

自由基 医学研究方法

ziyouji

ziyouji

ziyouji

ziyouji

战军
庞周陈

著



人民卫生出版社

110769

自由基医学研究方法

庞战军 著
周陈 琰

人民卫生出版社

EV22/3411

自由基医学研究方法

著 者: 庞战军 周 玫 陈 媛

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园3区3号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印 刷: 河北省遵化市今日印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 22.5

字 数: 446千字

版 次: 2000年6月第1版 2000年6月第1版第1次印刷

印 数: 00 001—3 000

标准书号: ISBN 7-117-03753-9/R·3754

定 价: 31.50 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

自 1969 年 McCord 和 Fridovich 发现超氧化物歧化酶以来,有关科学工作者经过三十年的辛勤耕耘,一门新兴交叉学科——自由基生物学与自由基医学已日趋成熟,它正在生命科学揭示“生命现象”的实践中发挥着重要作用。近年来自由基医学的飞速发展正说明这一点。目前,自由基医学基础研究迅速向临床医学渗透,自由基在疾病发生发展中的作用越来越引起生命科学及相关学科工作者的关注。新理论的提出,给方法学提出了新的要求,新技术的出现反过来推动着学科的发展。在自由基医学飞速发展的形势下,新的研究方法不断涌现,大有日新月异之势。我研究室亦不断收到询问有关研究方法的来电来函。有鉴于此,我们将我室常用的实验技术以及随着学科发展新出现的研究方法汇编成册,作一系统介绍,以与同道们交流。相信该书的出版无疑将对我国自由基医学研究起到促进和推动作用。

本书对每一方法的原理、操作步骤和注意事项都作了较详细的介绍。总体来说本书具有两大特点:一是对常见观察指标的测定方法加以扩充,特别注意对新近出现的灵敏度更高、准确性更好的方法的收入,以供研究者根据自己实验条件和实验目的加以选择;二是对随学科发展新出现的一批针对新研究指标的研究方法予以介绍,为研究者今后的研究需要和发展留有余地。因此,本书内容体现了自由基医学研究方法的广度和深度,它反映了当前自由基医学研究的新进展。

本书撰稿过程中,虽力求准确,但由于时间仓促和水平所限,书中缺点和错误在所难免,恳请同行专家和读者批评指正。

陈 瓊

1999.11.20

于广州第一军医大学自由基医学研究室

目 录

第一章 活性氧的制备	(1)
第一节 超氧阴离子	(1)
第二节 羟自由基	(2)
第三节 单线态氧	(3)
第四节 脂自由基	(5)
第五节 ONOO^-	(5)
第二章 活性氧的测定方法	(7)
第一节 电子自旋共振法的应用	(7)
一、ESR 标本处理方法	(7)
1. 冷冻法	(7)
2. 冰冻干燥法	(7)
3. 冷冻成形法	(7)
4. 直接测定法	(8)
二、自旋捕捉技术及样品制备	(8)
第二节 羟自由基的测定	(9)
一、高效液相色谱法	(9)
二、化学发光法	(11)
1. 邻菲罗啉化学发光法	(11)
2. 酵母化学发光法	(12)
三、荧光分析法	(13)
四、分光光度法	(14)
1. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法	(14)
2. 细胞色素 C 氧化法	(15)
3. 水杨酸比色法	(16)
五、气相色谱法	(17)
第三节 过氧化氢的测定	(18)
一、分光光度法	(18)

1. 碘化钾比色法	(18)
2. 四氯化钛法	(19)
3. Fe^{3+} -邻二氮菲分光光度法	(20)
4. 非酶法	(21)
5. 其他分光光度法	(22)
二、辣根过氧化物酶法	(22)
1. HRP-酚红法	(22)
2. HRP-荧光法	(23)
3. HRP-DCF 荧光法	(24)
4. 过氧化物酶-氧化酶法	(26)
三、NADPH 氧化法	(27)
1. GSH-NADPH 氧化法	(27)
2. Scopoletin-NADPH 氧化法	(29)
四、化学发光法	(30)
1. TCPO-ANS 化学发光法	(30)
2. 鲁米诺化学发光法	(30)
3. TCPO-TEA 化学发光法	(31)
五、DMTU 消耗法	(32)
六、组织化学法	(32)
第四节 超氧阴离子的测定	(32)
一、NBT 还原法	(32)
二、高铁细胞色素 C 还原法	(34)
三、荧光法	(35)
第五节 单线态氧的检测	(35)
一、发光检测法	(36)
1. 直接检测发光法	(36)
2. OH^- -NaOCl- H_2O_2 -红细胞影泡体系	(36)
3. 海萤荧光素发光体系	(37)
二、ESR 法	(38)
三、荧光分光光度法	(39)
四、高效液相色谱法	(40)
第六节 呼吸爆发的测定	(41)
一、流式细胞术	(41)
二、共聚焦显微镜法	(42)
 第三章 氧化型低密度脂蛋白	 (47)

