

图书在版编目 (CIP) 数据

现代微生物学实验技术及其应用/严杰等主编. —北京: 人民
卫生出版社, 1997
ISBN 7-117-02648-0

I. 现… I. 严… II. 微生物学-实验-技术 IV.Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 06358 号

现代微生物学实验技术及其应用

严 杰 罗海波 陆德源 主编

人民卫生出版社出版发行
(100050 北京市崇文区天坛西里 10 号)
三河市富华印刷厂印刷
新华书店经销

787×1092 16 开本 19 印张 443 千字
1997 年10月第 1 版 1997 年10月第 1 版第 1 次印刷
印数: 00 001—4 000
ISBN 7-117-02648 -0/R • 2649 定价: 28.50 元
(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

1. 醇类 醇类可先与三嗪试剂反应形成醚类衍生物, 剩余的取代氯则与亲核性较强的蛋白质分子上的氨基反应, 结果形成通过三嗪核偶联的结合物。双功能交联剂卤代硝基苯也可用于此类羟基和蛋白质分子上氨基的连接。

2. 酚类 酚类化合物可通过重氮化的对-氨基苯甲酸反应引入羧基, 再利用羧基反应与蛋白质交联。

3. 糖类 可用高碘酸钠氧化糖基, 生成的醛基可与氨基化合物交联。

4. 核苷或核苷酸类 此类化合物具有邻二醇结构, 故可用高碘酸盐氧化成醛基, 该醛基可与蛋白质分子上的氨基反应形成 Schiff 碱, 经硼氢化钠还原后可得到稳定的以碳-氮单键连接的结合物^[7]。

5. 甾体化合物 通过与琥珀酸酐反应形成琥珀酸单酯衍生物, 然后以羧基交联的方法与蛋白质分子偶联。

(四) 羰基

醛或酮均可通过与 O-羧甲基-羟胺反应, 转化为 O-羧甲基-肟衍生物, 从而引入一个羧基, 然后通过形成酰胺键与蛋白质交联。此外, 吡哆醛及其磷酸酯均可与蛋白质分子上的氨基形成 Schiff 碱, 实现与蛋白质分子的交联; 醛固酮类则可与对-肟基苯甲酸反应引入羧基, 再与蛋白质交联; 在羰基的 α 位引入一个卤素原子, 再与蛋白质分子中的氨基反应形成碳-氮单键交联的产物。

(五) 巯基

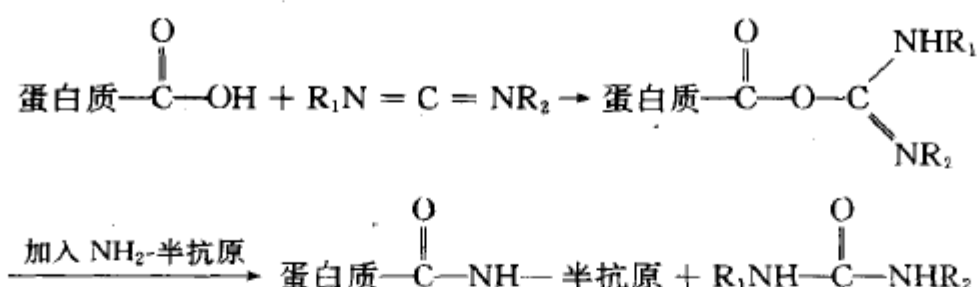
蛋白质分子中通常缺乏巯基反应活性基团。因此, 巯基交换反应具有较好的选择性, 可避免相同分子间的聚合。通过在蛋白质分子中定量引进巯基及巯基反应活性基团, 可实现控制交联, 获得化学和生物专一性均较好的交联产物。毒素或抗体分子可与 SPDP、2-亚胺四氢噻吩+4, 4'-二硫吡啶、3-(4'-二硫吡啶基)-丙酰亚胺甲酯反应, 引入保护性巯基——二硫吡啶基, 通过巯基交换反应与另一蛋白分子上的巯基形成二硫键。蛋白质分子中引入巯基反应活性的马来酰亚胺双键或碘乙酰基则可通过马来酰亚胺基活泼酯试剂或碘代乙酸活泼酯来实现, 然后与另一蛋白质分子中的巯基进行加成或取代反应, 形成以硫醚键连接的偶合物^[2]。蛋白质分子中巯基的引入还可通过与 3-巯基丙酰亚胺甲酯、N-乙酰同型半胱氨酸硫代内酯或 S-乙酰硫代琥珀酸酐等试剂反应来完成。

三、交联反应的类型

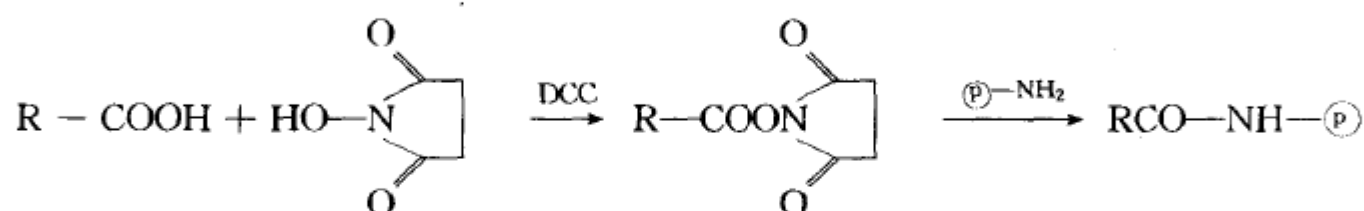
(一) 氨基与羧基的交联

1. 碳二亚胺法 本法常用于半抗原和蛋白质载体的连接。碳二亚胺 (EDC) 是化学性质极为活泼的化合物, 能使氨基和羧基之间脱水形成酰胺键, 常用的水溶性 EDC 化学名称为 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 ($R_1N=C=NR_2$)。EDC 既可与羧基结合, 也可与氨基结合, 通常羧基先与 EDC 反应生成中间产物, 再与另一分子上的氨基反应而形成偶联物。EDC 法反应的 pH 为 5~9, 可根据不同的交联对象选择合适 pH, 如为蛋白质则可选择 pH7.0 左右。使用本法进行交联时仅需将蛋白质与半抗原按一定比例 (M :

