

现代生物化学方法

[苏] B. H. 奥列霍维奇等编著
袁厚积 赵邦悌 合译

人民教育出版社

现代生物化学方法

〔苏〕B.H. 奥列霍维奇等编著

袁厚积 赵邦梯 合译

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京新华印刷厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 12 字数 289,000

1980年9月第1版 1981年9月第1次印刷

印数 00,001—7,000

书号 13012·0514 定价 1.10 元

译者前言

《现代生物化学方法》一书是由苏联医学科学院院士B. H. Орехович主编的,全书分68节,每节都叙述一个或几个现代生物化学常用方法。这些方法大体上可以分成三类:一类是人及动物组织中与含氮物质及碳水化合物氧化有关的酶与产物的研究法。一类是具有生物活性的多肽与蛋白质及与这类物质代谢有关的酶类的研究法。一类是动物组织中蛋白质生物合成的研究法。这些方法中包括近年发展起来的一些十分重要的生物化学方法,例如:亲和层析、免疫化学技术、mRNA的纯化法、蛋白质合成的无细胞体系等等。每个方法都是由从事这方面工作的专家撰写的,所以对实验操作中的一些重要细节也一一作了叙述,使读者应用这些方法时格外方便。

本书可供从事生物化学及临床生物化学的工作者参考之用。

全书由袁厚积(复旦大学)与赵邦悌(北京大学)两人合译。第一部分及第二部分的前7节由赵邦悌翻译,袁厚积校对,其余部分由袁厚积翻译,赵邦悌校对。由于水平所限,错误之处在所难免,希读者批评指正。

一九八〇年七月

序 言

在1964和1968年由苏联医学科学院生物化学和医学化学研究所编写出版了《生物化学现代方法》丛书中的两本书，在第一本书的序言中指出，生物化学方法的数量很大，并且它们的数量每年都有增加，至于某些很有名的方法的改良法数量就更多了。毫无疑问，随着许多新方法的出现，大量的过去所发表的方法由于其专一性差，不够灵敏，过分的复杂性或者某些试剂难以得到而已失去其本身的意义。要把杂乱无章的一大堆方法介绍阐述清楚，对从事某一方面生物化学研究的大专家来说也是困难的，而对年轻的研究人员来说要独立的完成此项任务更是困难。考虑到上述原因，研究所提出了有系统地出版这套书的任务，在这套丛书内论述了生物化学研究最有效和最专一的方法。

第一卷有廿六篇，在这当中详细地叙述了蛋白质和核酸以及这些生物高分子物质的基本组成成分的主要提取方法和物化性质。

这套丛书的第二卷专门叙述亚细胞结构和细胞化学成分及生物体体液的测定方法和性质鉴定。

第三卷材料所叙述的特点根本上有别于上述二卷，如果在第一、二卷大部分章节中是叙述各个方法以及综合方法的理论基础，和详细地叙述关于所用仪器的实际数据等等，那么在第三卷中是以非常扼要的形式着重注意叙述实验技术，这样就有可能叙述68种方法而不是象过去所出版的两卷中每卷内仅能叙述20~25种方法。蛋白质生物合成机理研究方面活跃的研究工作促进了新方法的建立，这些新方法能更有效和高质量地解决这个问题。因此，

很自然本书的编者对动物细胞的蛋白质合成系统研究方法的叙述加以更多的注意,这样的方法有17个,占本书所发表的方法总数的25%。它们是《多肽链合成时间的测定方法》,《分离单种多聚核糖体的免疫化学方法》,《Krebs-2腹水癌细胞无细胞蛋白质合成系统》,《胶原蛋白和其它蛋白质生物合成的无细胞微粒体系统》等等。

