 —Et—. MONs-uricase 在约 2950 cm⁻¹ 处的吸收带归属于尿酸酶中的特定基团, 表明尿酸酶已嵌入 MONs 的介孔和中空结构中, 成功固定在 MONs 上.

2.2 MONs 固定尿酸酶条件的优化

对 MONs 固定尿酸酶过程中的固定化时间和尿酸酶溶液体积进行了优化. 如图 4(A) 和 (B) 所示, 尿酸酶的最适固定化时间为 8 h, 最适尿酸酶溶液体积为 2.0 mL. 在该条件下, 尿酸酶的平均固定化率达到 91.4%.

经酶活性测定, 固定化尿酸酶的活性为 9.20 U/mL, 游离尿酸酶的活性为 9.94 U/mL. 固定化尿酸酶的活性达到了游离尿酸酶活性的 92.6%, 表明 MONs 未明显降低尿酸酶的活性. TEM 照片显示 MONs 的空心腔内无残留碎片. 上述结果表明, MONs 主要通过范德华力固定尿酸酶, 该结果与其它功

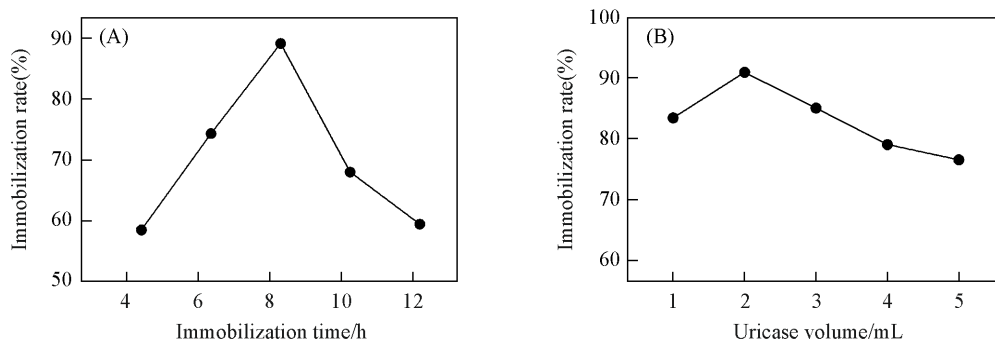


Fig. 4 Optimization of the immobilization time(A) and the amount of uricase(B)

能化介孔有机硅材料不同^[13,23,31].

2.3 MONs-uricase 的酶学性质

尿酸酶对 UA 的催化活性受到温度和 pH 值的显著影响, 当尿酸酶被 MONs 固定化后, 与游离尿酸酶相比, 其催化反应的最适温度与 pH 值均发生了偏移. 如图 5(A)和(B)所示, 游离尿酸酶的最适反应条件为 30 °C, pH=10; 而尿酸酶被 MONs 固定化后, 其最适反应条件为 40 °C, pH=8.5. 上述结果表明, MONs 固定化过程可能影响了尿酸酶的结构或微环境, 进而改变了其最适反应条件. MONs-uricase 检测 UA 的最适 pH 值为 8.5, 与过氧化物酶的最适 pH 值接近, 因此, MONs-uricase 与过氧化物酶可形成双酶系统, 从而促进酶促副产物降解, 并提高显色反应效率.