第一节 低密度脂蛋白的提纯	(47)
一、低密度脂蛋白的提取	(47)
1. 超速离心法	(47)
2. 区带离心法	(48)
3. 沉淀法	(50)
二、纯度鉴定	(51)
第二节 低密度脂蛋白的氧化	(51)
一、LDL 的氧化修饰	(51)
1. 铜诱导法	(51)
2. 铁诱导法	(52)
3. 巨噬细胞修饰	(52)
4. 自由基释放剂法	(53)
5. 丙二醛修饰法	(53)
二、LDL 氧化修饰度鉴定	(54)
第三节 氧化型低密度脂蛋白定量	(55)
一、Ox-LDL 的检测	(56)
二、自身抗体的测定	(57)
 第四章 脂质过氧化	(60)
第一节 脂质过氧化底物的检测	(60)
一、氧气的利用	(60)
二、多不饱和脂肪酸	(60)
第二节 脂自由基的检测	(61)
一、ESR 及自旋捕集法	(61)
二、化学发光法	(61)
第三节 TBA 反应物质的检测	(61)
一、TBA 比色法	(62)
二、TBA 荧光法	(64)
三、组织中过氧化脂质的测定	(65)
四、血清 LPO 测定	(66)
第四节 醛类终产物的检测	(67)
一、DNPH 法	(67)
二、HPLC 法	(68)
三、GC-MS 法	(69)
四、CHD 法	(70)
第五节 脂氢过氧化物的检测	(71)

一、碘量法	(71)
二、谷胱甘肽过氧化物酶法	(73)
三、FOX 法	(74)
四、氧化还原比色法	(77)
五、亚甲基蓝法	(78)
六、环加氧酶法	(79)
七、二氯荧光素法	(81)
第六节 荧光产物的检测	(81)
一、组织匀浆与亚细胞成分中的荧光物质测定	(81)
二、血清水溶性脂质过氧化物测定	(83)
第七节 烃类气体的测定	(84)
一、乙烷的测定	(84)
二、戊烷的测定	(86)
第八节 共轭二烯的检测	(87)
第九节 蛋白质羰基化合物的检测	(88)
一、氢硼化物还原法	(89)
二、DNPH 比色法	(90)
三、免疫印迹法	(91)
第十节 非酶糖化蛋白的测定	(94)
一、硫代巴比妥酸法	(95)
二、果糖胺测定	(96)
三、改良过碘酸钠法	(97)
四、葡萄糖苯脲分光光度法(GPS 法)	(98)
五、荧光法	(99)
六、电泳及等电聚焦法	(100)
1. 等电聚焦电泳法	(100)
2. 琼脂糖电泳法	(101)
七、离子交换层析法	(102)
八、亲和层析法	(102)
九、放射免疫法(RIA)	(103)
十、酶联免疫测定法(ELISA)	(103)
 第五章 超氧化物歧化酶	(106)
第一节 酶活性测定	(106)
一、直接法	(106)
1. 脉冲辐射分析法	(107)

