

固相酶与亲和层析

袁中一 刘树煌 袁静明 编著

科学出版社

内 容 简 介

本书主要对近十年来国际上新发展起来的固相酶(水不溶酶)技术作了比较系统的综述。内容包括固相酶的各种制备方法、固相酶的某些性质,以及固相酶在工业、医学和科学研究等各个领域中的应用。也讨论了固相酶研究的新进展,并将国际上已提及的固相酶列成总表。最后介绍了最近发展的建立在生物学专一的相互作用基础上的新的分离纯化方法——亲和层析。

本书可供生物化学、化学、微生物学、酶制剂生产和应用部门、制药工业、医学临床和化验工作的科技人员及有关高等院校师生参考。

固 相 酶 与 亲 和 层 析

袁中一 刘树煌 袁静明 编著

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1975 年 4 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1975 年 4 月 第一次印刷 印张: 7 7/8

印数: 0001—14,550 字数: 175,000

统一书号: 13031·109

本社书号: 219·13—10

定 价: 0.82 元

毛主席语录

我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

对于外国文化，排外主义的方针是错误的，应当尽量吸收进步的外国文化，以为发展中国新文化的借镜；盲目搬用的方针也是错误的，应当以中国人民的实际需要为基础，批判地吸收外国文化。

前 言

伟大的无产阶级文化大革命，有力地推动了我国生产和科学技术的迅速发展。在生物化学领域中的“酶”（即生物催化剂），也由于微生物和动植物的酶制剂在石油化工、食品、轻工业、医药卫生和农牧业中的重要作用，而越来越受到各方面的重视。酶学研究在深入，酶的应用在扩展。

近十几年来，在酶学研究方面国际上出现了“固相酶”这一新的应用技术，发展甚为迅速。自从跨入七十年代，各国都在计划或已经从事固相酶的研究。固相酶对探讨生命规律的理论研究有重大作用，但是更吸引人的还是固相酶在工业、医学和分析中应用的巨大潜在力。譬如，目前酶制剂应用中遇到的成本不易过关，可望由固相酶来解决。固相酶在减低酶价、减轻对酶源的压力、增加与化学法工艺的竞争力和减少公害方面，会远比目前使用的酶制剂优越；而且，固相酶还可扩大酶的应用面。由于固相酶的优点和从事此项研究的人员的日益增加，人们预计七十年代固相酶将大放异彩。

伟大领袖毛主席教导我们：“我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国。” 为了适应我国工、农、医等方面迫切需要酶制剂的情况，为了推动酶工程这一领域的发展，应该尽快地用固相酶这项新技术装备我国的科学研究、工业生产和医疗卫生。遵照毛主席关于“洋为中用”的伟大教导，查阅了国外有关固相酶方面的资料，并整理成文。供有关领导同志、科技人员和医务工作者参考。

本书包括三部分。第一部分介绍固相酶的制备方法、性质和应用；第二部分为固相酶研究的近年进展；第三部分将亲和层析独立出来作较详细的介绍。假如说近年固相酶是作为酶应用、酶工程的重要技术而受到特别重视，那末，亲和层析则是作为纯化生物高分子的好方法而获得飞速发展。

由于我们水平有限，在书中必然会有许多错误，恳切希望读者批评指正。

本书承王应睐同志、沈昭文同志、戚正武同志、汪静英同志、龚蓁蓁同志和王庆诚同志悉心审阅并提出宝贵的修改意见，在完稿过程中还得到吉鑫松、沈绿萍和曾以申同志的协助，在此一并致谢。