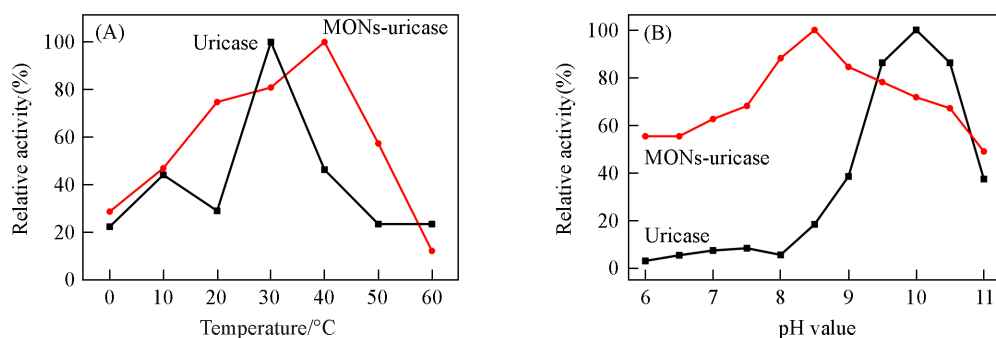


Fig. 5 Optimization of temperature(A) and pH value(B) of uricase and MONs-uricase

将 MONs-uricase 和游离尿酸酶置于不同温度下, 保持不同时间, 对其热稳定性进行了研究. 如图 6(A)所示, 在 70 °C 时, 30 min 内 MONs-uricase 的活性保留率在 40% 以上, 而游离酶的活性保留率低于 10%; 在 60 °C 时, 游离尿酸酶的活性在 30 min 内迅速下降, 而 MONs-uricase 的活性下降较缓慢. 上述结果表明, 在 60~70 °C 内, MONs-uricase 比游离尿酸酶更稳定. 游离酶在高温下失活是酶蛋白内部氢键断裂, 改变了酶分子的结构和性质所致. MONs-uricase 的 MONs 外壳为尿酸酶提供了保护, 从而提高

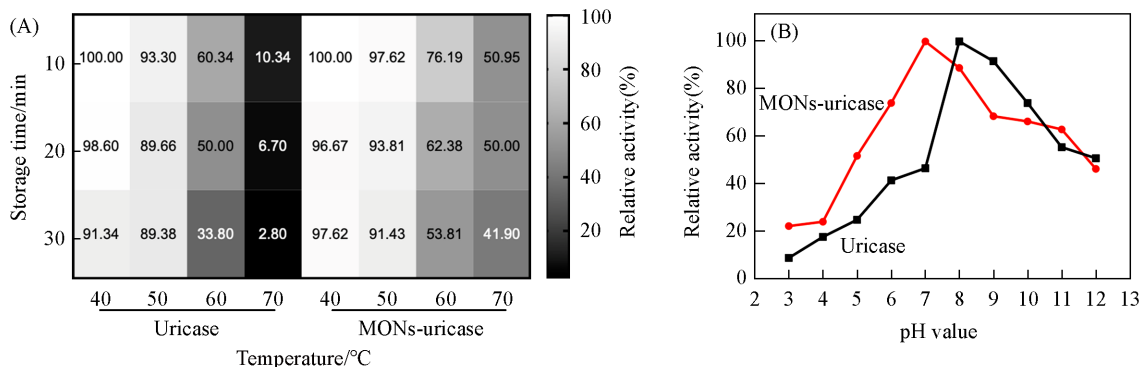


Fig. 6 Thermal stabilities(A) and pH stabilities(B) of uricase and MONs-uricase

了其热稳定性。

MONs-uricase 比游离尿酸酶的 pH 稳定性更高。如图 6(B) 所示, 游离尿酸酶在 pH=8~10 时保持稳定, 而 MONs-uricase 在 pH=7~11 时保持稳定。据文献^[32]报道, 酶的活性位点通常由带电的氨基酸残基占据, 酶的最佳催化活性取决于氨基酸残基的特定解离状态。反应体系的 pH 值可直接影响氨基酸残基的解离状态。MONs 带负电荷, 可吸引溶液中包括 H⁺ 在内的阳离子, 使 MONs-uricase 周围 H⁺ 浓度增大, 形成局部酸性微环境。外部溶液的 pH 值向碱性偏移, 从而使 MONs-uricase 酶活性的 pH 值稳定范围扩大。

