工具酶的活力测定

蒋传葵 金承德 吴仁龙 陶宗晋 编著

7435
图

海科学技术出版社

58.17435
720

工具酶的活力测定

蒋传葵　金承德
吴仁龙　陶宗晋　编著

中科院植物所图书馆
S0011920

上海科学技术出版社

23117

内 容 简 介

本书着重介绍生化研究、临床生化、生化分析等工作中常用的五十五种工具酶和辅酶的活力测定方法，并收集了它们的某些物理化学数据，以供参考。本书偏重实用，书中罗列的方法大部分经作者多年实践检验，成熟可用，读者参照本书即能进行工具酶的活力测定。附录内有蛋白质浓度的测定方法和常用缓冲液的配方，为测定提供方便。

本书可供工业、农业、医药卫生、国防、环境保护各领域中从事临床化学、食品化学、药物化学、生物化学和免疫学等工作的有关科技人员及大专院校师生参考。

工具酶的活力测定

蒋传葵　金承德
吴仁龙　陶宗晋　编著

上海科学技术出版社出版
（上海瑞金二路450号）
新华书店上海发行所发行　无锡县人民印刷厂印刷
开本 787×1092　1/32　印张 5.5　字数 117,000
1982年11月第1版　1982年11月第1次印刷
印数 1—4,600
统一书号：13119·1033　定价：（科五）0.64元

目　录

缩写符号
一、概说 …… 1
1．酶的定义和特性 …… 1
2．酶活力的定义和表示方式 …… 2
3．初速度 …… 3
4．测定酶活力的注意点 …… 6
二、各种酶的活力测定 …… 9
1．醇脱氢酶(ADH) (EC 1.1.1.1) …… 9
2．乳酸脱氢酶(LDH) (EC 1.1.1.27) ……11
3．苹果酸脱氢酶(MDH) (EC 1.1.1.37) ……14
4．葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH) (EC 1.1.1.49)……16
5．葡萄糖氧化酶(GOD) (EC 1.1.3.4) ……19
6．3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2.1.12) ……22
7．黄嘌呤氧化酶(XOD) (EC 1.2.3.2) ……25
8．L-氨基酸氧化酶(L-AOD) (EC 1.4.3.2) ……27
9．D-氨基酸氧化酶(D-AOD) (EC 1.4.3.3) ……29
10．胺氧化酶(MAO) (EC 1.4.3.4) ……31
11．尿酸氧化酶(URICASE) (EC 1.7.3.3)……33
12．过氧化氢酶(CTS) (EC 1.11.1.6) ……36
13．过氧化物酶(POD) (EC 1.11.1.7) ……38
14．谷丙转氨酶(GPT) (EC 2.6.1.2) ……40
15．己糖激酶(HK) (EC 2.7.1.1) ……43
16．丙酮酸激酶(PK) (EC 2.7.1.40)……46
17．肌酸激酶(CK) (EC 2.7.3.2) ……48

18. 脂肪酶(EC 3.1.1.3) ……51
19. 乙酰胆碱酯酶(AChE) (EC 3.1.1.7) ……54
20. 果胶酶(EC 3.1.1.11) ……57
21. 碱性磷酸酶(EC 3.1.3.1) ……60
22. 酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2) ……62
23. 磷酸二酯酶 I (EC 3.1.4.1) ……65
24. 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) (EC 3.1.21.1) ……67
25. 核糖核酸酶 T_1 (RNase T_1) (EC 3.1.27.3) ……69
26. 核糖核酸酶 A (RNase A) (EC 3.1.27.5) ……72
27. α-淀粉酶(EC 3.2.1.1) ……74
28. β-淀粉酶(EC 3.2.1.2) ……76
29. 纤维素酶(EC 3.2.1.4) ……79
30. 溶菌酶(EC 3.2.1.17) ……82
31. 神经氨酸苷酶(唾液酸酶)(EC 3.2.1.18) ……84
32. β-葡萄糖醛酸苷酶(EC 3.2.1.31) ……87
33. 透明质酸酶(HAse) (EC 32 .1.35) ……89
34. 氨肽酶(胞浆) (EC 3.4.11.1) ……92
35. 氨肽酶(微粒体) (EC 3.4.11.2) ……94
36. 羧肽酶 A (CPA) (EC 3.4.17.1) ……97
37. 羧肽酶 B (CPB) (EC 3.4.17.2) ……99
38. 胰凝乳蛋白酶(EC 3.4.21.1) …… 101
39. 胰蛋白酶(EC 3.4.21.4) …… 104
40. 激肽释放酶(EC 3.4.21.8) …… 107
41. 枯草杆菌蛋白水解酶(EC 3.4.21.14) …… 110
42. 木瓜蛋白酶(EC 3.4.22.2) …… 112
43. 胃蛋白酶(A)(EC 3.4.23.1) …… 114
44. 尿素酶(脲酶) (EC 3.5.1.5) …… 117
45. 氨基酰化酶(EC 3.5.1.14) …… 119
46. 精氨酸酶(EC 3.5.3.1) …… 125

47. 醛缩酶(ALD) (EC 4.1.2.13) …… 128
48. 柠檬酸合成酶(CS) (EC 4.1.3.7)…… 131
49. 碳酸酐酶(CHL) (EC 4.2.1.1)…… 133
50. 胰蛋白酶抑制剂(TPI) …… 135
51. 辅酶 I (NAD) (DPN) …… 138
52. 还原辅酶 I (NADH) (DPNH) …… 141
53. 辅酶II(NADP) (TPN) …… 143
54. 还原辅酶II (NADPH) (TPNH) …… 146
55. 氯化硫胺素焦磷酸盐(辅羧酶) (TPP) …… 149
三、附录 …… 152
(一)蛋白质浓度的测定方法 …… 152
(二)常用缓冲液的配置 …… 155
四、英文索引 …… 163

缩 写 符 号

A	光吸收
AChE	乙酰胆碱酯酶
ADH	醇脱氢酶
ADP	腺苷二磷酸
Ald	醛缩酶
AMP	腺苷-磷酸
ATP	腺苷三磷酸
BAEE	N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯
BTEE	N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯
CHL	碳酸酐酶
CK	肌酸激酶
Co I	辅酶 I
Co II	辅酶 II
CPA	羧肽酶 A
CPB	羧肽酶 B
CS	柠檬酸合成酶
CTS	过氧化氢酶
D-AOD	D-氨基酸氧化酶
DNA	脱氧核糖核酸
DNase	脱氧核糖核酸酶
DPN	辅酶 I
DPNH	还原辅酶 I
DTNB	二硫代双硝基苯甲酸
EDTA	乙二胺四乙酸
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸
GAPDH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
GOD	葡萄糖氧化酶
G-6-P	葡萄糖-6-磷酸
G-6-PDH	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
GPT	谷丙转氨酶
GTP	鸟苷三磷酸
HAse	透明质酸酶
HK	己糖激酶
L-AOD	L-氨基酸氧化酶
LAP	亮氨酸氨肽酶
LDH	乳酸脱氢酶
MAO	胺氧化酶
MDH	苹果酸脱氢酶
NAD	辅酶 I
NADH	还原辅酶 I
NADP	辅酶 II
NADPH	还原辅酶 II
PK	丙酮酸激酶
POD	过氧化物酶
RNA	核糖核酸
RNase	核糖核酸酶

TAME	对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯	TPP	氯化硫胺素焦磷酸盐（辅羧酶）
TNBS	三硝基苯磺酸	Tris	三羟甲基氨基甲烷
TPI	胰蛋白酶抑制剂	UTP	尿苷三磷酸
TPN	辅酶Ⅱ	XOD	黄嘌呤氧化酶
TPNH	还原辅酶Ⅱ		

一、概　说

1．酶的定义和特性[1]

