

生物分子固定化 技术及应用

蒋中华 张津辉 主编

化学工业出版社

Q503

J2H

Y421/22

生物分子固定化技术及应用

蒋中华 张津辉 主编

蒋中华 张津辉 蒋科卫 吴 波
陈惠鹏 王玉芝 毛秉智 编

化学工业出版社

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物分子固定化技术及应用/蒋中华 张津辉主编.
北京: 化学工业出版社, 1998
ISBN 7-5025-2134-8

I. 生… I. ①蒋… ②张… III. 生物化学-技术
N. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 06994 号

生物分子固定化技术及应用

蒋中华 张津辉 主编

蒋中华 张津辉 蒋科卫 吴 波 编

陈惠鹏 王玉芝 毛秉智

责任编辑: 王秀鸾

责任校对: 陶燕华

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

新华书店北京发行所经销

北京市密云云浩印制厂印刷

北京市密云云浩印制厂装订

*

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 8 1/2 字数 226 千字

1998 年 7 月第 1 版 1998 年 7 月北京第 1 次印刷

印数: 1—1000

ISBN 7-5025-2134-8/TQ·1047

定价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

序

将具有分子识别能力或特殊生物活性的生物分子与固相载体相结合，就成为一种有用的手段，可用于亲和分离、清除杂质、分析检验和传感技术的发展等领域。应用的范围十分广泛。本书汇总了各种固定生物分子的方法和技术，加上作者实验室的工作经验，编译成书。并将固定化生物分子的应用作全面系统的阐述。使读者既可了解这一先进技术的全貌，又可找到操作的细节。理论和实际兼而有之。可供科研工作者、制药工作者、临床检验工作者阅读和参考。是一本有用的理论和操作的工具书，谨向读者推荐。

吴祖泽
马主人

1997-5-19

前 言

生物分子的固定化技术兴起于本世纪五六十年代。固定化的生物分子除保持其原有的识别、结合、催化或药理活性外，还具有易于分离、稳定性提高和可重复使用等突出的优点。迄今为止，这一技术已在生化分离分析、生物工程工业、生物传感器、临床诊断、DNA 和多肽固相合成及药物新剂型等领域内得到了广泛的应用，受到了人们的普遍重视。有鉴于此，我们搜集了一些较为成熟的技术方法和这一领域近年来国内外的新进展，编写成这本小册子，贡献给从事有关工作和对此感兴趣的同志们，希望能够有所裨益。

本书分为五个部分，第一章介绍了生物分子固定化所使用的各种载体材料；第二章介绍了各种载体的化学活化方法；第三章给出了各类生物分子固定化的具体实验程序；第四章介绍了固定化生物分子分析检测的方法和一些常用的衔接技术。在最后一章中综合阐述了各类固定化生物分子的应用及其现阶段的进展。上述章节的划分完全是为了写作和查阅的方便，在很多情况下生物分子的固定化并不是完全按照上述章节的步骤进行的。本书中用大量篇幅具体介绍了一些经典的方法，也提及了很多新近发展的方法，以使读者能够方便地选择，并对方法学的发展有些了解。实际上，生物分子固定化方法的文献不可胜数，任何一本书均不可能将其全部包括，对于本书中未能提及的工作，读者完全可以依据书中的原理及例子自行设计实验或查阅相关文献以得到帮助。

本书中涉及的有关专业名词一般以《英汉化学化工词汇》(科学出版社，第三版，1987 年)、《英汉生物化学词典》(科学出版社，第一版，1983 年)及《英汉汉英生物化学词汇》(科学出版社，第一版，1996 年)为准。个别较新的专业名词，按上述词典中的规定译成中文，并注出了原文。

本书系借鉴 G. T. Hermanson 等人的 “Immobilized Affinity Ligand Techniques” 一书 (Academic Press, New York, 1992) 的编排结构和一些具体实验方法, 参阅了大量的国内外专著及文献并结合作者的工作经验编著而成的。参加具体编写工作的同志有蒋中华、王玉芝 (第二章、第四章)、张津辉 (第一章第六节、第三章、第五章第一节)、蒋科卫、陈惠鹏 (第五章)、吴波、毛秉智 (第一章)。全书由蒋中华、张津辉主编, 蒋中华统稿, 蒋中华、陈惠鹏审校。

本书承中国科学院生物学部常委、《中国科学》及《科学通报》副主编吴祖泽院士、国家生物医学分析中心副主任马立人研究员热情支持并作序, 王仁芝研究员提供了很多资料并给予了很多有益的指点, 一些同志在资料提供和文稿打印方面付出了辛勤的劳动, 在此一并致谢。