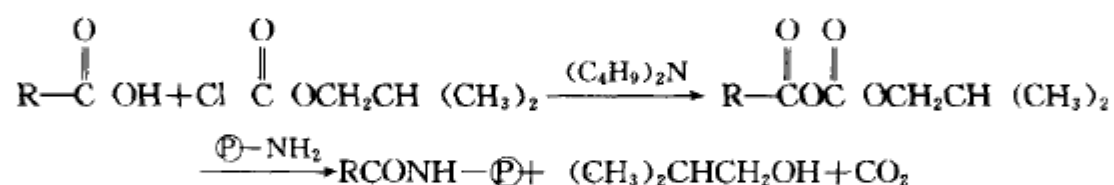
M) 溶解在适当的溶液中混匀, 加入稍过量的 EDC, 在 4℃ 或室温中搅拌反应 24h, 经透析除去未结合的半抗原, 即可获得人工抗原。但 EDC 的缩合反应无选择性, 易形成蛋白质分子间的自身聚合, 如先将含羧基的半抗原与 EDC 反应, 使该羧基活化后再加入蛋白质, 则可减少蛋白质分子间的交联。



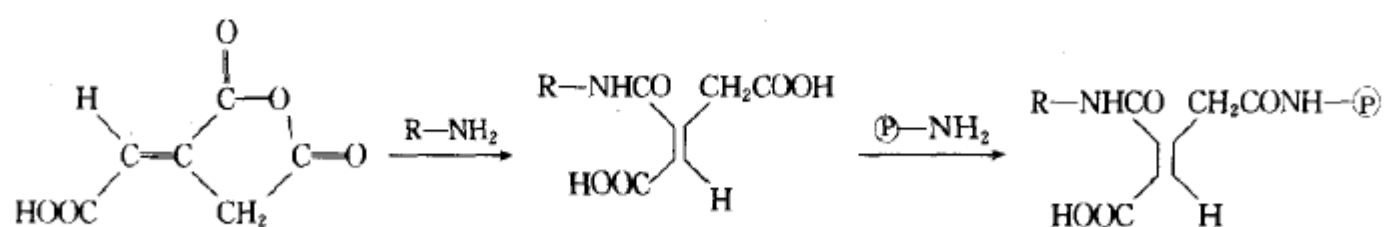
2. 活泼酯法 本法是对 EDC 法的改进, 避免了 EDC 对蛋白质的直接作用, 减少了蛋白质分子之间自身交联。含羧基的半抗原等在二环己基碳二亚胺 (DCC) 的作用下, 与 N-羟基琥珀酰亚胺反应, 生成活泼酯衍生物, 后者与蛋白质分子上的氨基反应, 形成以酰胺键连接的偶合物^[1]。



3. 混合酸酐法 含羧基化合物的羧基在三正丁胺 (或三乙胺) 存在下与氯甲酸异丁酯反应, 生成混合酸酐 (MA), MA 易与另一化合物的伯氨基反应形成酰胺键。本法反应过程简单, 不需制备和分离中间产物。



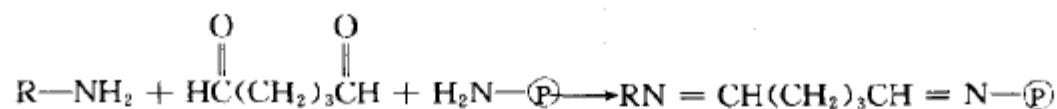
4. 多元酸酐法 含羟基或氨基的半抗原或药物等与琥珀酸酐、顺-乌头酸酐等在水无吡啶催化下反应, 形成单酯或单酰胺衍生物, 引入游离羧基, 然后以活泼酯法或碳二亚胺法与蛋白质交联。本法极易将小分子中的羟基或氨基转变为含游离羧基的衍生物, 但与羟基形成的酯键在血浆中不稳定, 与氨基形成的酰胺键常不能充分降解。然而, 半抗原或药物通过顺-乌头酸与蛋白质形成的交联物在中性 pH 时稳定, 在酸性 pH 时能充分解离^[2]。



(二) 氨基与氨基的交联

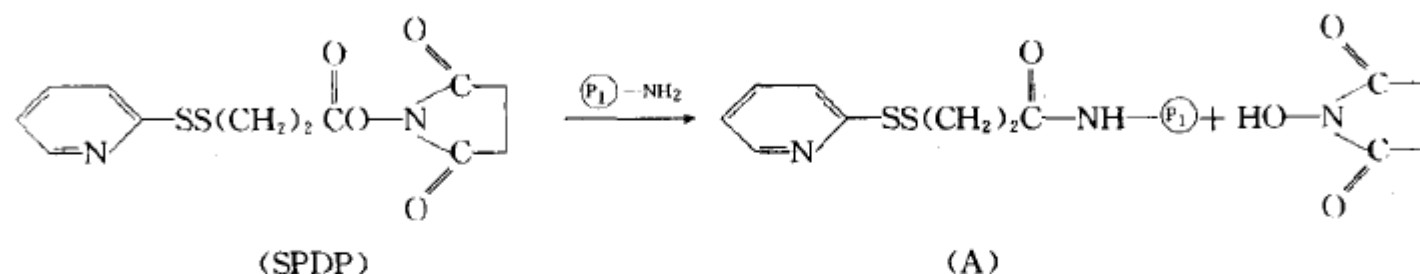
1. 戊二醛法 戊二醛是一种同型双功能交联剂, 其两个醛基可分别与两个相同或不同分子上的伯氨基形成 Schiff 碱 ($-\text{N}=\text{C}-$), 将两个分子以五碳桥连接起来。本法是最为温和的交联反应之一, 温度范围为 4~40℃, pH 为 6.0~8.0 的缓冲液, 但缓冲液中不

得含有氨基化合物。用硼氢化钠还原 Schiff 碱可形成稳定的单键。但本法易使相同蛋白聚合，产物均一性差。



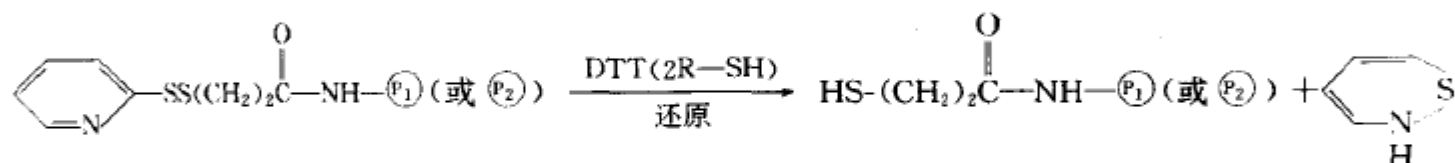
2. SPDP 法 SPDP 是一种新型的异型双功能交联剂，化学名为 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯，常用于蛋白质与蛋白质之间的交联和标记，其机理可分 4 个步骤^[9,10]。

