

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 Люминометрия	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 ⁺	121
	3.7.5.2	Определение общей активности ПДГК с регенерацией НАД ⁺	122
	3.7.5.3	Пируватдегидрогеназа (липоамид)	124
	3.7.5.4	Дигидролипоамацетилтрансфераза	125
	3.7.5.5	Дигидролипоамид-дегидрогеназа	128
	3.7.6	α -Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДГК)	130
	3.7.6.1	Определение общей активности ОГДГК по восстановлению НАД ⁺	131
	3.7.6.2	α -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	α -Амилаза	147

3.7.8.8	Глюкоамилаза	149
3.7.8.9	Лизоцим	150
3.7.8.10	α -Глюкозидаза	150
3.7.8.11	β -Галактозидаза	152
3.7.8.12	β -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	Антранилатсинтаза	169
3.7.10.4	Карбоангидраза	170
3.7.10.5	Фумараза	171
3.7.11	Изомеразы	171
3.7.11.1	Ксилоизомераза (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 бидинхониновой 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 β -галактозидазы с антителами с помощью сложного эфира 3-maleимидобензоил-N-гидроксисукцинимид	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	Изучение связывания	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	Применение ферментов в технологических процессах	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 швов	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 аминогруппами 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 карбонилдидимидазолом	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