编 者

1972 年 10 月

目 录

第一章 固相酶(1970年前国外资料综述)·····	(1)
一、固相酶的制备方法·····	(3)
(一) 吸附法·····	(3)
(二) 载体偶联法(共价法)·····	(6)
(三) 交联法·····	(19)
(四) 包埋法·····	(21)
(五) 其他·····	(24)
二、固相酶的性质·····	(27)
(一) “相对活力”和专一性的改变·····	(28)
(二) pH-活力曲线和最适 pH ·····	(34)
(三) 米氏常数的改变·····	(39)
(四) 稳定性的增加·····	(42)
(五) 抑制剂的影响·····	(46)
(六) 其他性质·····	(47)
三、固相酶的应用·····	(47)
(一) 工业生产中的应用·····	(47)
(二) 分析化学中的应用·····	(53)
(三) 酶反应机制的阐明·····	(58)
(四) 医药中的应用·····	(62)
(五) 酶和抑制剂的分离提纯——亲和层析·····	(65)
(六) 免疫化学中的应用·····	(71)
四、结束语·····	(72)

第二章 固相酶研究的新进展	(75)
一、固相化方法.....	(75)
(一) 吸附法.....	(75)
(二) 共价(载体偶联)法.....	(75)
(三) 交联法.....	(81)
(四) 包埋法.....	(81)
(五) 一些新方法.....	(82)
二、固相酶的性质.....	(85)
(一) 固相酶活力的变化.....	(85)
(二) 最适 pH 和稳定性	(87)
(三) 固相酶反应器的动力学研究.....	(88)
三、固相酶的应用研究.....	(89)
(一) 工业中的酶反应器.....	(89)
(二) 分析中的应用.....	(91)
(三) 理论研究中的应用.....	(92)
(四) 医药中的应用研究.....	(97)
(五) 生物学高分子纯化中的应用.....	(97)
四、小结.....	(97)
固相酶总表.....	(99)
参考资料.....	(129)
 第三章 亲和层析	 (145)
一、载体的选择.....	(149)
(一) 纤维素和葡聚糖凝胶.....	(150)
(二) 交联共聚和物理包埋.....	(154)
(三) 琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶和多孔玻 璃.....	(155)

二、配基的选择·····	(159)
(一) 纯化酶的吸附剂·····	(159)
(二) 纯化酶抑制剂的吸附剂·····	(162)
(三) 纯化亲和标记肽的吸附剂·····	(163)
(四) 利用分子内相互作用的吸附剂·····	(163)
(五) 纯化传递蛋白和受体的吸附剂·····	(164)
(六) 纯化激素的吸附剂·····	(164)
(七) 纯化抗原和抗体的吸附剂·····	(164)
(八) 纯化核酸的吸附剂·····	(165)
三、琼脂糖及聚丙烯酰胺的衍生物的制备···	(165)
(一) 琼脂糖的活化及其衍生物的制备·····	(165)
(二) 聚丙烯酰胺衍生物的制备·····	(172)
四、提高吸附剂亲和力的一些手段·····	(172)
(一) 引入“手臂”·····	(172)
(二) 增加配基的取代程度·····	(176)
(三) 以最少的键连接·····	(176)
(四) 载体多孔性的影响·····	(177)
五、亲和吸附和洗脱·····	(179)
(一) 吸附·····	(179)
(二) 洗涤·····	(181)
(三) 酶的洗脱·····	(181)
(四) 亲和柱的再生·····	(183)
六、亲和层析的应用·····	(184)
(一) 酶的纯化·····	(184)
(二) 分辨化学改变的酶及酶学研究中的其他 应用·····	(197)
(三) 纯化亲和标记的活性中心肽段·····	(199)
(四) 纯化互补的和人工合成的肽·····	(199)

（五）纯化酶的天然抑制剂·····	（ 200 ）
（六）纯化传递蛋白和结合蛋白·····	（ 202 ）
（七）纯化激素·····	（ 203 ）
（八）纯化激素受体及细胞膜制剂·····	（ 204 ）
（九）核酸研究中的应用·····	（ 206 ）
（十）纯化抗体和抗原·····	（ 207 ）
（十一）纯化细胞、细胞器及其他重要高分子 ···	（211 ）
酶的亲和层析总表·····	（212）
参考资料·····	（229）

