

生物藕合技术的原理及其应用

朱育菁¹, 于晓杰², 潘志针², 陈清西², 刘波¹

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 生物藕合是指将两种或多种分子进行键合的过程, 此过程形成一个新的联合体, 该联合体拥有其所有组分所具有的各特性。生物藕合技术自产生以来其应用不断推广, 几乎已经涉及到生命科学领域的各个方面, 也极大地推动了生物、化学、医学、农业等学科的发展。本文结合生物藕合技术的原理、特点, 探讨了其发展与应用的推广与问题。

关键词: 生物藕合; 原理; 应用

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

Theory and applications of bioconjugation techniques

ZHU Yu-jing¹, YU Xiao-jie², PAN Zhi-zhen², CHEN Qing-xi², LIU Bo¹

(1. Agricultural Bioresources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. School of life and science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Bioconjugation is a process that conjugating two or more molecules to form a new compound. The complex compound possesses all characteristics of its components. Bioconjugation technique has become popular ever since it was discovered. It involves almost all aspects of life science, driving the development of modern biology, chemistry, medicine and agriculture. This paper reviews and discusses the principles and applications of the bioconjugation techniques.

Key words: bioconjugate technique; theory; application

生物藕合是指将两种或多种分子进行键合的过程, 此过程形成一个新的联合体, 该联合体拥有其所有组分所具有的各特性。这是将两种以上物质结合在一起的方法之一, 它区别于另外两种方法: 化合和混合。化合是指两种物质生成一种不同于它们特性的新物质, 而混合仅指两种以上物质简单的混合, 其理化性质没发生根本变化^[1]。

生物藕合技术自产生以来其应用不断推广, 几乎已经涉及到生命科学领域的各个方面, 也极大地推动了生物、化学、医学、农业等学科的发展。除了在尖端领域的贡献, 它也带动产生了数以亿计产值的行业, 最重要的是推动了与人们生活息息相关的医药、化学农药和疾病诊断等行业的发展。虽然生物藕合近年来不断地发展和完善, 不过仍然存在很多的问题和制约该技术发展的瓶颈亟待解决。本文结合生物藕合反应进行的结构改造简要探讨一下

其发展过程中的应用及问题。

1 生物藕合技术

生物藕合修饰依赖于两种相互关联的化学反应: 反应性的功能性基团在各种交联或衍生试剂上出现, 和功能基团在将被修饰的靶标大分子上出现, 只有在这两种功能基团同时是可利用和化学相容的情况下, 反应才可以进行^[1]。通过了解反应性基团与靶标功能基团生物藕合的作用机理, 就可以自行设计一种生物藕合策略, 根据需要选择合适的生物藕合试剂和反应体系。很多的常用反应基团都能通过商业途径获得, 通过对它们的了解可以最大程度地简化生物藕合过程。

1.1 生物藕合试剂

生物藕合试剂在生物藕合反应中起着举足轻重的作用, 它们是导向一次反应的关键一环, 往往决

收稿日期: 2009-10-09 初稿; 2009-11-10 修改稿

作者简介: 朱育菁(1972-), 女, 博士, 从事农业生物技术研究

通讯作者: 刘波(1957-), 男, 研究员, 从事农业生物技术研究(E-mail: laeptb@163.com)

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10A212); 福建省自然科学基金项目(2007J0058); 福建省杰出青年自然科学基金项目(2009J06010)

定一次反应的成败。近年来，生物耦合试剂反应性基团的可用性、设计的多样性以及它们庞大的数量都空前的增长，能产生有用衍生物的试剂体系几乎都可以找到。可以说，没有生物耦合试剂的长足发展，生物耦合技术不可能取得今天这样的成就。当然，生物耦合试剂在反应中解决了很多问题，也带来很多不可避免的问题，所以要使该技术达到至善的地步还有很长的路要走。

1. 1. 1 零键桥交联剂 该试剂是生物耦合中最小的可利用试剂体系，它通过形成一个不含其他原子的键合介导 2 个分子之间的生物耦合，这其中 1 个分子中的 1 个原子共价的附着于另一个分子的 1 个原子，它们中间没有介入任何交联剂或间隔基。在制备半抗原——载体生物耦合物时，有时相应的免疫反应会对生物耦合剂显示出不必要的特异性，零键桥的交联剂则消除了这种可能性。常用的零键桥交联剂有碳化二亚胺类的 EDC、CMC、DCC、DIC，Woodward 试剂 K 和 CDI 等^[1]。

1. 1. 2 同型双功能交联剂 最早用于高分子的化学修饰和耦联的交联剂，是由在两端含有同样功能基的双反应性的化合物组成。多数这些同型双功能试剂在设计上是对称的，有 1 个碳链间隔基，连接 2 个一样的反应端。通过与 2 个分子上相同的共有基团共价的进行反应，这些试剂就像分子索一样，可将一个蛋白质系在另一个上。使用同型双功能试剂有一个主要的缺点，可能会产生难以确定的生物耦合物。例如，两种蛋白质进行生物耦合时，生物耦合剂会先与一种蛋白质形成活性中间体，然后该被激活的蛋白质可与另一种蛋白质交联也可与同类的另一分子反应，还可与自身肽链部分上某些功能及进行反应。