2.4 MONs-uricase 检测 UA

首先, 对 UA 检测的反应时间和 MONs-uricase 的加入量进行了优化。如图 7(A) 所示, 当反应时间为 20 min 时, 其在 290 nm 处的吸光度不再增加, 表明 UA 已完全反应。如图 7(B) 所示, 当 MONs-uricase 加入量为 3.0 mg 时, 反应 20 min 后, 在 290 nm 处的吸光度不再增加, 表明 UA 已完全反应。因此, 检测 UA 的最佳反应时间为 20 min, 最佳 MONs-uricase 加入量为 3.0 mg。

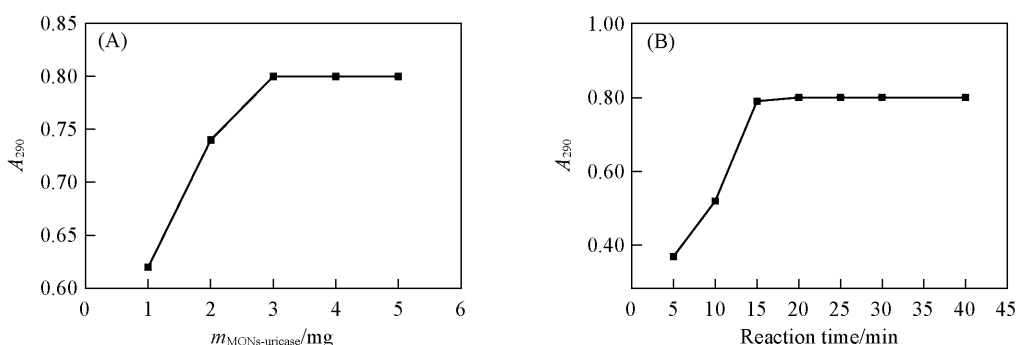


Fig. 7 Optimization of MONs-uricase quantity(A) and reaction time(B) for uric acid detection

然后, 在反应时间为 20 min, MONs-uricase 用量为 3.0 mg 条件下, 利用 MONs-uricase 检测了 UA 标准溶液。如图 8(A) 所示, 在 0.001~1.500 mg/mL 浓度范围内吸光度与 UA 浓度呈现良好的线性关系, 线性方程为 $y=0.8246x-0.0026$ ($R^2=0.9995$)。反应 20 min 后, 将含有 MONs-uricase 的溶液离心后, 洗涤和回收 MONs-uricase, 使用回收的 MONs-uricase 检测 UA 标准溶液。如图 8(B) 所示, 在重复使用 30 次后, MONs-uricase 的酶活性仍保留 80% 以上, 表明 MONs-uricase 具有可回收性和重复使用性。

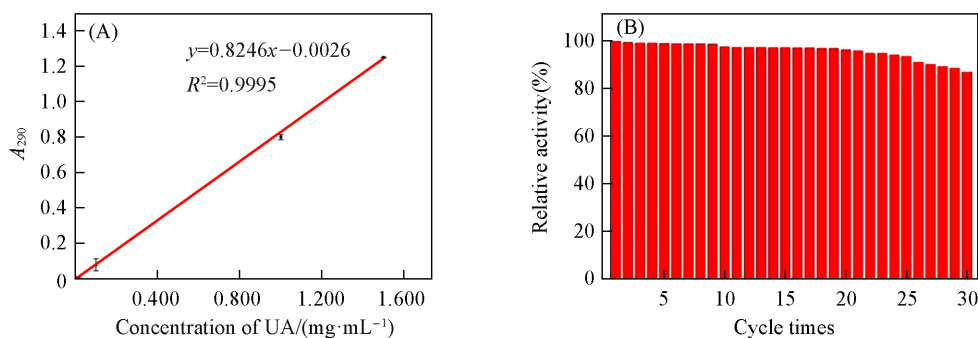


Fig. 8 Linear equation for uric acid determination(A) and relative activity of MONs-uricase after repeated use(B)