(1) 硫醇基的引入：SPDP 与第一种蛋白质的氨基反应，引入保护基——硫醇基，获得产物 A。

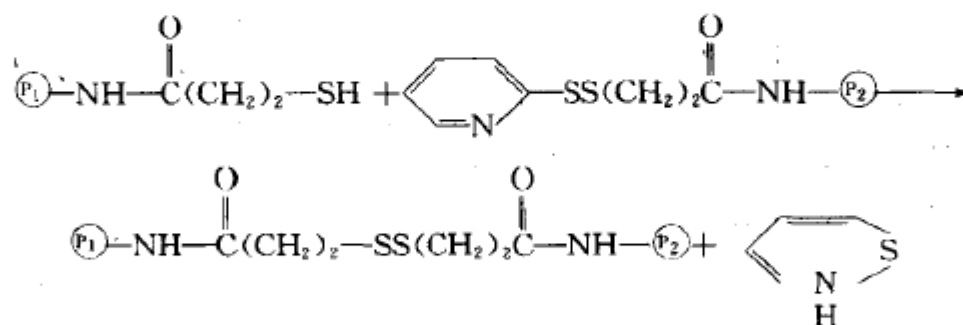


(2) 第二个硫醇的引入：SPDP 与第二种蛋白质（如 IgG 等）的氨基反应，引入硫醇基，获得产物 B，其反应同 (1)。

(3) 还原：用还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 除去 A 或 B 中的 2-硫醇吡啶保护基，得到含巯基的 A 或 B。

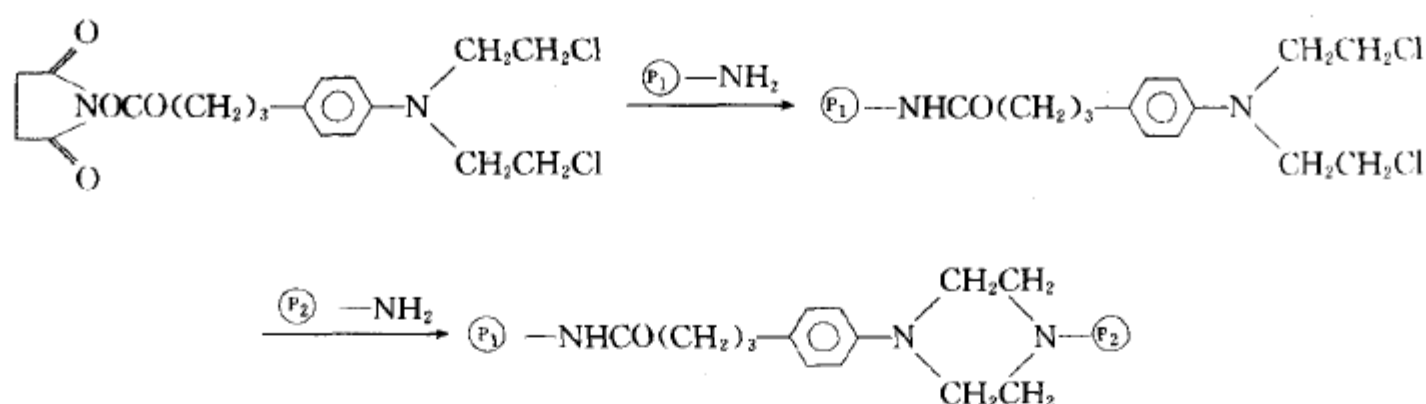


(4) 交联：巯基与含硫醇吡啶保护基之间，通过巯基与二硫键的交换作用使 A 和 B 形成结合物。

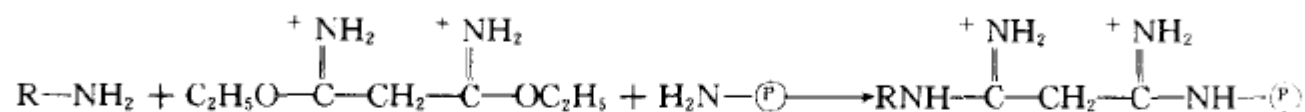


SPDP 法交联反应条件温和，副反应少，能定量地在蛋白质分子中引入保护的巯基，且能较为容易地测定其含量，故此法为目前最为常用的交联方法之一。同类的交联剂尚有 N-羟基琥珀酰亚胺-〔4-α-甲基-α-(2-吡啶基)-二硫代甲基]-苯甲酸酯 (SMPT) 和 N-羟基琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫)-丁酸酯 (SPDB)，通过在二硫键的 α-位引入位阻性基团如甲基等，增加了交联物中二硫键的稳定性^[6,10]。

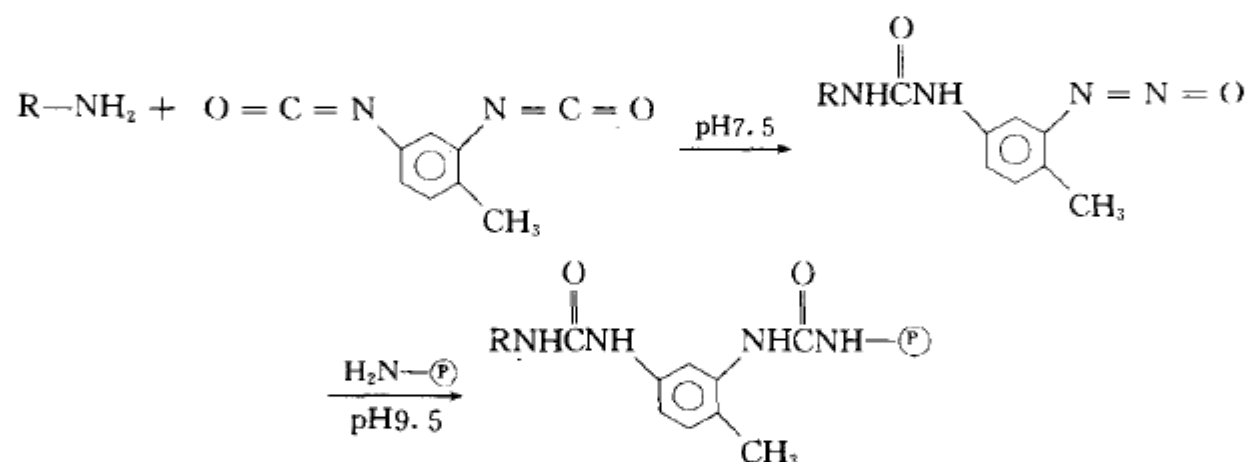
3. 苯丁酸氮芥衍生物法 苯丁酸氮芥的 N-羟基琥珀酰亚胺基酯或混合酸酐衍生物分子中的活性羧基和氮芥基可分别与两个蛋白质分子中的氨基反应，形成偶联物^[11]。本法在中性或微碱性 pH 条件下，氮芥基倾向于与巯基反应，在较高 pH 时则易与氨基反应。



