

706465

固定化细胞 和固定化酶

〔美〕J·伍德沃德 原著
王忠彦 邓小晨 陈荣基 译

四川大学出版社

固定化细胞和固定化酶

〔美〕 J. 伍德沃德 著

王忠彦 邓小晨 陈荣基 译

胡永松 审校

四川大学出版社

责任编辑 陈昭麟

封面设计 冯先洁

Immobilised cells and enzymes

J. Woodward

IRL PRESS 1985年

固定化细胞和固定化酶

王忠彦 邓小昆 陈荣基 译

胡永松 审校

四川大学出版社出版发行(成都市四川大学内)

四川省新华书店经销 西冶测绘印刷厂印刷

开本 787×1092毫米 1/32 印张 8.43 字数 180 千

1989年10月第1版 1989年10月第1次印刷

印数: 1-1000册

ISBN 7-5614-0247-3/Q·8 定价: 2.65元

前 言

本书主要内容是详细地描述了固定化细胞和固定化酶的技术，引导学生和读者了解通常使用的配方、仪器、材料和方法。有几章是讨论一般性质，其余几章着重介绍固定化细胞和固定化酶的特殊应用。现在最大的兴趣是应用生物技术生产燃料和化学物质(包括药物和激素)。同时也注意到应用固定化细胞和固定化酶在生物技术方面有极大的潜力。因此我希望这本实践性的书对工业界、学术界和政府部门同样有用。

我非常感谢各位作者，由于他们的贡献编出了这本我认为很有价值的手册。我也很感谢萨里大学的Alam Wiseman博士，他负责提供了我感兴趣的固定化细胞和固定化酶的内容；最后我还要感谢橡树桥国家实验室的Debbie Weaver小姐，因为她是出色的秘书。

Jonethan Woddward

引 言

我们发现人类活动的各个领域越来越多地认识到生物系统的性质和利用生物系统的独特的催化活性。从医药到军事，从食品生产到微电极传感器的设计，在许多方面实用技术的发展，都涉及生物因素的设计。这都要依赖于设计适合的程序，以保持生物成分的持久性和稳定性。这些物质是些大分子或小分子，而且在这些方面都需要固定化方法。

固定化方法在生物基础产品方面已经应用了多年，例如酶的裂解试验，但是最近几年生物技术还在以更快的速度发展。不仅在保持与生物因素接近的领域飞速地发展，而且固定化正在改变那些基本生物原理。例如，设计一个更适当的能大量生产的系统，改变酶的动力学特性、专一性和稳定性。进一步看，此项技术已在不断地成为发展的前沿。换言之，科学性更强于技巧性。

毫无疑问，固定化技术方法学在生物技术中将会起重要的作用。事实上，在有些方面的发展代表了发展速度，虽然一些方面发展领先，但是我们还有许多方法不了解。例如，最近牛津大学和雷兰菲尔合作研究成一种生物电极，电极内固定有氧化酶并与变性碳棒紧密接触作成的探头，与化学修饰的探头一起，结果酶动力学发生了戏剧性有价值的变化：电子流向探头代替了天然电子受体——分子氧。在分子水平上对出现这种现象的原因还不太清楚。

研究固定化细胞和固定化酶的工作是当前非常重要的科学。可以预见将来还要继续发展，而且它对酶工程、微生物

和细胞修饰的发展将起到更大的冲击作用。

本书对工艺问题提供了详细的材料，包括对现在固定化技术的作用与位置。而且特别强调了应用方面的问题，其覆盖面很宽，收集了固定化方面的各种情况，对于研究人员和从事这方面工作的人，需要详细了解固定化方面信息的工作者，本书有特别重要的作用。

缩 写

BSA	牛血清清蛋白
CAMP	环腺苷酸
CAS	伴刀豆球蛋白A琼脂糖
CM	羧甲基
CNBr	溴化氰
Con A	伴刀豆球蛋白A
DEAE	二乙基氮乙基
DMSO	二甲基亚砷
EDTA	乙二胺四乙酸
ELISA	酶偶联吸着试验
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸
FDA	荧光素二乙酸脂
FSH	促卵泡激素
HCG	人绒毛膜促性腺激素
Hepes	N-羟乙哌嗪-N-乙磺酸
IC	固定化细胞
LH	促黄体生成激素
MBA	N, N'-甲叉双丙烯酰胺
MIX	3-异丙基-1-甲基黄嘌呤
NAD(P)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (磷酸)
PEG	聚乙二醇
PEI	聚乙亚胺
PVA	聚乙烯醇

PVP	聚乙烯吡咯烷酮
RRDE	旋转环盘电极
s.c.e	饱和甘汞电极
TEMED	N, N, N'-四甲叉二胺
TSH	促甲状腺激素

目 录

前言

目录

引言

缩写

第一章	固定化酶、吸附和共价偶联	(1)
第二章	金属键合或螯合对生物催化 剂的固定化方法	(25)
第三章	凝胶包埋法对细胞和酶的 固定化	(56)
第四章	微胶囊包裹固定化酶	(72)
第五章	固定化酶电极	(82)
第六章	固定化生物材料的电化 学技术	(113)
第七章	固定化细胞：甾类化合	

