

多酶定向共固定化的研究进展

叶 鹏,胡玲玲,杜育芝,倪华钢

(浙江理工大学理学院,杭州 310018)

摘 要:多酶体系的定向共固定可以充分地结合不同种类酶的催化特性,既扩展了酶催化的应用范围,又提高了酶体系的整体反应效率,在很大程度上克服了单酶反应体系单一催化的局限性。文章对单酶应用领域的定向固定化方法作了概述,并讨论了多酶反应体系定向共固定化技术的发展现状。多酶体系定向固定化目前主要依赖于非共价定向化的方法,包括生物亲和作用以及DNA技术。

关键词:多酶体系;共固定;定向固定化;级联反应;亲和作用;DNA自组装

中图分类号: Q814.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)06-0899-07 **引用页码:** 110701

0 引 言

在自然界中,酶催化过程常常不是单一酶的反应。例如,细胞内代谢途径中,形成复杂的多酶复合体,存在着大量的多酶级联反应,这些反应往往需要多种酶参与完成^[1],即多酶共反应^[2]。通过提高中间产物在不同酶间的运转浓度^[3],可以更高效地完成整个催化过程。

在单酶固定化已不能满足实际需求的情况下,受到多酶级联反应的启发,研究者越来越关注多酶体系的共固定化技术。多酶共固定化体系在显著提高酶稳定性的同时,将不同酶的催化特性有效地结合起来,从而极大地提高酶的催化效率^[4]。

Ricca等^[5]通过对体外多酶级联反应体系的研究,将多酶生物催化反应体系分为线性级联反应、正交级联反应、并行级联反应以及循环级联反应四大类^[6],是目前比较典型和广泛认可的分类方式。早期,这些多酶级联催化反应体系广泛应用于有机合成和生物合成中。目前,多酶催化体系已经发展应用到了生物传感器^[7]、分子识别^[8]、免疫放大^[9]等领域。多酶共固定化,是将多种酶固定在同一载体上形成的共固定化系统^[10],或将多种酶通过交联形成共交联酶簇的技术^[11]。

传统固定化方法,酶通常是以任意位点与载体连接,可能导致酶多个位点的结合,往往会破坏酶的天然构象,或因位阻效应而阻碍底物与酶反应位点接触^[12],导致固定化酶的活性大幅降低^[13]。而酶的定向固定,是将酶蛋白以有序的方向和载体在特定位点连接起来^[14],酶天然构象基本保持不变,有助于保护酶催化功能。

对于多酶体系的定向共固定化,其共固定化和定向化方法基本都是建立在单酶固定化技术的基础上^[15],常包含多种技术的配合使用。因此,本文简要介绍单酶定向固定化的方法,并重点讨论了多酶定向共固定化技术。

1 单酶定向固定化技术

酶分子的不适空间取向会使其与底物发生邻近定向效应受阻,导致催化作用减弱;固定化过程中的构象变化,也会降低酶的催化活性^[16]。此外还存在一些特殊结构的酶,如脂肪酶需要形成界面活化效应^[17]才能表现出催化活性。因此,发展酶定向固定化技术具有重要的意义。

1.1 共价定向固定化

从酶分子表面的基团中,选取远离活性位点的特定稀有基团与载体共价键合来固定酶蛋白,使其活性

中心朝向底物方向,以达到调控酶空间取向的目的。最典型的是半胱氨酸残基定向固定化法^[18]。例如,葡萄糖-半乳糖受体(GGR)蛋白,其 N-末端丙氨酸可通过基因工程技术用半胱氨酸替代,以形成稳定的二硫键^[19]。Wang 等^[20]利用此法获得了含有半胱氨酸残基的 β -半乳糖苷酶,通过与硫代亚磺酸酯琼脂糖反应生成二硫键而定向固定,用于 β -糖苷键的水解。