第一章 固 相 酶*

(1970 年前国外资料综述)

酶是蛋白质,是生物体内催化各种化学反应的催化剂,有着高度的专一性和高效性。生命细胞的复杂代谢就是成千上万个不同酶控制的。人们在日常生活中早就利用它来催化各种反应,例如用曲制酱油、皮革脱毛、酿酒等。随着科学的发展,不但酶在食品、医学等方面被广泛使用,科学工作者还从生物体中分离出专一地催化某一物质转化的“酶”,有的已分离、提纯、结晶,甚至它们的立体结构近来也有不少已经阐明。目前工业生产中已有不少采用酶制剂,这样作用就比较专一,反应也可在较短期间内完成。但由于酶在水溶液中一般不很稳定,而且酶液只能和底物作用一次,这在经济上来说是不理想的。另一方面工业酶制剂大多不纯,在反应液中带进不少杂蛋白及有色物质等,这就造成了产物分离提纯的困难,产率也较低。酶在医学分析上应用又常被纯化酶所需的代价和酶的不稳定性所限制。近十年来,固相酶的发展弥补了上述水溶性酶的某些缺陷。

固相酶是酶学中近十几年来新发展起来的一个方面,开始主要集中于制备固相酶的技术上。近年来已逐渐注意到它

* 固相酶 (immobilized enzymes)。也曾用过 water-insoluble enzyme, insolubilized enzymes, solid phase enzymes, bound enzymes, fixed enzymes, solid-supported enzymes, matrix-supported enzymes, enzyme resins, carrier-bound enzymes 和不溶性酵素。

的理论研究和实际应用。固相酶是将水溶性的酶用物理或化学方法处理,使之变成不溶于水的仍具有酶活性的酶衍生物;在催化反应中,它以固相状态作用于底物。固相酶不但仍然具有酶的高度专一性及温和条件下高效率催化的特点,还具有离子交换树脂那样的优点,即有一定的机械强度,可用搅拌或装柱形式作用于底物溶液,使生产连续化自动化;不带进杂质,产物容易精制,收率较高;反应结束时,固相酶还可以反复使用。又因酶经固相化后,稳定性有较大增加,因此可根据生产情况,既可反复使用也可贮藏较长时间。由于固相酶的这些特点,这一新技术必将为工业微生物中酶的应用开辟新的途径。

固相酶的研究又有其理论意义。生物体细胞内大多数主要的酶都是在膜上或细胞器上发生作用的。可以想象成万个酶在细胞内分布必定象建筑学那样地精细,才能使不同酶对各个底物、产物、抑制剂等井井有条地进行作用。以往人们总是把这些酶从生物膜或亚细胞颗粒上分离出来进行研究的。这虽然也是研究酶的一种必要方法,但要真正探索这些酶在生物体内的本来面貌显然是困难的。固相酶作为一种酶模型,有助于了解生物体内膜或凝胶类的微环境对酶功能的影响,一定程度上可说是一种生物模拟。

固相酶为从事生物化学分析工作者提供了一类稳定的可重复使用的分析“试剂”,对蛋白质、核酸的结构研究提供了方便的手段。

固相酶也为医学提供了临床分析的新工具和治疗“缺酶病”的新方法。

固相酶应用于“亲和层析”这一新技术,为酶等生物化学制剂的提纯开辟了令人鼓舞的新途径。

有关固相酶的综述已出现很多^[1-8,134,196,286,289]。

一、固相酶的制备方法

酶的催化反应依赖于它的高级结构及活性中心。因此在进行某一酶的固相化时,必须选择适当条件,力图不使其活性中心的基团受到改变。为使高级结构不受破坏,在固相化过程中应避免过高温度、过酸过碱、有机溶剂及高浓度盐的处理。操作尽可能在温和条件——水溶液、低温、最适 pH——下进行。此外选择载体亦应注意到不致于引起蛋白质变性,以及经得起一定 pH 和温度的改变、有一定亲水性基团和机械强度等特点。

