

行政院國家科委員會專題研究計劃成果報告

題目：微過氧化酵素之動力學及光譜研究

計劃編號：NSC 89-2113-M-002-029

執行時間：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計劃主持人：林萬寅 執行單位：國立台灣大學化學系

中文摘要：

本文利用停止流法偵測 Fe- 及 Mn-MP-8 和 H_2O_2 作用形成中間體的速率，以及加入受質後，MP-8 的回復速率。在 Fe-MP-8 的系統中，中間體的形成及 MP-8 的回復共有五個步驟參與，我們也決定了每一步驟之速率常數。中間體 II 對不同受質之反應性相差約 2~3 個數量級，且與氧化電位有線性相關。Mn-MP-8 和 H_2O_2 作用只形成一個中間體，其對受質的反應性相差約 2 個數量級，且比 Fe-MP-8 小 2~25 倍。在 MP-8 催化 luminol 化學發光方面，以 mCPBA 為氧化劑之 CL 比 H_2O_2 大一個數量級，但發光時間明顯縮短，此乃酵素催化受質的轉換速率增加所致。

關鍵詞：微過氧化酵素、動力學、受質反應性、化學發光

Abstract

The stopped-flow technique has been used to study MP-catalyzed reactions. For Fe-MP-8, five steps are involved in the formation of intermediates and the regeneration of MP. We have determined the rate

constant of each individual step. The substrate reactivity towards intermediate II differs by 2~3 orders of magnitude and is linearly correlated with its oxidation potential. For Mn-MP-8, only one intermediate is involved. The substrate reactivity differs by 2 orders of magnitude and is small than that of Fe-MP-8 by 2~25 folds. For the chemiluminescence (CL) of luminol catalyzed by MP-8, the use of mCPBA enhances CL by an order of magnitude with much shorter duration of CL (as compared to H_2O_2), which is due to the fast turnover rate of CL cycle.

Keywords: Microperoxidase, Kinetics, Substrate reactivity, Chemiluminescence (CL)

計劃緣由與目的：

微過氧化酵素(MP-8)仍然留有八個胺基酸殘基鏈並以兩個 Cys 與血基質環相接，不但水溶性佳，且當 pH>3 時，則以 His 的支鏈作為血基質中心鐵離子的近側配位基，使 MP-8 可以作為含血基質蛋白酵素的極佳模型化合物。過氧化酵素 (HRP) 與過氧化氫的氧化反應機制中會形成失去兩個電子的中間體 compound I，而後藉由受質

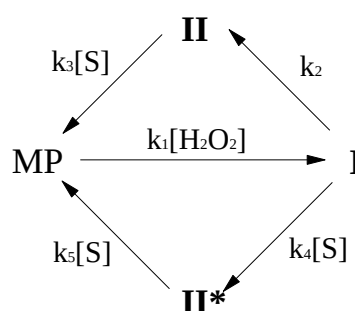
提供一個電子還原產生另一中間體 compound II，其若再繼續由受質處獲得一個電子，則可再繼續被還原成為原來的 HRP。MP-8 亦可能與過氧化氫反應產生類似於 HRP 的中間體 [1, 2]，大部分動力學研究皆於高濃度的過氧化氫濃度下進行，此結果可能造成 MP-8 的嚴重破壞、多次轉換以及產物複雜化的影響，進而會影響動力學結果的解釋。再者，於酵素多次轉換的條件下，若中間體與受質的反應速率大於中間體的形成速率時，受質的反應性則無法被區別出來。除此之外，不同的受質與微過氧化酵素不同的中間體反應所得之受質反應性亦尚未被報導過，所以本實驗中則利用停止流法研究微過氧化酵素催化反應之動力學，並將分別討論中間體的形成及回復過程。此外，本文也將針對 Mn-MP-8 之催化機制作一深入探討，並決定不同受質之反應性及其與電位關係。另一方面，MP-8 亦可應用於催化 luminol 的化學發光。本文也將探討 Fe-MP-8 及 Mn-MP-8 與 H_2O_2 及 mCPBA 之催化 luminol 之化學發光。

結果與討論：

鐵微過氧化酵素之催化機制

Fe-MP-8 和 H_2O_2 反應可形成兩個中間體 I 及 II，其相對量與 pH 值有關。受質 OMP 與 I 作用會進行二步驟的反應，先形成 II*再回復到 MP；而受質與 II 作用則直接回到 MP。整個中間體的形成及 MP 回復的過程可用 scheme 1 表示。反應機制中五個速率常數(k_1 - k_5)都可經由分析 stopped-flow 圖形而得到，其在三個 pH 下的結果則列於表一。 k_1 對 pH 的變化為鐘型，而

k_2 則隨 pH 的增加而持續增加；中間體對受質之反應性則為 $k_4 > k_3 > k_5$ 。在 pH 10.7 時，幾個受質對 II 之反應性列於表二，不同受質反應性相差約 2~3 個數量級。 k_3 - k_5 三個步驟皆與受質濃度有線性關係，並且三個速率常數大小也與受質的種類有關，若要觀察到三個步驟的變化，則必須特別注意受質濃度的使用範圍。