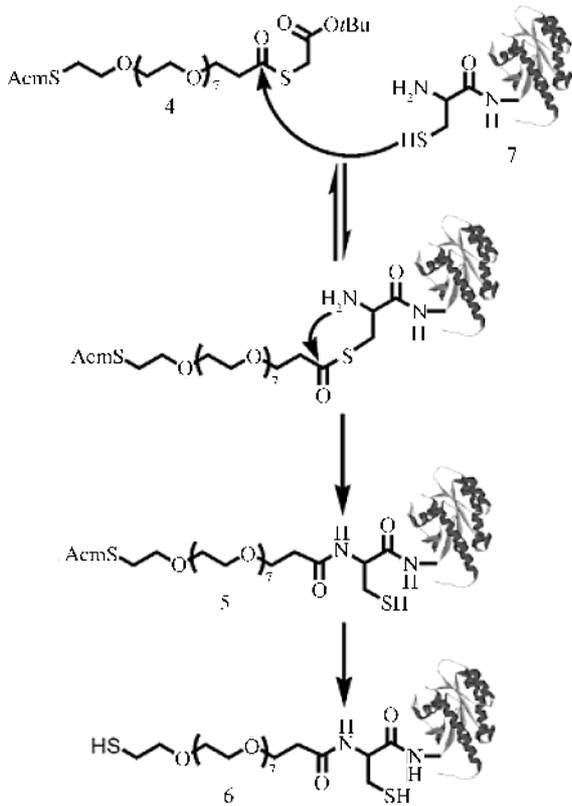


图1 N-末端改性的 N-半胱氨酸-Rab6A 与叔丁基巯基乙酸盐硫酯连接

Becker 等^[21]利用自然化学连接(NCL)法定向固定了 GTP 酶,即一个肽的 N 端半胱氨酸残基与另一肽 C 末端的硫酯形成酰胺键。这种定向固定只需在目标酶的 N 端有半胱氨酸残基或 C 端有末端硫酯,相应的载体上连有半胱氨酸或者硫酯,如图 1。共价定向固定中所需的特异基团通常由低频氨基酸提供,多数蛋白质表面没有这些基团,即使存在,位点也不一定可用。因此,限制了这一方法的广泛使用。

1.2 非共价定向固定化

非共价定向固定化主要包括两大类,一种是基于生物亲和吸附法,一种则是基于 DNA 自组装技术。

1.2.1 生物亲和吸附法

生物亲和吸附法是指酶分子通过生物亲和作用与固定在电极上的另一有生物活性的物质作用;或是酶分子的一部分与已经固定在电极表面酶的另一部分结合而固定化的方法^[22]。其中,前一种主要包括凝集素-糖类^[23]、亲和素/链霉亲和素-生物素^[24],以及抗原-抗体或激素-受体等亲和吸附^[25];第二种方法是先将辅基固定在载体表面,然后使脱辅基的酶与辅基结合而固定化^[26]。

Zhou 等^[27]利用凝集素-糖类亲和作用,将 GOD 固定到氧化石墨烯(GO)上。先将伴刀豆球蛋白 A(Con A)通过共价键固定到 GO 上,然后将 GOD 的糖残基与 Con A 相作用获得定向固定化的酶,如图 2。其中,Con A 可以与含有甘露糖或葡萄糖残基的分子形成复合物,已成为一种广泛研究的凝集素。

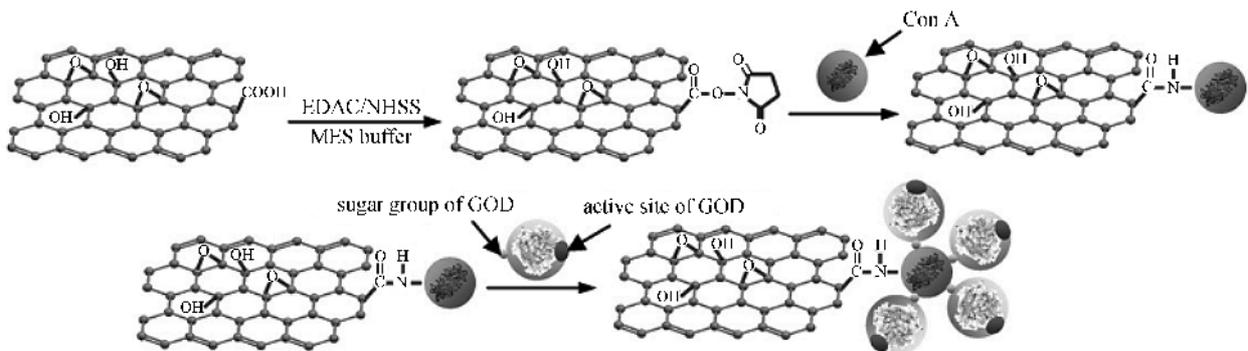


图2 GOD 通过 ConA-Sugar group 亲和作用定向固定于 GO 表面的过程

基于辅基法的定向固定化,应用范围还很局限。目前主要用于氧化还原酶的定向固定化,因其分子结构中一般存有辅基,并且辅基就是酶的氧化还原中心。Raitman 等^[28]先将聚苯胺和聚丙烯酸(Polyaniline/Poly(acrylic acid))共同电化