酶的固相化方法大致可分为四大类。(一)吸附法:酶被吸附于惰性的固相载体或离子交换剂上;(二)载体偶联法(共价法):酶通过化学共价键联结于固相载体上;(三)交联法:酶依靠双功能团试剂造成分子间交联而聚集成网状结构;(四)包埋法:酶被包裹于凝胶格子或聚合物的半透膜微胶囊中。模式图如图 1。

(一)吸附法

1. 物理吸附法 使酶蛋白的分子吸附于惰性载体上。

蛋白质吸附于不同吸附剂常常引起变性。但若找到恰当的载体,既能吸附酶蛋白而不引起剧烈变性,又能在酶反应时保持一定的酶活力,那末这种方法是十分简便的。但这种方法易引起蛋白质表面变性,且由于结合力较弱,当反应液的 pH、离子强度、温度、底物浓度等发生变化时,会导致酶从载体上部分或全部的脱落,所以至今成功的实例不多。使用对蛋白有高度吸附能力的硅胶、活性炭、石英砂及火棉胶膜常能制得活力不低的固相酶。物理吸附法制备的固相酶如表 1 所

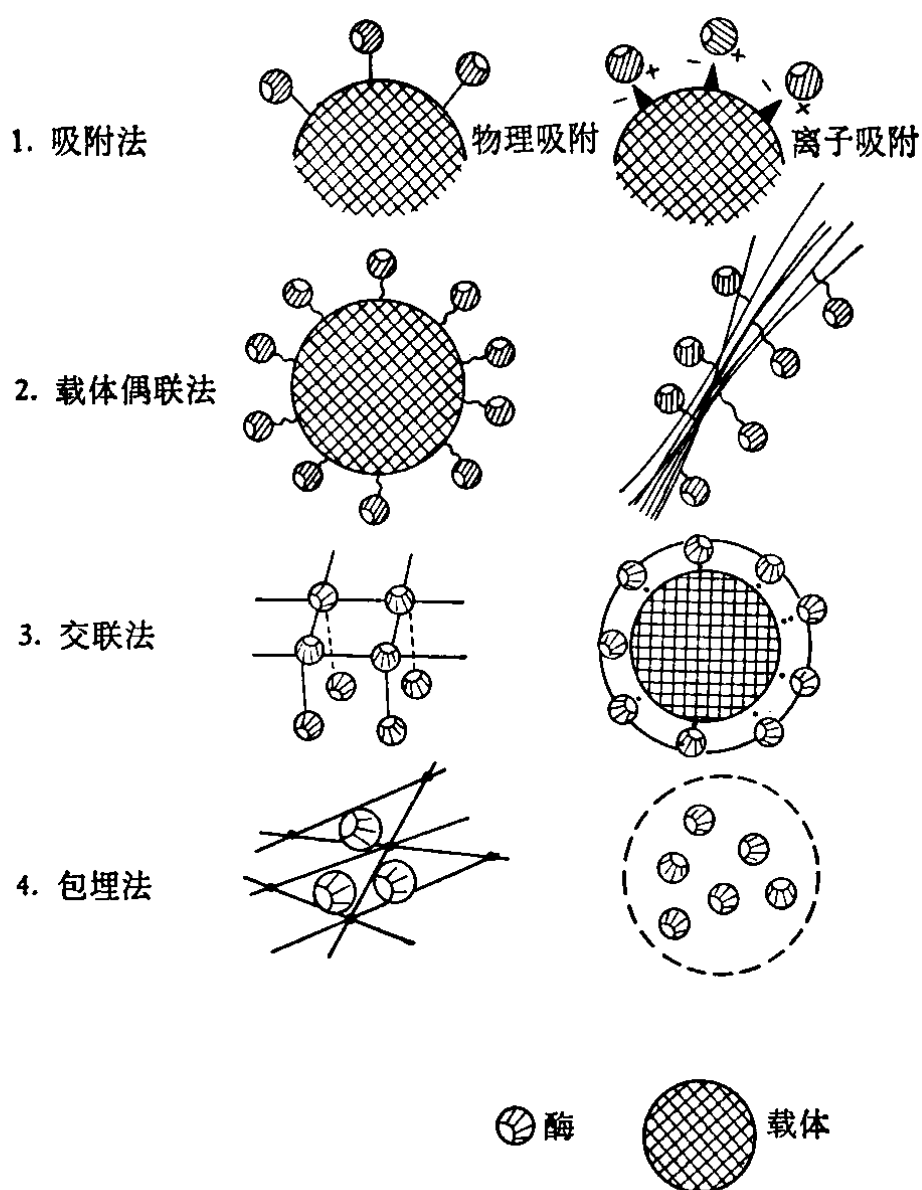


图1 固相酶模式图

示。

2. 离子吸附法 酶蛋白具有两性的多电解质的特性,其带电基团和含有离子交换基团的固相载体间由于静电相吸(离子键)而形成络合物。

酶溶液在适当离子强度和适当 pH 条件下就能吸附于适当的离子交换剂上。最常用的是 DEAE-纤维素和 DEAE-葡聚糖凝胶。这一类的固相酶总结于表 2。阴离子交换剂用来吸附酸性和中性酶蛋白,阳离子交换剂则吸附碱性酶蛋白。

表 1 物理吸附的固相酶

载 体	固 相 酶
活性炭	淀粉糖化酶 ^[11-13,143] 、蔗糖转化酶 ^[9,10] 、ATP 脱氨酶 ^[39]
玻璃片	脲酶、胃蛋白酶 ^[22] 、过氧化氢酶 ^[23]
玻璃粉	胰血管舒张素 ^[14] 、胰蛋白酶 ^[315]
多孔玻璃	胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶 ^[25] 、木瓜蛋白酶 ^[26,28] 、核糖核酸酶 ^[25,27] 葡萄糖氧化酶 ^[28]