本书中很多地方是叙述酶的化学与酶的生物化学方法。这当中必须注意许多氮代谢酶的研究方法和碳水化合物代谢的研究方法,这些方法对先天性代谢疾病的诊断是有很大的意义,在这里应该指出下列的方法:《生物体液酮糖的测定》,《人肠粘膜二糖分解酶类活力的测定》,《糖原积累症的生化诊断方法》,《用于胎儿期Tay-Sachs症诊断的氨基己糖苷酶A活力测定方法》等等。

作者企图扼要而简明地叙述一些示范实验,以便不仅对生物化学和医学专业知识造诣较深的专家,而且也对刚开始从事科学研究的工作者,研究生,实习医生,高年级的大学生能够没有多大困难地能重复任何一种方法。

本书的末尾附有下列图解,此图解表明了离心时根据转速(转数/分)和离心机转头的半径(厘米)来确定离心时的g值。

苏联医学科学院院士 В. Н. Орехович 教授

目 录

序言.....	1
---------	---

第 一 部 分

氮代谢、氧化及碳水化合物代谢的酶类的研究法	1
-----------------------------	---

二胺氧化酶活力的比色测定法

——М. И. Турков, Г. И. Климова, Г. А. Давыдова, К. М. Ермолаев, В. З. Горкин.....	1
---	---

猪肾二胺氧化酶的提纯

——Л. Н. Стесина	5
-----------------------	---

猪肾二胺氧化酶提纯的改良法

——Г. И. Климова	8
-----------------------	---

用二氯异三聚氰酸反应测定线粒体单胺氧化酶的活力

——Р. С. Кривченкова.....	11
--------------------------	----

用对-硝基苯乙胺作底物测定单胺氧化酶的活力

——Г. Д. Исаханян, Ж. И. Акопян	14
--------------------------------------	----

动物组织线粒体单胺氧化酶的溶解及纯化 16 |

用无离子去污剂溶解和纯化公牛脑组织单胺氧化酶

——Т. А. Москвитина	16
--------------------------	----

用无离子去污剂溶解与纯化公牛肝脏单胺氧化酶

——Ж. И. Акопян	20
----------------------	----

用超声波与无离子去污剂联合溶解和纯化大鼠肝脏单胺氧化酶

——И. С. Северина.....	24
-----------------------	----

用丁酮溶解和纯化猪肝单胺氧化酶

——И. С. Северина.....	28
-----------------------	----

测定腺苷酸脱氨酶活力的电位滴定法

——В. А. Пеккель, Ж. И. Аюпян	31
大鼠骨骼肌腺苷酸脱氨酶的纯化	
——Ж. И. Аюпян, А. З. Киркель	34
线粒体悬浮液中琥珀酸脱氢酶活力的测定	
——Р. С. Кривченкова	37
线粒体悬浮液中细胞色素氧化酶活力的测定	
——Р. С. Кривченкова	39
肝脏微粒体组分的分离及其氧化系统的特性	
——И. И. Карузина, А. И. Арчаков	42
动物组织中脂类物质的某些过氧化产物的测定方法	54
不饱和高级脂肪酸二烯轭合作用的测定方法	
——И. Д. Стальная	55
用硫氰酸铵测定脂类过氧化物的方法	
——Л. А. Романова, И. Д. Стальная	56
用硫巴比妥酸测定丙二酸二醛的方法	
——И. Д. Стальная, Т. Г. Гаршвили	58
用大肠杆菌色氨酸酶蛋白测定 5'-磷酸吡哆醛的微量酶学方法	
——Ю. В. Букин, А. В. Сергеев	60
测定哺乳动物及人体组织中磷酸吡哆醛激酶活力的微量方法	
——Ю. В. Букин	67
哺乳动物组织中丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定	
——А. В. Сергеев	72
尿及血清中精氨酸含量的测定方法	
——Л. П. Алексеенко	77
生物体液及组织中 pH, pNa ⁺ , pK ⁺ 的动力学研究	
——Е. А. Юматов	82
糖原磷酸化酶活力的测定	
——Е. В. Раменский	89
用葡聚糖凝胶(Sephadex)亲和层析从人体及动物组织中分离	

