



酶组织化学与免疫组织化学 原理和技术

谢克勤 主编

*Meizuzhi Huaxue yu
Mianyizuzhi Huaxue Yuanli he Jishu*

山东大学出版社

酶组织化学与免疫组织化学 原理和技术

(供研究生使用)

主 编 谢克勤

副主编 赵秀兰 宋福永 张翠丽 曾 涛

山东大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

酶组织化学与免疫组织化学原理和技术/谢克勤主编. — 济南: 山东大学出版社,
2014. 03
ISBN 978-7-5607-5000-2

I. ①酶…

II. ①谢…

III. ①酶学—组织化学—研究生—教材②免疫学—组织化学—研究生—教材

IV. ①Q550.3②R392.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 054377 号

责任策划: 米克荣

责任编辑: 唐棣

封面设计: 张荔

出版发行: 山东大学出版社

社 址 山东省济南市山大南路 20 号

邮 编 250100

电 话 市场部(0531)88364466

经 销: 山东省新华书店

印 刷: 山东泰安金彩印务有限公司

规 格: 787 毫米×1092 毫米 1/16

13.25 印张 306 千字

版 次: 2014 年 3 月第 1 版

印 次: 2014 年 3 月第 1 次印刷

定 价: 28.00 元

版权所有, 盗印必究

凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页, 由本社营销部负责调换

编者的话

为适应研究生教学的需要,我们根据多年研究生教学经验总结编写而成本书,供研究生使用。全书分上、下两篇,上篇的内容为酶组织化学原理与技术;下篇的内容为免疫组织化学原理与技术,以及核酸原位杂交技术。本书原稿于1997年在孙克任教授主审下,由谢克勤、高树君、张磊、厉保秋、张旻等老师参加编写而成。这次是在原书稿的基础上,由谢克勤、赵秀兰、宋福永、张翠丽和曾涛老师进行重新编写,正式出版。

由于编写时间仓促和水平有限,不适之处在所难免,敬请批评指正。

编者

2013.10 于山东大学高校毒理学重点实验室

目 录

上篇 酶组织化学

第一章	绪 论	(3)
第二章	酶和辅酶	(7)
第三章	酶促反应	(18)
第四章	酶组织化学的基本操作	(38)
第五章	酶组织化学方法的原理	(58)
第六章	酶组织化学实验技术	(76)

下篇 免疫组织化学

第一章	总 论	(99)
第二章	免疫学的基本概念	(102)
第三章	免疫组化的取材、固定、包埋及切片	(113)
第四章	免疫酶组织化学	(126)
第五章	亲和组织化学	(144)
第六章	原位杂交组织化学	(151)
第七章	免疫组织化学实验	(171)
附录一	免疫细胞化学常用试剂介绍	(181)
附录二	原位杂交组织化学常用试剂及处理	(195)

第一章 绪 论

一、基本概念

(一)组织化学与细胞化学(histochemistry and cytochemistry)

组织化学与细胞化学是运用物理和化学的技术与方法研究分析组织和细胞结构中的化学成分,并确定这些化学成分在组织、细胞结构内的定位、定性和定量,从而找出其变化规律的科学。

研究组织细胞的化学成分及其化学反应机制是了解机体脏器、组织、细胞生理功能和病理变化的一种方法。一般来讲,研究化学物质的方法有三种。①将组织细胞完全破坏或磨碎,进行检查;②提取组织细胞的特殊组成成分或细胞器,探讨其中存在的化学物质及其功能和变化;③不破坏组织细胞而保持其结构,使其中的化学物质在原位变成具有可见性的物质,以便了解它的存在和功能。第一种方法,现已经发展成为生物化学这样一门独立的学科。第二、三种方法即为细胞化学和组织化学。这两种概念有时混用,有时又不同。组织化学主要是指第三种方法;细胞化学有时指第二种方法,有时指第三种方法。

组织化学与细胞化学是介乎组织学、细胞学和生物化学之间的边缘科学。它既基于并溯源于这些学科,又区别于这些学科。①组织化学与组织学的区别:组织学的着眼点是组织与细胞的形态结构,组织学技术会尽可能地保持组织和细胞的微细结构,许多组织学染色方法是一种“经验”的方法;而组织化学的着眼点是组织与细胞结构的化学组成,组织化学技术的基础,不是依靠“经验”,而是运用已知的化学反应,即是一个严格的化学反应过程。②组织化学与生物化学的区别:虽然两者都着眼于组织与细胞的化学成分的分析及其含量的测定,但生物化学技术中常将组织、细胞破坏,制成匀浆,然后进行化学成分的分析测定,故其定位性较差;组织化学技术则要求尽可能地在原位显示各种化学成分。生物化学反应多是在试管内进行,而组织化学意在使其化学反应在细胞上进行。