常用的该类交联剂有 NHS 酯类的 DSP 和 DTSSP、DSS 和 BS³、DST 和 Sulfo-DST、BSO-COES 和 sulfo-BSOCOES、EGS 和 sulfo-EGS、DSG、DSC，亚氨基脂类的 DMA、DMP、DMS、DTBP，巯基反应类的 DPDPB，二氟苯衍生物的 DFDNB、DFDNPS，光反应性交联剂类的 BASED，醛类的甲醛、戊二醛，双环氧化物类的 1, 4-丁二醇缩水甘油醛，脲酰类的己二酸二脲酰、碳脲酰，双重衍生物类的被重氮的 o-联甲苯胺、双重氮联苯胺，以及双烷基卤化物等^[1]。

1. 1. 3 异型双功能交联剂 异型双功能交联剂具有两种不同的反应性基团，能与蛋白质和其他高分子上的两种不同的功能性靶标结合。这使得它具有将交联反应定向于靶标分子上被选择部位的能力，

从而在生物耦合过程获得更好的控制。该类交联剂可用于在二步或三步的反应过程中交联蛋白质和其他分子，限制了上述使用同型双功能性试剂经常产生的聚合的程度。另外，它也可以用于将一个生物耦合反应位点定向于靶标分子上的特定部位。并且很多这样的生物耦合剂在它们的交联桥上含有可裂解的基团，这给予实验设计很大的弹性。

常用的此类交联剂有胺反应性和巯基反应性的交联剂 SPDP、LC-SPDP 和 Sulfo-LC-SPDP、SMPT 和 Sulfo-LC-SMPT、SMCC 和 Sulfo-SMCC、MBS 和 Sulfo-MBS、SIAB 和 sulfo-SIAB、SMPB 和 sulfo-SMPB、GMBS 和 sulfo-GMBS、SIAX 和 SIAXX、SIAC 和 SIACX、NP1A，羰基反应性和巯基反应性的试剂 MP-BH，M₂C₂H，PDPH，胺反应性和光反应性的交联剂 NHS-ASA，Sulfo-NHS-ASA 和 Sulfo-NHS-LC-ASA，SASD，HSAB 和 Sulfo-HSAB，SANPAN 和 Sulfo-SANPAN，ANB-NOS，SAND，SADP 和 Sulfo-SADP，Sulfo-SAPB，SAED，Sulfo-SAMCA，PNP-DTP，巯基反应性和光反应性的交联剂 ASIB，APDP，苯甲酮-4-碘乙酰胺，苯甲酮-4-马来酰亚胺，羰基反应性和光反应性的交联剂 ABH，羧基反应性和光反应性的交联剂 ASBA，精氨酸反应性和光反应性的交联剂 APG^[1]。

1. 1. 4 三功能交联剂 三功能交联剂是一种比较新型的生物耦合试剂，每个分子具有 3 种不同反应性或配位的基团。这种试剂融合了异型双功能概念的要素，在其中，交联剂的两端含有可与靶标分子上的两种不同的功能基结合的反应性基团。一种三功能试剂有 1 个第三种臂，它仍在另一个基团的末端，可特异性地与 1 个第三种化合物或生物靶标连接。该类交联剂有 4-叠氮-2-硝基苯生物胞素-4-硝基苯酯 (ABNP) 和 Sulfo-SBED。

1. 2 功能性靶标

如果说生物耦合试剂是生物耦合技术的关键，那么功能性靶标则是其基础，生物耦合衍生方案都要根据功能性靶标的特性、特点围绕其结构而展开。生物耦合产物的特性往往也受到功能性靶标的左右。这些靶标基团几乎可以在任何的生物分子上找到，包括氨基酸、肽、蛋白质、糖、糖类衍生物、多糖、核酸、寡核苷酸、脂肪和复杂的有机化合物^[1]。

1. 2. 1 氨基酸、肽和蛋白质的功能性靶标 肽和蛋白质都是由氨基酸通过肽键的形成而聚合在一起

的,氨基酸组分的次序和性质决定了蛋白质的结构、活性和功能。每个氨基酸都至少有 1 个氨基和 1 个羧基,与 1 个 α -C 的中心碳原子相连。迄今为止,有 20 种常见的氨基酸,每种都有 1 个可辨别的侧链,具有独特的化学结构、电荷、氢键结合的能力、亲水性或疏水性以及反应性,侧链并不参与多肽的形成,因此可以自由地在它们的环境中进行相互作用和反应。有 7 种氨基酸拥有相对非极性和疏水性的脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸和脯氨酸。其中蛋氨酸末端有硫醚基团,脯氨酸是唯一的亚氨基酸,它的侧链与 α -氨基形成 1 个氮杂戊环的环状结构。苯丙氨酸和色氨酸都包含芳香族侧链,它们也是相对非极性的和疏水的。苯丙氨酸对普通的衍生试剂不起反应,而色氨酸的吲哚环十分活跃,只要能接近就能起反应。天冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸和丝氨酸包含着相对极性的成分,表现出亲水性。天冬氨酸、苏氨酸和丝氨酸经常被糖类化合物以 N -糖苷键和 O -糖苷键进行转译后修改。