酶普遍存在于生物体(动物、植物和微生物)中，是生物体内起催化作用的蛋白质。由于酶的存在使生命赖以存在的很多化学反应能在生理条件(常温、常压和中性的环境)下迅速完成。酶具有一般催化剂的共性，即只改变化学反应达到平衡的时间，而不改变平衡点。此外，酶还有其本身的特点：(1)酶有很高的催化效率。生物体内的许多化学反应，在体外没有酶存在的情况下，几乎都不能进行，然而在体内有酶催化的情况下可以在常温、常压和中性的环境下迅速完成。例如：碳酸酐酶催化水和二氧化碳的水合反应，在一秒钟内一个碳酸酐酶分子可以使 10^5 个二氧化碳分子与水分子发生水合反应，其效率之高是惊人的。(2)酶具有高度的专一性。一种酶只能作用于某一种底物或某一类底物。例如：脲酶只能作用于脲，其他化合物一概不能作用，这是绝对专一性。此外，还有作用于某一类化合物的。例如：L-氨基酸氧化酶，它能作用于所有L-型的氨基酸，但不能作用于D-型的氨基酸，这叫做族专一性。(3)酶作为一种蛋白质，它具有一般蛋白质的共性，即容易变性和失活。紫外线、强酸、强碱、高温、有机溶剂

和变性剂等都会引起酶的变性。酶变性以后，生物活性丧失，因而在制备和保存酶制剂时要特别注意这一点。在使用酶时一般首先要了解一下酶是否已经失活，这就需要对酶进行活力测定。

2. 酶活力的定义和表示方式[2]

大多数酶都不象常用的无机或有机催化剂那样用百分比或克分子来表示酶的含量。酶存在的量是通过测定它所催化的反应速度来定量的，在适当条件下，酶所催化的反应速度正比于酶量。

酶量常用酶活力单位表示。所谓酶的活力单位（简称酶单位U），就是酶在一定的作用条件下，单位时间内作用物的消耗量或产物的生成量。酶含量可以用每克酶制剂或每毫升酶制剂含有多少酶单位来表示(U/g 或 U/ml)。

在实际测定中，酶单位往往与所用的测定方法、底物的特性和反应条件等因素有关，因此对同一种酶由于采用不同的测定方法而有不同的单位。为了避免混乱，经过各国科学家的努力已使各种酶的活力单位得以标准化。1959 年国际生物化学协会酶学委员会和国际纯化学与应用化学协会临床化学委员会接受了 Racker 等人的建议，采用了“国际单位”表示酶活力。“国际单位”的定义为：在 25℃，以最适底物浓度，最适缓冲液的离子强度，以及最适 pH 值等条件下，每分钟能催化消耗一微克分子(μ mole)底物的酶量定为一个活力单位。由于制订了“国际单位”，就有可能将各种酶制剂或来源不同的同种酶制剂加以比较。

为了比较酶制剂的纯度，往往采用比活力作为一个指标，所谓比活力是表示每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位，用U/

mg 蛋白表示。比活力是酶的生产和研究过程中经常使用的基本数据，用来比较每单位重量酶蛋白的催化能力。比活力越高，表示酶越纯。

Katal (Kat)单位是 1972 年国际酶学委员会推荐的一个新的酶活力国际单位。1 Kat 单位定义为：在最适条件下，每秒钟能使 1 mole 底物转化的酶量；同样能使 1 micromole 底物转化的酶量为 microkatal (μ Kat) 单位；以此类推，有 nano Katal (n Kat) 和 pico Katal (p Kat)等。

Kat 单位与国际单位的换算如下：

$$1\ \text{Kat} = 1\ \text{mole/秒} = 60\ \text{mole/分}$$
$$= 60 \times 10^6 \mu\ \text{mole/分} = 6 \times 10^7 \text{U}$$

$$1\ \text{U} = 1\ \mu\ \text{mole/分} = \frac{1}{60} \mu\ \text{mole/秒}$$
$$= \frac{1}{60} \mu\ \text{Kat} = 16.67\ \text{n Kat}$$

3. 初 速 度[3]

酶的活力是用酶所催化的化学反应的速度来表示的，因此测定酶活力实际上就是测定为酶所催化的化学反应的速度。与一般催化反应相同，酶促反应速度可以用单位时间内底物的减少或产物的增加来表示。酶反应的过程若用产物生成和时间的关系作图（图 1），反应速度即为图 1 中曲线的斜率，在反应开始时反应速度可以保持一定值，可是随着时间的增加，反应速度逐渐降低，造成这一现象的可能因素很多，如：底物浓度的降低和产物浓度的增加而加速了逆反应的进行；产物的抑制作用；酶的失活等等。因此为了准确表示酶活力，就必须采用图 1 中曲线的直线部分即反应的初速度。在一定

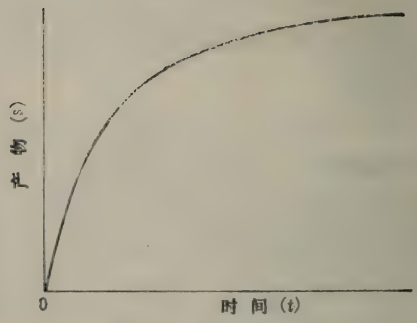
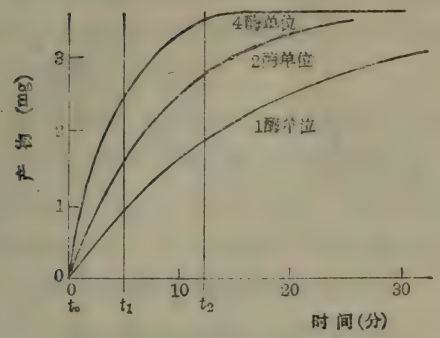


图 1　酶反应过程

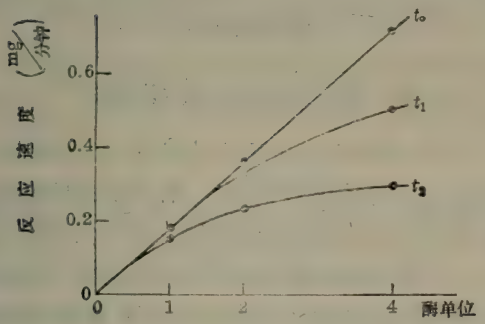
条件下，只有用初速度表示反应速度时，反应速度和酶量才可能有正比例的关系。

图 2, a 是不同酶量的酶反应过程曲线，图 2, b 是不同时间的反应速度和酶量的关系曲线。可以看出，只有在反应的初速度阶段，反应速度才正比于酶量，因此只有用初速度表示酶活力才能准确地代表酶制剂中酶的含量。但是并不是所有情况下用初速度表示酶单位都一定正比于酶量的，例如图 3 中举出的是属于在初速度阶段速度与酶量不成正比的例子。因此，为了得到正确的测量结果，一般取三个酶浓度来测定反应初速度。以初速度对酶浓度作图，如果是线性关系，这说明你选择的条件是合适的，这样计算得到的酶活力才正确，如果初速度与酶浓度不成线性关系，那么酶样必须进一步稀释或找其他原因。总之在后面诸酶的测定中酶样必须稀释成“适当浓度”，这个“适当浓度”的含意即在这个浓度范围内取三个酶浓度测得的反应速度和酶浓度成正比。

在实际测定过程中，为了保证测得的是初速度，往往使底物浓度足够大，把酶完全饱和。这样整个酶反应对于底物来说



a



b

图 2 不同酶量的酶反应过程

a. 不同酶量的酶反应过程曲线；b. 反应速度与酶量的关系曲线

是零级反应，而对于酶来说是一级反应。这样测得的初速度可以比较可靠地反映酶的含量，但是对某些会受过量底物抑制的酶就不能这样做，因此底物也要选择最合适的浓度。一般说来，测酶活力时，酶要稀一些，底物要适当地过量一些。

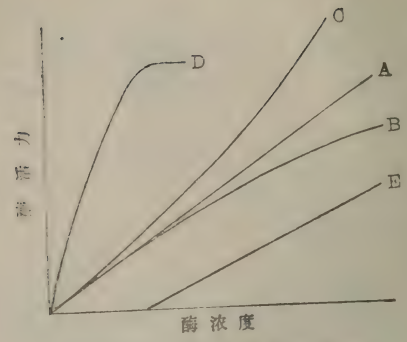


图 3　酶活力和酶浓度的关系

A. 表示正常的反应曲线；B. 有两种情况：(1)以非线性部分来计算酶活力；(2)酶制剂中含有酶的抑制剂；C. 酶制剂中含有激活剂；D. 底物不够，在反应过程中耗尽；E. 体系中存在着一定量的失活剂如重金属离子等

4. 测定酶活力的注意点[4]