2.5 MONs-uricase 测定血清中 UA

采用所建立的方法, 在 4 °C 下, 将人体血样离心得到人体血清, 用 MON-uricase 检测血清中的 UA。如图 9(A) 所示, 在 0.01~1.00 mg/mL 浓度范围内吸光度与浓度具有良好的线性关系, 线性方程为 $y=0.7714x-0.0133$ ($R^2=0.9982$)。人体血清样本 UA 的浓度范围为 0.015~0.070 mg/mL, 表明该方法可用于检测人体血清中的 UA。如图 9(B) 所示, 重复使用的 MONs-uricase 可用于血清中 UA 的检测, 重复

使用20次后,其仍保留约50%的活性,在重复使用40次后,MONs-uricase丧失活性.这是由于血清中含有的多种化学物质可能与MON-uricase反应,导致其酶活性降低.临床样本检测中常见的干扰物有尿素、胆红素、胆酸钠和维生素C.干扰实验结果表明,维生素C对MONs-uricase检测血清中的UA有较大干扰($T=-4.992$, $P=0.004$).维生素C具有较强的还原性,可与MON-uricase反应,在MONs-uricase检测血清中的UA时,使其消耗增加,进而导致多次使用后MONs-uricase酶活性降低.

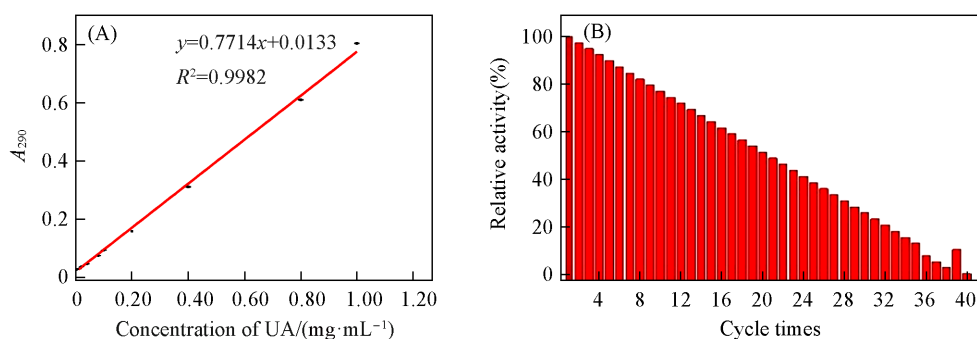


Fig. 9 Linear equation for determination of serum uric acid(A) and relative activity after reusing of MONs-uricase(B)

使用MONs-uricase与游离尿酸酶检测血清中的UA,利用 t 检验对检测结果进行了统计分析.结果表明,MONs-uricase与游离尿酸酶检测结果无显著差异($T=0.007$, $P=0.995$),表明MONs-uricase与游离尿酸酶检测血清中UA的结果具有等效性.但MONs-uricase具有游离尿酸酶无法比拟的可回收性和重复使用性,可减少资源浪费.

3 结 论

合成了中空介孔有机硅纳米球(MONs),并用于固定化尿酸酶(Uricase).实验结果表明,尿酸酶固定化后可保留90%以上的酶活性.与游离尿酸酶相比,MONs-uricase具有更好的热稳定性和pH稳定性.建立了MONs-uricase检测UA的方法,并对人体血清样本进行了检测分析,在0.01~1.00 mg/mL浓度范围内可实现快速且高灵敏度的检测.MONs-uricase可通过离心回收,在多次循环使用后仍可保留较高活性,表明其可重复利用性良好.