石英砂	α -淀粉酶 ^[24] 、胰蛋白酶 ^[315]
氧化铝	蔗糖转化酶 ^[9,10] 、赖氨酸脱羧酶 ^[311]
活性白土	糖化酶 ^[15,16]
高岭土	溶菌酶、胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 ^[17-20]
磷酸钙凝胶	亮氨酸氨肽酶 ^[29,30]
羟基磷灰石	NAD-焦磷酸化酶 ^[31]
纤维素 (透析袋)	枯草杆菌蛋白酶 ^[32] 、胰蛋白酶 ^[315] 、核糖核酸酶 ^[315] 、多核苷酸磷酸化酶 ^[312]

表 2 离子吸附法制备固相酶

载 体	固 相 化 的 酶
DEAE-纤维素	胃蛋白酶、中性蛋白酶(肾、脾脏) ^[36] 、氨基酰化酶(肾脏) ^[36] 、蔗糖转化酶 ^[37,38] 、ATP 脱氨酶 ^[39] 、氨基酰化酶(黄曲) ^[40,41,42] 、右旋糖苷蔗糖酶 ^[48] 、天门冬酰胺酶 ^[49,50] 、无机焦磷酸酶 ^[31]
DEAE-葡聚糖凝胶	氨基酰化酶(黄曲) ^[40,43-47]
CM-纤维素	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 ^[36] 、天门冬酰胺酶 ^[49]
TEAE-纤维素	氨基酰化酶(黄曲) ^[40]
ECTEOLA-纤维素	氨基酰化酶(黄曲) ^[40] 羟基脲解酶 ^[21]
磷酸-纤维素	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 ^[33,36]
柠檬酸-纤维素	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 ^[36]
阴离子交换纤维素	过氧化氢酶 ^[35]
Amberlite XE97	脂肪酶 ^[33]
Dowex-50	核糖核酸酶 ^[34]
Dowex-2	核糖核酸酶 ^[34]
聚氨基聚苯乙烯	过氧化氢酶 ^[33]
丹宁酸	蔗糖转化酶 ^[268]