对于化学修饰和生物耦合同具有重要意义的氨基酸,是那些包含可离子化侧链的氨基酸:天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、组氨酸和酪氨酸。在非质子化条件下,它们的每一个侧链都是一个潜在的亲核剂,能参与到加成反应中。天冬氨酸和谷氨酸都含有具有离子化特性的羧基。赖氨酸包含 1 个直的四碳链,精氨酸的侧链包含 1 个强碱性的化学组分:胍基,组氨酸的侧链是 1 个咪唑环,这些残基可以发生的最重要的反应是烷化和酰化反应。另外,蛋白质中的羧基可被衍生化,通过利用能形成酰胺键合试剂,或是通过活性的酯或反应性的羧基中间体^[1-2]。

1.2.2 糖、多糖和糖复合物的功能性靶标 许多作为化学修饰或生物耦合同目标的大分子包含很大比例的糖类化合物,反应可被设计成直接靶准这些糖类化合物组分,也可以通过利用小的、可检测的组分或将它们作为生物耦合同桥与其他的大分子进行生物耦合同,有选择地对它们进行化学修饰^[1]。单糖的功能基包括 1 个酮或 1 个醛、几个羟基和可能的氨基、羧基、硫酸或磷酸基作为附加的组成。某些糖类化合物在相邻碳原子上带有羟基,可以用高碘酸钠来裂解相关的 C-C 键,并将羟基氧化成活性的甲酸基。糖类化合物原有的还原端也可与含胺分子通过还原胺化反应进行生物耦合同。寡糖的还原端可用 N -(β -氨基-苯基)氨基乙烷进行修饰,来产生末端芳香胺衍生物,而后可以与含氮的活性分子生

物耦合同仅此那个重氮化。另一类可发生在糖类化合物原有的乙醛上的反应是与酰肼功能基反应,产生腙键,含酰肼的探针或交联剂可与高碘酸氧化的多糖或糖的还原端进行生物耦合同反应^[1-2]。

1.2.3 核酸和寡核苷酸的功能性靶标 RNA 和 DNA 不包含任何一种诸如蛋白质上的一级胺、巯基、羧基和酚那样的功能基,但是仍然存在特殊的位点可以被生物耦合同。嘧啶碱基单位胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶包含六元含氮环结构带有各种不饱和和位点。其环状结构可用于亲核置换反应,1 个类似的强亲核剂,羟胺,是几乎完全特定的用于修饰嘧啶。另外,亲电试剂也可以修饰核酸的嘧啶环,烷化和酰化反应都可在 3 个碱基的几个位点上发生。尤其是杂环原子是最好的部位,具有高电子密度。另外,嘧啶碱基的卤化反应可用溴或碘来进行。胞嘧啶衍生物的 N-3 位置是最易被烷化的,尿嘧啶的 N-3 位置可用碳化二亚胺试剂进行修饰^[1]。嘌呤碱基是由 1 个双环系构建的,1 个嘧啶型的、合并有 1 个五元咪唑环的六元环。在腺嘌呤的 C-6 和 N-1 之间有 1 个额外的不饱和点,而鸟嘌呤的 C-2 或 C-6 上存在胺或酮基。如嘧啶碱基一样,嘌呤碱也在它们环状结构特定位点上接受亲核置换反应,两种化合物都与亲核剂在 C-2、C-6 和 C-8 上反应,C-8 是化学修饰最常见的靶标。另外,在腺嘌呤的 N-1、N-3 和 N-7 上或鸟嘌呤的 N-3 和 N-7 上可以发生烷化反应。嘌呤最重要的反应之一是,在 C-8 位置的鸟嘌呤或腺嘌呤的溴化反应。寡核苷酸生物耦合同或修饰反应可以通过它的 3'-羟基或是核糖核酸的 2',3'-二醇基进行。而核苷酸的磷酸基通过酯或酞键合被加成到糖组分的 5'-羟基上。利用缩合剂如碳化二亚胺类。核苷酸的磷酸可被靶准进行修饰反应^[1-2]。

2 生物耦合同技术的应用

判定一项技术是否成熟,很大程度上取决于其应用和推广的程度以及范围,生物耦合同技术的应用几乎渗透到生物医学领域的各个方面,它最主要的应用是检测分析和医药免疫,此外,其在农业上的应用前景也很广阔,另外生物耦合同在改善分子特性甚至在生命活动中都有很大的作用。难能可贵的是,一些生物耦合同反应除了改善聚合物的特性以外,同时还兼有医药、农业方面的应用。

2.1 生物耦合同在医学诊断、检测、分析中的应用

生物耦合同技术自从被人们发现应用以后,其在分析检测中的应用就一直占很大的比重,从物质的

检测分析到疾病的诊断再到荧光探针示踪，无一不是利用了生物藕合。并且，无论其准确度还是检测范围，都是其他方法很难比拟的。尤其是某些物质和疾病的检测，要想用较为简单的方法达到较高的准确度，几乎脱离不了藕合。