(二)酶组织化学(enzyme histochemistry)

酶组织化学是在形态学基础上,运用物理的和化学的技术与方法研究组织和细胞的酶的定位、定性和定量,以及在不同生长及发育阶段、不同生理及病理状态下酶活性变化的科学。

酶组织化学把研究组织结构特点的形态学和研究组织功能状态的生物化学紧密地结合起来,在同一标本上对结构和功能两个方面进行综合研究,成为形态学和生物化学间的



联系环节。酶组织化学不是一种简单的联系手段,而有它自身的研究目的、研究方法及其自身的规律性,现已发展成为一门独立的学科。

从应用的角度来看,酶组织化学也是一种方法学。在组织学领域内,它是阐明组织、细胞和细胞器的代谢及功能的强有力的手段之一;在病理学和临床医学中,它对形态改变和功能异常间的相互关系以及对疾病发生机理的了解、诊断和鉴别诊断能提供了可贵的资料;在药理学和毒理学领域中,对药物的作用效应和毒性损伤,药物和毒物作用机理研究均是一种重要手段。

二、方法原则

生物体内进行着许多复杂而有规律的反应,如生物氧化、还原、合成和分解等过程。这些化学反应之所以能够在体温 37℃ 和适宜的 pH 环境中快速而有规律地进行,是因为体内含有催化新陈代谢中各种反应的酶。可以说,在生物机体内几乎没有一种生物化学反应不是由酶催化而完成的。目前发现的酶,已超过 2000 余种。新陈代谢就是酶催化的多种多样的同化与异化反应的复杂体系。总之,没有酶的催化就没有新陈代谢,也就会丧失生命的重要特征,即没有生命。

酶组织化学是用组织化学方法证明组织、细胞、超微结构中酶的存在。作为一门独立的学科,在方法学上有其特殊性。在酶组织化学的研究中,既要保持组织细胞在结构上的完整性,也要把酶在组织细胞不同结构上的定位和活性尽可能符合自然状态地显示出来。因此,酶组织化学方法的基本原则是:

- (1)保持组织细胞的良好形态结构。
- (2)在组织和切片的制备过程中,应尽可能地不影响酶的自然定位和活性。
- (3)底物和其他辅助试剂应以同样速度渗入所有的受试细胞及其各种结构中。
- (4)底物对待测酶应当具有尽可能高的特异性,即只受待测酶的作用。
- (5)辅助试剂应当不干扰酶反应,也不应影响底物的渗透。
- (6)酶反应产物应迅速被同一孵育液中存在的辅助试剂捕捉。
- (7)捕捉后形成的终产物应立即沉淀,既不溶于水,也不溶于脂质,形成的沉淀应当是稳定的,形态是无定形或细小结晶。
- (8)参与反应的物质不结合或不吸附到酶反应部位以外的其他结构上。

三、酶组织化学方法

目前发展起来的酶组织化学方法,从基本原理上可分为:

(一)依存酶催化活性的方法

1. 溶解底物法

(1)不需捕捉反应的方法:自身有色底物法,分子内重排、合成法,DOPA(dihydroxy-phenylalanine)反应。

(2)需捕捉反应的方法

①同时偶联法、金属沉淀法、偶氮偶联法、四唑盐法、靛蓝法、Nadi 反应(indophenol reaction)、DAB 法。

②后偶联法。

2. 底物膜法(substrate film method)

(二)不依存酶催化活性的方法

1. 标记抑制物法

2. 免疫组织化学

(1)免疫荧光法。

(2)免疫酶法。

(3)抗体标记法。

四、酶组织化学的局限性

由于酶组织化学在方法学上的特殊要求,使其存在一定的局限性:

1. 可定位、定性,但是半定量

酶组织化学的上述方法,主要是一些定性的方法。也就是说,它主要用于确定酶在组织细胞内或细胞器内的存在和定位,对酶活性反映是有条件的、相对的。目前普遍使用所谓“半定量法”,是以终产物显色反应强度作不同的分级记录,如阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)、极强阳性(++++)、以表示或比较酶活性的强弱。