离子吸附法操作简便,条件温和,所以往往能获得较高的固相酶活力,而且经过反复使用酶失活后,载体用酸碱处理再生,又可重新使用。但酶与载体间依靠较弱的离子键维系,所以当接触溶液的离子强度增加、pH 改变、温度改变或底物浓度较高时,酶会从载体上逐渐脱落下来。

(二)载体偶联法(共价法)

这是使酶蛋白的非必需基团通过共价键和载体形成不可逆的联接。在温和条件下能偶联的蛋白质基团包括:游离氨基(肽链 N-末端的 α -氨基和赖氨酸的 ϵ -氨基)、游离羧基(肽链 C-末端的 α -羧基、天门冬氨酸和谷氨酸的 β -、 γ -羧基)、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、酪氨酸的酚基、丝氨酸和苏氨酸的羟基。氨基易和酰化剂、烷化剂、异氰酸盐反应,也能和重氮盐反应;咪唑基、酚基易和重氮盐反应,咪唑基也能与烷化剂反应;羟基易和酰化剂反应;巯基易和烷化剂及有机汞反应;羧基易起缩合反应。参加和载体共价结合的基团必须不是活性中心基团,也不是参与维系酶蛋白高级结构的必需基团,否则将会使制成的固相酶几乎不呈现催化活力。

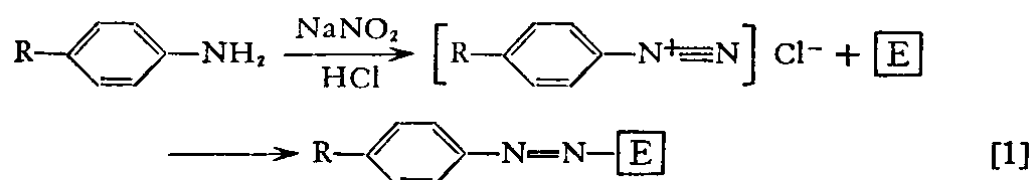
载体必须具有在温和条件下可与酶蛋白发生偶联反应的基团,又有一定的机械强度和较大的表面积。常用载体可分两大类:一类是天然的高分子,包括纤维素、葡聚糖凝胶(Sephadex)和琼脂糖(Agarose, Sepharose)的衍生物;另一类是合成的高聚物如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺衍生物、氨基酸共聚物和甲基丙烯酸共聚物等。

在这一类固相酶制剂中,酶和载体间的共价键较牢固,在介质组成发生改变和进行反应时都不会造成酶的脱落,因而这类固相酶可以较长时间的反复使用。但此法操作比较复杂,条件也比较剧烈,所以要制备活力很高的固相酶较为困

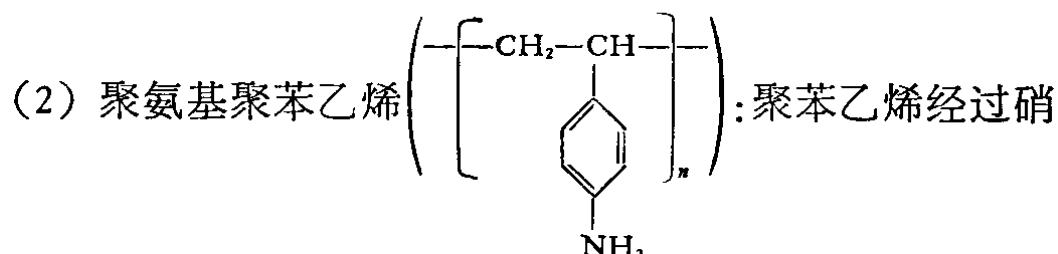
难。

载体偶联法在固相酶研究中报道最多，这类固相酶在国外已作为商品制剂出售。按载体和酶之间所发生的反应的不同，可分为 1. 重氮法；2. 肽法；3. 烷化法；4. 载体交联法。