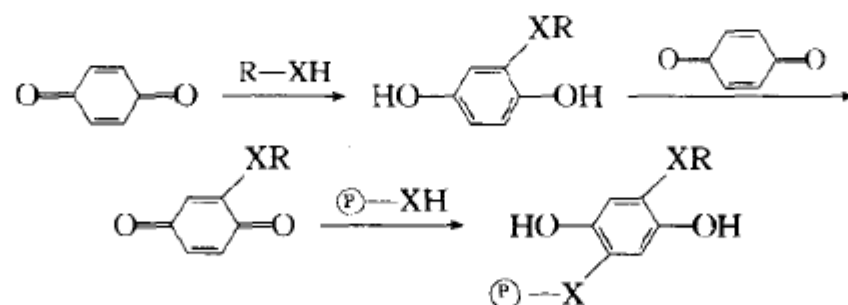
4. 亚胺酸酯法 双功能试剂亚胺酸酯类如丙双亚胺酸二乙酯双盐酸盐可与半抗原和载体蛋白的氨基交联，中间连接一个三碳桥。亚胺酸酯类水溶性好，反应条件温和，与氨基反应选择性高，其特点为可与蛋白质分子中的赖氨酸残基广泛地反应，而不影响蛋白质分子的净电荷变化。



5. 二异氰酸酯法 二异氰酸酯类双功能试剂中的两个异氰酸基能分别与两个不同分子上的氨基反应，介以不同碳链长度的桥将两者偶联。这类试剂在 $\text{pH} > 7$ 时的主要反应为与氨基反应形成取代脲，也可在 $\text{pH} < 7$ 时与羟基反应形成氨基甲酸酯衍生物，水溶液中的副反应为可能通过疏水作用引起蛋白质分子的聚合。



6. 苯醌法 本法交联过程分两步进行，第一步反应完成后，分离除去过量试剂，再进行第二步反应。

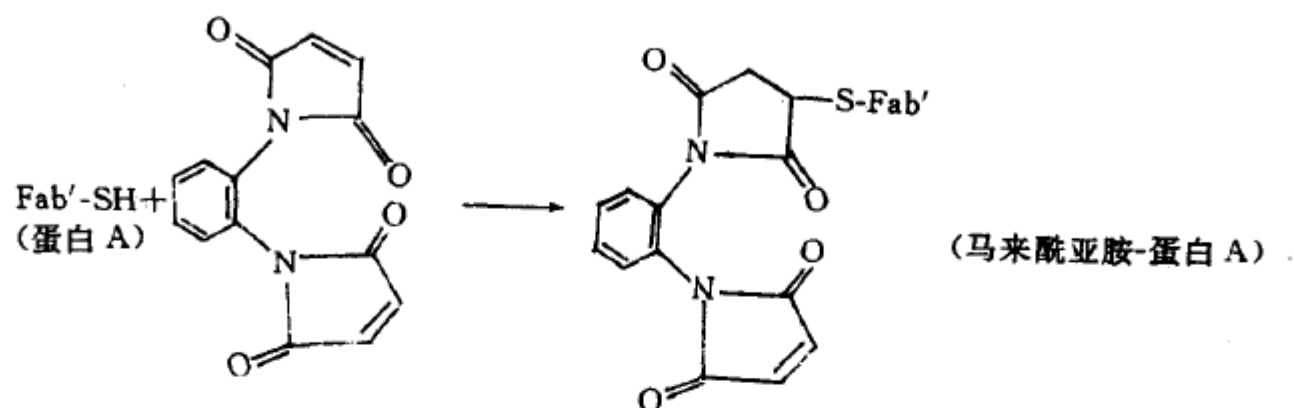


(三) 巯基与巯基的交联

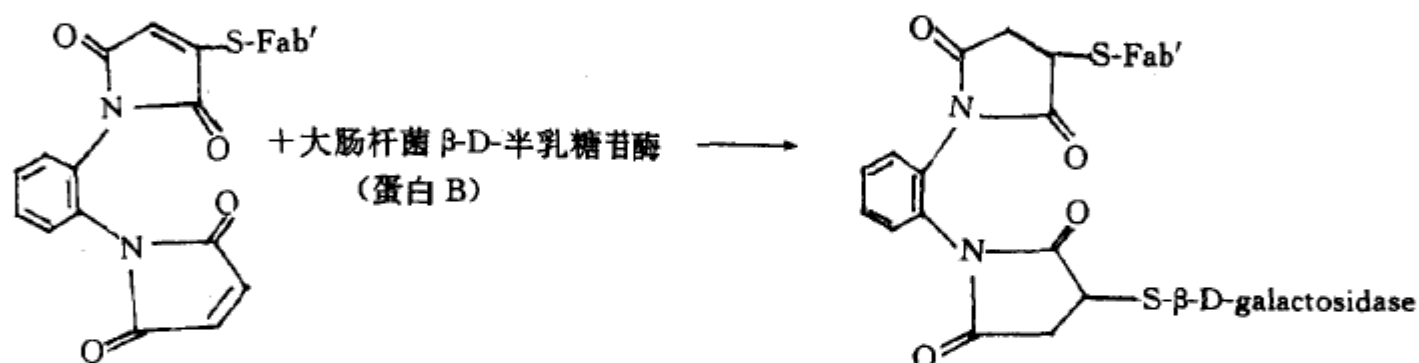
1. 双马来酰亚胺试剂法 这类试剂的代表为苯二马来酰亚胺 (N, N'-O-Phenylendi-maleimide, PDM)，也是一种同型双功能交联剂。PDM 不仅可与巯基反应，也可与氨基或羟基反应，所需的反应条件温和，反应选择性较高。在相同的温和条件下，PDM 与蛋白质分子中的 -SH 反应最快这对保护酶的活性至关重要。本法产生的交联物较为稳定，但