酸性 α -葡萄糖苷酶(γ -淀粉酶)的方法	
——Д. М. Беленький	94
经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的酶制剂中酸性 α -葡萄糖苷酶 (γ - 淀粉酶)的麦芽糖酶活力和葡萄糖淀粉酶活力的测定方法	
——Д. М. Беленький	98
游离的及结合的 6-脱氧己糖的测定方法	
——Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба	103
生物体液酮糖的测定	
——В. К. Городецкий, В. И. Михайлов	110
人肠粘膜二糖分解酶类活力的测定	
——И. С. Лукомская	116
用于胎儿期 Tay-Sachs 症诊断及检出疾病的杂合子携带者的 N-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 活力的测定法	
——И. В. Цветкова, А. Б. Козина	120
糖原积累症的生化诊断方法	
——И. А. Папова, И. В. Чибисов	124

第 二 部 分

生物活性肽、蛋白质及参与这些肽及蛋白质代谢的酶的 研究方法	135
根据血管紧张肽 I 的三肽测定人血清中羧基组织蛋白酶(肽酰- 二肽酶)的活力的灵敏荧光法	
——Л. В. Павлихина, Ю. Е. Елисеева, В. Ф. Позд- нев, В. Н. Орехович	135
从蛋白质胶(生产人 γ -球蛋白时的废渣)提取血管紧张肽原	
——Л. П. Алексеенко	139
人血清(血浆)中激肽释放酶和激肽释放酶原的定量测定	
——Т. С. Пасхина, А. В. Кринская	145
从人血清制备部分纯化的激肽释放酶制剂	

——А. В. Кринская, Т. С. Пасхина.....	150
从兔血清制备高度纯化的激肽原	
——Т. П. Егорова, Л. Г. Макевнина, Е. Б. Россинская, Т. С. Пасхина	158
人血中羧肽酶N (激肽酶 I) 的酯酶活力的测定。马尿酸-L-精氨酸的合成	
——С. С. Трапезникова, Е. Б. Россинская, Б. Л. Крайнова, Е. С. Чаман, Т. С. Пасхина	167
人血清抗胰蛋白酶活力的测定	
——В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина	176
从兔血清制备高度纯化的热稳定和酸稳定的胰蛋白酶抑制剂	
——В. Ф. Нартикова, О. Г. Оглоблина, Р. И. Якубовская, Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина.....	179
新的测定蛋白酶活力的微量方法	
——Л. П. Алексеенко.....	192
亲和层析(生物学上专一的层析)	
——О. В. Казакова	201
用 5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸比色法测定蛋白质的一SH基和—S—S—键	
——И. В. Веревкина, А. И. Точилкин, Н. А. Попова	209
生物多聚物经醋酸纤维素薄膜超过滤	
——Л. В. Воробьев, Р. И. Гвоздев	217
鱼精蛋白硫酸盐商品制剂的纯化和利用它们来提取核酸、酸性和碱性蛋白	
——Р. И. Гвоздев, А. В. Татьянаенко, З. П. Белова, А. П. Садков.....	222
血红蛋白的醋酸纤维素电泳	
——О. В. Троицкая.....	227

用超离心法分离人血清脂蛋白的组分	
——Е. Н. Левитова	233
从菜豆种子中提取植物血球凝集素	
——И. М. Карманский	238
测定植物血球凝集素的淋巴细胞刺激活性的方法	
——Н. Н. Голубева	241
根据羟脯氨酸测定胶原蛋白含量的方法	
——Т. В. Замараева	246
以 ^{14}C -羟脯氨酸的测定作为模式体系研究胶原蛋白合成的 一个方法	
——Т. В. Замараева	248
胶原蛋白脯氨酸-羟化酶活力的测定	
——Т. В. Замараева	253
从细菌胶原蛋白酶除去其他蛋白质水解酶杂质的方法	
——А. Е. Берман, Т. А. Оборотова	256