Scheme 1

(一)：各步驟之速率常數值。

pH	$k_1/10^3$	k_2	$k_3/10^3$	$k_4/10^5$	$k_5/10^2$
pH 7.0	8.07	—	—	4.42	2.10
pH 9.0	188	0.057	1.80	212	1.10
pH 10.7	110	—	688	—	—

unit: $M^{-1}s^{-1}$.

表(二)：不同受質於 pH 10.7 下之回復速率常數值。

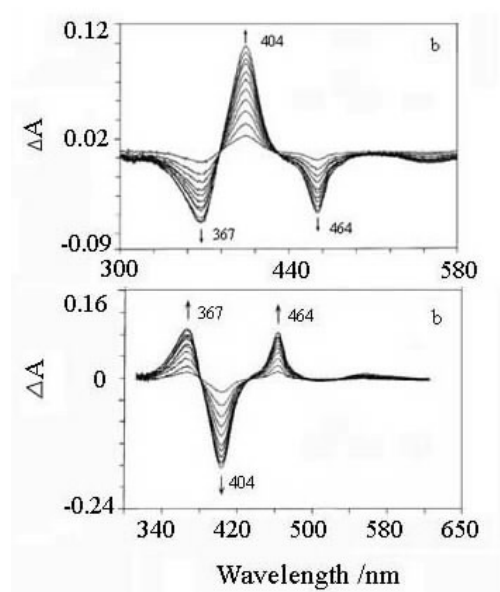
Substrates	Fe-MP-8 (k_3)	Mn-MP-8 (k_2)
1-naphthol	1.36×10^7	6.25×10^5
ascorbic acid	3.68×10^6	1.04×10^6
4-methoxyphenol	1.18×10^6	4.71×10^4
homovanillic acid	7.18×10^5	3.36×10^4
<i>o</i> -methoxyphenol	6.88×10^5	3.26×10^4
ABTS	4.08×10^5	1.62×10^5
<i>p</i> -anisidine	2.30×10^5	2.36×10^4
aniline	4.86×10^4	4.61×10^3
ferrocyanide	4.03×10^4	1.08×10^4

unit: $M^{-1}s^{-1}$.

利用掃描方波伏安法偵測受質的氧化電位，發現受質的反應性 ($\log k_3$) 與其氧化電位間呈現很好的相關性 (data not shown)。此結果說明了愈容易被氧化的受質則呈現出愈快的受質反應性。

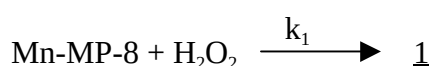
銻-微過氧化酵素之催化機制

Mn-MP-8 與 H_2O_2 在 pH 10.7 下作用，利用停止流吸收全光譜模式偵測 Mn-MP-8 中間體形成隨時間之差異光譜變化，如圖 1a 所示。

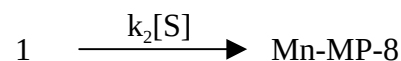


圖(1)：(a)Mn-MP-8 中間體 1 形成及(b) 1 與 OMP 作用之差異光譜隨時間的變化。

當 Mn-MP-8 被 H_2O_2 氧化可由光譜上得知在波長 367 及 464 nm 處的吸收峰下降，伴隨著波長 404 nm 處新峰的生成，同時，也可從圖中觀察到 389 及 418 nm 明顯的等吸收點，由此得知中間體 1 的形成是直接由 Mn-MP-8 轉換而來。此中間體的形成可由下式表之：



式中 k_1 (pH 10.7) = $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。圖 1b 則為 1 與受質 OMP 反應後之差異光譜隨時間的變化，其光譜變化正好與形成過程相反，此即為 Mn-MP-8 的回復。回復率高達 90~95%，表示中間體的破壞並不嚴重。回復的過程可表示如下：



中間體 1 與不同受質作用所得的回復速率常數值整理於表二。由表二可知受質的反應性相差了兩個數量級；而且 Mn 催化系統較 Fe 催化系統的受質反應性小 2~25 倍。此外，Mn-MP-8 的最佳受質為 ascorbic acid，而 Fe-MP-8 的最佳受質為 1-naphthol。由文獻 [3, 4] 可以得知 ascorbic acid 在 P-450 型態反應中會抑制過氧化酵素的反應，而本實驗結果正指出 ascorbic acid 可以非常有效的抑制大部分受質的過氧化酵素反應。