易形成同类分子的聚合物。PDM 可用于多种蛋白质和肽类的交联，系因不少蛋白质或多肽分子中均有游离的巯基（如抗体 Fab'），也可通过还原剂（如 N-乙酰基琥珀酰琥珀酸酐等）将蛋白质分子中的二硫键还原而形成巯基^[12]。本法反应主要分为两步。

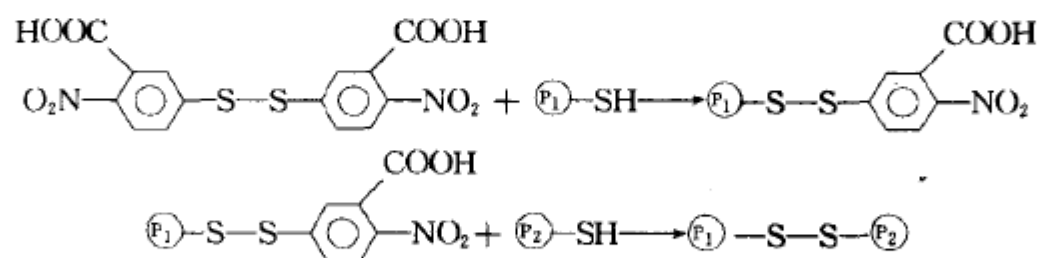
(1) 马来酰亚胺-蛋白 A 的形成：用稍过量的 PDM 处理含巯基的蛋白 A，PDM 分子中的一个马来酰亚胺基与蛋白 A 的巯基反应形成马来酰亚胺-蛋白 A，同一 PDM 分子中另一个马来酰亚胺基则保持原型不变。



(2) 蛋白 A-PDM-蛋白 B 的形成：第一步反应的中间产物马来酰亚胺-蛋白 A 紧接着与第二种蛋白（蛋白 B）的-SH 反应形成蛋白 A-PDM-蛋白 B 的结合物。

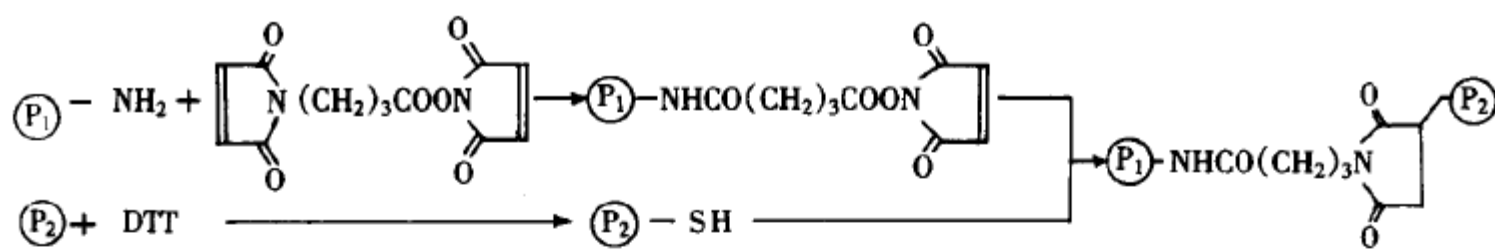


2. Ellman 试剂法 Ellman 试剂即为 5, 5'-二硫-2, 2'-双硝基苯甲酸 (DTNB), DTNB 通过两步反应使含有巯基的两种蛋白质分子形成偶联物^[13]。

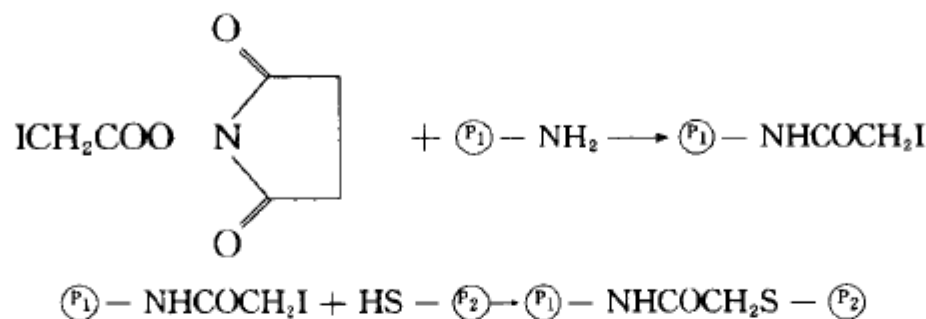


(四) 巯基与氨基的交联

1. 马来酰亚胺基类活泼酯法 本法所用的试剂为一组异型双功能交联剂，常用的有 N-羟基琥珀酰亚胺基-间- (N-马来酰亚胺基)-苯甲酸酯 (SMB)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4- (对-马来酰亚胺基)-苯丁酸酯 (SMPB) 等。马来酰亚胺基中的双键可与巯基进行选择性的加成反应。马来酰亚胺基取代羧酸衍生物的 N-羟基琥珀酰亚胺酯则与氨基反应，引入马来酰亚胺基，与另一含有游离巯基的分子通过巯基对双键的加成反应连接起来^[14]。

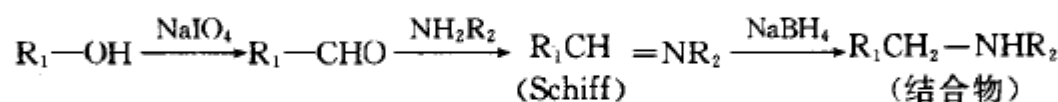


2. 卤代乙酰衍生物法 卤代乙酸的活泼酯衍生物如 N-羟基琥珀酰胺基碘代乙酸酯分子中的活泼酯成分和 α -位活泼卤素可分别与蛋白质分子中的氨基和巯基反应而实现两种分子的交联。