学聚合在金电极表面,然后将氨基改性的 GOD 辅基—氨基化的黄素腺嘌呤二核苷酸(H₂N-FAD)固定在电极表面。脱辅基后的 Apo-GOD 通过亲和吸附,与 FAD 进行重组,获得高度定向的酶,如图 3。

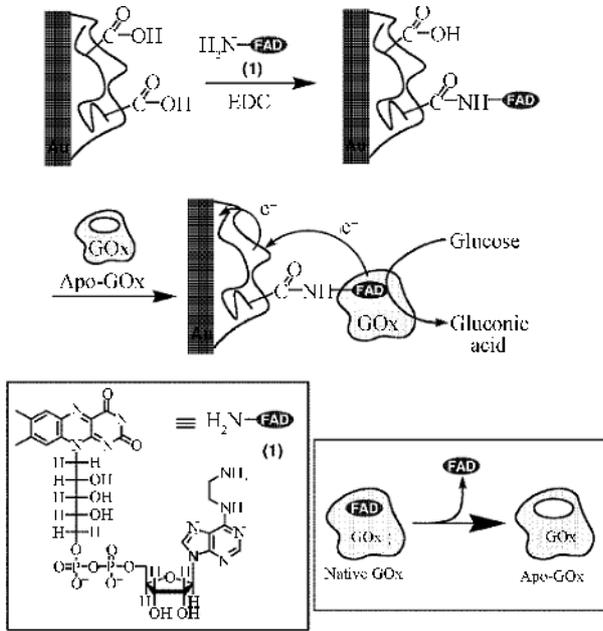


图 3 FAD 功能化 Polyaniline/Poly(acrylic acid) 薄膜表面重构 GOD 过程

1.2.2 DNA 自组装技术

DNA 是一种双链结构,由脱氧核糖及四种含氮碱基组成的大分子,其碱基之间的特异性可以稳定地自组装^[29]。DNA 定向固定(DDI)是利用 DNA 结构上特殊序列与酶上特异性碱基配对,从而实现定向定位固定的技术^[30]。

Müller 等^[31]制备了分别与 F5 和 F9 片段连接的 GOx-DNA 复合物,以不同顺序固定于载体上,实现了酶分子的定向化,如图 4。此外,立体位阻效应会影响 DNA 配位数,以及酶分子的固定化量。

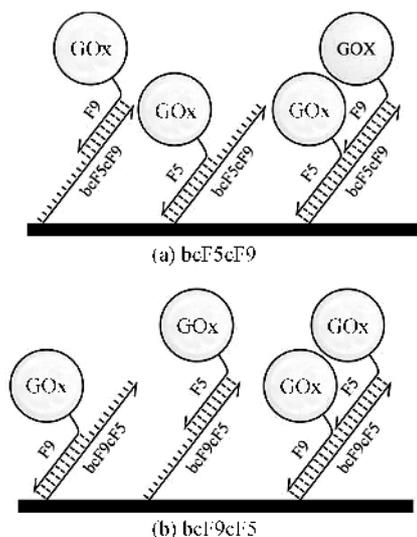


图 4 DDI 技术用于定向固定化 GOx

2 多酶体系定向固定化技术

发展多酶体系定向共固定化具有广泛的应用前景。但是需要兼顾不同酶的最适 pH 值、最适温度、共固定比例以及固定化次序等问题,多酶体系定向共固定比单酶定向固定化要复杂得多^[32],目前主要以非共价定向固定化技术为主,并结合运用多种共固定化方法。

