

ДЫ В БИОЛОГИИ



Х. Биссвангер

# ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

**БИНОМ**

Х. Биссвангер

# ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Перевод с английского  
канд. хим. наук Т. П. Мосоловой

С предисловием  
доктора хим. наук, профессора А. В. Левашова



Москва  
БИНОМ. Лаборатория знаний  
2010

УДК 577(075.8)  
ББК 28.072я73  
Б65

**Биссвангер Х.**

Б65 Практическая энзимология / Х. Биссвангер ; пер. с англ. —  
М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 328 с. : ил.  
ISBN 978-5-94774-940-3

В учебном издании, написанном известным ученым из Германии, рассмотрены теоретические основы энзимологии, применяемых в этой научной области методов, а также приведены описания основополагающих лабораторных работ.

Для студентов-химиков, биохимиков и биологов, специалистов, работающих в исследовательских и промышленных лабораториях, а также для медиков — научных работников.

УДК 577(075.8)  
ББК 28.072я73

---

*Учебное издание*

**Биссвангер Ханс**

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ**

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редактор *И. С. Беленькая*

Художник *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *О. А. Пелипенко*

Подписано в печать 24.06.10. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 20,5. Тираж 500 экз. Заказ 5584

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>

При участии ООО «ЭМПРЕЗА»

Отпечатано с готовых файлов заказчика в ОАО «ИПК

«Ульяновский Дом печати». 432980, г. Ульяновск, ул. Гончарова, 14

---

© Originally published in the English language by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany, under the title «Practical Enzymology». Copyright 2004 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

© Перевод на русский язык, оформление. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010

# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к русскому изданию	10
Предисловие	12
Список сокращений	14
1 Введение	16
2 Номенклатура ферментов	19
3 Ферментативные реакции	22
3.1 Теория ферментативной реакции	22
3.1.1 Порядок реакции	22
3.1.1.1 Реакции нулевого порядка	22
3.1.1.2 Реакции первого порядка	23
3.1.1.3 Реакции второго и более высокого порядков	24
3.2 Уравнение Михаэлиса—Ментен	25
3.3 Теория ферментативного анализа	33
3.3.1 Анализ кинетической кривой	33
3.3.2 Проведение ферментативного анализа	39
3.3.2.1 Общие замечания	39
3.3.2.2 pH	42
3.3.2.3 Ионная сила и буферные растворы	43
3.3.2.4 Температура	43
3.3.2.5 Специфические компоненты	45
3.3.2.6 Концентрация компонентов и методические замечания	47
3.3.3 Активность фермента	49
3.3.3.1 Единицы ферментативной активности	49
3.3.3.2 Коэффициент поглощения	50
3.3.3.3 Расчет ферментативной активности	52
3.4 Теория сопряженных ферментативных реакций	55
3.4.1 Две сопряженные реакции	55
3.4.2 Три сопряженные реакции	59
3.5 Определение концентрации субстрата	59
3.5.1 Метод конечной точки	59
3.5.2 Сопряженные ферментативные реакции	62
3.5.3 Кинетический метод определения концентрации субстрата	62
3.5.4 Циклические ферментативные процессы	63
3.6 Методы ферментативного анализа	65
3.6.1 Спектральные методы	66
3.6.1.1 Фотометрия в УФ/видимом диапазоне	66
3.6.1.2 Турбидиметрия	74
3.6.1.3 Флуориметрия	75
3.6.1.4 Люминиметрия	79
3.6.1.5 Поляриметрия	81
3.6.2 Электрохимические методы	82
3.6.2.1 pH-метр	82
3.6.2.2 pH-стат	84
3.6.2.3 Потенциометрия	84
3.6.3 Реакции, протекающие с выделением или поглощением газа	85
3.6.3.1 Аппарат Варбурга	85
3.6.3.2 Радиоактивная метка	86