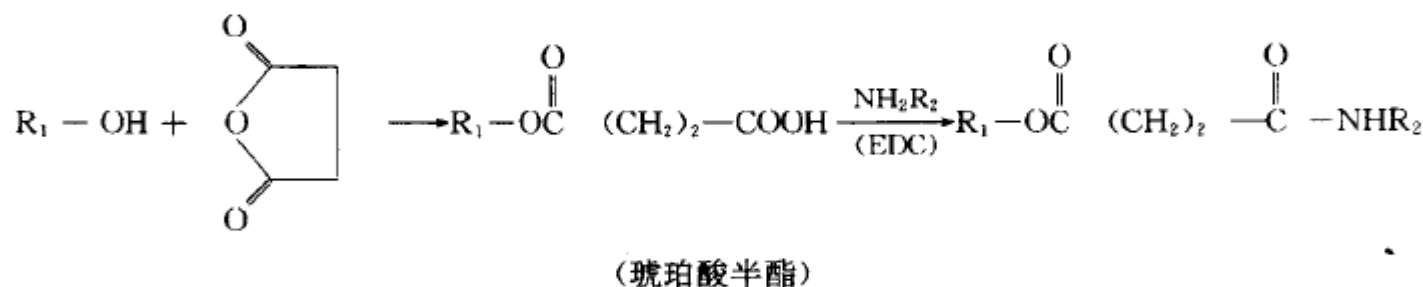


(五) 糖基与氨基的交联

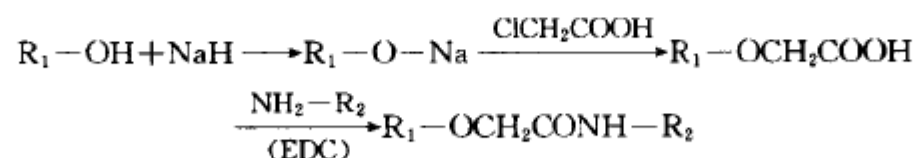
1. 高碘酸盐氧化法 本法常用于含糖蛋白质与含氨基的化合物的交联。糖蛋白的羟基被氧化成醛基，然后与氨基作用形成 Schiff 碱，通过还原形成稳定的结合物^[7,15]。



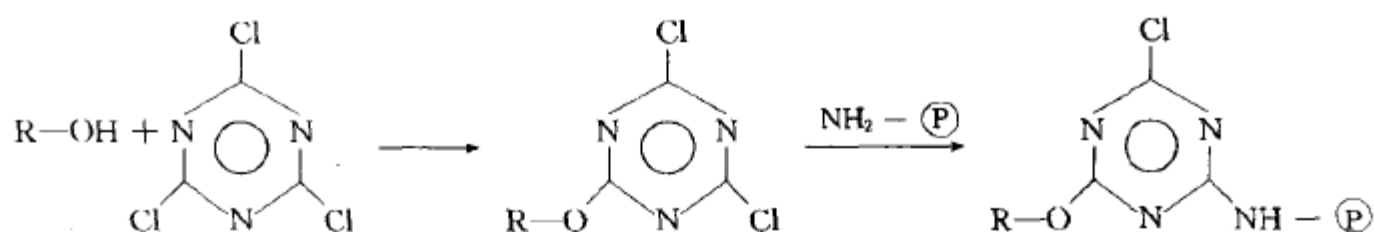
2. 琥珀酸酐法 含羟基的化合物先与琥珀酸酐反应生成琥珀酸半酯，再经 EDC 或氯甲酸异丁酯作用与氨基化合物反应形成酰胺键，在交联的两个化合物之间插入一个琥珀二酰基。



3. 氯乙酸钠法 含羟基的化合物与氢化钠 (NaH) 作用生成钠盐，再与氯乙酸反应形成醚基，在 EDC 作用下与蛋白质氨基连接形成交联物^[16]。

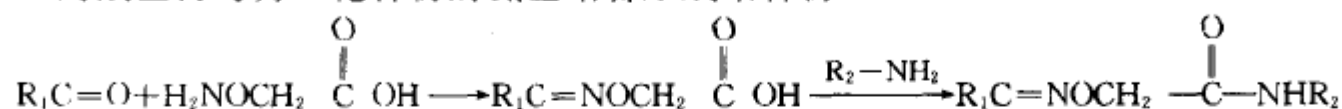


4. 三氯三嗪试剂法 三氯三嗪可与含羟基的分子反应，剩余的第二氯原子活性稍低，可被蛋白质中氨基取代，从而实现交联。应用本法时须注意，第一个含羟基的分子中不能含有氨基、巯基等亲核性较强的基团，否则易发生自身聚合。

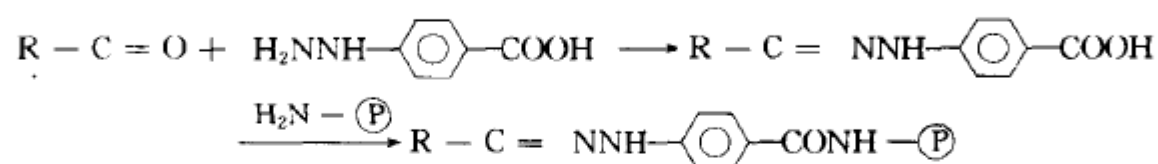


(六) 酮基与氨基的交联

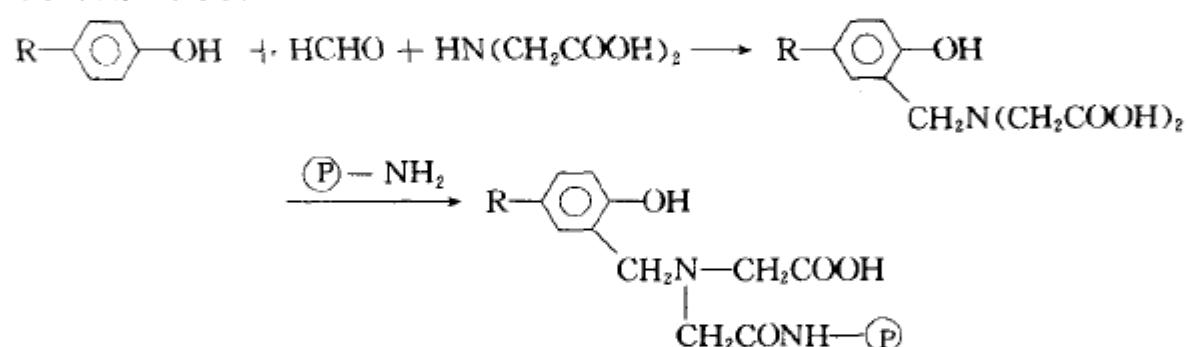
1. O-羧甲基羟胺法 含酮基化合物与O-羧甲基羟胺反应,生成O-羧甲基肟衍生物,引入的羧基再与另一化合物的氨基结合形成结合物。