第 三 部 分

研究动物细胞蛋白质合成系统的方法	260
多肽链合成时间的测定方法	
——В. Л. Лейтин, М. И. Лерман	260
能阻碍动物细胞蛋白质合成系统的抗癌化合物的作用机理分 析方法	
——О. Ю. Абакумова	268
分离单种多聚核糖体的免疫化学方法	
——Е. В. Сидорова, М. Г. Трудюлюбова	275
提取游离的和与细胞质网膜结合的多聚核糖体的方法	
——А. Е. Берман	283
从 80 S 核糖体制备有生物活性的核糖体亚基的方法	
——О. Ю. Абакумова	285

心肌核糖体的提取与研究	
——М. П. Явич	291
动物细胞的亚细胞组分中 RNA 和 DNA 的定量测定	
——М. Г. Трудюлюбова	296
从哺乳动物细胞中提取和纯化含有多聚(A)的 mRNA 的方法	
——Е. В. Любимова, О. В. Подобед	298
心肌 RNA 分解过程的研究	
——М. П. Явич	304
动物细胞质膜的提取	
——А. В. Поспелова	308
细胞质网膜的提取法	
——А. Д. Златопольский	310
鼠的唾液腺神经组织生长因子的提取	
——Н. А. Кузьмичева	317
用微孔滤膜分级分离标记的细胞大分子的方法	
——О. Ю. Абакумова	320
放射自显影方法	
——И. Д. Беляева	325
大鼠肝脏组蛋白的分级分离	
——Н. В. Смирнова	330
胶原蛋白和其他蛋白质生物合成的无细胞微粒体系统	
——А. Е. Берман	333
Krebs-2 腹水癌细胞无细胞蛋白质合成系统	
——Т. Ю. Угарова	338
附录	350
参考文献	352

第一部分

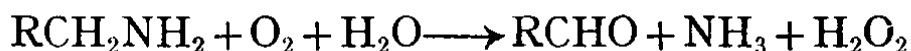
氮代谢、氧化及碳水化合物 代谢的酶类的研究法

二胺氧化酶活力的比色测定法

М. И. Турков, Г. И. Климова 等

方法的原理

二胺氧化酶(DAO)胺: O_2 -氧化还原酶(脱氨基的酶)(含磷酸吡哆醛的酶), EC 1.4.3.6, 催化以下反应:



式中的R代表脂肪族二胺类、组胺类及某些其它的胺类, 其中包括4-硝基苄基胺(Zeller, 1972)。

试样中所形成的4-硝基苯醛被定量地转变成它的4-硝基苯腙。可以在碱性条件下用波长 590 nm 测定光密度值来计算4-硝基苯腙的浓度。

试 剂

4-硝基苄基溴(纯)。

4-硝基苯肼(纯)。

4-硝基苯醛(纯)。

水合肼(分析纯)。

N, N-二甲基甲酰胺。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)(纯«Serva»)。

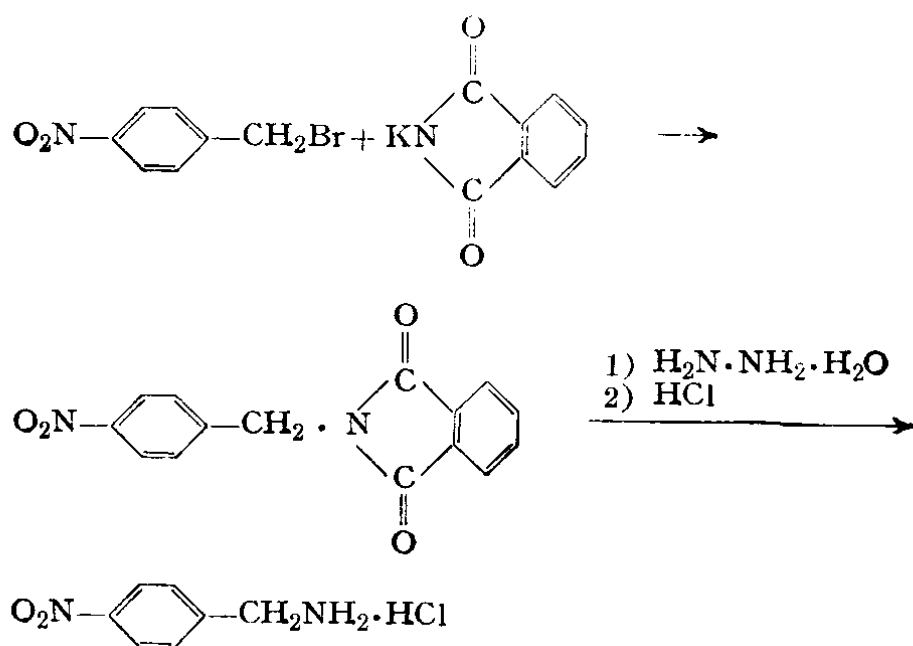
氢氧化钾(纯)用以制备 50% KOH 水溶液。

乙醇(96%)。

盐酸—浓盐酸、10%盐酸及 0.1 M 盐酸。

苯邻二酰亚胺钾。

4 硝基苄基胺盐酸盐的制备



将 2.16 克(0.01M)4-硝基苄基溴(纯,用乙醇重结晶,熔点为 90~100°C)溶于 20 毫升新重蒸的 N,N-二甲基甲酰胺中,并在室温中与 1.85 克(0.01M)的苯邻二酰亚胺钾(悬浮在 10 毫升 N,N-二甲基甲酰胺中)相混合。反应温度提高到 45°C。将反应混合物在室温中放置过夜,过滤除去溴化钾沉淀,将滤液在真空中蒸发浓缩。将残留物(1.6 克)转移到一个带有搅拌器、冷凝管及滴液漏斗的三角烧瓶中,加入 30 毫升乙醇,加热至沸,在充分搅拌下,用滴液漏斗逐滴加入 5 毫升水合苯肼的乙醇溶液(0.5 克水合苯肼溶于 5 毫升乙醇中)。可以见到有白色乳酪状沉淀形成。然后加入 5 毫升浓盐酸,沸腾 3 小时。冷却至室温后将沉淀过滤,并将滤液加热,蒸发至干。将残留物(900 毫克)溶于 20 毫升水中,用碱的水溶液使它碱化到 pH 10.0,用乙醚抽提。将乙醚抽提液(30 毫升)合并后,将它与 15 毫升 10% 的盐酸一起振荡。将酸性抽提液

在真空中蒸发至干燥，将残留物在乙醇中结晶，得到 400 毫克(理论值的 23%) 白色片状结晶的 4-硝基苄基胺盐酸盐，其熔点为 $250\sim 252^{\circ}\text{C}$ 。

实验测得的数值(%): N——14.69; 14.90%; $\text{C}_7\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2$ 。计算值(%): N——15.07%。

4-硝基苯醛-4-硝基苯胺的制备

将 0.31 克(0.002 M) 4-硝基苯醛和 0.31 克(0.002 M) 4-硝基苯胺的混合物在 15 毫升乙醇中煮沸 5 分钟。冷却后，滤出胺的结晶，用乙醇洗涤后，再用乙醚加以洗涤，产率为 0.55 克(占理论值的 96.5%)。用 90 毫升正丙醇加以结晶后得到 0.45 克橙色结晶，熔点为 249°C 。

不含羰基化合物的乙醇的制备

0.5 升 96% 乙醇中加入 0.5 克 2,4-二硝基苯胺及数滴浓盐酸。将此混合物在一个带有冷凝管的一升烧瓶中在 $78\sim 79^{\circ}\text{C}$ 加热 10 小时。然后，在此同一温度下蒸馏除去乙醇(用砂浴或电炉丝上加有罩子的电炉!)。