2.1 凝集素—糖复合物之间的生物亲和和作用

在酶定向固定化技术中运用最广泛的凝集素是伴刀豆球蛋白(Con A),可以固定糖类或含糖蛋白质,如 GOD、HRP 等。

Chen 等^[33]利用功能化碳纳米管(CNTs)和糖凝集素生物亲和作用(Sugar-lectin biospecific interactions),通过层层自组装(LBL)获得结构为(PAH-MCNTs-HRP)_n(Con A-GOD)_n的 HRP-GOD 多酶传感器,既对单个酶构象进行了调控,又实现了酶层的定向组装,如图 5。该体系在催化葡萄糖溶液时,呈现正交级联反应性,具有快速的响应性,高度的选择性以及良好的稳定性。Li 等^[34]借助于凝集素—糖复合物生物亲和作用的同时,结合交联及电化学沉积方法,在金/壳聚糖(Au/CS)表面构建了 HRP-GOD 薄膜双酶传感器。

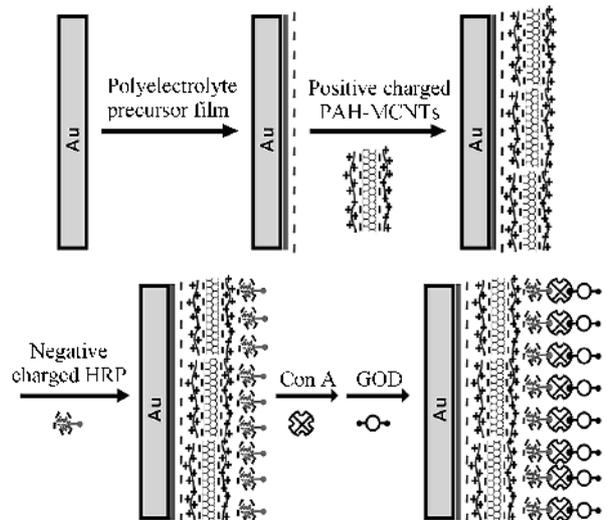


图 5 基于功能化 CNTs 和 sugar-lectin 生物亲和作用的双酶生物纳米多层电极的制备示意图

2.2 亲和素/链霉亲和素与生物素之间的生物亲和和作用

生物素(Biotin)是生物体内广泛分布的一种羧化酶的辅酶,其分子一端的羧基通过单一的生化反应能与酶、蛋白质等物质进行化学连接,不影响酶的生物活性。亲和素(Avidin,简称 Av)是一种糖蛋白,链霉亲和素(Streptavidin,简称 SA)则是与 Avidin 有相似生物学特性的一种蛋白质。二者的

亚基可通过专一的非共价键连接到生物素。这种非共价作用非常强,接近共价键^[35]。

Garcia 等^[36]通过相应的官能团反应分别构建 HRP-Biotin 和 HRP-Av 单元,GOx-Boitin 以及 NHS-EG4-Biotin 单元,以牛血清蛋白(BSA)为“连接桥”,借助 Biotin-Avidin 生物亲和作用的可控层层组装(LBL)制备 GOD-HRP_x-MNP 多酶层传感器。这种多酶层悬浮液具有极高的稳定性:在 4℃ 储存 14 周,酶活性没有大幅降低。

Mansur 等^[37]分别将三种酶{HRP,GOD 及蔗糖酶(INV)}与 Boitin 结合形成 Enzyme-Boitin 基本单元,再通过与 Avidin 之间的亲和作用,在 PS-NH₂ 载体的表面构建了 HRP-Boitin-AV-GOD-Boitin-AV-Boitin-INV 结构的定向生物催化传感器,如图 6。在 HRP-GOD 体系的基础上,加入 BINV,

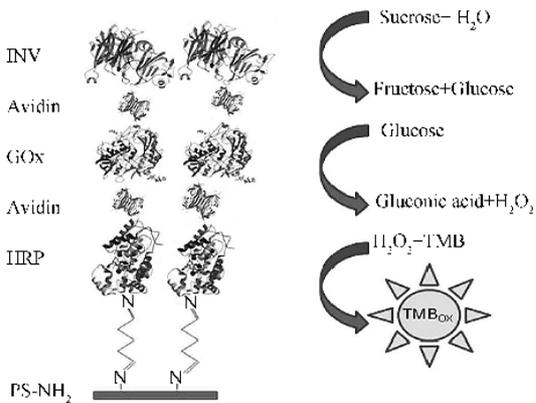


图 6 基于 Biotin-Avidin 生物亲和作用的可控 HRP-Boitin-AV-GOD-Boitin-AV-Boitin-INV 多酶催化体系示意图

催化蔗糖(Sucrose)生成果糖(Fructose)和葡萄糖(Glucose),其中 Glucose 作为 GOD 的催化底物参与后续反应,是两级正交级联反应的线性组合。