(1) 必须将影响酶反应速度的因素恒定在最适当的数值

影响酶反应速度的因素很多，前面谈到的底物浓度是一个因素，温度对反应速度影响也很大，酶促反应速度的温度系数≥10%/1℃ 即温度变化 10℃ 就要引起反应速度测定中的100%的误差。所有的酶的活力都受 pH 影响，因此都要选择最适当的 pH 范围，某些酶的 pH 范围可能很窄。pH、温度等反应条件对底物浓度的选择也有影响。总之，应将这些因素综合考虑，选择最佳测定条件。

(2) 酶空白　要测准酶活力，扣除正确的空白值是重要的。空白值往往通过底物中杂质、酶制剂中杂质或其他参加反应的试剂引起的。如果测定过程中要终止反应，那么空白的做法可先加终止反应的试剂后加酶，这样扣除的空白较全面。如果测定中不终止反应，则可做多种空白，其他试剂都和

样品管相同，只缺底物的"酶空白"或其他试剂都和样品管相同而只缺酶样的"底物空白"等等，这些空白都应扣除，但在某些空白值很小的情况下可忽略不计。

(3) *酶浓度的选择*　通常测定时，酶样要充分稀释，使反应很慢地进行，这样有利于测定反应速度，反应速度慢可使过程中底物浓度的变化小到可以忽略不计。酶样品稀释到怎样的程度才叫适当呢？取3个不同酶量测得的初速度和酶量之间为正比关系，这样的酶浓度范围就是适当的。

(4) *偶联酶反应*　第一个酶反应产物为第二个酶反应的底物，这样两个酶系统在一起反应即为酶的偶联反应。如果第二个反应过程中引起参与反应的物质发生光吸收的变化（例如NAD和NADP的还原或NADH和NADPH的氧化），则第一个反应速度的测定就可以用第二个反应中引起的光吸收的变化来表示，利用偶联反应简化测定工作是酶分析中常用的手段。例如：

$$\text{丙氨酸}+\alpha\text{-酮戊二酸}\xrightleftharpoons{\text{GPT}}\text{谷氨酸}+\text{丙酮酸} \qquad (1)$$

$$\text{丙酮酸}+\text{NADH}+\text{H}^+\xrightleftharpoons{\text{LDH}}\text{乳酸}+\text{NAD}^+ \qquad (2)$$

以上两个反应如果偶联起来，第一反应中的GPT（谷丙转氨酶）就可以用紫外分光光度法来测定其活力，但是有一个必要的前提，第二个反应速度必须比第一个反应快很多倍，以K_1表示第一反应的反应速度常数，K_2表示第二个反应的反应速度常数，理论上讲当$K_2:K_1=1000:1$时，测得的速度才能真正表示第一反应的速度，当$K_2=1000K_1$时，$V_{偶系酶}=0.993V_{第一反应}$则误差为0.7%。

(5) *杂酶分析*　有些很难提纯的酶制剂往往会有一些杂酶存在。对于特定的实验要求，某些杂酶可能有害，另一些杂

酶可能无害或害处很小，因此只要杂酶不影响实验的进行或把酶量控制在一定的范围内使用时，杂酶的影响不显著，这样的酶制剂还是可以用的。这就要求对酶进行杂酶的分析，一般进行杂酶分析主要是测定一些有害杂酶的含量。例如：蛇毒磷酸二酯酶制剂，往往含有一些磷酸单酯酶，因此在测定二酯酶活力后，一般也测一下制剂中磷酸单酯酶的活力。这两种数据都表示酶的质量情况。杂酶含量一般也以每毫克酶蛋白含有多少活力单位来表示，也有人用相对于主酶活力的百分比来表示的。

(6) 其他　测定酶活力的反应除特别规定外，一般在25℃进行，酶样应放在4℃或更低温度保存。反应之前，酶和底物应预先在反应温度下平衡，这样使试样一混合即达到反应温度。实验中应全部用重蒸水，避免其他离子对酶反应的影响。

参 考 文 献

[1] Dixon, M. and Webb, E. C. (1979), Enzymes, 3rd ed.

[2] CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed.

[3] Plummer, D. T. (1978), An Introduction to Practical Biochemistry, 2nd ed.

[4] Bergmeyer, H. U. (1963), Methods of Enzymatic Analysis Academic Press, N. Y.

二、各种酶的活力测定

1. 醇脱氢酶
ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH)

EC 1. 1. 1.1 Alcohol: NAD^+ oxidoreductase

催化反应

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \overset{ADH}{\rightleftharpoons} CH_3CHO + NADH + H^+$$

存在和性质

醇脱氢酶在哺乳动物的组织内，以肝和肾中含量较高；在微生物中以酵母中含量最丰富，一般从面包酵母提取。

每个醇脱氢酶分子含有四个 NAD^+ 分子和四个锌原子及约三十六个游离的巯基。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中，一般溶解于 pH 7.5 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液。

〔稳定性〕 此酶的冷冻干粉在－20℃贮存，可稳定一年。干粉状态加入蔗糖可增加其稳定性；溶液状态加入 0.1% 牛血清白蛋白可增加其稳定性。

〔分子量〕 148,000(面包酵母); 80,000(马肝)

〔最适 pH〕 7.9(0.05 M Na^+)

〔等电点〕 pH 5.4(酵母); pH 4.0(鼠肝微粒体)
pH 8.5(鼠肝细胞浆); pH 5.6(鼠肝线粒体)

〔激活剂〕 Na^+

〔抑制剂〕 重金属离子、NADP、ADP、AMP

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=12.6$(1 cm 光径)(酵母)

活力测定

〔原理〕 醇脱氢酶催化乙醇氧化为乙醛，同时辅酶 I 被还原。还原辅酶 I 在 340nm 处有一吸收峰值，用紫外分光光度计测定反应过程中 340nm 处光吸收的增加，以还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数计算出每分钟还原辅酶 I 量的变化来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃，每分钟能催化产生 1 微克分子产物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：95% 乙醇溶液。

② 0.05 M pH 8.8 焦磷酸盐缓冲液。

③ 0.01 M pH 7.5 磷酸盐缓冲液，内含 0.1% 牛血清白蛋白(4℃)。

④ 0.015 M 辅酶 I 溶液。

⑤ 待测酶溶液：将待测的酶用试剂③溶解，并稀释至适当的浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340 nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 pH 8.8 的焦磷酸盐缓冲液	1.40	1.30
2. 加底物溶液	0.10	0.10
3. 加 0.015 M 辅酶 I 溶液	1.50	1.50
4. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管的光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围　生化分析和生化研究。

参 考 文 献

Vallee, B.L. and Hoch, F.L. (1955), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **41**, 327.

2. 乳酸脱氢酶
LACTATE DEHYDROGENASE (LDH)

EC 1.1.1.27 L-Lactate: NAD^+ oxidoreductase

催化反应

$$\text{L-乳酸盐}+\text{NAD}^{+}\underset{\text{pH7.4}\sim\text{7.8}}{\overset{\text{LDH}}{\underset{\text{LDH}}{\overset{\text{pH8.8}\sim\text{9.8}}{\rightleftharpoons}}}}\text{丙酮酸盐}+\text{NADH}+\text{H}^{+}$$

存在和性质

乳酸脱氢酶存在于微生物和很多哺乳动物的组织中，尤其在心肌和骨骼肌中含量较高。它有五种同功酶都是由两种类型亚基所构成的四聚体。

〔溶解度〕 溶解于水或稀缓冲液。

〔稳定性〕 此酶结晶悬浮于 3.2M、pH7 硫酸铵中，在4℃贮存，不要冰冻，可稳定一年。

〔分子量〕 132,000(兔肌)；135,000(猪心)

〔最适pH〕 8.8～9.8(顺向反应)；7.4～7.8(逆向反应)

〔等电点〕 pH4.5～4.8

〔抑制剂〕 重金属离子、稀碘液、2,4-二硝基氟苯、对氯苯甲酸汞。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=14.9$(1cm 光径)(牛心)

$A^{1\%}_{280nm}=12.6$(1cm 光径)(兔肌)

活力测定

〔原理〕 乳酸脱氢酶能催化丙酮酸生成乳酸，同时使还原辅酶 I 氧化为辅酶 I。还原辅酶 I 在 340nm 处有一吸收峰值。一般以 340nm 处光吸收值的减少表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH7.4，每分钟能催化生成 1 微克分子辅酶 I 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.0227M 丙酮酸钠。

② 0.10 M pH 7.4 磷酸缓冲液。

③ 0.006 M 还原辅酶 I 溶液。

④ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加磷酸缓冲液	1.10	1.00
2. 加还原辅酶 I 溶液	0.10	0.10
3. 加底物溶液	0.10	0.10
4. 加重蒸水	1.70	1.70
5. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分} = \Delta A_{样/分} - \Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg = \frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22 \times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

用于测定 L(+)乳酸和丙酮酸，也可和其他酶偶联测定。

参 考 文 献

Reeves, W. J. and Fimognari, G. M. (1963), J. Biol. Chem. 238, 3853.