2. 肾上腺素法	(107)
3. 改良 Marklund 法	(108)
4. 联苯三酚自氧化法	(110)
5. 没食子酸法	(112)
6. 6-羟多巴胺法	(113)
7. 亚硫酸盐法	(114)
二、一般化学法	(114)
1. 细胞色素 C 还原法(McCord 法)	(114)
2. 核黄素-NBT 还原法	(117)
3. 黄嘌呤氧化酶-NBT 还原法	(118)
4. MTT 法	(120)
5. 亚硝酸盐形成法	(121)
6. 化学发光法	(123)
7. 碱性二甲亚砷法	(125)
8. 四硝基甲烷还原法	(126)
三、光氧化增强法	(126)
四、电化学法	(128)
五、极谱氧电极法	(128)
六、免疫学方法	(130)
1. 液相竞争放免法(RIA)	(130)
2. 化学发光免疫分析法(CLIA)	(132)
3. ELISA 方法	(134)
七、电泳法	(135)
八、原位法	(136)
第二节 MnSOD、FeSOD 的鉴别与活力测定	(138)
一、MnSOD 活性的测定	(138)
1. 氰化物抑制法	(138)
2. SDS 法	(139)
3. 不同 pH 值法	(139)
4. DDC 法	(139)
5. 其他方法	(140)
二、FeSOD 活性测定	(140)
第三节 SOD 的纯化	(140)
一、CuZnSOD 的纯化	(140)
1. 从牛红细胞提纯 CuZnSOD	(140)
2. 从植物中提取 CuZnSOD	(141)

3. 从酵母中提取 SOD	(141)
二、MnSOD 的纯化	(142)
三、FeSOD 的纯化	(143)
四、SOD 纯度鉴定	(144)
第六章 谷胱甘肽过氧化物酶	(147)
第一节 含硒酶活性测定	(147)
一、DTNB 直接显色法	(147)
二、酶偶联法	(151)
三、荧光测定法	(152)
四、PHGPx 酶活性测定方法	(155)
第二节 不含硒酶活性测定	(155)
第三节 细胞外 GPx 酶含量测定	(155)
第四节 酶的提取与纯化	(156)
一、亲和层析法	(156)
二、一般层析法	(159)
三、人红细胞 GPx 的纯化	(160)
第七章 过氧化氢酶	(163)
第一节 活性测定	(163)
一、钼酸铵比色法	(163)
二、快速简便法	(165)
三、紫外速率直接法	(166)
四、改良比色法	(168)
五、过硼酸盐底物法	(169)
六、化学发光法	(170)
七、氧电极法	(171)
八、检压测定法	(173)
九、滴定法	(175)
十、原位负染色法	(176)
第二节 提取与纯化	(177)
一、酵母过氧化氢酶的提纯	(177)
二、组织过氧化氢酶的提纯	(179)
第八章 谷胱甘肽代谢酶类	(182)
第一节 谷胱甘肽还原酶	(182)

一、活性测定	(182)
1. 分光光度法	(182)
2. DTNB 法	(183)
3. 电泳法	(185)
4. 荧光法	(186)
二、分离与纯化	(188)
1. 红细胞谷胱甘肽还原酶的纯化	(188)
2. 组织谷胱甘肽还原酶的纯化	(190)
3. 酵母谷胱甘肽还原酶的提纯	(191)
4. 两步层析法	(192)
第二节 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶	(192)
一、活性测定——放射性同位素法	(193)
二、提取与纯化	(195)
第三节 谷胱甘肽合成酶	(196)
一、活性测定——放射性同位素法	(196)
二、提取与纯化	(198)
第九章 谷胱甘肽转硫酶	(201)
第一节 活力测定	(201)
一、动力学法	(201)
二、CDNB 比色法	(202)
三、mBrB 法	(204)
四、BPO 法	(205)
五、NBD-Cl 法	(206)
第二节 同工酶分析	(207)
一、放射免疫分析	(207)
二、免疫金银法	(208)
三、等电点聚焦电泳法	(209)
四、碘染凝胶法	(210)
五、负染凝胶法	(211)
第三节 分离与纯化	(212)
一、Reddy's 法	(213)
二、碱性 GST 的纯化	(215)
三、酸性 GST 的纯化	(215)
1. 亲和层析法	(215)
2. 改良 Kwak 和 Bark 法	(217)