目前,随着用于图像分析技术的仪器和相应软件的发展,已能对酶组织化学终产物的显色反应进行量化处理。

2. 酶组织化学方法所能定位的酶,在数量上较生化方法能测定的酶少

这是由于方法上的限制。目前生物化学方法能证实的酶达 2100 种左右。而组织化学方法能定位的酶仅 80 余种,电镜组织化学能定位的酶也仅 80 种左右。

五、酶组织化学发展史

酶组织化学是自然科学的一部分,随着相关学科的发展而逐渐发展。

酶组织化学的历史大致可分为四个阶段:

第一阶段,是 1939 年以前,即酶组织化学发展的早期阶段,集中于研究组织细胞的氧化还原,此时尚未出现“酶组织的证明”这种想法。

人们最早熟悉的是 Nadi 反应。它是在萘酚和二乙基-对苯二胺的混合液受到氧化时产生蓝色色素-靛酚的一种反应。这个反应最初由 Ehrlich(1885)发现,他把该试剂注入机体内,观察到组织被染成蓝色。有人将此法应用于新鲜组织和固定的组织细胞。认为蓝染是基于不稳定性氧化和稳定性氧化酶作用的结果(Gierke, 1911; Graeff, 1936)。

以后 Keilin(1938)证明不稳定性氧化酶的反应是由细胞色素氧化酶催化的真正的酶反应,而所谓稳定性氧化酶的反应,它不是酶的作用,而是基于 Nadi 试剂,特别是 α -萘酚所致。



还有一个与酶反应有关的例子是愈创树脂(guaiacum)反应。它是一种过氧化物酶的反应。用组织化学方法,使用联苯胺,在过氧化氢共存的情况下,通过氧化反应而生成蓝色。在此反应中,过氧化物酶和过氧化氢酶的作用可以共存,一般认为是由于过氧化物酶作用的结果。多巴氧化酶也有同样的问题,虽然称它为“氧化酶反应”或者是“过氧化物反应”,但尚未能真正证明是哪种酶作用。

1939年是酶组织化学发展中划时代的一年,是酶组织化学真正开始的一年。Gomori(1939)提出磷酸酶硫化钴反应,高松(1939)提出磷酸酶银反应。关于酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的酶组织化学证明的论文都是在这一年发表的。

第二阶段:1940~1950年,此期是酶组织化学发展的黄金时代。在方法学上,确立了“金属盐法”或“金属沉着法”(metal precipitation method)的,并采用这种方法对许多水解酶开展了酶组织化学的证明。Meten Junge和Green(1944)又创立了“偶联偶氮色素法”(coupling azodye method)。这种方法是利用人工合成底物,通过色素沉着来确定酶的定位。虽然仍主要用于水解酶类,但对酶组织化学却有很大的促进。

此期也出版了许多有关组织化学的书籍。

第三阶段:20世纪50年代以后。

1956年,由Scheldon等人把超薄切片法和电镜技术应用于酶组织化学技术上,利用金属沉淀法观察酸性磷酸酶,接着Brander等(1956)用以观察碱性磷酸酶,用金属盐法证明酶的存在,称此为电镜酶组织化学(electron microscope enzyme histochemistry)或电镜细胞化学(electron microscope cytochemistry)。Seligman(1967~1970)等人相继提出了俄黑化法(osmification method),又明确证明了多种酶的定位。

由于电镜技术的发展和广泛应用,逐渐弄清楚了细胞超微结构。酶与细胞器的定位的关系在此时期及此后得到迅速发展。

至今,电镜组织化学方法能观察的酶达80种左右。

第四阶段:是指免疫组织化学发展阶段。在20世纪60年代以后,免疫组织化学(immunohistochemistry)的进展为酶组织化学的证明更加专一化和酶的定位提供了重要手段,使以往在方法学上难于证明的酶,逐渐弄清了其在细胞内的定位。

我国开展组织化学与细胞化学的研究起步较晚,始于20世纪50年代。

在中国解剖学会领导下,于1988年3月在广州第一军医大学召开了中国解剖学会“组织与细胞化学学组”成立大会,并决定筹划《中国组织化学与细胞化学杂志》,这标志着中国组织化学与细胞化学科学研究进入了崭新的阶段。

1992年,经国家有关部门批准《中国组织化学与细胞化学杂志》(Chinese Journal of Histochemistry and cytochemistry)(季刊)正式出版发行。

综上所述,酶组织化学具有将形态学、生物化学和生理学联系起来的独特特点,在医学生物学领域内日益发挥其重要作用。

第二章 酶和辅酶

一、酶的特性(property of enzyme)