3.6.3.3	Электроды для определения кислорода и углекислого газа . . . . .	86
3.7	Ферментативный анализ. . . . .	87
3.7.1	Общие замечания . . . . .	87
3.7.2	Практические аспекты. . . . .	91
3.7.3	Буферы и растворы . . . . .	92
3.7.3.1	Теоретические аспекты . . . . .	92
3.7.3.2	Приготовление буферов . . . . .	93
3.7.3.3	Наиболее распространенные буферные системы и растворы . . . . .	96
3.7.3.4	Расчет активности фермента . . . . .	97
3.7.4	Определение оксидоредуктаз . . . . .	99
3.7.4.1	Оптические методы . . . . .	99
3.7.4.2	Флуоресцентные методы . . . . .	100
3.7.4.3	Алкогольдегидрогеназа . . . . .	100
3.7.4.4	Шикиматдегидрогеназа . . . . .	103
3.7.4.5	L-Лактатдегидрогеназа . . . . .	104
3.7.4.6	Изоцитратдегидрогеназа . . . . .	106
3.7.4.7	Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа . . . . .	107
3.7.4.8	Малатдегидрогеназа . . . . .	108
3.7.4.9	Глюкозооксидаза . . . . .	109
3.7.4.10	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа . . . . .	110
3.7.4.11	Пируват:ферредоксин оксидоредуктаза . . . . .	112
3.7.4.12	Глутаматдегидрогеназа . . . . .	112
3.7.4.13	Оксидаза L-аминокислот . . . . .	113
3.7.4.14	Уриказы . . . . .	114
3.7.4.15	Каталаза . . . . .	115
3.7.4.16	Пероксидаза . . . . .	116
3.7.4.17	Люцифераза . . . . .	119
3.7.5	Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК) . . . . .	120
3.7.5.1	Определение общей активности ПДГК по восстановлению НАД <sup>+</sup> . . . . .	121
3.7.5.2	Определение общей активности ПДГК с регенерацией НАД <sup>+</sup> . . . . .	122
3.7.5.3	Пируватдегидрогеназа (липоамид) . . . . .	124
3.7.5.4	Дигидролипоамацетилтрансфераза . . . . .	125
3.7.5.5	Дигидролипоамид-дегидрогеназа . . . . .	128
3.7.6	$\alpha$ -Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДГК) . . . . .	130
3.7.6.1	Определение общей активности ОГДГК по восстановлению НАД <sup>+</sup> . . . . .	131
3.7.6.2	$\alpha$ -Оксоглутаратдегидрогеназа . . . . .	132
3.7.7	Трансферазы . . . . .	132
3.7.7.1	Синтаза жирных кислот . . . . .	132
3.7.7.2	Фосфорилаза а . . . . .	133
3.7.7.3	Гексокиназа . . . . .	135
3.7.7.4	Пируваткиназа . . . . .	136
3.7.7.5	Ацетаткиназа . . . . .	137
3.7.7.6	3-Фосфоглицераткиназа . . . . .	138
3.7.8	Гидролазы . . . . .	139
3.7.8.1	Липаза . . . . .	139
3.7.8.2	Холинэстераза . . . . .	142
3.7.8.3	Ацетилхолинэстераза . . . . .	143
3.7.8.4	Щелочная фосфатаза . . . . .	144
3.7.8.5	Кислая фосфатаза . . . . .	146
3.7.8.6	Рибонуклеаза (панкреатическая) . . . . .	147
3.7.8.7	$\alpha$ -Амилаза . . . . .	147