4-硝基苯醛的测定

在几个磨口试管中各加入含有 4-硝基苯醛(每毫升 25 nM) 的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5) 0.4 毫升。对照管中加入相同体积的但不含 4-硝基苯醛的缓冲液。再在实验及对照管中各加入 0.2 毫升 0.1 M 盐酸(每毫升中含有 4-硝基苯胺 1500 nM)，及 0.30 毫升蒸馏水。试管中的 pH 值应为 2.5。用玻璃塞紧塞试管，摇匀后在 45°C 的水浴中保温 1 小时。然后各试管中加入 1.5 毫升不含羰基化合物的乙醇和 0.10 毫升 50% 氢氧化钾，仔细摇匀，

5~10 分钟后, 在波长 590 nm 下测量其光密度 (以对照管作空白)。根据标准曲线 (图 1) 确定样品中 4-硝基苯醛的含量。此标准曲线是根据人工合成的 4-硝基苯醛-4-硝基苯胺溶液在同样的条件下所测定的光密度值而制作的。

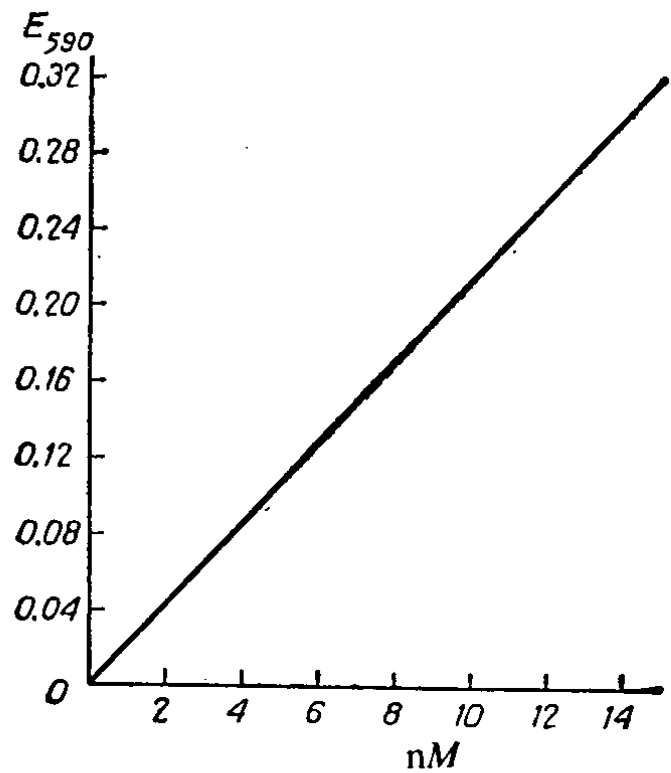


图 1 测定 4-硝基苯醛含量的标准曲线
纵座标—— E_{590} , 即 590nm 下的光密度; 横座标
——试样中 4-硝基苯醛的含量, 以 nM 表示

用 4-硝基苄基胺作为底物测定二胺氧化酶的活力

可用比活力为每毫克蛋白质在一分钟内可以氧化 400 nM 丁二胺的二胺氧化酶纯品作为研究材料的实例 (Е. В. Горяченкова и др., 1967)。

在磨口试管中加入 0.05 毫升研究材料 (5 微克二胺氧化酶纯制剂)、0.4 毫升 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 及 0.05 毫升 4-硝基苄基胺水溶液 (每毫升 5000 nM), 最终体积为 0.5 毫升。加磨口塞子, 在 37°C 水浴中保温 20 分钟。保温后, 试管中加入 4-硝