3. 苹果酸脱氢酶
MALATE DEHYDROGENASE (MDH)

EC 1.1.1.37 L-Malate: NAD^+ oxidoreductase

催化反应

$$\text{L-苹果酸盐} + \text{辅酶 I} \overset{\text{MDH}}{\rightleftharpoons} \text{草酰乙酸盐} + \text{还原辅酶 I}$$

存在和性质

苹果酸脱氢酶广泛存在于动植物中，一般从猪心中提取。此酶有两种形式：一种是线粒体 MDH，一种是细胞质 MDH。每克分子酶含有 2 克分子辅酶 I 和 14 克分子游离的巯基。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 此酶的冷冻干粉在 4℃ 贮存一年不失活；此酶悬浮于 70% 饱和度硫酸铵中，在 5℃ 贮存二年不失活；在此酶稀溶液中，加入白蛋白可增加酶的稳定性。

〔分子量〕 70,000(猪心)；66,300(鼠肝)

〔最适 pH〕 6.9(顺向反应)；7.4(逆向反应)

〔等电点〕 pH 6.1～6.4

〔抑制剂〕 对氯化苯基汞、高浓度草酰乙酸、8-羟基喹啉*、1,10-邻啡罗啉*。

〔激活剂〕 磷酸根、砷酸根*和锌离子*。

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=4.5$(1cm 光径)(猪心)

$A_{280nm}/A_{260nm}=1.6\sim1.7$

活力测定

〔原理〕 苹果酸脱氢酶能催化草酰乙酸生成苹果酸，同时使还原辅酶 I 氧化为辅酶 I。一般以还原辅酶 I 在 340 nm 处光吸收减少的数值表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH 7.4，每分钟能催化产生 1 微克分子辅酶 I 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.006M 草酰乙酸(用试剂②新鲜配置)。

② 0.10M pH 7.4 磷酸缓冲液。

③ 0.006M 还原辅酶 I 溶液：用试剂②新鲜配置。

④ 待测酶溶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 保温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 0.10M pH 7.4 磷酸缓冲液	2.80	2.70
2. 加 0.006M 还原辅酶 I 溶液	0.10	0.10
3. 加底物溶液	—	0.10
4. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	0.10	0.10

* 仅对线粒体中 MDH 有效。

试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

广泛用于生物代谢过程中酶偶联测定。

参 考 文 献

Mehler, A. H. et al. (1948), J. Biol. Chem. **174**, 961.

4. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G-6-PDH)

EC 1.1.1.49 3α-Hydroxysteroid: NAD(P)$^+$ oxidoreductase

催化反应

$$D\text{-}G\text{-}6\text{-}P+NADP^+ \overset{G\text{-}6\text{-}PDH}{\rightleftharpoons} 6\text{-}磷酸葡萄糖酸内酯+NADPH+H^+$$

存在和性质

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶广泛存在于动物组织和微生物中，一般从啤酒酵母中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 此酶的冷冻干粉在4℃贮存可稳定六个月，其结晶悬浮于3.2*M* pH6 硫酸铵溶液，4℃贮存，可稳定几个月。

〔分子量〕 212,000(酵母)

〔最适pH〕 7.8(以NAD为辅酶)，pH>8.5(以NADP为辅酶)

〔等电点〕 pH4.5

〔激活剂〕 5～10m*M* Mg^{++}、Ca^{++}、Na^{+}、K^{+}

〔抑制剂〕 Hg^{++}、高浓度 Mg^{++}、其他二价离子、ADP、ATP、GTP、UTP等。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280.5\ nm}=11.5$(1cm 光径)

(*Leuconostoc mesenteroides*)

活力测定

〔原理〕 该酶能催化葡萄糖-6-磷酸生成6-磷酸葡萄糖酸内酯，同时使辅酶 II 还原为还原辅酶II。还原辅酶 II 在340nm处有一吸收峰值。一般以340nm处光吸收值的增加表示酶活力。

〔单位定义〕 在25℃，每分钟能催化生成1微克分子还原辅酶II的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.10*M* 葡萄糖-6-磷酸钠盐(用重蒸水配置)。

② 0.20*M* pH8.5 Tris 缓冲液。

③ 0.10M 氯化镁溶液。

④ 辅酶II溶液：每 ml 溶液含辅酶II（含量 70%）4.0 mg。

⑤ 待测酶溶液：用重蒸水稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	0.50	0.50
2. 加氯化镁溶液	0.30	0.30
3. 加辅酶 II 溶液	0.30	0.30
4. 加重蒸水	1.80	1.70
5. 加底物溶液	—	0.10
6. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	0.10	0.10

择波长为 340 nm，用 1 cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶II在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

用于测定葡萄糖-6-磷酸和其他偶联反应的底物。

参 考 文 献

Glaser, L. and Brown, D. H. (1955), J. Biol. Chem. 216, 67.

5. 葡萄糖氧化酶
GLUCOSE OXIDASE (GOD)

EC 1.1.3.4 β-D-Glucose: oxygen 1-oxidoreductase

催化反应

$$\beta\text{-D-葡萄糖} + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{D-葡糖酸-}\delta\text{-内酯} + H_2O_2$$

甲烯兰、苯醌、2,6-二氯苯酚、吲哚酚能作为氢受体代替氧气。

存在和性质

葡萄糖氧化酶存在于 *Penicillium notatum*、*P. amagasakiense*、*Aspergillus niger* 和蜂蜜中，是含有16% 糖成分的糖蛋白，每克分子酶含有二克分子的黄素腺嘌呤二核苷酸。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 最适稳定 pH 4.0～6.5。冷冻干粉 4℃ 贮存稳定一年。此酶的水溶液在 pH>8 和温度高于 50℃ 的条件下是不稳定的，葡萄糖的存在对酶有保护作用。

〔分子量〕 186,000 (*A. niger*)

152,000 (*P. notatum*)

〔最适 pH〕 3.5～7.5，在 pH 5.5 有极大值。

〔等电点〕 pH 4.3

〔抑制剂〕 Ag^{+}、Cu^{++}、Hg^{++}、对苯基汞、D-阿拉伯糖和2-脱氧 D-葡萄糖。

〔稳定剂〕 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=16.7$(1cm 光径) (*A. niger*)

$A^{1\%}_{280nm}=11.9$ (1cm 光径) (*P. amagasakiense*)

光吸收极大值在 278、383、454nm。

活力测定

〔原理〕 葡萄糖氧化酶和过氧化物酶偶联测定，反应方程式如下：

$$\beta\text{-D-葡萄糖}+O_2\xrightarrow{GOD}\text{D-葡糖酸-}\delta\text{-内酯}+H_2O_2$$

$$4H_2O_2+\text{4-邻甲氧基苯酚}\xrightarrow{\text{过氧化物酶}}\text{四邻甲氧基联酚}+8H_2O$$

测定每分钟四邻甲氧基联酚量的增加表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃，pH 7.0，每分钟催化分解 1 微克分子葡萄糖的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：1.0*M* 葡萄糖水溶液。

② 0.125*M* pH 7.0 磷酸缓冲液(内含 0.36m*M* 邻甲氧基苯酚)。

③ 过氧化物酶溶液：1ml 水溶液含 1mg 酶蛋白。

④ 待测酶溶液：用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0 ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加磷酸缓冲液	2.49	.48
2. 加底物溶液	0.50	0.50
3. 加过氧化物酶溶液	0.01	0.01
4. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.01

择波长为 436nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到O点，每隔半分钟读取各管的光吸收（A），共读 3 分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值（ΔA/分）为$\Delta A_{436nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{436nm/分}\times 4}{25.5\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

四邻甲氧基联酚在 436 nm 处克分子消光系数为 25.5×10^6。

应用范围

和过氧化物酶偶联可以测定葡萄糖，此方法可用于诊断糖尿病；和过氧化氢酶联合使用可除去体系中的氧气或葡萄糖。

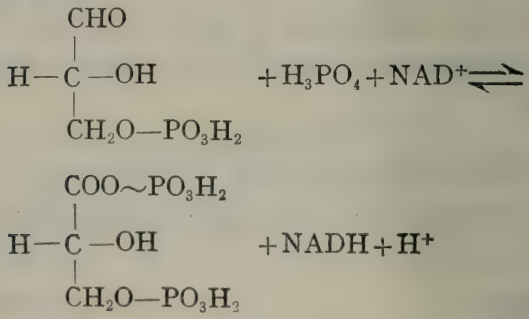
参 考 文 献

Bergmeyer, H. U. (1970), Methoden der Enzymatischen Analysis p. 416.