3.7.8.8	Глюкоамилаза	149
3.7.8.9	Лизоцим	150
3.7.8.10	$\alpha$ -Глюкозидаза	150
3.7.8.11	$\beta$ -Галактозидаза	152
3.7.8.12	$\beta$ -Фруктозидаза	153
3.7.9	Протеазы	154
3.7.9.1	Метод Ансона	154
3.7.9.2	Расщепление казеина	157
3.7.9.3	Расщепление азоказеина	158
3.7.9.4	Нингидриновый метод	158
3.7.9.5	Лейцинаминопептидаза	160
3.7.9.6	Химотрипсин	161
3.7.9.7	Пепсин	162
3.7.9.8	Трипсин	163
3.7.9.9	Аспарагиназа	163
3.7.9.10	Уреаза	164
3.7.9.11	Аденозинтрифосфатаза	166
3.7.10	Лиазы	167
3.7.10.1	Пируватдекарбоксилаза	167
3.7.10.2	Альдолаза	168
3.7.10.3	Анранилатсинтаза	169
3.7.10.4	Карбоангидраза	170
3.7.10.5	Фумараза	171
3.7.11	Изомеразы	171
3.7.11.1	Ксилозиизомераза (глюкозоизомераза)	171
3.7.12	Определение концентрации никотинамидных нуклеотидов с помощью сопряженных ферментативных реакций	175
3.7.12.1	Определение концентрации НАДФ(Н)	175
3.7.12.2	Определение концентрации НАД(Н)	177
3.8	Различные методы	179
3.8.1	Определение концентрации белков	179
3.8.1.1	Биуретовая реакция	179
3.8.1.2	Определение концентрации белков с помощью бицинхониновой кислоты	180
3.8.1.3	Метод Лоури	182
3.8.1.4	Определение концентрации белка с помощью Кумасси (метод Брэдфорд)	183
3.8.1.5	Определение концентрации белка по поглощению раствора	184
3.8.1.6	Флуоресцентный анализ	187
3.8.1.7	Нингидриновый метод	190
3.8.1.8	Модифицированный нингидриновый метод без гидролиза образца	191
3.8.1.9	Определение концентрации белков с помощью 2-нафтол-1-карбоксиальдегида	193
3.8.2	Определение концентрации фосфата	194
3.8.3	Концентрирование растворов ферментов	195
3.8.3.1	Преципитация	195
3.8.3.2	Ультрафильтрация и диализ	199
3.8.3.3	Ультрацентрифугирование	201
3.8.3.4	Лиофилизация	201
3.8.3.5	Некоторые другие методы	202
3.9	Иммуноферментный анализ	203
3.9.1	Неконкурентный твердофазный иммуноферментный анализ	204

3.9.2	Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ. . . . .	205
3.9.3	Методы иммуноферментного анализа и способы иммобилизации. . . . .	206
3.9.3.1	Связывание белков с агарозой, активированной бромцианом. . . . .	206
3.9.3.2	Присоединение диаминогексана . . . . .	207
3.9.3.3	Активация целлюлозы периодатом. . . . .	208
3.9.3.4	Получение конъюгата белков (антител) с ферментами (пероксидазой) . . . . .	209
3.9.3.5	Введение тиогрупп в молекулы антител или белков. . . . .	209
3.9.3.6	Конъюгация $\beta$ -галактозидазы с антителами с помощью сложного эфира 3-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимиды . . . . .	210
3.9.3.7	Конъюгация щелочной фосфатазы с антителами с помощью глутарового альдегида . . . . .	211
3.9.3.8	Перекрестное сшивание белков с помощью диметилсуберимидата. . . . .	212
4	<b>Изучение связывания</b> . . . . .	213
4.1	Необратимое, обратимое, специфическое и неспецифическое связывание . . . . .	213
4.1.1	Общие замечания . . . . .	213
4.1.2	Экспериментальные аспекты. . . . .	216
4.1.2.1	Количество фермента или макромолекулы. . . . .	217
4.1.2.2	Стабильность фермента или макромолекулы . . . . .	217
4.1.2.3	Стабильность лиганда . . . . .	218
4.1.2.4	Концентрация компонентов. . . . .	219
4.2	Анализ связывания с помощью определения размеров частиц . . . . .	219
4.2.1	Ультрафильтрация. . . . .	220
4.2.2	Равновесный диализ . . . . .	221
4.2.2.1	Связывание индола с бычьим сывороточным альбумином . . . . .	223
4.2.3	Обработка результатов эксперимента по изучению связывания . . . . .	227
4.2.4	Гель-фильтрация. . . . .	230
4.2.5	Ультрацентрифугирование. . . . .	232
4.3	Спектральные методы . . . . .	234
4.3.1	Дифференциальная спектроскопия . . . . .	235
4.3.1.1	Применение метода дифференциальной спектроскопии для анализа связывания лигандов с каталазой . . . . .	239
4.3.1.2	Анализ кривой связывания, полученной спектральным методом. . . . .	245
4.3.2	Флуоресцентная спектроскопия. . . . .	247
4.3.2.1	Связывание АНС с бычьим сывороточным альбумином . . . . .	250
4.4	Другие методы анализа связывания . . . . .	255
4.4.1	Радиоактивная метка. . . . .	255
4.4.2	Отражательная интерференционная спектроскопия. . . . .	256
5	<b>Применение ферментов в технологических процессах</b> . . . . .	257
5.1	Принципы иммобилизации ферментов. . . . .	258
5.1.1	Адсорбция. . . . .	259