(一)酶的生物学意义和化学本质

1. 酶的生物学意义

生物体内不断地进行物质代谢,物质代谢过程涉及多种有机化合物的合成与分解两个基本过程。这个过程是在体温、常压和接近中性条件下进行的。这种复杂的化学反应得以顺利进行,依赖于多种生物催化剂——酶。

酶是由活细胞产生,并能在体内外起催化作用的一类特异性蛋白质(即酶蛋白),又称生物催化剂。在酶学中常把被酶催化的物质称为底物或基质(substrate)。由酶催化的化学反应称为酶促反应(enzymetic reaction)。酶加速化学反应的能力,称为酶活性或活力(enzyme activity or vitality)。酶失去催化能力,称为酶失活或酶抑制(enzyme deactivation or inhibition)。

酶是催化剂,它既具有催化剂的共性,又具有与一般催化剂不同的特征。

(1)酶与一般催化剂的共同点

①能加快化学反应的速度,但在反应前后其本身不发生变化,故可以极小的含量促进大量反应物的转变。

②只能改变化学反应速度,即缩短反应达到平衡所需要的时间,不能改变化学反应的平衡点。

③只能催化热力学允许进行的化学反应。

④可降低反应的活化能。

(2)酶与一般催化剂的不同点

①催化效率高:酶能在常温及适宜的酸碱度的条件下,使反应速度几乎等于零的化学反应迅速进行。有酶催化反应比非酶催化反应速度快 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍;酶催化反应比其他催化反应速度快 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。每分钟,每个酶分子能催化反应物分子转化的数量-转换数(turnover number),一般为 1000,最大可达 100 万以上。

②高度特异性(specificity):即一种酶只作用于某一个或一类底物。一般催化剂对反应物的特异性比较差。从酶的特异性可以推测出酶的种类是极其复杂、多种多样的,这种特异性是一般催化剂所不具备的。

③酶活性受多种机制或因素调控:在生物体内许多酶形成体系,其催化功能受各种因



素,如激素的调节和控制,而一般催化剂均缺乏这种性质。酶是生物体自身合成的蛋白质,因而酶的功能,除决定于它的分子结构外,还与酶的生物合成量和代谢情况有关。

④大部分酶活性与辅酶和金属离子有关:如维生素是许多酶的辅酶,许多酶的活性需要金属离子如 PCR 反应中的镁离子。

⑤生物、物理、化学因素作用可使酶失活:酶易受各种因素作用而失活,如生物因素(细菌、病毒等)、化学因素(各种化学物质)、物理因素(温度等)等。

⑥酶是大分子物质,具有大分子的各种性质。一般催化剂是小分子物质。

2. 酶的化学本质

酶的化学本质是蛋白质。酶蛋白同其他蛋白质一样,由多肽链组成,并具有不同的结构水平,即一、二、三、四级结构。

(1)一级结构(primary structure):是指共价多肽链及其氨基酸排列顺序。通常从左到右,从氨基端开始,依次用氨基酸缩写符号向羧基端书写。蛋白质的一级结构是由基因上的遗传信息决定的。一级结构是蛋白质分子的基本结构,也是蛋白质空间结构的基础。通过一级结构的信息可以说明生物进化、遗传变异以及蛋白质功能的分子机理。

(2)二级结构(secondary structure):是蛋白质分子中肽链的局部空间结构,也就是多肽链骨架中氨基酸残基相对空间位置。蛋白质的二级结构有 5 种基本的构象单元。

① α -helix:多肽链骨架围绕中心轴顺时针方向螺旋式上升,每上升一圈为 3.6 个氨基酸残基,螺距为 0.54nm。分为左手螺旋和右手螺旋。

② β -pleated sheet:呈折纸状,多肽链充分伸展,每个肽单元以 α -碳原子为旋转点,依次折叠成锯齿状结构, β -Pleated sheet 有平行式和反平行式两类,前者肽链的 N'端都在同一端,后者所有肽链 N'端按正反方向排列,维持蛋白质空间结构的稳定性。蛋白质一级结构中氨基酸残基的排列顺序决定二级结构的类型。蛋白质空间结构的正确形成,还需要一类称为分子伴侣(chaperon)的蛋白质的参与。