参 考 文 献

- [1] Chen W. K., Lu C. H., Xu J., Yang Y. C., Li J. Q., *Chinese J. Struct. Chem.*, **2002**, 21(2), 186—190(陈文凯, 陆春海, 许娇, 杨迎春, 李俊钱. 结构化学, **2002**, 21(2), 186—190)
- [2] Wang J. G., Staessen J. A., Fagard R. H., Birkenhäger W. H., Gong L., Liu L., *Hypertension*, **2001**, 37(4), 1069—1074
- [3] Martinon F., *Immunol. Rev.*, **2010**, 233(1), 218—232
- [4] Huang S. H., Wu T. K., *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271(3), 517—523
- [5] Hu X., Wang Y., Liu C., Jin Z., Tian Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 111, 28—32
- [6] Wu D., Lu H. F., Xie H., Wu J., Wang C. M., Zhang Q. L., *Sens. Actuat. B: Chem.*, **2015**, 221, 1433—1440
- [7] Galbán J., Andreu Y., Almenara M. J., de Marcos S., Castillo J. R., *Talanta*, **2001**, 54(5), 847—854
- [8] Wang J., *Chem. Rev.*, **2008**, 108(2), 814—825
- [9] Wang X., Li F., Cai Z., Liu K., Li J., Zhang B., He J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410(10), 2647—2655
- [10] Zhao Y., Yang X., Lu W., Liao H., Liao F., *Microchim. Acta*, **2009**, 164(1), 1—6
- [11] Zhang Y., Yan M., Gao P., Jiang J., Zhang G., Li J., Shuang S., *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2015**, 51(4), 470—478
- [12] Chauhan N., Preeti, Pinky, Pundir C., *Anal. Sci.*, **2014**, 30(4), 501—506
- [13] Fang X., Zang J., Wang X., Zheng M. S., Zheng N., *J. Mater. Chem. A*, **2014**, 2(17), 6191—6197
- [14] Phaugat K., Bhambi M., Renu, Pundir C. S., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 62(1), 27—31
- [15] Nohair B., Thao P. T. H., Nguyen V. T. H., Tien P. Q., Phuong D. T., Hy L. G., Kaliaguine S., *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116(20), 10904—10912
- [16] Guan L., Di B., Su M., Qian J., *Biotechnol. Lett.*, **2013**, 35(8), 1323—1330



- [17] Bhargava A. K., Lal H., Pundir C. S., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1999**, 39(3), 125—136
- [18] Zhang K., Zhang N., Zhang L., Wang H., Shi H., Liu Q., *RSC Adv.*, **2018**, 8(10), 5280—5285
- [19] Hoffmann F., Cornelius M., Morell J., Fröba M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(20), 3216—3251
- [20] Mizoshita N., Tani T., Inagaki S., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40(2), 789—800
- [21] Wang W., Lofgreen J. E., Ozin G. A., *Small*, **2010**, 6(23), 2634—2642
- [22] van der Voort P., Esquivel D., de Canck E., Goethals F., van Driessche I., Romero-Salguero F. J., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(9), 3913—3955
- [23] Guan B., Wang X., Xiao Y., Liu Y., Huo Q., *Nanoscale*, **2013**, 5(6), 2469—2475
- [24] Kumar V., Misra N., Paul J., Dhanawade B. R., Varshney L., *Polymer*, **2014**, 55(11), 2652—2660
- [25] Lee J., Farha O. K., Roberts J., Scheidt K. A., Nguyen S. T., Hupp J. T., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38(5), 1450—1459
- [26] Xuan W., Zhu C., Liu Y., Cui Y., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41(5), 1677—1695
- [27] Zou H., Wang R., Li X., Wang X., Zeng S., Ding S., Li L., Zhang Z., Qiu S., *J. Mater. Chem. A*, **2014**, 2(31), 12403—12412
- [28] Fang X., Liu S., Zang J., Xu C., Zheng M. S., Dong Q. F., Sun D., Zheng N., *Nanoscale*, **2013**, 5(15), 6908—6916
- [29] Bui S., von Stetten D., Jambrina P. G., Prangé T., Colloc'h N., de Sanctis D., Royant A., Rosta E., Steiner R. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53(50), 13710—13714
- [30] Poyraz B., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 117, 713—720
- [31] Wu S. H., Hung Y., Mou C. Y., *Chem. Mater.*, **2013**, 25(3), 352—364
- [32] Kosuge K., Sato T., Kikukawa N., Takemori M., *Chem. Mater.*, **2004**, 16(5), 899—905

(Ed.: X, V, K, M)