2.3 抗体-抗原之间的生物亲和作用

抗体(Antibody)与抗原(Antigen)之间存在生物亲和作用,具有特异性、比例性、可逆性三大特点。若酶能作为抗原,可直接根据抗原抗体之间的亲和作用定向固定;若酶不能作为抗原,则通过基因融合方法在酶的 C 端或 N 端融合一段多肽标签序列,然后酶通过亲和作用定向固定在抗多肽标签的抗体上。这种方法适用于酶分子的活性中心背对着其 N 端或 C 端氨基酸残基,同时融合在酶分子上的标签不能影响其天然结构。

基于 Antibody-Antigen 生物亲和作用的多酶体系,多用于制备生物免疫传感器。如图 7, Jia 等^[38]将分别用硫堇(THI)标记的癌胚抗原抗体(anti-CEA)和二茂铁(Fc)标记的甲胎蛋白抗体(anti-AFP)结合到铂纳米粒子(PtNPs)功能化的石墨烯纳米复合材料(PGN)载体上(图 7 A);另外,在金纳米粒子(AuNPs)改性的玻璃碳电极(GCE)表面,固定大量的 anti-CEA 和 anti-AFP (图 7B)。出现 CEA 和 AFP 时二者相结合, GOD、HRP 与 glucose 催化产生的电化学信号通过载体传导,实现免疫信号的放大,即可达到检测 CEA 和 AFP 的目的,如图 7C。其中涉及多级的氧化还原过程,包含了线性和正交级联催化的部分特征。

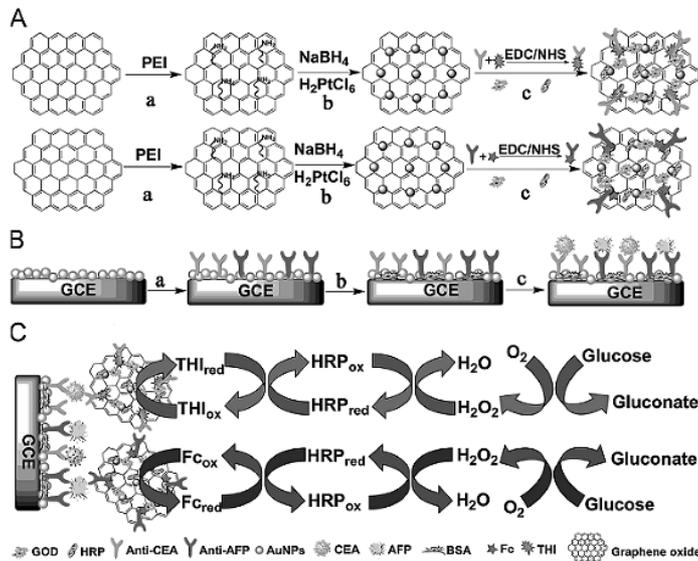


图 7 构建 CEA、AFP 免疫信号放大生物传感器示意图

注:A 为功能化的石墨烯纳米复合材料,B 为改性的玻璃碳电极,C 为免疫信号的放大。

2.4 DNA 自组装技术

对于多酶级联催化,通过对 DNA 分子进行独特的三维结构和空间设计,将酶与一定长度的 DNA 单链序列进行连接,利用其自组装特性实现多酶的自组装^[21],可以达到多酶定向固定的目的。

Liu 等^[39]将 DNA 和酶的特异性的抑制剂相结合,将 INV、GOD 和 HRP 连接在一起,然后通过

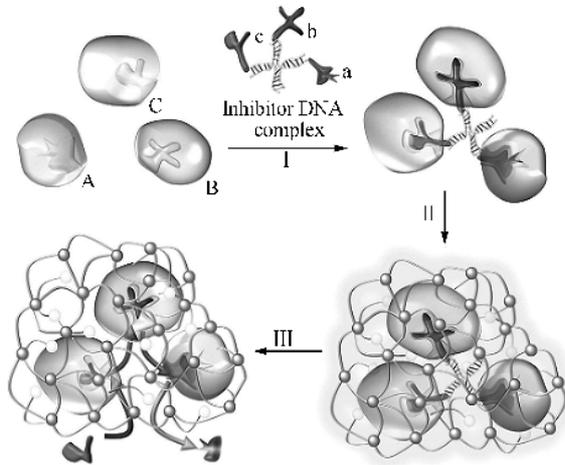


图 8 通过 DNA 自组装合成的纳米多酶体系的构建

3 个酶的表面原位聚合后将 DNA 模板去除,形成 3 个酶相互连接的超分子酶体系,见图 8。实验结果表明该复合体催化效率是游离酶的 24 倍,活力显著增强,热稳定性也极大提高。