	物的转化.....	(137)
第八章	固定化植物细胞: 制备和 生物合成能力.....	(191)
第九章	固定化哺乳动物细胞用于 激素的检验和定量.....	(223)

第一章 固定化酶、吸附和共价偶联

JONATHAN WOODWARD

1. 导 言

一种不溶解的支持物吸附酶是固定化酶中最简单的方法，然而又是一种有用的方法。研究人员最早使用于固定化酶方面。这种方法是在适当条件下酶与载体材料混合，保温孵育一段时间，然后离心或过滤使可溶性物质与载体分离。这种方法的主要缺点是酶不能牢固地固定在载体上，例如，酶吸附在一种不溶性介质，如DEAE-葡聚糖，主要靠多价盐键连接，实验条件一旦改变，如pH、离子强度、温度和溶剂改变，便会影响其交联，引起酶从载体上脱落下来。除多价离子键的连接以外，还有别的弱连接力（例如氢键、范德华力）也在载体吸附酶的过程中起作用。表1例出了吸附酶的材料，理想的固定化酶是不损失酶活，还有的情况也能达到此目的。例如，用伴刀豆球蛋白-A-琼脂糖（CAS）吸附固定 β -葡萄糖苷酶（注意参考文献1）。一般说来吸附法是一种温和的固定化方法，对酶的活性影响较小。

共价偶联固定化酶是基于酶分子与载体材料形成共价键。对于酶的催化活性最关键的氨基酸不能与载体形成共价键，这是很重要的，做到这点是困难的。因此，一般情况下酶被固定总是要损失一些酶活。这个问题可以想办法防止。在有底物存在的情况下对酶进行固定，这一步骤倾向于对酶

的催化中心进行保护。典型的不溶于水的与酶接触生成共价连接的载体材料列于表2。首先把酶偶联进载体，然后载体与酶的基团反应，包括赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、精氨酸和半胱氨酸的残基 α 和 ϵ 基团。本章对酶和载体的共价偶联将要作详细的讨论。

本章中我们的目的不在于评论吸附和共价交联法的固定化酶的方法，而是要请读者注意参考下面这些文章内容，例如，Zaborsky (2)，Barker and Kay (3)，Goldstein and Manneek (4)等。特别强调理论探讨。例如理解固定化酶的方法，读者也要参考《酶学方法》这本书 (5)。

这章是用特殊的例子， β -果糖呋喃糖苷酶（蔗糖酶）和 β -葡萄糖苷酶（纤维二糖酶）来说明酶的吸附和共价偶联的支持物质。也将描述酶的固定、活性测定和特性的决定等过程。这种技术将应用到很多酶，但是最终使用哪种方法将由酶的特性来确定。

β -果糖呋喃糖苷酶（蔗糖酶）和 β -葡萄糖苷酶（纤维二糖酶）特别适合于开始研究酶的固定化，因为这些酶便宜且容易使用。这两种酶都是工业产品，常为作研究目的而免费赠送。例如商业酵母蔗糖酶（ β -果糖呋喃糖苷酶）的浓缩物从Honeywill和Stein公司得到，250升纤维二糖酶是一个 β -葡萄糖苷酶的浓缩物，是从Novo实验室获得的。

表1 用于酶吸附的材料

矾土
膨润土
碳酸钙

续表

磷酸钙凝胶
碳
纤维素
粘土
骨胶朊
Con.A琼脂糖
多孔玻璃
羟基磷灰石
离子交换树脂
高岭土
苯酚聚合物
硅凝胶

表2 用于酶共价连接的材料

琼脂糖
纤维素
葡聚糖
玻璃
聚丙烯酰胺复合多聚物
聚氨基苯乙烯

2. 二醋酸葡聚糖 (DEAE-Sephadex) 和羧甲基葡聚糖 (CM-Sephadex) 的离子键吸附

2.1 支持物(载体)的准备

葡聚糖凝胶离子交换的一个特征是当把它放入水溶液中就会膨胀, 膨胀程度由膨胀物的离子强度决定。离子强度低则膨胀强度就大, 这两个关系成反比。酶在载体上的吸附时间取决于葡聚糖物质的性质和在吸附酶的缓冲溶液中的膨胀情况。选择缓冲溶液是以被固定的酶的性质为依据的。例如面包酵母的蔗糖酶将吸附在阳离子交换型的 DEAE-葡聚糖 A-50 上。在 10mM pH 7.0 的磷酸缓冲液中膨胀平衡(6)。取 DEAE 葡聚糖 A-50 干重 0.5 克放入 pH 7.0 的 10mM 磷酸缓冲液 100ml (6), 在室温下存放三天, 这样载体物质充分膨胀。如果把温度升到 90°C, 则膨胀将在 12 小时达到平衡。如果使用非离子交换型材料 CM-葡聚糖凝胶 C-50, 则用 pH 3.6 10mM 醋酸盐缓冲液, 同样有平衡膨胀过程。注意, 离子强度低的缓冲溶液作为其它酶吸附上载体时, 由于优先吸附缓冲溶液的相应离子多于蛋白质离子而使吸附受到破坏。