由于时间仓促, 学识有限、经验不足, 不妥甚至舛误之处在所难免, 敬祈各界学者专家给予批评和指正。

编 者

1997 年于北京

概 述

在日常生活中，天花板上装吊灯的生活常识人人皆知、家家都有，我想用它作为例子说明什么是生物分子固定化技术。也许此例不一定恰当，只希望大家理解其意思也就可以了。用螺丝钉把日光灯的底盘固定到天花板上，通过两根链子把灯座吊在空中，装上日光灯，就完成了日光灯在天花板上的固定化。这里我们把天花板比作固定日光灯的载体，螺丝钉即为载体表面的活性基团，两条金属链即是连接的手臂，通过它把灯管底座偶联起来，这灯底座即相当于生物分子，这个被固定化的生物分子与日光灯管之间有着特异的结合，也就是说只有灯管底座能识别日光灯管这个新的分子。这里的天花板相当于书中第一章提到的各种载体，如硅胶，塑料板、96孔板，纤维素膜、玻璃、金属片等。用化学处理的方法使上述载体带上各种不同的活性化学基团，如氨基、巯基、羧酸基、羟基等，这些基团相当于固定日光灯底盘的钉子。用一个一端能和载体上的活性基团反应；另一端和被固定的生物分子反应的手臂把生物分子，如蛋白质、酶、DNA、抗原（抗体）偶联到载体上，这个过程即所谓的生物分子固定化技术。例如，在活化的琼脂糖载体上（色谱柱填料，40~120 μm 的颗粒）固定了抗体，把含有抗原分子的溶液流过琼脂糖的柱子，由于抗体-抗原的特异性结合，抗原分子被固定化的抗体牢牢的抓住，而其他杂质分子不具备这种特异性结合而流出柱子，这时只要改变一下洗脱溶剂，抗原分子即被洗脱下来得到纯的抗原分子，这个过程就是书中常提到的亲和色谱分离技术。生物分子固定化技术还可用来筛选新药，新的单克隆抗体，提取新的基因，进行DNA和多肽的固相合成，也是未来生物传感器芯片制作的核心技术，它已受到人们普遍的重视，并已应用到分子生物学、临床诊断，生物工程和环境保护等诸多领域。

内 容 提 要

本书汇总了 20 多年来亲和固定化技术的发展,描述了固相材料、活化方法学、生物分子的固定化方法和亲和分离分析技术的种种应用;使读者既可了解这一先进技术的全貌,又可找到具体操作的细节;是一本全面而详尽的理论和实验操作的工具书。适合化学、生物化学、生物学及相关专业的大学生、研究生、教师及科研工作者及药学、临床检验和环境监测等工作者的阅读参考。

目 录

第一章 载体	1
第一节 对载体的要求	1
第二节 无机载体材料	2
一、硅胶	2
二、可控孔玻璃	3
三、其他	5
第三节 天然有机高聚物	6
一、纤维素	6
二、琼脂糖凝胶	7
三、葡聚糖凝胶	8
四、脂质体	9
五、用于膨胀床技术的载体材料	9
六、微生物表面呈现	9
七、其他	10
第四节 合成有机高聚物	10
一、丙烯酰胺衍生物	10
(一) 聚丙烯酰胺凝胶	10
(二) Trisacryl	11
(三) 聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶	12
(四) 吡内酯颗粒	13
二、甲基丙烯酸衍生物	14
(一) 聚甲基丙烯酸羟乙酯	14
(二) TSK Toyopearl 凝胶	14
(三) Eupergit	14
三、聚苯乙烯类	17
(一) 聚苯乙烯板	17
(二) 灌注色谱填料	18

四、聚四氟乙烯	18
五、其他	19
第五节 膜	19
第六节 磁性微球	19
(一) 机械分散或喷珠法	20
(二) 有机单体聚合涂布于磁流体表面法	20
(三) 渗磁法	21
(四) 大分子稳定铁氧化物溶胶法	21
(五) 天然磁颗粒	22
参考文献	22
第二章 活化方法	25
第一节 概述	25
第二节 实验程序	26
一、活化氨基的方法	26
(一) 溴化氰法	26
(二) <i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺酯活化法	29
(三) 羰基二咪唑活化法	34
(四) 还原氨化法	37
(五) FMP 活化法	44
(六) 碳二亚胺法	45
(七) 有机磺酰氯法	49
(八) 二乙烯基砒法	51
(九) 吡内酯法	53
(十) 氰尿酸氯	57
二、巯基活化方法	60
(一) 碘乙酰和溴乙酰活化方法	60
(二) 马来酰亚胺法	61
(三) 吡啶二硫化物	64
(四) 二乙烯基砒	66
(五) 环氧法	67
(六) TNB-硫醇活化法	67
三、羰基活化法	69
(一) 酰肼活化法	69