6. 3-磷酸甘油醛脱氢酶
GLYCERALDEHYDE-PHOSPHATE DEHYDROGENASE

EC 1.2.1.12 D-Glyceraldehyde-3-phosphate: NAD^+ oxidoreductase (phosphorylating)

催化反应



存在和性质

3-磷酸甘油醛脱氢酶存在于动物的肌肉组织、酵母、其他微生物和高等植物组织中，一般从兔肌和酵母中提取。它是含锌的蛋白质，1 分子的酶含有 12～16 个巯基。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲溶液。

〔稳定性〕 此酶的溶液在低于 pH 6 时是不稳定的，在 2.5*M* 硫酸铵溶液中悬浮，0～4℃ 贮存可稳定半年。

〔分子量〕 138,000(兔肌); 144,700(酵母)

〔最适 pH〕 8.6～9.0

〔等电点〕 pH6.5

〔激活剂〕 巯赶试剂

〔抑制剂〕 重金属离子、破坏巯基的试剂、$10^{-4}M$ 碘乙酸和 $2M$ 对氯苯汞可完全抑制 1 克分子的酶。

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=10$(1cm 光径)(猪)

$A_{280nm}^{1\%}=8.29$(1cm 光径)(兔肌)

活力测定

〔原理〕 此酶在催化 3-磷酸甘油醛氧化的同时，辅酶 I 被还原为还原辅酶 I，以还原辅酶 I 在 340nm 处光吸收值的变化来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH8.4 条件下，每分钟能产生 1 微克分子还原辅酶 I 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：8.8m M 3-磷酸甘油醛。

② 30m M pH8.4 焦磷酸盐缓冲液。

③ 7m M 辅酶 I 水溶液。

④ 170m M 砷酸钠水溶液。

⑤ 40m M pH8.4 半胱氨酸溶液：用试剂②新鲜配置。

⑥ 4m M pH 8.4 半胱氨酸溶液：用 4℃ 试剂②新鲜配置。

⑦ 待测酶溶液：用试剂⑥稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 **3.0ml**。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收 (A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加焦磷酸盐缓冲液	1.70	1.70
2. 加40m *M* 半胱氨酸溶液	0.30	0.30
3. 加 170m *M* 砷酸钠溶液	0.30	0.30
4. 加辅酶 I 溶液	0.10	0.10
5. 加底物溶液	0.50	0.50
6. 加 4m *M* 半胱氨酸溶液	0.10	—
7. 放置二分钟		
8. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

每分钟A的增加值(ΔA/分)为$\Delta A_{340nm\ 分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处的克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

Velick, S. F. (1955), Methods in Enzymology 1, 401 (Colowick, S. P. and Kaplan, N.O. ed.) Academic Press, N. Y.

7. 黄嘌呤氧化酶
XANTHINE OXIDASE (XOD)

EC 1.2.3.2 Xanthine: oxygen oxidoreductase

催化反应

$$\text{次黄嘌呤} + O_2 \xrightarrow{XOD} \text{黄嘌呤} + H_2O_2$$

$$\text{黄嘌呤} + O_2 \xrightarrow{XOD} \text{尿酸} + H_2O_2$$

存在和性质

黄嘌呤氧化酶存在于牛奶、肝脏、牛的小肠和细菌中，能催化黄嘌呤、次黄嘌呤类的嘌呤化合物生成尿酸。乙醛和还原辅酶 I 也能被其氧化。可作为该酶电子受体的有：氧气、细胞色素 C、高铁氰化物、甲基蓝和硝酸盐。此酶一般从牛奶中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 于 4℃ 贮存，活力损失不大。

〔分子量〕 181,000(牛奶)

〔最适 pH〕 8.3

〔等电点〕 pH 5.3～5.4

〔抑制剂〕 Hg^{++}、Ag^{+}、Cd^{++}、尿素、氰化物、磷酸根和氯离子。

〔稳定剂〕 水杨酸盐、半胱氨酸、组胺和维尔烯酸盐。

活力测定

〔原理〕 利用此酶催化反应的最终产物尿酸在293nm处有特征吸收峰，以每分钟293nm处光吸收的增加来计算酶活力。

〔单位定义〕 在25℃，每分钟能催化分解1微克分子黄嘌呤的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.15m M 黄嘌呤水溶液。

② 0.05M pH7.5 磷酸缓冲液。

③ 待测酶溶液：用试剂②溶解和稀释至适当的浓度。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加磷酸缓冲液	2.00	1.90
2. 加底物溶液	1.00	1.00
3. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

择波长为293 nm，用1 cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{293nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{293nm/分}}{12.3\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

尿酸在293nm处克分子消光系数为 12.3×10^6。

应用范围

用于测定黄嘌呤、次黄嘌呤、肌苷、鸟嘌呤、鸟苷等。

参 考 文 献

[1] Massey, V. et al. (1969), J. Biol. Chem. **244**, 1682.

[2] Andrews, P. et al. (1964), Biochem. J. **93**, 627.

8. L-氨基酸氧化酶
L-AMINO ACID OXIDASE (L-AOD)

EC 1.4.3.2 L-Amino acid: oxygen oxidoreductase (deaminating)

催化反应

$$L\text{-}RCHNH_3^+COO^- + O_2 + H_2O \xrightarrow{L\text{-}AOD} RCOCOO^- + NH_4^+ + H_2O_2$$

存在和性质

L-氨基酸氧化酶存在于蛇毒、兔肝、鼠肾和鼠肝中，一般从蛇毒中提取。每克分子酶含有二克分子的 FAD。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 结晶悬浮于 3.2 M pH 6 的硫酸铵溶液，于 4℃ 可保存一年；干粉在 4℃ 贮存几个月内不失活。

〔分子量〕 89,000(鼠肾)

〔最适 pH〕 7～7.5

〔等电点〕 pH 5.2(蛇毒)

〔激活剂〕 K^+

〔抑制剂〕 芳香族羧酸盐、磺酸、硫酰胺。

〔光谱性质〕 $A_{275nm}^{1\%}=9.55$(1cm)(鼠肾)

活力测定

〔原理〕 利用此酶催化 L-氨基酸产生过氧化氢的反应和过氧化氢酶偶联以释放出氧气的体积来计算酶活力。2 克分子 L-氨基酸脱氨可产生 1 克分子氧气。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟催化 1 微克分子 L-亮氨酸脱氨的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.10M L-亮氨酸水溶液。

② 0.20M pH7.8 Tris 缓冲液(每 ml 缓冲液内含 2～3 微克过氧化氢酶)。

③ 0.10M 氯化钾溶液。

④ 待测酶溶液：用试剂③稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取一只瓦氏烧瓶按下表操作步骤加入试剂：

步　　骤	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	1.00
2. 加氯化钾溶液	1.30
3. 加待测酶液	0.20
4. 混合后于 37℃ 平衡 10 分钟	
5. 迅速加入底物溶液，立即混匀并记时	0.50

然后，每隔 5 分钟测定所产生氧气的体积，共测 30 分钟，以所产生氧气体积 V_{O_2}（微升）对时间 t（分）作图得一直线，求得每分钟所产生氧气体积 V_{O_2}/t（微升/分）。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{V_{O_2}/t}{11.2 \times \text{瓦氏烧瓶中酶的 mg 数}}$$

应用范围

用于测定 L-氨基酸含量和制备较纯 D-氨基酸。

参 考 文 献

Wellner, D. and Meister, A. (1960), J. Biol. Chem. **235**, 2013.