1. 重氮法 具有苯氨基的载体，用亚硝酸处理，生成重氮盐衍生物，然后和酶蛋白的酚基、咪唑基发生偶联反应(酶蛋白的游离氨基也能十分缓慢地发生反应)。反应可用式[1]表示，下面按载体性质分别叙述。



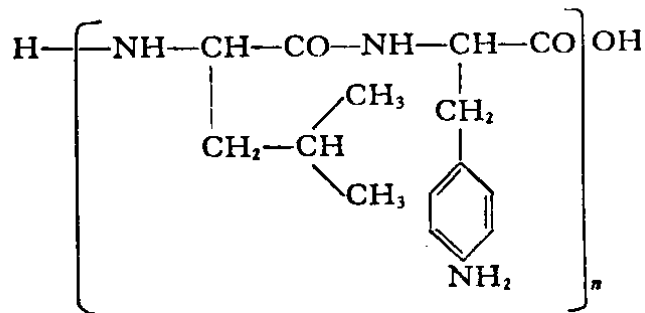
(1) 对-氨基苄基纤维素 $\left(\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-\text{纤维素} \right)$ ：国外已有商品制剂。最早是在 1951 年用于固相化血清白蛋白，以分离兔抗血清中专一的抗体^[51]。不久使用来固相化核糖核酸酶^[52,55,56]、胰凝乳蛋白酶^[52,56,59]、过氧化氢酶^[53]、谷氨酸脱氢酶^[54]、和 ATP-肌酸磷酸转移酶^[57]。最近又用于木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的固相化^[58]。



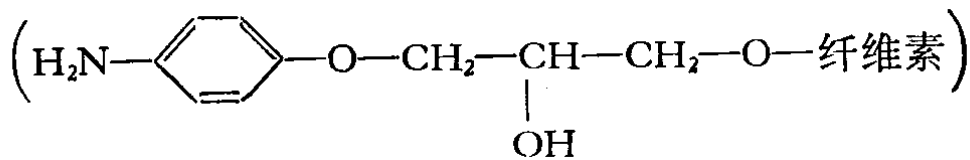
聚苯乙烯经过硝化及还原后制得。早年用于固相化淀粉糖化酶、核糖核酸酶和羧肽酶^[60,61]，也用于过氧化氢酶、脂肪酶^[33]、ATP-去焦磷酸酶^[62]和谷氨酸脱氢酶^[54]。最近又报道用珠状聚氨基聚苯乙烯制备了固相蔗糖转化酶^[271]。

(3) 氨基酸共聚物：为 *l*-亮氨酸-N-羧酸酐和对氨基-*dl*-苯丙氨酸-N-羧酸酐反应后所得的共聚物。在重氮化后

成功地固相化了木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶^[63-70,76,90]。还有脲酶^[71]、溶血纤蛋白酶原和链激酶^[72-74]、核糖核酸酶^[1]、细菌蛋白酶^[75]和凝血酶^[90,309]。



(4) 3-(对氨基苯氧基)-2-羟丙醚纤维素：重氮化后用于固相化 α -、 β -、 γ -淀粉酶^[77,78]。



(5) 硅烷—多孔玻璃：近年有人报道把多孔玻璃、氧化铝、羟基磷灰石、硅胶、镍网等无机载体和 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷 (γ -aminopropyltriethoxysilane) 一起迴流，制得烷基胺的衍生物。烷基胺衍生物再和对-硝基苯甲酰氯反应，经还原制得芳香胺的衍生物，经重氮化后即可偶联酶。(式[2])