蛋白质分子中以上两种主要的二级结构单元由于折叠盘曲,在空间上进一步聚集、组合在一起,形成有规则的二级结构聚合体,可作为结构域的组成单位,或直接作为二级结构的“建筑块”,这种结构的聚合体称为超二级结构(super secondary structure),常见的超二级结构有 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta$ 三种类型。

③ β -转角:常发生在肽链进行 180° 回折时的转角上。

④无规则卷曲:指蛋白质分子中无规则卷曲的那部分肽链构象。

⑤无序结构:指蛋白质分子中没有确定空间结构的区域。

(3)三级结构(tertiary structure):是指蛋白质分子中一条多肽链在二级结构、超二级结构和结构域的基础上进一步盘曲、折叠形成的空间结构,也就是整条多肽链所有原子在三维空间的排布位置。对单链蛋白质来说,三级结构就是蛋白质分子的特征性立体结构,具有了蛋白质的特性和功能。而对多链蛋白质来说,具有三级结构的多肽链,称为蛋白质分子的亚基,尚不具有蛋白质的生物学活性。具有三级结构的蛋白质分子或亚基一般呈球状、椭球状或纤维状。其结构的特点是整个分子比较致密,亲水性氨基酸残基多分布在表面,形成亲水面;而疏水性氨基酸残基大多埋在分子内部,形成疏水核,少数在表面形成疏水面。在球状蛋白质分子表面常出现一个内陷的“洞穴”,该“洞穴”一般是疏水区,是蛋

白质分子与配体结合发挥生物功能的中心部位。对酶而言,该洞穴是与底物结合并发挥催化反应的活性中心。

(4)四级结构(quarternary structure):由两条以上多肽链组成的蛋白质,此类蛋白质分子中的每条多肽链成为亚基,亚基与亚基之间呈特定的三维空间排布。蛋白质分子中各个亚基的空间排布和相互间的布局即为蛋白质的四级结构。亚基之间的结合力主要是靠疏水键,此外氢键、范德华力、离子键和二硫键也有一定作用。

(二)酶蛋白的理化性质

1. 酶为大分子有机化合物

其分子量较大,变化范围在1万至数百万以上。因此,它们不能透过半透膜。利用酶的这一特性,形成了酶组织化学中的半透膜法。该法对改善非结合酶类的定位有较好的效果。

2. 水溶性

酶是极性分子,因而在水和稀盐溶液中是可溶的。

在溶液中,酶分子将随浓度梯度而扩散(diffusion),达到均匀分布于整个溶液系统中。酶组织化学反应一般均在溶液中进行,待测组织内的酶分子,尤其是非结合酶,必然向溶液内扩散,从而影响准确定位,甚至出现假定位。酶的扩散取决于扩散系数,后者与酶分子的大小、形状和溶液的黏度有关。

酶分子大小和形状,不能人为控制,而溶液的黏度却可以人为控制。因此,在检测某些酶的组化技术中,常用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或明胶等加入反应液内,增加溶液的黏度,减轻酶的扩散,改善酶定位的准确性。

3. 酶的胶体性质与沉淀

酶与其他蛋白质一样,是亲水胶体(hydrophilic colloid),它的亲水胶体性质决定于以下三个方面:

(1)蛋白质在溶液中的质点大小为1~100nm,已达到胶体质点的范围内。

(2)蛋白质中的氨基酸组分包含有氨基($-\text{NH}_2$)和羧基($-\text{COOH}$)。因此,具有两性离子性质。在酸性条件下,蛋白质带正电(H^+);在碱性条件下,可带负电(OH^-)(见图1-2-1)。

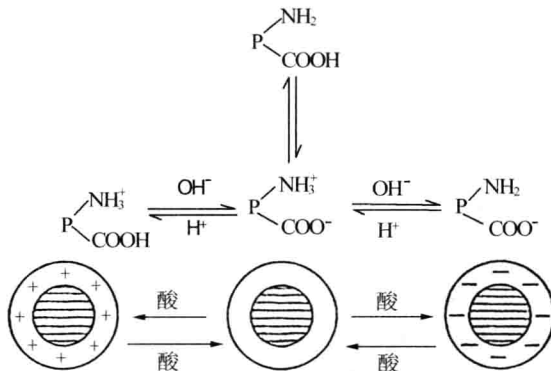


图 1-2-1 蛋白质分子的离解作用



因此,酶分子表面,在一定的 pH 中,都带有相同电荷,可与它周围电荷相反的离子构成稳定的双电层(electric double layer)。

(3)蛋白质分子表面有许多亲水基团,如氨基、羧基、羟基和酰胺基(—CO—NH—)等,在水溶液中能与水分子起水化作用(hydration)。因此,每一分子表面有一水化层(hydrationmantle)包围着,各分子由水化层互相隔开。由于水化层和双电层两方面稳定因素的存在,形成稳定的胶体系统,蛋白质分子不致相互凝集而沉淀析出。