9. D-氨基酸氧化酶
D-AMINO ACID OXIDASE (D-AOD)

EC 1.4.3.3 D-Amino acid: oxygen oxidoreductase (deaminating)

催化反应

$$D\text{-}RCHNH_3^+COO^- + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{D-AOD}} RCOCOO^- + NH_4^+ + H_2O_2$$

存在和性质

D-氨基酸氧化酶存在于所有哺乳动物中，特别是绵羊和猪的肝或肾中。每克分子酶含一克分子的 FAD。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 结晶悬浮于 pH6.5，1.8M 硫酸铵溶液中，于 4℃ 可稳定几个月；干粉于 4℃ 可贮存一年。

〔分子量〕 35,000～40,000

〔最适 pH〕 9.0，pH8.3 (0.02M Na^+)。

〔激活剂〕 Na^+

〔抑制剂〕 重金属离子、巯基试剂。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=16.0$ (1cm 光径)(猪肾)

活力测定

〔原理〕 利用此酶催化 L-氨基酸产生过氧化氢的反应和过氧化氢酶偶联以释放出氧气的体积来计算酶活力。2 克分子 D-氨基酸脱氨可产生 1 克分子氧气。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟催化 1 微克分子 D-丙氨酸脱氨的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.30M DL-丙氨酸用试剂②配置。

② 0.020M pH8.3 焦磷酸钠缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释至适当浓度。

④ 过氧化氢酶溶液：每 ml 酶液含 8.0 微克过氧化氢酶。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取一只瓦氏烧瓶按下表操作步骤加入试剂。然后，每隔 5 分钟测定所产生氧气的体积，共测 30 分钟，以所产生氧气体积 V_{O_2}(微升)对时间 t (分)作图得一直线，求得每分钟所产生氧气体积 V_{O_2}/t (微升/分)。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{V_{O_2}/t}{11.2\times\text{瓦氏烧瓶中酶 mg 数}}$$

步　　骤	样品管(ml)
1. 加焦磷酸钠缓冲液	1.50
2. 加待测酶溶液	0.50
3. 加过氧化氢酶溶液，混合后于 37°C 平衡 10 分钟	0.50
4. 迅速加入底物溶液，立即混匀并记时	0.50

应用范围

用于测定 D-氨基酸含量和制备较纯 L-氨基酸。

参 考 文 献

Wellner, D. and Meister, A. (1960), J. Biol. Chem. **235**, 2013.

10. 胺 氧 化 酶
MONOAMINE OXIDASE (MAO)

EC 1.4.3.4 Amine: oxygen oxidoreductase (deaminating) (flavin-containing)

催化反应

$$RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{MAO} RCHO + NH_3 + H_2O_2$$

存在和性质

胺氧化酶存在于植物、动物的肝、脑、血浆及细菌中，一般

从血中提取。MAO是含黄素的蛋白质。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 最适稳定的pH为7.2～7.6，冷冻干粉在−20℃保存较稳定。

〔分子量〕 170,000(牛血)

〔最适pH〕 7.4 ($0.2M$ K^+)

〔激活剂〕 K^+

〔抑制剂〕 重金属离子、肼类化合物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=9.8$ (1cm光径)(牛血)

活力测定

〔原理〕 该酶能催化胺氧化为醛的反应，导致反应体系中250nm光吸收值的增加，以每分钟250nm处光吸收的增加值计算酶活力。

〔单位定义〕 在25℃，每分钟能催化分解1微克分子底物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：$0.10M$ 苄胺硫酸盐(1.07g苄胺＋5ml $2N$ 硫酸加水到100ml)。

② $0.20M$ pH7.4磷酸钾缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为250nm，用1cm光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值为 $\Delta A_{250nm/分}=\Delta A_{样\ 分}-\Delta A_{空\ 分}$。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	0.10	0.10
2. 加磷酸钾缓冲液	2.90	2.80
3. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A_{250\text{nm}\ \text{分}}}{11.3 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

苯甲醛和苄胺在250nm处光吸收差值的克分子消光系数为11.3×10^6。

应用范围

用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

[1] Tabor, C. W. et al. (1954), J. Biol. Chem. **208**, 645.

[2] Buffoni, R. and Blaschko, H., F. R. S. (1964), Proc. Roy. Soc. **B161**, 153.

11. 尿酸氧化酶(尿酸酶)
URATE OXIDASE (URICASE)

EC 1.7.3.3　Urate: oxygen oxidoreductase

催化反应

$$尿酸+O_2+2H_2O \xrightarrow{尿酸酶} 尿囊素+H_2O_2+CO_2$$

存在和性质

尿酸氧化酶存在于微生物和大多数哺乳动物的肝、脾、肾中，一克分子酶含有一克原子的铜，一般从猪肝中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和 pH 7～11 稀的缓冲液中。

〔稳定性〕 在 pH6.5～10.5 范围内酶液较稳定，干粉在 −20℃干燥保存至少可稳定二年。

〔分子量〕 100,000(猪肝); 122,000(牛肾)

〔最适 pH〕 9.25

〔等电点〕 pH6.3

〔激活剂〕 打萨宗、邻菲罗林、α,α'-联吡啶、硫脲和二乙基二硫代氨基甲酸酯。

〔抑制剂〕 氰化物和重金属离子。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{276nm}=11.3$(1% Na_2CO_3)(猪肝)

活力测定

〔原理〕 利用尿酸氧化酶能分解尿酸，使其在 293nm 处光吸收减少，利用这一性质来测定酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH8.5，每分钟能分解 1 微克分子尿酸的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：2mg 尿酸溶于 30ml 试剂②中，用稀 KOH 溶液调节 pH 至 8.6，然后用试剂②稀释，使测定时 293nm 处光吸收为 0.50。

② 0.1M pH8.5 硼酸缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

④ 测定方法：

在25℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.00	2.00
2. 加硼酸缓冲液	1.00	0.50
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.50

波长为293nm，用1cm光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图取反应最初线性部分，计算出每分钟A的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{293nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{293nm/分}}{12.3\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

尿酸在293nm处克分子消光系数为 12.3×10^6。

应用范围

由于尿酸氧化酶具有高度专一性，它广泛地用于测定体液中的尿酸。

参 考 文 献

Hübscher, G. et al. (1957), Biochem. Biophys. Acta. 23, 43.

12. 过氧化氢酶
CATALASE (CTS)

EC 1. 11. 1. 6 Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase

催化反应

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CTS} O_2 + 2H_2O$$

存在和性质

广泛存在于植物和动物的细胞中，一般从牛肝、血液、微生物特别是 *Aspergillus niger* 中提取。

〔溶解度〕 溶解于磷酸缓冲液。

〔稳定性〕 在pH7.0较稳定，干粉于4℃避光干燥保存，一年内稳定。

〔分子量〕 244,000(牛肝)

〔最适pH〕 7.0(肝)，pH6.0 (*A. niger*)

〔等电点〕 pH6.7(鼠肝)，pH5.7(牛肝)

〔激活剂〕 K^+

〔抑制剂〕 $SO_4^=$、Cu^{++}、AsO_3^-、酚。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{276nm} = 15.5$(1 cm 光径)(鼠肝)

$A_{404nm}/A_{276nm} = 0.775$

活力测定

〔原理〕 该酶能催化过氧化氢分解，使过氧化氢在240 nm处吸收随时间增加而减少。

〔单位定义〕 25℃，每分钟能催化分解 1 微克分子的底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.067M 过氧化氢溶液：取 0.16ml 30% 过氧化氢溶液用试剂②稀释成 100ml，($A_{240nm}=0.500$)。

② 0.067M pH7.0 磷酸缓冲液。

③ 待测酶溶液：用试剂②稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 0.067M pH7.0 磷酸缓冲液	0.10	—
2. 加底物溶液	2.90	2.90
3. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

波长为 240nm，用 1cm 光径比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初直线部分，计算出每分钟 A 的减少值为 $\Delta A_{240nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{240nm/分}}{0.043\times mg\,酶/ml\,反应混合液}$$

过氧化氢在 240nm 处的克分子消光系数为 0.043×10^6。

应用范围

用于测定生物体内和代谢物中过氧化氢的含量。

参 考 文 献

Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952), J. Biol. Chem. **195**, 133.