第十章 一氧化氮与一氧化氮合酶	(221)
第一节 一氧化氮含量测定	(221)
一、微电极法	(221)
二、EPR 法	(223)
三、Griess 试剂法	(224)
四、改良微盘测定法	(226)
五、化学发光法	(228)
六、液体充气鲁米诺化学发光法	(229)
七、荧光分光光度法	(231)
八、NACNO 荧光分析法	(233)
九、硝酸盐还原酶法	(234)
十、硝酸盐还原酶偶联法	(235)
十一、示波极谱测定法	(237)
十二、催化光度法	(239)
十三、全血 NO 代谢产物的测定	(240)
十四、流式细胞术测定 NO 含量	(242)
第二节 NOS 活性测定	(243)
一、NOS 样品制备	(243)
1. 组织匀浆	(243)
2. Bredt's 法纯化 NOS	(244)
3. Mayer's 法纯化 NOS	(244)
4. 硫酸铵沉淀法制备 NOS	(245)
二、测定方法	(246)
1. 化学发光法	(246)
2. 放射强度测定法	(247)
3. 血红蛋白法	(249)
4. 荧光分析法	(250)
5. 薄层层析法	(251)
6. NADP ⁺ 检测法	(252)
第三节 NOS 组化技术	(253)
一、黄递酶组化法	(253)
二、荧光染色法	(254)
第四节 ONOO⁻ 的检测	(255)
一、直接法	(255)
二、间接法	(256)

第十一章 谷胱甘肽	(259)
第一节 还原型谷胱甘肽测定	(259)
一、改良比色法	(259)
二、Beutler 改良法	(260)
三、荧光测定法	(261)
四、改良荧光法	(262)
五、高效液相层析法	(263)
第二节 总谷胱甘肽的测定	(264)
一、循环法	(264)
二、Tietze's 法	(266)
第三节 氧化型谷胱甘肽的测定	(268)
一、乙二醛酶 I 法	(268)
二、NEM 过柱法	(269)
三、碱水解法	(269)
四、荧光法	(270)
五、2-VP 法	(271)
第十二章 其他抗氧化物质	(273)
第一节 总抗氧化能力	(273)
一、ORAC 测定	(273)
二、FRAP 测定	(275)
三、TRAP 测定	(276)
第二节 抗坏血酸	(277)
一、分光光度法	(278)
1. 动力学比色法	(279)
2. DNPH 比色法	(280)
3. 固蓝盐 B 分光光度法	(282)
二、荧光分析法	(283)
三、气相色谱法	(285)
四、氧化酶法	(285)
五、高效液相色谱法	(285)
1. HPLC/uv 法	(286)
2. HPLC/EC 法	(286)
第三节 维生素 E	(287)
一、荧光法	(287)

二、HPLC-分光光度法	(289)
三、HPLC-荧光分析法	(290)
第四节 辅酶 Q	(292)
第五节 铜蓝蛋白	(293)
一、DPPD 法	(293)
二、TMB 法	(294)
三、ELISA 法	(295)
四、放免法	(296)
五、火箭电泳法	(297)
第六节 尿酸	(298)
一、磷钨酸还原法	(298)
二、Fe ²⁺ 氧化比色法	(298)
三、结晶紫比色法	(300)
四、340nm 分析法	(301)
五、293nm 分析法	(302)
六、DHBS 比色法	(303)
七、耗氧率分析法	(304)
 第十三章 细胞氧化损伤	(307)
第一节 细胞活力检测	(307)
第二节 DNA 损伤检测	(308)
一、DNA 断裂的定性分析	(308)
二、DNA 断裂的定量分析	(308)
1. 二苯胺法	(308)
2. 荧光分光光度法	(309)
3. Comet 法	(310)
第三节 细胞膜流动性测定	(311)
 第十四章 氧化应激与基因表达	(315)
第一节 基因表达的检测	(315)
一、RT-PCR	(315)
二、斑点(狭缝)杂交	(316)
三、其他方法	(321)
第二节 NF- κ B 的检测	(321)
一、EMSA 法	(321)
二、共聚焦显微镜法	(322)