类固醇的羧基衍生物直接生物藕合到酶的氨基酸功能基上形成酶的生物藕合物是一种常用的类固醇酶免疫检测的方法，序列中含 6 个赖氨酸位点的辣根过氧化物酶（HRP）就是该种酶免疫分析过程中广泛被使用的酶，但是在实际操作过程中，通常只有 1 或 2 个位点可用作反应。这种参加反应的氨基酸基团含量的差异，是由于从辣根植物的根中提取 HRP 所采用的萃取条件不同而造成的。起初，采用戊二醛、碳化二亚胺等双功能藕合剂将 HRP 偶联到 IgG 上的几率很低，后来采用高碘酸盐途径将 HRP 生物藕合到 IgG，但是由于氨基酸基团的差异性，很难建立标准的 HRP 生物藕合到蛋白质的反应，于是，先将脂肪酸胺胍（ADH）藕合到 HRP 上，这样就提供了相同的氨基酸功能团以便进行后续的藕联反应。这样，ADH 在 HRP 和类固醇羧基衍生物的藕合反应中起到桥梁作用，形成酶生物藕合物进行酶联免疫吸附测定（ELISA）反应。并且，为了将 ADH 藕合到 HRP 上，要利用 HRP 上的糖基部分，而 HRP 有大约五分之一的糖含量，包括甘露糖、N-乙酰葡萄糖、木糖和海藻糖。这样，这些糖基很好地提供了高碘酸氧化作用的位点，同时又不会导致酶活性的大量丢失。另外，ADH-HRP 试剂也可以做核酸的生物藕合以便进行核酸杂交分析，做蛋白质的藕合进行免疫分析和免疫化学，还对高碘酸氧化作用后蛋白质印迹的糖蛋白染色有很大作用^[3]。

纳米技术跟生物学的整合使分子诊断、治疗学以及生物工程都产生巨大进步，并且功能性微颗粒跟诸如抗体、肽、蛋白质和核酸等生物分子共价连接的产物都有很广泛的应用。这些功能性微颗粒可以用作新型诊断病原体的工具和方法，将它们跟单克隆抗体进行藕合，可以直接、快速、特异性地检测呼吸道融合病毒。它们可以提供对病毒快速、直接、灵敏的检测，有效地解决了当前病毒检测方法的繁琐与迫切需要一种高效、快速的病毒检测试剂之间的矛盾^[4]。另外，胶体金颗粒在“光学成像橱”中具有消光波段，吸光和分散峰引起的强烈的胞质基因共鸣，使得它们适合于光学成像技术中的对照试剂，因而可以将这种颗粒用于光声癌症成像^[5-6]。光声成像依赖于其信号的光学吸收，当光

子被吸收后，被吸收的光学能量就会发生非放射性去激活作用，同时伴随着局部的热量释放，局部的热量膨胀又会导致压力越迁^[7]。当用脉冲激光照射时，由于血管再生，肿瘤位点相比于健康组织由于较高的吸收值，会表现为双极光电脉冲的发起源^[8]。采用适当波段的探测器，这种超声波会对探测的表面最小限度的失真。跃迁的时间，振幅等包含着关于探测位置的定位、吸收值以及维度等信息，因而可以对肿瘤的位置进行重建^[9-10]。临床上，采用基于抗体与胶体金颗粒表面的电亲和和疏水反应的非共价连接模式，将胶体金颗粒生物藕合到由小鼠乳腺癌 SKBR3 细胞特异性表达的单克隆抗体 HER2，这样可以通过成像检测肿瘤部位^[11]。

2.2 生物藕合在医学治疗、免疫的应用

伴随着生物藕合技术的发展，其在医学治疗上的应用也逐步广泛，使很多以前医学上的难题迎刃而解或者为其解决提供了新的思路和方法。例如对癌症的控制和治疗一直以来是困扰医学界的难题，最近出现的生物导向治疗，虽然还不能彻底解决这个问题，可也算是一个能够采用的最有效的方法。有人设计过实验通过 i.p 试验来测定紫杉醇-透明质醇藕合物（ONCOFID-P）对 GROV-1 和 OVCAR-3 人卵巢癌异种移植物的药理学和生物学特性。在体外，肿瘤对 ONCOFID-P 的敏感性是通过噻唑兰化验得到，然而藕合物跟细胞之间相互作用的研究则是通过荧光显微镜和共聚焦显微镜。体外条件下的毒性是通过单剂量最大耐受剂量，周围细胞计数和组织分析来研究的。复合物的生物分布是通过注射有被^{99m}Tc 标记的 ONCOFID-P 的动物的射线闪烁扫描来测定的。另外，实验中也进行了病理分析。向患有严重免疫缺陷的母小鼠中移植卵巢癌细胞，然后分别在 7 d 和 14 d 后用 ONCOFID-P 和紫杉醇处理，接着研究、比较存活小鼠的情况。结果，ONCOFID-P 可以跟 CD44 相互作用，通过受体介导机制进入细胞，并能对肿瘤细胞的生长表现出浓度依赖型抑制效应。实验中发现，i.p 试验后，统一分布在腹腔中的藕合物并不具有组织毒性，是可容的。病理学研究表明，血液中藕合衍生物形式的紫杉醇的含量以及持续时间都要远远超过非藕合形式的自由药物。用藕合物对患有肿瘤小鼠的腹腔治疗表明 ONCOFID-P 比起常规药物具有相对高的治疗活性^[13]。