微過氧化酵素在化學發光上的應用

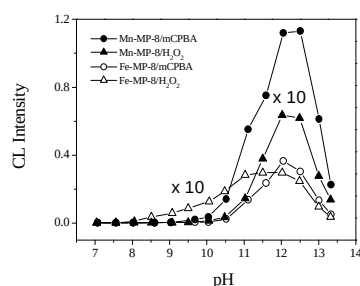


圖 2：不同酸鹼值對於四種催化劑及氧化劑組合在 luminol 發光強度上的影響。微過氧化酵素、氧化劑、luminol 及緩衝液濃度分別為 2.4 μM 、10.0 μM 、50.0 μM 及 5 mM。光電倍增管電壓為 500 V。

不論以 Fe-或 Mn-MP-8 為催化劑及 H_2O_2 或 mCPBA 為氧化劑都能有效的催化 luminol 的化學發光(簡稱 CL)。圖 2 所示為四種可能的催化劑、氧化劑組合之 luminol CL 在不同 pH 之變化情形。四個系統的發光強度的最大值皆約在 pH 12, 且在最適化酸鹼值下, 利用 mCPBA 作為氧化劑所得之發光強度約比 H_2O_2 為氧化劑時之發光強度大了一個數量級。CL 強與所使用的催化劑及氧化劑有很大的關係。

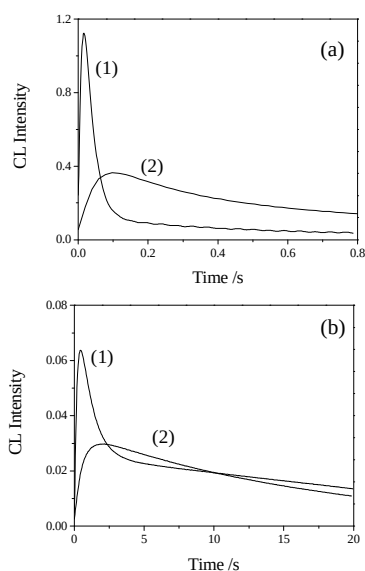


圖 3：利用(a) mCPBA (b) H_2O_2 為氧化劑，偵測化學發光強度於 pH 12 下隨時間的變化。圖中(1)及(2)分別表示以 Mn-MP-8 和 Fe-MP-8 為催化劑之結果。實驗條件與圖(2)中相同。

圖 3 為最適化酸鹼值下四個系統的發光強度隨時間變化的曲線圖，其相對的峰強度為 Mn-MP-8/mCPBA (A)：Fe-MP-8/mCPBA (B)：Mn-MP-8/ H_2O_2 (C)：Fe-MP-8/ H_2O_2 (D) = 38：12：2.2：1。圖 3a 亦指出使用 mCPBA 為氧化劑時較圖 3b 中以 H_2O_2 為氧化劑所得的發光時間較短；由曲線下的面

積(即發光總量)可知除了系統 A 所得的面積較小外(約為其他三者的 40%)，其他三個系統的發光總量幾乎差不多。本研究得到一個結論：當發光總量差不多時，如果發光時間縮短，則發光強度增加，而發光時間縮短的原因為酵素催化受質的轉換速率增加所致。由結果也得到下列的結論：若酵素具有較高的轉換速率且其中間體較為穩定不易被破壞，在充分的試劑下則可得到強度極強且時間延長的化學發光。

計劃成果自評：

本計劃利用停止流法決定出 Fe- 及 Mn-MP-8 之催化機制，並得到每一各別步驟之速率常數。不同受質之反應性相差 2~3 個數量級且與氧化電位有一線性關係。以 mCPBA 為氧化劑有較強的化學發光，但時間明顯縮短。根據本計劃的結果讓我們對 MP-8 的催化機制有更深入的瞭解，而化學發光的增強將可應用於各種物質的偵測。

References:

1. Wang, J. -S. and Van Wart, H. E. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7925-31.
2. Wang, J. -S., Back, H. K. and Van Wart, H. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 1320-24.
3. Adams, P. A., De Milton, R. C. and Silver, J. *Biometals.* **1994**, *7*, 217-20.
4. Spee, J. H., Boersma, M. G., Veeger, C., Samyn, B., Van Beeumen, J., Warmerdam, G., Canters, G. W., Van Dongen, W. M. A. M. and Rietjens, I. M. C. M. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 215-20.