随着 DNA 纳米技术和自组装技术的不断发展,提出的一种全新的 DNA 自组装的方法,称之为 DNA“折纸技术”^[40]。Fu 等^[41]以 GOx 和 HRP 作为固定化的模型酶,在酶所需位点引入基因片段;以 DNA 折纸纳米粒子作为载体,利用碱基配对原理制备固定化多酶。该法不仅实现了多酶体系的定向化,又可以控制两种酶的固定间距,具有突出的优势。研究表明,当酶分子之间的距离为 10 nm 时,级联反应中酶的整体活性可超出游离酶的 15 倍。

Wilner 等^[42]利用 DNA“折纸技术”设计了一个由 DNA 条带自组装成的 DNA 骨架,并将 GOx 和 HRP 吸附固定在类似六边形的骨架上,如图 9。该体系的反应活性与 DNA 骨架的拓扑结构有关,合理的设计 DNA 条带可控制酶固定的相对位置,从而保持酶整体最大催化活性。

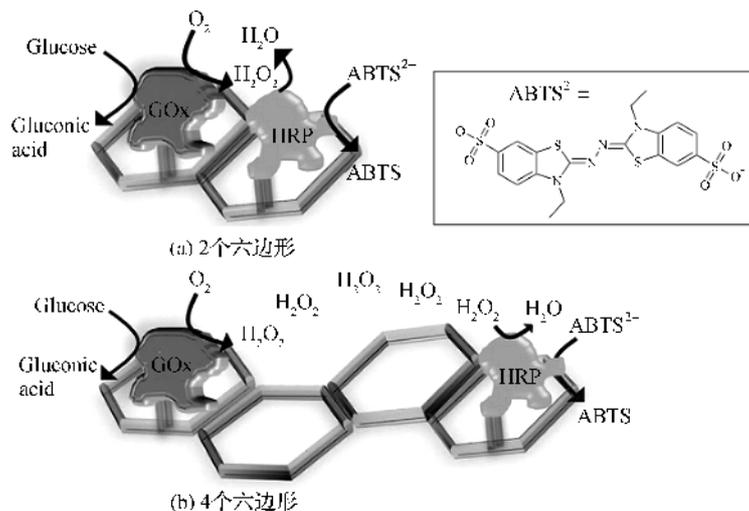


图 9 GOD 和 HRP 采用 2 个和 4 个六边形的连接

3 总结与展望

多酶共固定化体系,其研究主要集中在线性级联和正交级联这两种反应体系,并已在有机合成、生物传感器以及分子识别等领域发挥着重要的作用。多酶定向共固定化技术是在单酶定向固定化的基础之上发展起来的,二者在方法上有许多相同的特点。但由于多酶体系自身的复杂性,以及单酶定向固定化实现难度还较大,要实现多酶催化体系的定向共

固定化依旧存在很多问题和挑战。

目前用于多酶定向固定化的方法,主要是基于生物亲和作用的非共价定向共固定和 DNA 自组装技术。前者主要利用凝集素—糖复合物、亲和素/链霉亲和素—生物素以及抗体—抗原间的亲和作用,这些方法能够在一定程度上控制酶的构象,达到定向固定的目的。但是,由于使用的各种生物药品价格仍然较为昂贵,使用成本偏高,并且涉及对酶分子的局部修饰改性,易降低酶活。而 DNA 自组装技术,借助于

DNA 严密的编码、配对特征,具有较强的专一性和较高的精准性,是酶定向固定化技术发展的重要方向。不过,该方法的操作难度和应用成本都相对较高,普适性还有赖于 DNA 技术的发展。