除了抗癌方面的应用，生物藕合在其他免疫治疗等方面也有不小的贡献。在用药物进行溶栓治疗

时, 由于机化血栓的外层包裹有一层胶原蛋白, 这将妨碍药物的溶栓效果^[14]。因此, 可用胶原蛋白溶解已经机化的血栓栓子^[15]。采用水溶性碳化二亚胺法将胶原蛋白酶与牛血清白蛋白交联后在连接抗胶原蛋白单克隆抗体, 使胶原蛋白酶具有对血栓的主动靶向性^[16]。另外, 将 siRNA 与脂质生物藕合的产物作为药剂治疗急性和慢性病也引起人们的浓厚兴趣。siRNA 可以介导一种序列特异性的转录后基因沉默, 这就是 RNA 干扰 (RNAi)。不像其他的 mRNA 靶标策略, RNAi 采用生理上的基因沉默机制。RNAi 既可以通过化学上合成的 siRNA 也可以通过小的发卡 RNA、siRNA 和 miRNA 的内吞表达来实现。然而基因沉默需要相当大量的 siRNA, 限制了它在医疗方面的应用。它与脂质生物藕合后, 不仅能增加它的热力学稳定性, 增加它的生物分布和药物动力学分布, 还能将它们靶定特定的细胞种类^[17]。

另外, 通过靶准铁转移蛋白受体 (TfR) 介导 OX26 单克隆抗体藕合到脂质微囊 (LNC) 就可以形成免疫微囊。其中 TfR 在脑内皮中过量表达并且能够介导细胞转运机制。同样地, 将能够介导与网状内皮组织系统的交互作用的 Fab 片段藕合到 LNC 上, 而将用反应性的巯基顺丁烯二亚酰胺功能化的 PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀-巯基) 结合到 LNC 外壳上可以促进这个藕合过程。一种采用动态上升下降技术的界面模式可以帮助确定影响 DSPE-PEG₂₀₀₀-巯基插入以及停留位点性质的参数。热量是 DSPE-PEG₂₀₀₀-巯基藕合到 LNC 上必不可少的因素。OX26 单克隆抗体要被硫酸醇化才能够跟顺丁烯二亚酰胺反应, 然而 Fab 片段的硫醇位点可以直接使用。根据在藕合反应混合物中的原始数量可以调整每个微囊的配基数目, 使其达到 16~183 个完整的抗体, 以及每个 LNC 有 42~173 个 Fab 片段。这样, 免疫微囊跟过量表达 TfR 的细胞之间特异的结合, 可以作为一种将药物转运到脑部的新途径^[18]。

2.3 生物藕合在农业方面的应用

藕合现象在植物自身代谢中普遍存在, 对植物生命活动也很重要, 可是根据这一特点, 对植物抗药性、抗虫性代谢的研究虽然在我国很早就开始, 然而并未引起太多科学工作者的注意, 因此这方面的资料一直都呈断断续续增长的状态, 可是对这些资料仔细研究, 会发现藕合技术在农业方面会有很大的发展空间, 尤其我国是农业大国, 任何有助于农业发展的技术都会对提高广大农民生活水平作出

巨大贡献。关于水杨酸的研究就是一个很好的例子。水杨酸曾被猜测为一种与病源相关蛋白的合成及烟草疾病抗性有关的天然信号。用烟草花叶病毒 (TMV) 感染 Xanthi-nc 烟草后, 作为对 TMV 的应答, 在被病毒感染以及未被感染的叶片中都会发现内源性水杨酸的含量升高, 而检测到的含量最高的位置则位于被感染位置及其附近。对 TMV 感染叶片的萃取物进行化学及酶学水解表明, 水杨酸以一种藕合物的形式出现, 该藕合物被初步确定为 α -葡萄糖苷-水杨酸。水杨酸藕合物只是在含有感染损伤部位的叶片中被检测到, 而在韧皮分泌物及正常叶片中却并没有发现。而用外源性水杨酸培育离体烟草叶片, 它在 10 h 内被代谢完。然而, 这种外源性水杨酸的减少却并没有阻止随后的 PR-1 家族抗原产生相关蛋白的积聚。可是, 在 32 条件下培育的 TMV 感染烟草植株中不出现水杨酸的积聚却并不是水杨酸葡萄糖基化的结果。向水培法培养的烟草培养基中添加水杨酸可以提高烟草正常叶片中水杨酸的含量。向自然培养的烟草植株叶片中施加更大量的外源性水杨酸, 可以提高其对 TMV 的抗性。这都表明, 水杨酸很可能在 TMV 感染的烟草中是一种病源相关蛋白和系统获得性抗性的天然诱导物^[19]。另外, 至于抗药特性, 有研究表明禾本科植物中恶唑禾草灵与谷胱甘肽的非酶藕合对除草剂具有解毒作用^[20]。虽然这只是很早期的研究, 但是可以看出, 对植物中的藕合深入研究下去, 应该可以找到一条增加植物对病毒、药物抗性的方法。