三、原位法	(323)
第十五章 相关研究方法	(326)
一、脂质体转染方法	(326)
二、Lowry's 法测蛋白	(327)
三、细胞数定量	(328)
附录	(329)
一、离心机转速与离心力的换算	(329)
二、常用缓冲液的配制	(329)
1. 常用缓冲液介质的 pKa 值	(329)
2. Tris-HCl 缓冲液	(329)
3. 温度对 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 值的影响	(330)
4. 磷酸钾缓冲液	(331)
5. 磷酸钠缓冲液	(331)
6. 甘氨酸缓冲液	(331)
7. 硼砂-盐酸缓冲液	(332)
8. 硼砂-硼酸缓冲液	(333)
9. 巴比妥钠-盐酸缓冲液	(333)
10. 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液	(333)
11. 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液	(334)
12. 醋酸盐缓冲液	(334)
13. 碳酸盐缓冲液	(334)
14. 咪唑-HCl 缓冲液	(335)
15. KCl-HCl 缓冲液	(335)
16. KCl-NaOH 缓冲液	(336)
17. 马来酸氢钠-NaOH 缓冲液	(336)
18. 平衡盐溶液	(336)
三、重铬酸盐清洁液配制方法	(337)
四、放射性核素数据	(337)
1. 放射性核素测量单位	(337)
2. 放射性核素衰变表	(337)
五、常见市售酸碱的浓度	(338)
六、常用电泳缓冲液	(338)
七、凝胶加样缓冲液	(339)
八、常用层析数据	(340)

1. 常用阴离子交换纤维素	(340)
2. 阳离子交换纤维素	(340)
3. 琼脂糖凝胶的技术数据	(340)
4. 葡聚糖凝胶(Sephadex)的技术数据	(340)
5. 各种凝胶允许的最大操作压	(341)

第一章 活性氧的制备

为考察活性氧对细胞的损伤,或检测抗氧化剂对特定活性氧的清除作用,建立体外实验的活性氧产生体系是关键步骤。事实上,活性氧的体外实验产生方法的理论基础与机体内活性氧的产生过程相同,以下就各种活性氧的生成方法进行简述。

第一节 超氧阴离子

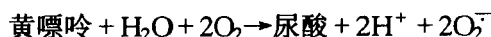
超氧阴离子是氧分子(O_2)的单电子还原产物,带有一个负电荷又具有一个未配对电子,其既是阴离子,又是自由基。超氧阴离子自由基包括 O_2^- 和 HO_2^- , O_2^- 可与质子发生可逆反应,其反应式为: $O_2^- + H^+ \leftrightarrow HO_2^-$

体外实验中, O_2^- 的生成体系可分为两类:酶促反应及非酶促反应。

1. 酶促反应法

许多氧化酶均可促使 O_2 发生单电子还原,形成 O_2^- 。这类氧化酶包括黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶、NADPH 氧化酶、谷胱甘肽还原酶、二胺氧化酶、二氢乳清酸脱氢酶、NADPH-细胞色素氧化酶、铁氧还蛋白-NADP 还原酶等,其中最常用的是黄嘌呤氧化酶。

由黄嘌呤氧化酶催化生成 O_2^- 的反应如下:



2. 自氧化法

包括一些蛋白质、低分子化合物在内的物质自动氧化,可以产生 O_2^- 。自氧化能产生 O_2^- 的蛋白质有:血红蛋白、肌红蛋白等。血红蛋白和肌红蛋白自动氧化时,首先形成氧合血红蛋白和氧合肌红蛋白,随后一个电子从 Fe^{2+} 转移至 O_2 ,于是高铁血红蛋白和高铁肌红蛋白分别变为高铁血红蛋白和高铁肌红蛋白,而 O_2 则变为 O_2^- 。

自氧化可产生 O_2^- 的低分子化合物包括:黄素单核苷酸(FMN)、辅酶 I (NAD)、6-羟多巴胺、6,7-二羟色胺、5-羟巴比妥酸、四氢蝶啶、二硫苏糖醇、二吡啶基化合物、亚甲蓝、硝基咪唑、链黑菌素、肾上腺素、焦性没食子酸、维生素 K_3 、维生素 C、硫醇等,可利用这些物质建立体外实验的 O_2^- 产生体系。

3. 物理法

将通入空气的 H_2O_2 溶液置于波长小于 200nm 的紫外线下照射可产生羟自由基($\cdot OH$),羟自由基与 H_2O_2 反应可生成 H_2O 与 HO_2^- 。在 pH 大于 7 的实验条件下,一部分