如果在蛋白溶液中加入脱水剂(如乙醇、丙酮)使失去水化层;或者改变溶液 pH 使达到蛋白质等电点(isoelectric point,PI),则使质点失去相同的电荷(或加入电解质)都可破坏双电层。那么,蛋白质就会发生凝集,形成更大的质点从溶液中沉淀出来。这种不稳定的质点的形成如图 1-2-2 所示。

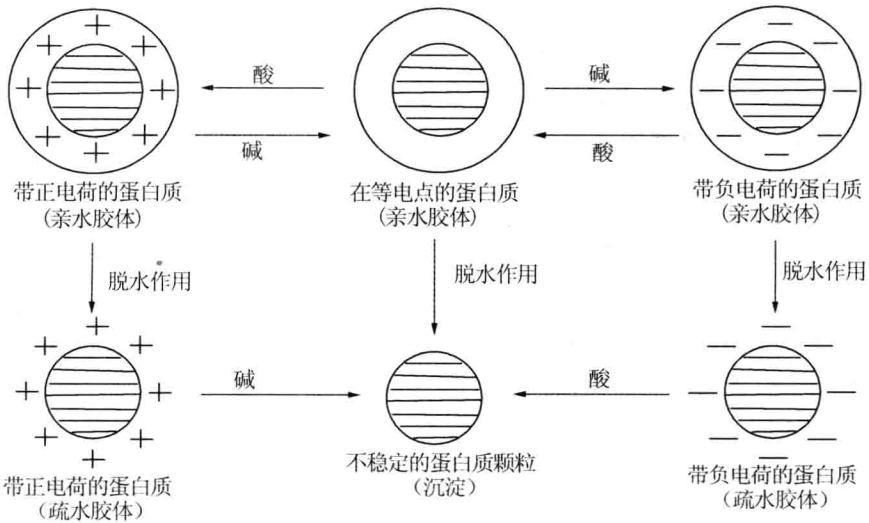


图 1-2-2 不稳定蛋白质点形成

在酶组织化学操作中,待测酶可在组织内扩散或扩散入孵育液中,造成定位的困难。根据上述蛋白质沉淀原理,可用脱水剂丙酮、乙醇等破坏水化层,使酶在原位沉淀于组织内,达到准确定位的目的。但这些脱水剂也有使蛋白质变性的作用,造成酶活性下降或完全失活,故应掌握应用的指征、方法和条件。

4. 变性(denaturation)

蛋白质的变性是指在变性因素作用下,天然蛋白质的二、三或二、三、四级结构发生改变,以及物理、化学性质的异常变化,从而导致生物功能丧失。变性可分为可逆性变性和非可逆性变性。前者在除去变性因素后,蛋白质的构象可以恢复原状;后者不能恢复原状。

维持蛋白质分子二、三、四级结构的化学键,主要是次级键:如离子键、氢键、疏水键和范德华力。凡能影响这些次级键的因素,均可能成为变性因素。因此,使蛋白质变性的因素可分为两大类,即化学因素和物理因素。化学因素包括酸、碱、有机溶剂(乙醇、乙醚、丙酮等)、重金属盐类、脲类、胍类以及表面活性剂(长链的脂肪酸)等;物理因素包括温

度、紫外线、超声波、高压、剧烈振荡、搅拌、研磨等。

(1)pH对蛋白质构象的影响:大多数蛋白质在pH 4~10范围内是稳定的,pH小于4或大于10就发生变性。因为pH低于等电点时,蛋白分子产生净的正电荷;pH高于等电点,产生净的负电荷。由于同性电荷相斥,使维持蛋白构象的离子键受到影响,导致构象变化。对蛋白质而言,可导致酶活性中心的构象崩溃,丧失活性。

(2)有机溶剂的变性作用

①有机溶剂可影响静电力、氢键和疏水键,从而导致蛋白质的构象变化。有机溶剂会使溶液极性和介电常数减少,蛋白分子中的静电力会增大,多肽链会高度伸展。这也是丙酮、乙醇等脱水剂在引起蛋白质沉淀达到固定作用的同时,也引起酶蛋白变性,活性降低的原因。