2.2 蔗糖酶吸附的活性

2.2.1 游离的或溶解的蔗糖酶活性的决定

测定被固定到载体上的酶的量是很重要的事情。经常是测定在固定化过程中分离吸附载体后测定溶液中残留的酶活

性，以此决定吸附到载体上的酶活性。最大固定化活性和理论值不同，取适当稀释的酶液0.1ml于0.4ml蔗糖溶液（5% w/v）和1.5ml pH4.7 0.1M醋酸盐缓冲液在25℃一起保温，测定蔗糖酶的活性，适当时间后取0.1ml反应混合液用商业的葡萄糖测定剂，测定葡萄糖的含量。注意稀释酶液和蔗糖开始进行缓冲液中的反应。酶活单位的定义是：上述测定条件下每分钟水解一微克分子蔗糖的酶为一个酶活单位。本章谈到的商业蔗糖酶（从Honeywill和Stein得到），其酶活单位是4000单位/毫升。

表3 准备葡聚糖凝胶-蔗糖酶混合物

-
1. 加0.1ml商业蔗糖酶（400单位左右）于10ml平衡的葡聚糖凝胶（50mg干重的载体物）。
 2. 在室温下缓慢或轻微地搅拌30分钟。
 3. 用台式离心机分离葡聚糖凝胶与蔗糖酶的混合物，倾去上清液，把混合物放入平衡缓冲液，反复离心，悬浮这些混合物，直到在上清液中测不出酶活性为止。这样可去掉未吸附的酶。
 4. 最后，把混合物悬浮于平衡缓冲液中（总体积10ml）。
-

2.2.2 酶和载体的偶联

葡聚糖-蔗糖酶混合物的制备法于表3描述，参考其混合或振荡过程，这些技术常在实验室中使用。

2.2.3 蔗糖酶的吸附和酶活性的稳定；载体的键（交联）

吸附酶的活性测定完全与游离酶或可溶性酶的测定方法相同。取0.1毫升蔗糖酶与葡聚糖凝胶作混合测定。葡聚糖凝胶的颗粒足够细，能够通过标准吸管或塑料吸管口，但这

些颗粒有粘附在吸管口的倾向，要克服这些困难也不难，只要反复冲洗这些吸管和吸管口，就能全部把粘附的颗粒洗下混合进行测定。

由于酵母蔗糖酶的最适pH为4.7，所以在测定条件下确定被吸附的酶（pH7.0或3.6）不从载体上解吸下来是一件重要的事情。换言之，则是酶与载体间的键的稳定性如何。事实上是众所周知蛋白质吸附到离子交换材料上对pH变化敏感。

DEAE和CM-葡聚糖吸附活性量于表4列出（在最适pH条件下测出）。从这些数据可以看出，在测定条件下，这些酶与载体的连接是稳定的。被固定的酶的活性被测定，这个假设只适合于DEAE-葡聚糖凝胶与酶的连接，而不适合于CM-葡聚糖凝胶（表5）。而在测定CM-葡聚糖吸附蔗糖酶活性时看来它的保留活性要高些（表4第六项），这可能是由于在PH4.7时酶活性的一半被解吸下来，然而总酶活的测定不代表真正固定化酶的活性。

表4 蔗糖酶吸附到DEAE-和CM-葡聚糖凝胶上

载体	加入蔗糖酶 (单位)	洗脱液中蔗糖酶 (单位)	连接的蔗糖酶最大量 (单位) A	混合物的酶活 (单位) B	B/A (%)
DEAE-葡聚糖凝胶	400	0	400	164	41
CM-葡聚糖凝胶	400	100	300	210	70

表5 从DEAE-和CM-葡聚糖凝胶用各种pH值缓冲液洗脱的蔗糖酶活性^a

缓冲液 ^b pH	洗 脱 活 性 (单位)	
	DEAE-葡聚糖凝胶	CM-葡聚糖凝胶
2.5	13	0
3.6	0	0
4.0	0	0
4.7	0	16
5.6	0	21
6.0	0	19
7.0	0	22

a. DEAE-葡聚糖凝胶-蔗糖酶13个单位及CM-葡聚糖凝胶-蔗糖酶34个单位，分别与1.9ml缓冲液在室温下(18°C)混合振荡五分钟，然后测定洗脱液的酶活性。

b. 缓冲液组成：10mM甘氨酸盐酸盐 pH2.5；10mM醋酸钠 pH3.6, 4.0, 4.7, 5.6；10mM磷酸钠 pH6.0, 7.0。

酶处在各种条件下（如pH、温度、离子强度、底物和产物浓度）只有未被吸附的酶可以测定出来，这样才能确定吸附酶的性质包括其活性。在10mM的醋酸缓冲液（pH4.7）中，吸附在DEAE-葡聚糖凝胶上的蔗糖酶牢固地连接在一起，在这些条件下，吸附酶的活性也是知道的。典型情况下，我们需要了解吸附酶的以下性质：最适pH、pH稳定