13. 过氧化物酶
PEROXIDAE (POD)

EC 1.11.1.7 Donor:hydrogen-peroxide oxidoreductase

催化反应

$$\text{供体} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{POD}} \text{氧化型供体} + 2H_2O$$

供体为酚、芳香胺、色氨酸、焦性没食子酸和胆红素等。

存在和性质

几乎存在于所有的植物细胞中，也存在于白血球、酵母、牛奶中。在辣根(西洋山蒿菜)中含量很高，一般从辣根中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 pH<3.5 或 pH>12 时均不稳定，干粉于4℃避光干燥贮存，一年内稳定。

〔分子量〕 40,200(辣根)

〔最适 pH〕 4.0～8.0

〔等电点〕 pH7.2

〔抑制剂〕 CN^-、$S^=$、羟胺和氟化物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{275nm} = 7.5$(1 cm 光径)

$\epsilon_{403nm} = 91$(cm^2/微克分子)

$$RZ = A_{403nm}/A_{275nm} = 3.04(\text{结晶纯酶})$$

活力测定

〔原理〕 利用该酶在过氧化氢存在下使邻甲氧基酚氧化生成四邻甲氧基连酚，氧化产物在 436nm 处有光吸收峰，测定每分钟 436nm 处光吸收的增加计算酶活力。

反应式如下：

$$4\text{邻甲氧基酚} + 4H_2O_2 \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{四邻甲氧基连酚} + 8H_2O$$

〔单位定义〕 25℃，每分钟催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位*。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.008M 过氧化氢：取 0.1ml 30% 过氧化氢用水稀释至 120ml。$A_{240nm} = 0.400$(1cm光径)。

② 0.1M pH7.0 磷酸缓冲液。

③ 0.018M 邻甲氧基酚：24.5mg 邻甲氧基酚溶于水定容 10ml。

④ 待测酶液：用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 436nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值为 $\Delta A_{436nm/分} = \Delta A_{样/分} - \Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

---

* 1 邻甲氧基酚单位 (25℃) 近似于 0.95 焦性没食子酸单位 (20℃) 近似于 12.85 邻联茴香胺单位(25℃)。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	0.05	0.05
2. 加磷酸缓冲液	2.90	2.80
3. 加邻甲氧基酚	0.05	0.05
4. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A_{436\text{nm}/\text{分}} \times 4}{25.5 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

四邻甲氧基连酚在 436 nm 的克分子消光系数为 25.5×10^6。

应用范围　可催化某些有机化合物和过氧化氢的氧化还原作用，产生有色产物。它与产生 H_2O_2 的其他酶反应偶联，可比色测定葡萄糖、半乳糖和 L-氨基酸，也可用于免疫酶标记实验。

参 考 文 献

Bergmeyer, H. U. (1974), Methods of Enzymatic Analysis **1**, 495.

14. 谷丙转氨酶
ALANINE AMINOTRANSFERASE (GLUTAMIC-PYRUVIC TRANSAMINASE, GPT)

EC 2.6.1.2　L-Alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase

催化反应

$$\text{丙氨酸} + \alpha\text{-酮戊二酸} \xrightleftharpoons{\text{GPT}} \text{丙酮酸} + \text{谷氨酸}$$

存在和性质

广泛存在于动物和植物的组织中，在哺乳动物的心脏中含量较高，一般从猪心中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 结晶悬浮于 3.2M pH6 硫酸铵中，于 4℃ 贮存可稳定六个月，干粉－20℃贮存可稳定二年。

〔分子量〕 115,000(猪心)

〔最适 pH〕 7.3～7.8 (磷酸缓冲液)

〔激活剂〕 K^+

〔抑制剂〕 巯基或羧基试剂、甘氨酸、L-天门冬氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸。

活力测定

〔原理〕 利用该酶的转氨作用将丙氨酸上的氨基转移到 α-酮戊二酸上，形成丙酮酸和谷氨酸，丙酮酸在 NADH 参与下由乳酸脱氢酶还原生成乳酸及 NAD^+，在 340nm 处测量 NADH 被氧化后光吸收的减少来表示酶活力。

〔单位定义〕 25℃，每分钟能催化产生 1 微克分子产物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物：0.10M α-酮戊二酸溶液用试剂③配置。

② 底物：0.133M L-丙氨酸溶液用试剂③配置。

③ 0.10M pH7.5 磷酸钾缓冲液。

④ 0.006M 还原辅酶 I。

⑤ 乳酸脱氢酶溶液：每 ml 试剂③含 1.0mg 酶蛋白。

⑥ 待测酶液：用试剂③稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 0.10M pH 7.5 磷酸钾缓冲液	1.60	1.50
2. 加 0.006M 还原辅酶 I	0.10	0.10
3. 加乳酸脱氢酶溶液	0.10	0.10
4. 加 0.133M L-丙氨酸溶液	1.00	1.00
5. 加待测酶溶液	—	0.10
6. 迅速加入试剂①立即混匀并记时	0.20	0.20

波长 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初直线部分，计算出每分钟 A 的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围　用于生化分析和临床测定。

参 考 文 献

Wroblewski, F. and LaDue, J. S. (1956), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 569.

15. 己 糖 激 酶
HEXOKINASE (HK)

EC 2. 7. 1. 1 ATP:D-hexose-6-phosphotransferase

催化反应

$$ATP + \underset{\text{己糖}}{D\text{-}C_6H_{12}O_6} \overset{HK}{\rightleftharpoons} ADP + \underset{\text{己糖-6-磷酸}}{D\text{-}C_6H_{11}O_6\text{-}6\text{-}PO_3H_2}$$

存在和性质

广泛存在于酵母、动物组织、高等植物、霉菌等生物中。一般从酵母中提取。己糖激酶能催化己糖如：D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖的磷酸化作用。它有两种类似物 P-I 和 P-II，它们在 DEAE 纤维素柱层析的行为和电泳性质，以及对不同己糖的催化特异性都不相同，其中 P-II 对葡萄糖的活力比 P-I 对葡萄糖的活力高三倍。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 酶干制剂悬浮于 3.0M硫酸铵溶液或 50% 甘油中，在 0～4℃ 可保存一年。

〔分子量〕 105,000（酵母 P-I），102,000（酵母P-II）
100,000(兔肝)

〔最适 pH〕 6.0～9.0

〔等电点〕 pH 4.5～4.8

〔抑制剂〕 重金属离子、金属离子的络合剂、氯化巯基的试剂。

〔激活剂〕 Mg^{++}、Mn^{++} (Mg^{++} 最适浓度为 5～6.5×$10^{-3}M$)。

〔光谱性质〕 P-I $A^{1\%}_{280nm}=8.85$(1cm 光径)

P-II $A^{1\%}_{280nm}=9.47$(1cm 光径)

活力测定

〔原理〕 测定已糖激酶时偶联葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)，使辅酶II还原，以 340nm 光吸收的增加来表示酶活力。

$$\text{葡萄糖}+\text{ATP}\xrightleftharpoons{\text{HK}}\text{葡萄糖-6-磷酸}+\text{ADP}$$

$$\text{葡萄糖-6-磷酸}+\text{NADP}^{+}\xrightleftharpoons{\text{G-6-PDH}}\text{6-磷酸葡萄糖酸内酯}+\text{NADPH}+\text{H}^{+}$$

〔单位定义〕 25℃，每分钟能催化 1 微克分子 D-葡萄糖磷酸化的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：用试剂②配制 10% β-D-葡萄糖溶液。

② 0.10M pH 7.6 三乙醇胺缓冲液。

③ 0.08M ATP 溶液。

④ 0.10M $MgCl_2$ 溶液。

⑤ 0.013M 辅酶II溶液。

⑥ G6PDH 溶液：用试剂②稀释成约 15 单位/ml。

⑦ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加三乙醇胺缓冲液	1.20	1.10
2. 加底物溶液	1.20	1.20
3. 加氯化镁溶液	0.20	0.20
4. 加 ATP 溶液	0.10	0.10
5. 加辅酶 II 溶液	0.20	0.20
6. 加 G_6PDH 溶液	0.10	0.10
7. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收（A），共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶II在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围　可用于测定葡萄糖、果糖、甘露糖和 ATP。在生命细胞的呼吸和酵解作用中起关键作用。

参 考 文 献

Beisenherz, G. (1953), Z. Naturforsch. 86, 555.