2. 对-胍基苯甲酸法 带酮基的化合物可与对-胍基苯甲酸反应,引入羧基,再按常法与蛋白质的氨基交联。

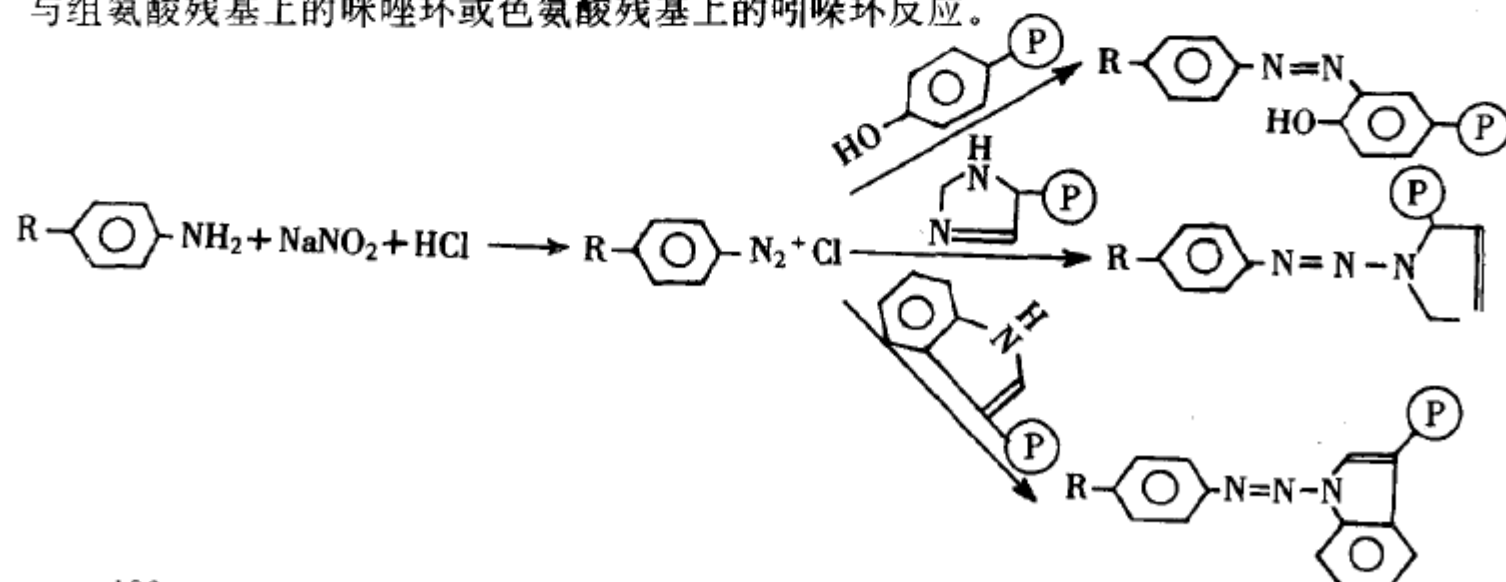


3. Mannich 反应法 含酮基或羟基的化合物可用 Mannich 反应引入羧基,然后按常法与蛋白质的氨基交联。

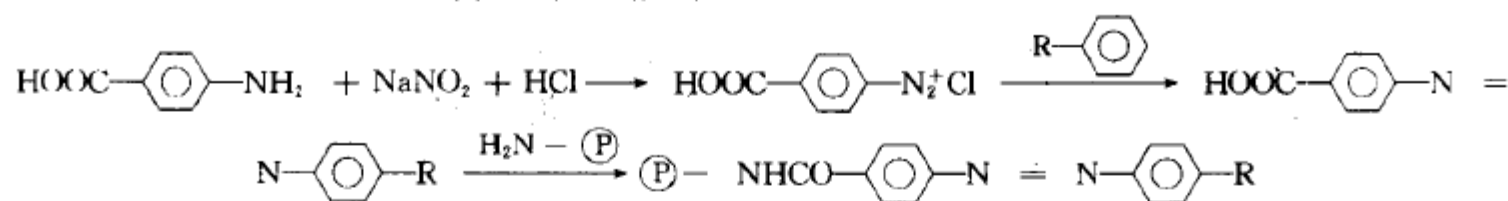


(七) 芳香胺与酪氨酸残基酚羟基的交联

1. 重氮化法 含芳香胺的化合物,可以与亚硝酸反应生成重氮盐,然后直接连于蛋白质分子中酪氨酸残基上酚羟基的邻位,获得以偶氮键相联的结合物。这种重氮盐也能与组氨酸残基上的咪唑环或色氨酸残基上的吲哚环反应。