基苯肼盐酸溶液以终止酶反应。盐酸的浓度应事先计算好,使它正好能将试样的 pH 值调到 2.5。对照组中加入底物及 4-硝基苯肼后,即将酶失活后再保温。

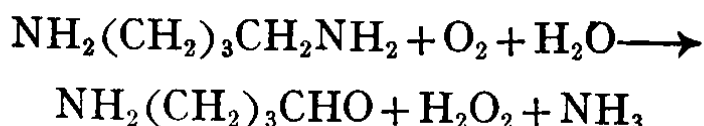
根据试样中 4-硝基苯醛形成的量来确定二胺氧化酶之活力。4-硝基苯醛的测定法如前面所述。

猪肾二胺氧化酶的提纯

Л. Н. Стесина

二胺氧化酶活力的测定

原理 根据二胺氧化酶所催化的丁二胺(腐胺)-[1, 4]的氧化反应进行测定:



反应产物 4-氨基丁醛由于分子内的缩合而形成 Δ' -吡咯啉(二氢吡咯), Δ' -吡咯啉再与邻-氨基苯甲醛作用形成有颜色的化合物,它在 430 nm 处有最大的吸收(Holmstedt et al., 1961)。

试剂 50 mM 丁二胺(丁二胺-[1, 4]·2HCl)。饱和的邻-氨基苯甲醛水溶液。0.067 M 磷酸钠钾缓冲液(pH 7.5)。50% 三氯乙酸(TCA)。

操作过程 试管中加入 1 毫升缓冲液, 0.2 毫升丁二胺, 0.5 毫升饱和邻氨基苯甲醛水溶液, 0.05~0.2 毫升酶液, 用水补足至 2.8 毫升。将试样用氧饱和 1~2 分钟后在 37°C 保温 20~40 分钟(时间的长短取决于酶的活力)。加入 0.2 毫升 50% TCA 以终止反应。离心分离出沉淀在波长 430 nm 下测定其光密度(用 10 mm 比色杯, СФ-16 分光光度计)。以不加底物的试样作为对照。

按形成的氨量计算出已被氧化的丁二胺的量。氨量则按标准

曲线测定。所列的标准曲线是用含邻-氨基苯甲醛的试样中光密度的变化对在同一试样中用等温蒸馏后再用奈氏试剂处理的方法测得的氨量的曲线。

在上述试验条件下在 1 分钟内能催化氧化 1 nM 丁二胺的酶量定为二胺氧化酶的一个活力单位。以每毫克蛋白质所具有的活力单位表示比活力。蛋白质的浓度用克氏定氮法或按 Lowry 等 (1951) 的方法测定。

酶的提纯

从猪肾皮层的匀浆分离二胺氧化酶。分离的步骤包括：有控制的加热、硫酸铵盐析、DEAE-纤维素吸附、氢氧化铝凝胶吸附 (E. B. Горяченкова и др., 1967) 及生物凝胶 p-300 过滤。

匀浆的制备 新鲜的 (或在 -20°C 下贮存但不超过 10~12 天的) 猪肾, 除去髓质后在 Waring 匀浆器中在 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 6.8$) 中匀浆 5 分钟。应用 50% 的匀浆。

加热 所得匀浆在不断搅拌下在 60°C 水浴中加热 20 分钟。在 4000 g 下离心 10 分钟除去变性蛋白及细胞碎片的沉淀。

硫酸铵分级分离 向所得上清液在不断的搅拌和控制 pH 值的情况下加入结晶硫酸铵至 0.35 饱和度。加入 4% 的氨水使 pH 值保持在 6.8。加完硫酸铵后放置 3~4 小时, 然后以 4000 g 离心 10 分钟, 弃去沉淀, 向上清液加入硫酸铵至 0.50 饱和度, 放置 3~4 小时, 4000 g 离心 10 分钟, 弃去上清液, 然后将沉淀溶解于最小体积的 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 6.8$) 中。

再次加热 将所得酶液在 58°C 的水浴中在不断的搅拌下加热 10 分钟。然后 4000 g 离心 15 分钟以除去变性杂蛋白。将上清液对 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 7.0$) 透析至除尽铵离子为止。

DEAE-纤维素处理 将 DEAE-纤维素事先用 10 mM 磷酸