(二) 还原氨化	72
四、羟基活化方法	74
(一) 环氧化物 (二环氧乙烷) 活化方法	74
(二) 二乙烯基砜	76
(三) 氰尿酸氯	76
五、活泼氢的活化	76
(一) 偶氮反应	76
(二) 曼尼期缩合法	80
六、光交联反应	84
参考文献	86
第三章 生物分子的固定化	89
第一节 “手臂”	89
一、3,3'-二氨基丙基亚胺	90
二、1,6-二氨基己烷	92
三、6-氨基己酸	93
四、乙二胺	94
(一) EDA 与固定化 6-AC 反应	94
(二) EDA 通过转氨基反应对聚丙烯酰胺凝胶进行衍生化	95
五、戊二醛	95
六、氨化环氧化物	96
七、酸酐	96
八、对 β -硫酸酯乙砜基苯胺	97
九、氨基酸	98
十、封闭	98
第二节 小分子配基的固定化	99
一、糖类	99
(一) 蜜二糖	99
(二) 乳糖	100
(三) 甘露糖	102
(四) 肝素	102
二、酶抑制剂	103
(一) 对氨基苯甲脒	103
(二) 抑胃肽 A	104

(三) 赖氨酸	105
三、生物素及类似物	105
四、染料	107
(一) Cibacron Blue F3GA	107
(二) 酚红和百里酚蓝	108
五、金属离子螯合剂	109
(一) 亚氨基二乙酸	110
(二) 三羧甲基乙二胺	110
六、疏水性配基	111
(一) 辛胺	112
(二) 苜胺	112
七、药物	112
(一) 氮甲蝶呤	112
(二) 阿普洛尔	114
(三) 17 β -雌二醇	114
(四) 四氢大麻酚	118
(五) 乙炔基甾体	119
八、巯基还原剂	119
(一) <i>N</i> -乙酰高半胱氨酸	120
(二) 二氢硫辛酰胺	120
九、组氨酸	121
十、硼酸衍生物	121
第三节 蛋白质的固定化	121
一、鸡卵粘蛋白	121
二、亲和素、链亲和素及亲和素亚基	121
(一) CNBr 活化法固定亲和素或链亲和素	122
(二) 单亚基(单价)亲和素的制备	123
三、凝集素	123
(一) ConA 固定于 CNBr 活化的 Sepharose 4B	124
(二) ConA 固定于戊二醛活化的磁性微球	124
四、细胞因子	124
第四节 固定化酶	125
一、5'-磷酸二酯酶	126

二、TPCK-胰蛋白酶	126
三、胃蛋白酶	127
四、木瓜蛋白酶	127
五、金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶	128
六、 β -D-半乳糖苷酶	128
七、电化学聚合高分子固定法	128
第五节 肽类抗原、抗体及免疫球蛋白结合蛋白的固定化	129
一、肽类抗原	129
(一) 通过氨基或羧基进行肽的偶联	130
(二) 通过巯基进行偶联	131
(三) 通过活性氢偶联肽	131
二、抗体	132
(一) 抗志贺氏菌抗血清直接偶联于醛基磁性微球	135
(二) EDC 法偶联甲状腺素 (T_4) 抗体	135
(三) 抗体定位固定	135
(四) 抗体偶联于聚苯乙烯上	137
(五) 抗体与脂质体偶联	140
(六) 基因工程单链抗体的固定化	140
三、免疫球蛋白结合蛋白	141
(一) 蛋白 A	141
(二) 蛋白 G	141
(三) 蛋白 A/G	141
(四) 蛋白 B	142
(五) Mannan 结合蛋白	142
第六节 核酸的固定化	143
一、吸附于固相载体上	143
二、化学偶联	143
(一) 重氮法偶联单链 DNA	143
(二) 碳二亚胺偶联寡聚脱氧胸苷	145
(三) 过碘酸氧化法固定 RNA	146
三、亲和交联法	147
第七节 诊断与治疗用药物的固定化	147
第八节 细胞的固定化	147

第九节 亲和交联法	148
一、第二抗体-第一抗体系统	148
二、蛋白 A-抗体系统	149
三、生物素-亲和素系统	149
四、配位交联法	149
五、其他亲和交联系统	149
六、两个通过多重亲和交联与标记系统进行基因分离与分析的例子	150
(一) 固定化磁性核酸扩增检测	150
(二) 转基因动物基因组中特定基因的回收	151
参考文献	151
第四章 示踪技术	155
第一节 活化程度和固定化配基密度的测定	155
一、用茚三酮测量活化的程度	155
二、用双辛可宁酸检测固定化的蛋白质	157
三、用2,4,6-三硝基苯磺酸盐定量测试氨基, 酰肼或者巯基.....	158
四、用双辛可宁酸检测酰胺功能团	159
五、对固定化亲合素或链亲和素上生物素结合位点的检验	160
六、用考马斯亮蓝染料定量检测固定化蛋白质	161
七、用不同的分析方法测量偶联的配基	161
八、固定化配基的直接吸收扫描	162
九、用埃尔梅试剂测量巯基基团	163
第二节 亲和技术	164
一、小柱的装填和使用	165
二、大柱的装填与使用	167
三、缓冲液和流速的考虑	168
(一) 结合缓冲溶液	168
(二) 非特异作用	170
(三) 洗脱方法	171
(四) 流速	173
四、样品	174
五、测量固定化配基的容量和活性	175
(一) 总结合容量的测量	176