②有机溶剂可影响分子内的氢键。不同的有机溶剂,对蛋白质分子内的氢键有不同的影响。能与蛋白质生成氢键的溶剂中,不利于蛋白质分子内的氢键生成;不能与蛋白质生成氢键的溶剂中,则有利于蛋白分子内的氢键生成。

③有机溶剂可影响蛋白质分子内的疏水键。天然蛋白质中,疏水键是疏水侧链为避开水相而群集在一起的一种作用力。这种力可稳定蛋白质的构象。当溶剂极性减少时,疏水键减弱,可导致蛋白质构象改变。

(3)离子对蛋白质构象的影响:离子与蛋白质相互作用的机制,可能有两个方面:①直接作用:离子对蛋白质分子内部极性基团的直接作用。②间接作用:离子改变溶剂的结构,以影响水分子与蛋白质极性侧链基团的相互作用,从而间接地影响蛋白质构象的稳定性。

因此通过以上两种作用,一些离子(如 SO_4^{2-})能提高蛋白质构象的稳定性,同时也能使蛋白质溶解度下降;另一些离子(如 Ca^{2+} 、 SCN^-)能降低蛋白质构象的稳定性,使蛋白质变性,也能提高蛋白质的溶解度。

(4)脲和胍影响疏水键:一般说来,高浓度脲和胍及类似化合物的水溶液,可以作为非极性物质的溶剂,此类物质主要是破坏蛋白分子内部的疏水键,使疏水基暴露,从而导致蛋白质变性。

(5)表面活性物质的影响:如长链脂肪酸(月桂酸等)或相应的表面活性剂(十二烷基磺酸钠,SDS)很容易与蛋白质反应,常常引起蛋白质解离成亚基或单个肽链的变性。与脲和胍类物质不同,其在很低的浓度下就能和蛋白质高度地结合。

(6)物理因素的影响:物理性的变性因素中,热变性是引起酶失活的最普遍的因素,在 $50^\circ\text{C}\sim 60^\circ\text{C}$ 溶液中经过一段时间,蛋白质往往发生变性。热变性可以是可逆的,但多是不可逆的。热变性主要涉及氢键、疏水键等非共价键的变化,在某些蛋白质中,也促使二硫键的断裂或二硫键之间的交换反应。因此,酶组织化学操作应避免高温。

为了克服变性的不利影响,常采取一些措施防止变性发生,常用抗变手段如在适当缓冲液中加入蛋白质(包括明胶)、树胶、底物、辅酶、必需的金属离子以及某些盐类,从而增加蛋白质的稳定性。



二、辅酶和辅基 (coenzyme and prosthetic group)

大部分的酶是结合蛋白质,其分子组成中除蛋白质部分外,尚含有一些无机或有机成分,如果缺少这些无机或有机成分,酶则丧失活性。

酶的纯蛋白部分称为脱辅基酶蛋白(apoenzyme),或简称酶蛋白。与酶的功能直接有关的另一些成分,广义地称为辅酶。酶蛋白与辅酶结合在一起称为全酶(holoenzyme)。

根据非蛋白部分(即广义的辅酶)与酶蛋白结合的紧密程度,可分为辅基和辅酶。如果两部分结合十分紧密,透析不能使之分离,称为辅基;两部分结合松弛,透析处理则与酶蛋白分离,称为辅酶。广义的辅酶包括辅基和辅酶。辅因子(cofactor)一词,是在辅酶的本质尚未阐明前的一种称呼,其与辅酶和辅基间常混淆不清。

就广义的辅酶而言,按其作用可分为两大类:

(一)与氢(电子)转移有关的辅酶(与氧化还原反应有关的辅酶或辅基)

这类辅酶的作用是传递氢(电子),形成呼吸链的酶类,其辅酶都属于此类。

1. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$)