在未来的多酶体系定向共固定化研究中,在考虑每个酶催化功能的同时,还需充分掌握其结构特征,以便最大程度上优化酶定向化和固定化方法,实现酶的高度定向化而又保持其构象,确保多酶体系最佳的整体活性。随着酶工程、DNA 技术的进步,相信定向共固定化多酶体系将具有更加广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] XUE R, WOODLEY J M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems [J]. *Bioresource Technology*,2012,115:183-195.
- [2] SANTACOLOMA P A, SIN G, GERNAEY K V, et al. Multienzyme-catalyzed processes: next-generation biocatalysis [J]. *Organic Process Research & Development*,2011,15:203-212.
- [3] NAJDI T S, HATFIELD G W, MJOLSNESS E D. A 'random steady-state' model for the pyruvate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase enzyme complexes[J]. *Physical Biology*,2010,7:1-8.
- [4] RODRIGUES R C, ORITIZ C, BERENQUER-MURCIA A, et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization[J]. *Chem Soc Rev*,2013,42:6290-6307.
- [5] RICCA E, BRUCHER B, SCHRITTWIESER J H. Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives[J]. *Adv Synth Catal*,2011,353:2239-2262.
- [6] 汤玉兰,陈缙光,成志毅.多酶共固定化反应体系的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*,2015,35(1):82-87.
- [7] RONKAINEN N J, HALSALL H B, HEINEMAN W R. Electrochemical biosensors [J]. *Chemical Society Reviews*,2010,39:1747-1763.
- [8] DITZLER L R, SEN A, GANNON M J, et al. Self-assembled enzymatic monolayer directly bound to a gold surface : activity and molecular re-cognition force spectroscopy studies[J]. *J Am Chem Soc*,2011,133:13284-13287.
- [9] YANG F, HAN J, ZHOU Y, et al. Highly sensitive impedimetric immunosensor based on single-walled carbon nanohorns as labels and bienzyme biocatalyzed precipitation as enhancer for cancer biomarker detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2014,55:360-365.
- [10] CAO L Q, LANGEN L V, SHELDON R A. Immobilised enzymes : carrier-bound or carrier-free? [J]. *Current Opinion in Biotechnology*,2003,14:387-394.
- [11] 王金丹,张光亚.多酶共固定化的研究进展[J]. *生物工程学报*,2015,31(4):469-480.
- [12] 曹黎明,陈欢林.酶的定向固定化方法及其对酶生物活性的影响[J]. *中国生物工程杂志*,2003,23(1):22-29.
- [13] LIN P C, WEINRICH D, WALDMANN H. Protein biochips : oriented surface immobilization of proteins [J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*,2010,211(2):136-144.
- [14] REDEKER E S, TA T D, CORTENS D, et al. Protein engineering for directed immobilization [J]. *Bioconjugate Chemistry*,2013,24:1761-1777.
- [15] 陈必强,崔彩霞,谢荣,等.多酶催化剂的制备及其应用[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*,2014,5(41):1-8.
- [16] 邵文海,张先恩.固定化酶的空间取向控制策略[J]. *生物技术通报*,2000,3(1):25-28.
- [17] HANEFELD U, GARDOSI L, MAGNER E. Understanding enzyme immobilisation [J]. *Chemical Society Reviews*,2009,38:453-468.
- [18] CAMARERO J A. Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports[J]. *Biopolymers (Peptide Science)*,2007,90(3):450-458.
- [19] CHAH S, FENDLER J H, YI J. In-situ analysis of stepwise self-assembled 1,6-hexanedithiol multilayers by surface plasmon resonance measurements[J]. *Chem Commun*,2002,18:2094-2095.
- [20] WANG J, LUCK L A, SUNI I I. Immobilization of the glucose-galactose receptor protein onto a Au electrode through a genetically engineered cysteine residue[J]. *Electrochemical and Solid-State Letters*,2007,10(2):33-36.
- [21] BECKER C F W, MARSAC Y, HAZARIKA P, et al. Functional immobilization of the small GTPase Rab6A on DNA-gold nanoparticles by using a site-specifically attached poly(ethylene glycol) linker and thiol place-exchange reaction[J]. *ChemBiochem*,2007,1(8):32-36.
- [22] 许永娟.蛋白质的定向固定化:亲和作用和 LB 法[D]. 杭州:浙江理工大学,2014.
- [23] ZHOU L Y, JIANG Y J, GAO J, et al. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide[J]. *Biochemical Engineering Journal*,2012,69:28-31.
- [24] CHIRRA H D, SEXTON T, BISWAL D, et al. Catalase-coupled gold nanoparticles : comparison between the carbodiimide and biotin-streptavidin methods[J]. *Acta Biomaterialia*,2011,7:2865-2872.
- [25] VISHWANATH S K, WATSON C R, HUANG W, et al. Kinetic studies of site-specifically and randomly immobilized alkaline phosphatase on functionalized membranes[J]. *J Chem Tech Biotechnol*,1997,68:294-302.
- [26] XIAO Y, PATOLSKY F, KATZ E, et al. "Plugging into Enzymes" : nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle[J]. *Science*,2003,299:1877-1881.