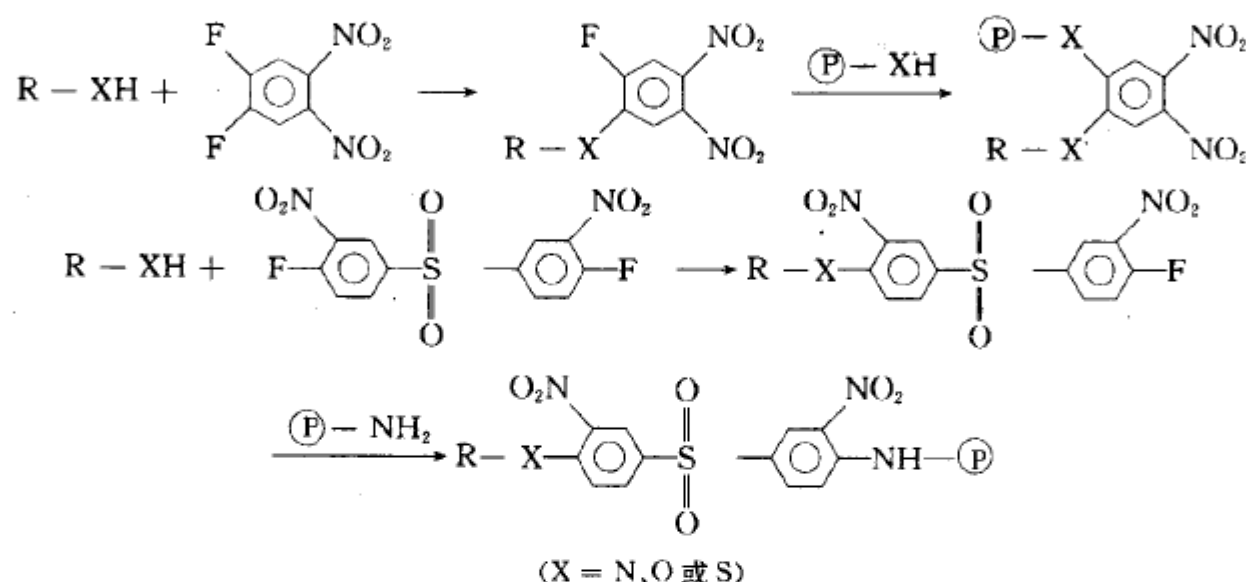


2. 偶氮苯甲酸法 对氨基苯甲酸重氮化后, 与带苯环的半抗原等小分子偶联引入羧基, 再利用羧基的反应连接于蛋白质分子上。

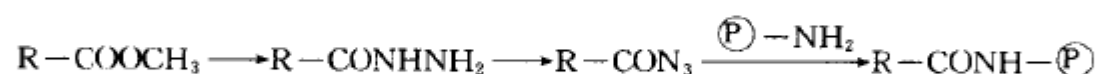


(八) 其它类型

1. 卤代硝基苯法 双功能试剂二硝基二氟苯或二氟二硝基苯磺分子中的氟原子, 由于邻近硝基的活化作用, 易与半抗原等小分子或载体蛋白等大分子上的亲核基团如氨基、羟基和巯基等反应。



2. 叠氮化法 羧酸甲酯衍生物经胼解、亚硝化, 转变为叠氮化物, 再与蛋白质分子上的氨基反应形成偶联物。



四、交联反应的实例

(一) HRP-T₂ 或 T₂-BSA 的制备

T₂ 是一种主要由镰刀菌 (fusarium) 产生的倍半萜烯类 (C₁₅H₂₄) 化合物, 常存在于霉变的玉米和谷类等粮食中, 对人和牲畜具有多种毒性, 国际上已将 T₂ 毒素视为与黄曲霉素同等的天然存在的最危险的食物污染源。T₂ 毒素是含有羟基 (-OH) 的小分子半抗原, 故需制备 HRP-T₂ 用于对 T₂ 检测的竞争酶联免疫吸附试验; 制备 T₂-BSA 免疫动物获得 T₂ 抗体, 用于对 T₂ 检测的放射免疫法。常用琥珀酸酐法进行 T₂ 与 HRP 或 T₂ 与 BSA 的交联^[16~18], 该反应可分为两步, 具体步骤如下。

1. T₂-琥珀酸半酯 (T₂-HS) 的制备

(1) 称取 T₂ 毒素 20mg, 用 5ml 吡啶溶解, 加琥珀酸酐 420mg, 90℃~100℃ 搅拌反应 4h。

(2) 减压蒸馏, 除去溶剂吡啶。

(3) 加 10ml 氯仿溶解, 再加 10ml 蒸馏水混合在分液漏斗中抽提, 将未反应的试剂抽提至水相, T_2 -SH 仍留于氯仿中。

(4) 将 T_2 -HS 氯仿溶液在 $60^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ 蒸馏以去除氯仿。

(5) 蒸馏后余下的 T_2 -HS 为固体, 再用二甲基甲酰胺 (DMF) 2ml 进行溶解。

2. T_2 -HRP 或 T_2 -BSA 的制备 T_2 -HRP 与 T_2 -BSA 制备方法基本相同, 故仅介绍 T_2 -HRP 的制备。

(1) HRP 15mg 溶于 pH 7.2, 0.01 mol/L 的 PBS 3 ml 中, 加 EDC 50 mg, 混匀使其溶解。

(2) T_2 -HS 0.5 ml 缓慢逐滴加入酶液中, 室温反应 30 min, 再加 50 mg EDC, 4°C 反应 24 h。

(3) 反应物用上述 PBS 充分透析后冻干即为 T_2 -HRP。

(二) EDC 法制备人工抗原

可选用两种水溶性碳二亚胺, 化学名称分别为 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 和 1-环己基-3-(2-吗啉代乙基)-碳二亚胺对甲苯甲磺酸 [1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate], 缩写分别为 EDC 或 Ethyl-CDI 和 CMC 或 Morpho-CDI。EDC 法制备人工抗原的主要步骤如下。

1. 200mg 载体蛋白溶于 3ml~5ml pH 7.2, 0.01mol/L 的 PBS 中。

2. 加入 50mg 半抗原 (含 -NH_2 或 -COOH) 及少量 ^3H 标记的半抗原溶于 DMF 中, 同时加 100mg EDC 边加边搅拌, 室温反应 2h。

3. 边搅拌边加 25mg EDC, 室温反应 24h。

4. 用上述 PBS 于 4°C 充分透析后冻干备用。

5. 可从中取少量交联产物测 ^3H 标记的半抗原, 所测得的 cpm 值用于计算半抗原与载体蛋白 mol 比。

(三) 亲和标记法

近 20 年来, 出现了生物亲和交联法, 其中已广泛采用的有 BAS 法、SPA 法和 PHA 法等。常用于核酸探针 (DNA、RNA、合成的寡核苷酸探针等) 的标记以检测肿瘤或病毒等的基因组; 细菌毒素或激素的标记用于研究相应的受体; 凝集素的标记用于其受体或特异性糖蛋白结合物的检测、用于分离纯化蛋白质和核酸等大分子物质^[19,20]。

1. BAS (Biotin-Avidin) 法 BAS 是利用生物素 (Biotin, B) 和亲和素 (Avidin, A) 之间有很强的亲和力 ($K_a=10^{15}/\text{M}$) 的特性, 作为酶对抗体等标记的一种通用工具。

生物素又称维生素 H, 是生物体内羧化酶的辅酶, 广泛存在于动植物体内, 尤其是肝、肾等组织中的小分子生长因子 (分子量 244.31), 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$, 结构式为: 式中 I 环为咪唑酮环, 与亲和素进行结合。II 环为噻吩环, C' 的侧链末端的羧基可用于与其它蛋白质交联。

亲和素又称抗生物素蛋白, 是一种分子量 68000 的碱性糖蛋白, 由 4 个相同的亚基组成, 每个亚基均可结合一个生物素。