(二) 比活性的测量	177
参考文献	177
第五章 固定化生物分子的应用	178
第一节 亲和分离系统	178
一、亲和色谱法	178
(一) 基本流程	178
(二) 配基的选择	179
(三) 亲和色谱方法	179
(四) 亲和色谱新进展	182
(五) 具体应用实例	188
二、利用亲和吸附剂特异性地除去体系中的污染物质	192
(一) 去污剂	192
(二) 脂类与脂蛋白	193
(三) 内毒素	194
(四) 蛋白酶类	195
(五) 血液净化	196
(六) 其他	197
三、细胞及其组分的亲和分离	197
第二节 固相免疫分析	199
一、基本概念与原理	199
二、标记固相免疫分析的技术关键	203
(一) 抗体	203
(二) 抗体的固相化	205
(三) 标记	208
(四) 一些实用中的相关问题	213
三、其他固相标记结合分析	215
第三节 固定化酶固定化细胞与生物反应器	215
一、在食品、制药等轻化工领域的应用	216
二、临床治疗方面的应用	220
三、化学分析方面的应用	221
四、环境监测与治理	221
五、生化基础研究	221
(一) 用固定化 TPCK-胰蛋白酶水解胰岛素 β -链	222

(二) 用固相胃蛋白酶水解 IgG 制备 F(ab) ₂	222
(三) 用连续的固相酶柱进行 DNA 序列分析	223
六、新能源的开发	224
第四节 载体药物	224
一、聚合物修饰	225
二、凝胶包埋	226
三、微球制剂	226
四、脂质体	227
五、导向药物	228
第五节 载体试剂及生物大分子的固相合成	229
一、固定化巯基还原剂	229
(一) 肽的还原	229
(二) 溶菌酶与核糖核酸 A 的还原	229
二、生物大分子的固相合成	230
三、多肽的固相序列分析	231
第六节 生物传感器	233
一、生物传感器的组成和工作原理	233
二、生物传感器中配基固定化技术	234
三、换能器	235
四、生物传感器的发展和应用	236
第七节 固定化生物分子的一些其他用途	241
参考文献	242
基本参考文献	251

第一章 载体

在色谱学中，载体（support）是指作为固定相或支持固定相的固体材料。本书中引申了这一含义，将用于连接、吸附或包埋各种生物分子使其以水不溶态行使功能的固相材料统称为载体。例如亲和色谱中用于偶联配基的琼脂糖凝胶，固相免疫分析中用于吸附抗体的聚苯乙烯微孔板，固定化酶中用于包埋酶类的聚丙烯酰胺凝胶等。

第一节 对载体的要求

（1）载体表面应具有化学活性基团，这些基团可以直接与生物分子偶联，或经过较为温和的化学方法活化后与生物分子偶联，这是化学偶联制备固定化生物分子的前提。例如，琼脂糖凝胶富含羟基，可以直接与三嗪类染料偶联；聚丙烯酰胺凝胶可以用戊二醛活化后与含氨基的蛋白质分子偶联。如果用物理吸附或包埋法固定生物分子，则也应考虑载体的结构与表面性质以使固定化过程容易进行。

（2）载体应具备一定的容量，可以偶联足够量的生物分子，这对于提高实验的效率和节省成本是很重要的，因此，市售的载体材料，尤其是亲和色谱用凝胶，都标明了单位质量（或体积、表面积）载体所能结合生物分子的最大容量，对于亲和色谱的载体，应有较高的活性基团密度，以便较多量地偶联配基；而对于细胞培养微载体来说，则应有较大的比表面积，以便贴附较多的细胞，以提高培养密度。

（3）载体应是惰性的。载体的作用仅是使生物分子固定化，而不应干扰生物分子的功能。例如在亲和色谱中，载体不应对待分离的组分或杂质有显著的非特异性吸附，其孔径也应足够大以免发生凝胶排阻现象。

（4）载体应具有良好的生物相容性，这一点对于细胞培养的微载体及载体药物来说尤为重要。载体药物的制备在很多情况下都要选用