- [27] ZHOU L Y, JIANG Y J, GAO J, et al. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 69: 28-31.
- [28] RAITMAN A O, KATZ E, BÜCKMANN F A, et al. Integration of Polyaniline/Poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports : an in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 6487-6496.
- [29] MEYER R, GISELBECHT S, NIEMEYER C M. Advances in DNA-directed immobilization[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 18(1): 8-15.
- [30] VIDOTTI M, CARVALHAL R F, MENDES R K, et al. Biosensors based on gold nanostructures[J]. *J Braz Chem Soc*, 2011, 1(22): 3-20.
- [31] MÜLLER J, NIEMEYER C M. DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377: 62-67.
- [32] 陈培策, 张朝晖, 谢雪凤. 共固定化辣根过氧化物酶的最新研究进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(5): 75-78.
- [33] CHEN H, XI F N, GAO X, et al. Bienzyme bionanomultilayer electrode for glucose biosensing based on functional carbon nanotubes and sugar-lectin biospecific interaction [J]. *Analytical Bio-chemistry*, 2010, 403: 36-42.
- [34] LI F, WANG Z, CHEN W, et al. A simple strategy for one-step construction of bienzyme biosensor by in-situ formation of biocomposite film through electrodeposition [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24: 3030-3035.
- [35] LAITINEN O H, HYTÖNEN V P, NORDLUND H R, et al. Genetically engineered avidins and streptavidins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(24): 2992-3017.
- [36] GARCIA J, ZHANG Y, TAYLOR H, et al. Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors [J]. *Nanoscale*, 2011, 03: 3721-3730.
- [37] MANSUR H S, MANSUR A A P, MARQUES M E. Multi-enzymatic systems with designed 3D architectures for constructing food bioanalytical sensors [J]. *Food Anal. Methods*, 2014, 7: 1166-1178.
- [38] JIA X L, CHEN X, HAN J M, et al. Triple signal amplification using gold nanoparticles, bienzyme and platinum nanoparticles functionalized graphene as enhancers for simultaneous multiple electrochemical immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 53: 65-70.
- [39] LIU Y, DU J J, YAN M, et al. Biomimetic enzyme nano-complexes and their use as antidotes and preventive measures for alcohol intoxication[J]. *Nature Nanotechnology*, 2003, 8(3): 187-192.
- [40] ROTHEMUND P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns[J]. *Nature*, 2006, 440(7082): 297-302.
- [41] FU J L, LIU M L, YAN H, et al. Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(12): 5516-5519.
- [42] WILNER O I, WEIZMANN Y, GILL R, et al. Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(4): 249-254

Research Progress of Oriented Co-immobilization of Multi-enzyme Reaction Systems

YE Peng, HU Lingling, DU Yuzhi, NI Huagang

(School of Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Oriented co-immobilization of multi-enzyme system can fully combine the catalytic properties of different enzymes, which expands the application range of enzyme catalysis and improves overall reaction efficiency of enzyme system. Thus, it overcomes the limit that single enzyme reaction system can only catalyze one kind of reaction. This paper summarizes the oriented-immobilization methods of single-enzyme reaction and discusses development status of oriented co-immobilization technology of multi-enzyme system. Oriented co-immobilization of multi-enzyme system mainly depends on non-covalent orientation methods, including biological affinity interaction and DNA technology.

Key words: multi-enzyme system; co-immobilization; orientated immobilization; cascade reaction; affinity interaction; DNA self-assembly

(责任编辑: 许惠儿)