另外, 由于杀虫剂和除草剂在人体中即使很少量也会有害, 考虑到农业上使用它们的警戒线, 有必要建立一种对其快速、高效、灵敏而又特异的检测方法。量子点是半导体的荧光微颗粒, 将其用于环境检测会具有很高的灵敏性。当前就有研究试图采用镉碲化合物量子点微粒 (CdTe QD) 确立一种可靠、高效的对 2, 4-D 的分析检测方法。采用基于量子点荧光特性的免疫荧光分析以及免疫分析方法检测 2, 4-D。将巯基丙酸用 EDC 藕合到 CdTe 上, 然后又以 NHS 为偶联剂将其藕合到碱性磷酸酶 (ALP) 上, 而碱性磷酸酶又可以藕合到 2, 4-D 分子上。用琼脂糖 CL-4B 作为惰性介质将抗 2, 4-D IgG 抗体固定在免疫反应柱上。2, 4-D 的检测是通过基于免疫荧光分析的生物反应器中的藕合的 2, 4-D-ALP-CdTe 和自由的 2, 4-D 与固定在柱子上的抗 2, 4-D 抗体的竞争性结合。另外, 这个研究也让人关注到 ALP 和 CdTe

QD 之间由于藕合的共振能量跃迁，这可以推动基于量子点-生物分子反应的生物反应器的未来发展^[21]。

当前随着人们环保意识的增强，过去普遍被使用的高毒化学合成农药已经失去了市场，而毒性普遍较低的生物毒素开始受到青睐。藕合技术与生物毒素的制备、分离相结合也大大促进了这一领域的发展。首先，利用藕合技术可以对微生物生物毒素进行收集、分离，在已有物质分析设备的基础上，增加高分辨率核磁共振分析手段，建立微生物毒素分析与鉴定平台，研究生物毒素的分子组成与空间结构，了解它们的基本理化特性。其次，根据生物藕合的特点，相应地可以分离、纯化、鉴定生物毒素结构改造与修饰的产物，建立以平面色谱分析为主的毒素结构改造与修饰监控技术体系以及 Bt 等重要杀虫毒素的受体、抗体制备与藕合产物检测体系，形成重要杀虫毒素生物藕合与鉴定平台。再次，基于藕合剂的技术特点，研究人员不断地研制生物毒素提取装置、毒素结构改造反应釜与产物提取装置以及毒素间藕联反应釜与产物提取配置，形成了一整套的毒素菌株发酵、生物毒素的纯化与浓缩、生物毒素的衍生化与衍生物制备、毒素藕联及产物分离、藕联产物制剂研究与生产等技术，也相应地搭建起藕合型多位点杀虫毒素生产过程中各环节生产工艺的研究平台。例如，生物农药方面多位点生物杀虫剂 BtA 的研究，利用生物藕合技术，将苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 的伴孢晶体进行酶切改造，形成带末端氨基的原毒素，将阿维菌素上的羟基进行激活、衍生化，形成带羧基的阿维菌素衍生物，最后利用氨基-羧基偶联剂 (EDC) 进行生物藕合，实现生物毒素的结构改造，形成单体双毒素的成分结构，以提高生物农药杀虫谱和杀虫速率，延缓和降低害虫的抗药性^[22-24]。

2.4 生物藕合在其他方面的应用

利用藕合，可以改善物质的特性。有时候为了使目标物质具有理想的理化性质，比如增加稳定性、活性以及延长半衰期等，采用生物藕合就可以实现。将血清白蛋白的 Cys34 上的硫醇基藕合以生物活性肽的活性基团，可以有效地延长胞浆半衰期^[25]。将假单胞菌脂肪酶与藻酸盐可以通过简单吸附方式制成藕合物，原子力显微镜成像也显示这种藕合物是通过吸附形成的，而不是作为凝胶表面可见的酶分子探针的捕获过程形成的。其较大的 V_{max}/K_m 值，表明可溶性的藕合物表现出增强的酶