这类辅酶为重要的递氢体,作为脱氢酶的辅酶,参与呼吸链组成,在生物氧化还原反应中起电子载体或递氢体的作用。

与 NAD^+ 和 $NADP^+$ 有关的脱氢酶如表 1-2-1 所示。

表 1-2-1 与 NAD^+ 和 $NADP^+$ 有关的脱氢酶

酶	催化反应	辅酶
乙醇脱氢酶	乙醇 \rightleftharpoons 乙醛	NAD^+
苹果酸脱氢酶	L-苹果酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸	NAD^+
苹果酸脱氢酶(脱羧)	L-苹果酸 \rightleftharpoons 丙酮酸 + CO_2	$NADP^+$
异柠檬酸脱氢酶	异柠檬酸 \rightleftharpoons α -酮戊二酸 + CO_2	$NADP^+$
乳酸脱氢酶	L-乳酸 \rightleftharpoons 丙酮酸	NAD^+
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	6-PG \rightleftharpoons 6-PGA	$NADP^+$
3-磷酸甘油醛脱氢酶	3-磷酸甘油醛 + P \rightleftharpoons 1,3-二磷酸甘油醛	NAD^+
谷氨酸脱氢酶	L-谷氨酸 + H_2O \rightleftharpoons α -酮戊二酸 + NH_3	NAD^+ 或 $NADP^+$
α -甘油磷酸脱氢酶	D-3-磷酸甘油 \rightleftharpoons 磷酸二羟丙酮	NAD^+

2. 黄素类辅酶

黄素类辅酶有两种,黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)。二者与酶结合很牢,在狭义上属辅基类。核黄素(黄素类)是 FMN 和 FAD 组成成分。

脱氢过程中,氧化型黄素类辅酶在 N-1 和 N-10 位上加入氢,转化为还原型。这种反

应的氢原子是来自底物或 NADH 和 NADPH。还原型 FMN 和 FAD 将氢传递给氧原子或其他受氢体。

具有黄素类辅基的酶类称为黄素蛋白(flavoprotein),属于此类酶的有:D-氨基酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、NADH-脱氢酶、醛氧化酶、琥珀酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶等。需要 FMN 或 FAD 的重要的酶有葡萄糖氧化酶、黄嘌呤氧化酶、混合功能氧化酶、微粒体混合功能胺氧化酶、谷胱甘肽还原酶、细胞色素 P₄₅₀ 还原酶、NADP 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶等。

3. 辅酶 Q (泛醌, ubiquinone)

辅酶 Q 是苯醌的一种衍生物,由于苯醌的形成与苯酚的形式可互相转变,使这类物质能参加呼吸链中的氧化还原反应。该物质在线粒体呼吸链中,从 FAD 接受氢,然后把电子转移到细胞色素 b。

4. 血红素类辅基

血红素类辅基是卟啉环与铁离子组成的络合物,它是一些氧化酶和细胞色素的辅基,如过氧化氢酶、过氧化物酶、细胞色素 b、细胞色素 c、细胞色素 a 和细胞色素 P-450。

5. 谷胱甘肽(glutathione)

谷胱甘肽是一种三肽,即 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸。它有氧化型与还原型,前者以 GSSG(oxidized glutathione)表示,后者以 GSH (reduced glutathione) 表示。GSH 是乙二醛酶的辅基。

(二)与氢以外的其他特定基团有关转移反应的辅酶或辅基

1. 硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate)

(1)硫胺素(thiamine):即维生素 B₁,其活性辅酶是硫胺素焦磷酸(TPP),是羧化酶、转羟乙醛酶的辅酶(carboxyl coenzyme)。

TPP 的生成反应如下:硫胺素+ATP→TPP+AMP

此辅酶主要是 α -酮酸的氧化脱羧及非氧化脱羧作用的脱羧酶,以及戊糖磷酸支路中的转酮醇作用中的转酮醇酶的辅基。

(2)羧化酶(carboxylase):为发生在线粒体中的生物氧化过程的关键环节,从葡萄糖、脂肪酸、支链氨基酸衍生来的丙酮酸和 α -酮戊二酸经氧化脱羧,产生乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA(succinyl CoA),才能进入柠檬酸循环(citric acid cycle)彻底氧化。

(3)转羟乙醛酶(transketolase):在细胞浆中参与了磷酸戊糖途径,在此酶的作用下,可把来自 5-磷酸木酮糖的 α -酮基转给 5-磷酸核糖,形成 7-磷酸景天庚酮糖和 3-磷酸甘油醛,此反应是可逆的。它虽然不是葡萄糖氧化供能的重要途径,但却是核酸合成所需的戊糖,以及脂肪和类固醇合成所需 NADPH 的重要来源。由于乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA 是三大营养素分解代谢的关键环节,同时又是它们合成代谢的连接点。因此如果不足,会影响到机体的整个能量代谢。如果缺乏,可对机体造成广泛的损伤。

2. 辅酶 A

CoA 是一个带三个磷酸基和一个巯基的核苷酸,其中含有泛酸。CoA 主要是乙酰化酶及其他转酰基酶的辅酶。