5.1.2	Включение в пористую матрицу . . . . .	260
5.1.3	Капсулирование . . . . .	261
5.1.4	Образование перекрестных сшивок . . . . .	262
5.1.5	Ковалентное связывание на твердом носителе . . . . .	264
5.1.5.1	Носители . . . . .	264
5.1.5.2	Спейсер . . . . .	265
5.2	Методы иммобилизации ферментов . . . . .	266
5.2.1	Микрокапсулирование в нейлоновые шарики . . . . .	267
5.2.2	Включение в полиакриламидный гель . . . . .	267
5.2.3	Ковалентная иммобилизация фермента на поверхности непористого стекла . . . . .	269
5.2.4	Иммобилизация на стекле с контролируемым размером пор . . . . .	272
5.2.5	Ковалентная иммобилизация на полиамидной матрице . . . . .	274
5.2.6	О-Алкилирование с помощью тетрафторбората триэтилоксония . . . . .	275
5.2.7	Связывание фермента с аминокруппами после частичного гидролиза полиамида . . . . .	278
5.2.8	Связывание фермента с карбоксильными группами после частичного гидролиза полиамида . . . . .	281
5.2.9	Иммобилизация фермента на полиэфирной матрице . . . . .	281
5.2.10	Иммобилизация с помощью щелочного гидролиза и активации тозилхлоридом . . . . .	284
5.2.11	Щелочной гидролиз и активация карбонилдиимидазолом . . . . .	285
5.3	Методы анализа иммобилизованных ферментов . . . . .	286
5.3.1	Определение концентрации белка . . . . .	286
5.3.2	Определение ферментативной активности . . . . .	287
5.3.2.1	Модификация оптических методов анализа для определения активности иммобилизованных ферментов . . . . .	287
5.3.2.2	Кофакторы в реакциях с иммобилизованными ферментами . . . . .	289
5.4	Биореакторы . . . . .	290
5.4.1	Реактор периодического действия . . . . .	292
5.4.2	Мембранный реактор . . . . .	292
5.4.3	Реактор с неподвижным слоем . . . . .	293
5.4.4	Иммобилизованные клетки . . . . .	294
5.5	Биосенсоры . . . . .	294
5.5.1	Ферментные электроды . . . . .	294
5.5.2	Иммунные сенсоры . . . . .	300
5.5.3	Другие типы биосенсоров . . . . .	301
5.5.4	Биоаффинные сенсоры . . . . .	302
5.6	Иммобилизованные ферменты в медицине . . . . .	302
	Приложение . . . . .	304
	Список ферментов в соответствии с их международной классификацией (КФ) . . . . .	304
	Предметный указатель . . . . .	322