活性，这构成了脂肪酶由于结合到亲水性分子上致使盖子打开而引起的酶活性增强的很少见的情况之一。比起自由酶，这种藕合物在 55 条件下更稳定，并且可以重新用来将脂肪水解成四环而不致丢失活性。荧光发射光谱也表明，固定酶要经过明确的构象变化^[26]。另外，合成功能性单体 3-苄氧羰基乙基吗啉-2, 5-二酮 (BEMD)，在辛酸亚锡的作用下通过开环聚合与 γ -己内酯共聚，经催化氢化反应脱除苄氧保护基团，可以获得功能侧基为羧丙基的聚 (γ -己内酯)-co-(乙醇酸-alt-L-谷氨酸) (PCGG) 共聚物。该共聚物是一类具有良好的生物降解性和生物相容性的生物医用高分子材料。一方面，酰胺基团的引入可以改善聚酯的物理性质和降解特性；另一方面，功能基团羧基侧基的引入可以对其进行改性修饰、药物偶联等，例如偶联合羟基的抗癌药用做靶向肿瘤治疗的载体，偶联合氨基的多肽避孕疫苗用做免三疫避孕的药物载体^[27]。

此外，还有报道发现酿酒酵母的自噬现象需要一种蛋白质藕合系统的参与。自噬是一种细胞质成分整体降解的细胞内过程，其中，一种新的修饰蛋白 Apg12p 的 C 端甘氨酸通过异肽键藕合到 Apg5p 的赖氨酸位点。这种藕合反应是由 Apg7p 和 Apg10p 介导的，而 Apg7p 是一种类似于泛素激活酶的物质，这都说明这是一种类泛素化系统。尽管自噬在真核细胞是一种普遍的过程，但是在高等真核生物中，并没有确定出究竟哪些分子参与其中。人同系物 Apg12 (hApg12) 是 1 种含 140 氨基酸的蛋白质，并且跟酵母 Apg12p 拥有 27% 的同源性及 48% 的相似性，但是跟泛素并没有任何同源性。Northern 印迹杂交表明它的表达在人体组织中是很普遍的，它是共价藕合到另一种蛋白质上的，而这个靶标蛋白又可以被人 Apg5 (hApg5) 同系物识别。诱变分析表明这个藕合过程是通过 hApg12 的 C 端甘氨酸和 hApg5 的赖氨酸-130 间的异肽键形成的。Apg12 系统可以在人体细胞中构建并且在自噬过程中发挥功能^[28]。

3 生物藕合技术的问题与对策

任何技术在应用上都不会尽善尽美，总会或多或少带来一些负面问题或者影响该技术进一步推广使用的自身问题。所以，生物藕合技术自产生以来，尽管不断完善，但是还有诸多问题，诸如从藕合反应系统的规划、选择到藕合反应过程的控制，再到产物的获取，以至于反应结束的后处理过程等

各个细节, 仍然未能得到很好的解决。

在选择生物耦合体系时, 很多的生物耦合反应都可以采用多种不同的生物耦合剂, 并且其反应体系所处的缓冲液也都可以有很大的跨度。但是不同的生物耦合剂在不同的缓冲液中参加反应得到的产物其理化性质都并不可能严格的一致, 或多或少都会有差异, 甚至其根本性质也会不同。并且几乎很少会有生物耦合剂能达到实验者预先设计的理想效果。另外, 虽然有的生物耦合剂也能反应得到较好的产物, 但是发生反应的难易程度却成了制约的因素。所以每一次的生物耦合反应体系的选择, 都是根据其达到预期结果的程度权衡比较得到的。再就是生物耦合剂的相对含量也是影响结果的一个至关重要的因素, 太多或太少都不行, 因为这不仅涉及到生物耦合度的问题, 还会影响最终产物的活性。有时反应过程还要严格控制在一定的温度、一定的浓度下才能进行, 反应过程的细节稍有变化都有可能对结果产物产生很大的影响。

获得产物的性质也是一个重要的问题, 很多生物耦合得到的物质都具有很高的反应活性, 但是其稳定性往往不足或是半衰期太短, 这就给其实际应用带来了诸多不便。而假如相应改变了反应流程, 使得产物稳定性增加^[29], 又会使其活性降低。因而, 这又需要调和好稳定性及活性之间的关系。还有一些生物耦合产物虽然具有较好的医学药用特性, 但同时也兼有毒性, 对正常人体组织会有损坏作用, 这就需要对其药性和毒性进行比较, 选择出药性尽可能大、毒性尽可能小的产物。另外, 就是其过程经常会发生副反应产生不必要的产物, 给纯化带来不小的困难, 而且其副产物可能还会对正常应用有其他负面影响。再有一个问题, 就是关于对环境的影响, 很多的生物耦合反应会产生有毒、对环境有害的副产物。因此在设计一次耦合实验时, 既要考虑到实验预期结果方面的因素, 又要考虑可能对环境造成的影响。

总之, 生物耦合技术经过这么长时间的发展和完备, 将会在很多领域成为关键步骤, 实际中也给人类带来巨大的收益, 并且在以后还会产生无可估量的经济效益和社会效益。虽然其本身存在很多的漏洞和不足, 相信经过科研人员的不断努力, 终会一一得到解决, 以后生物耦合技术更会渗透到人们生活的方方面面, 其应用也会更加广泛。

参考文献:

[1] HERMANSON G T. Bioconjugate Techniques 2 nd Edition

[M]. USA: Academic Press, 2008.

- [2] 王镜岩, 朱圣康, 徐长法. 生物化学第三版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [3] BASU A, SHRIVASTAV T G, KARIYA K P. Preparation of enzyme conjugate through adipic acid dihydrazide as linker and its use in immunoassays [J]. Clin Chem, 2003, 49: 1410 - 1412.
- [4] TRIPP R A, ALVAREZ R, ANDERSON B, et al. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection [J]. Int J Nanomedicine, 2007, 2 (1): 117 - 124.
- [5] COPLAND J A, EGHTEHARI M, POPOV V L, et al. Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography [J]. Mol Imaging Biol, 2004, 6 (5): 341 - 349.
- [6] EGHTEHARI M, MOTAMEDI M, POPOV V L, et al. Optoacoustic imaging of gold nanoparticles targeted to breast cancer cells [J]. Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing, 2004, 5320: 21 - 28.
- [7] XU M, WANG L V. Photoacoustic imaging in biomedicine [J]. Rev Sci Instrum, 2006, 77 (4): 22.
- [8] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 6801 (4): 249 - 257.
- [9] MANOHAR S, KHARINE A. Photoacoustic mammography laboratory prototype: imaging of breast tissue phantoms [J]. J Biomed Opt, 2004, 9 (6): 1172 - 1181.
- [10] MANOHAR S, KHARINE A. The twente photoacoustic mammoscope: system overview and performance [J]. Phys Med Biol, 2005, 50 (11): 2543 - 2557.
- [11] RA YAVARAPU R P, PETERSEN W, UNGUREANU C, et al. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques [J]. Int J Biomed Imaging, 2007, 1: 5.
- [12] 席作明, 赵青. 阿霉素与转铁蛋白受体单抗偶联方法探讨 [J]. 医学检验与临床, 2009, 20 (2): 26 - 28.
- [13] BANZATO A, BOBISSE S, RONDINA M, et al. A paclitaxel - hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (11): 3598 - 3606.
- [14] CHEU K K W, JOHN K F, GAO W Z, et al. Relation of initial platelet counts to thrombolysis in myocardial infarction - 3 flow rates at 90 minutes after commencing fibrinolytic therapy in patients with acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2002, 90: 54 - 57.
- [15] EMANUELE A, PAOLO C, CARLO D A, et al. High-dose antioxidant therapy during thrombolysis in patients with acute myocardial infarction [J]. Curr Ther Res Clin Exp, 1996, 57: 131 - 141.
- [16] 杨本霞, 尹宗宁, 俞功龙. 注射用胶原蛋白酶免疫结合物的制备 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (3): 169 - 172.
- [17] DE PAULA D, M V L B, R I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting [J]. RNA, 2007, 13: 431 - 456.

- [18] BE DUNEAU A, SAULNIER P, HINDRE F. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab fragments [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 4978 - 4990.
- [19] NYEDI A J, YALPANI N, SILVERMAN P, et al. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus [J]. *Plant Biology*, 1992, 89: 2480 - 2484.
- [20] TAL J A, HALL J C, STEPHENSON G R. Non-enzymatic conjugation of fenoxaprop-ethyl with glutathione and cysteine in several grass species [J]. *Weed Research*, 1995, 35 (3): 133 - 139.
- [21] VINA YAKA A C, BASHEER S, THAKUR M S. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluorimmunoassay based biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24: 1615 - 1620.
- [22] LIU B, SENGONCA C. Conjugation of α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* with abamectin of *Streptomyces avermitilis* as a new type of biocide GCSC-BtA in control of agricultural insect pests [J]. *J Pest Sci*, 2003, 76: 44 - 49.
- [23] SENGONCA C, LIU B. Effects of GCSC-BtA biocide on population dynamics of cabbage pests and their natural enemies from fields in southeastern China [J]. *J Pest Sci*, 2002, 75: 46 - 50.
- [24] 刘波, 朱育菁, SENGONCA C, 等. 害虫抗药性治理策略——多位点杀虫毒素的研究 [J]. *农药*, 2004, 43 (11): 492 - 496.
- [25] JETTÉ L, LÉGER R, THIBAUDEAU K, et al. Human growth hormone-releasing factor (hgrf)₁₋₂₉-albumin bioconjugates activate the grf receptor on the anterior pituitary in rats: identification of cjc-1295 as a long-lasting grf analog [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 3052 - 3058.
- [26] MONDAL K, MEHTA P, MEHTA B R, et al. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764: 1080 - 1086.
- [27] 吕冬梅, 郭颖志, 顾忠伟. 药物分子偶联用功能性聚酯-聚氨基酸共聚物的合成与表征 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2009, 165 (7): 397 - 401.
- [28] MIZUSHIMA R, SUGITA H, YOSHIMORI T, et al. A new protein conjugation system in human—the counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy [J]. *Biol Chem*, 1998, 273: 338 - 389.
- [29] TASKINEN J, ETHELL B T, PIHLAVISTO P, et al. Conjugation of catecholes by recombinant human sulfotransferases, UDP-glucuronosyl transferases, and soluble catechole *o*-methyltransferase: structure-conjugation relationships and predictive models [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 1187.

(责任编辑：林海清)