16. 丙酮酸激酶
PYRUVATE KINASE (PK)

EC 2.7.1.40 ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase

催化反应

$$ADP + \underset{\text{磷酸烯醇丙酮酸钠盐 (PEP)}}{CH_2{=}C(OPO_3H_2)COONa} \xrightleftharpoons{PK} ATP + \underset{\text{丙酮酸钠}}{CH_3COCOONa}$$

存在和性质

广泛存在于动物的肌肉、脑、肝、心脏，植物、细菌和酵母中；存在于一切能进行糖酵解的生物组织中。一般从兔肌中提取。此酶含有 1.6% S 和 0.06% P。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 丙酮酸激酶悬浮于 $3M$ $(NH_4)_2SO_4$ 溶液中，在 4℃ 至少可保存一年。

〔分子量〕 237,000(兔肌) 166,000(酵母)

〔最适 pH〕 6.8～7.8

〔等电点〕 pH 5.98(兔肌)

〔激活剂〕 K^+、Mg^{++}、Mn^{++} 共存或 NH_4^+ 和 Rb^+ 共存。

〔抑制剂〕 Na^+、Ca^{++}、$2.5M$ 尿素

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm} = 5.4$ (1 cm 光径)(兔肌)

$A^{1\%}_{280nm} = 6.53$(1 cm 光径)(酵母)

活力测定

〔原理〕 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶偶联以还原辅酶 I 的

A_{340nm} 的变化表示酶活力。

〔单位定义〕 25℃，每分钟催化分解 1 微克分子磷酸烯醇丙酮酸的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：30mM 磷酸烯醇丙酮酸环己胺盐的水溶液。

② 0.1M pH7.6 Tris 缓冲液。

③ 激活剂：含有 0.2M $MgSO_4$ 和 0.8M KCl 水溶液。

④ 10mM 还原辅酶 I 溶液。

⑤ 0.02M ADP 水溶液。

⑥ 乳酸脱氢酶溶液：1.0ml 溶液含有 3600 单位。

⑦ 待测酶液：用试剂②（含 0.1% 牛血清白蛋白）稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	2.20	2.10
2. 加激活剂	0.10	0.10
3. 加底物溶液	0.10	0.10
4. 加 0.02M ADP 水溶液	0.60	0.60
5. 加 10mM 还原辅酶 I 溶液	0.05	0.05
6. 加乳酸脱氢酶溶液	0.01	0.01
7. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

在25℃恒温条件下，取二支试管按表中操作步骤加入试剂。然后，使用紫外分光光度计，选择波长340nm，用1cm光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图取反应最初线性部分，计算出每分钟A的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶I在340nm处的克分子消光系数为6.22×10^6。

应用范围 用于用偶联酶方法测定磷酸烯醇丙酮酸、ADP、ATP等。

参 考 文 献

Bücher, T. and Pfleiderer, G. (1955), Methods in Enzymology 1, 435 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N. Y.

17. 肌酸激酶
CREATINE KINASE (CK)

EC 2. 7. 3. 2 ATP: creatine N-phosphotransferase

催化反应

$$肌酸+三磷酸腺苷\overset{CK}{\rightleftharpoons}磷酸肌酸+二磷酸腺苷$$

存在和性质

存在于脊椎动物的肌肉和组织中，一般从兔肌中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 pH 7～9 最稳定，冷冻干粉于－20℃可保存一年。

〔分子量〕 81,000(兔肌)

〔最适 pH〕 正向反应是 pH9.0，逆向反应是 pH6～7。

〔等电点〕 pH 6.1 (兔肌)

〔激活剂〕 Mg^{++}、Mn^{++}、Ca^{++}

〔抑制剂〕 Zn^{++}、Cu^{++}、AMP、ADP、甲状腺素、三碘甲腺原氨酸、丙二酸和无机阴离子等。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=8.76$(1 cm 光径)(兔肌)

活力测定

〔原理〕 利用酶的偶联法以 340nm 光吸收的变化表示酶活性。

$$\text{肌酸}+\text{三磷酸腺苷}\overset{CK}{\rightleftharpoons}\text{磷酸肌酸}+\text{二磷酸腺苷}$$

$$\text{二磷酸腺苷}+\text{磷酸烯醇丙酮酸}\overset{PK}{\rightleftharpoons}\text{丙酮酸}+\text{三磷酸腺苷}$$

$$\text{丙酮酸}+NADH\overset{LDH}{\rightleftharpoons}\text{乳酸}+NAD^{+}$$

总反应平衡式为：

$$\text{肌酸}+\text{磷酸烯醇丙酮酸}+NADH\overset{CK,PK}{\underset{LDH}{\rightleftharpoons}}\text{乳酸}+\text{磷酸肌酸}+NAD^{+}$$

〔单位定义〕 25℃，每分钟能催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物 0.10M 肌酸溶液：用试剂②配制调节 pH 至 9.0 备用。

② 0.15M pH9.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

③ 0.03M 氯化镁溶液。

④ 0.006M 还原辅酶 I 溶液。

⑤ 0.03 M 三磷酸腺苷溶液。

⑥ 0.06 M 磷酸烯醇丙酮酸溶液。

⑦ 乳酸脱氢酶溶液：每 ml 含乳酸脱氢酶 360 单位。

⑧ 待测酶溶液：用含有 0.1% 牛血清白蛋白的冷试剂②配制。

⑨ 丙酮酸激酶溶液：每 ml 含 540 单位。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值为 $\Delta A_{340nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围 可用于测定肌酸和磷酸肌酸的含量。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物 0.10M 肌酸溶液	2.30	2.30
2. 加 0.03M 氯化镁溶液	0.10	0.10
3. 加 0.006M 还原辅酶 I 溶液	0.10	0.10
4. 加 0.03M 三磷酸腺苷溶液	0.10	0.10
5. 加 0.06M 磷酸烯醇丙酮酸溶液	0.10	0.10
6. 加乳酸脱氢酶溶液	0.10	0.10
7. 加丙酮酸激酶溶液	0.10	0.10
8. 加缓冲液(试剂②)	0.10	—
9. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时		0.10

参 考 文 献

Tanzer, M. L. and Gilvarg, C. (1959), J. Biol. Chem. 234, 3201.

18. 脂 肪 酶
LIPASE

EC 3. 1. 1. 3　Triacylglycerol acylhydrolase

催化反应

$$\text{甘油三酯}+H_2O \overset{\text{脂肪酶}}{\rightleftharpoons} \text{甘油二酯}+\text{游离脂肪酸}$$

存在和性质

广泛存在于动物组织、植物种子、微生物、酵母、丝状菌中，特别是胰脏中含量最高。脂肪酶水解长链脂肪酸的酯比酯酶更有力。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 pH 3～7 时，酶溶液稳定，贮藏于巴比妥缓冲液和牛胆酸钠溶液中 4℃ 可保存一个月，干粉在－20℃可保存二年。

〔分子量〕 ～42,000(胰脏)

〔最适 pH〕 7.5～8.0(胰脏)

〔等电点〕 pH 5.0(猪胰)

〔激活剂〕 Ca^{++}、牛磺胆酸钠

〔抑制剂〕 Fe^{++}、Fe^{+++}、Zn^{++}、Cu^{++}、Hg^{++}。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=13.3$(1 cm 光径)(猪胰)

活力测定

〔原理〕 脂肪酶在一定条件下，将甘油三酯水解，在不同水解阶段可放出脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯及甘油。水解所放出的脂肪酸可以用标准碱液滴定之，以此表示酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟催化产生 1 微克分子脂肪酸的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：称取 40g 聚乙烯醇，加蒸馏水约 1000ml，在小火上加热，并不断搅拌，至聚乙烯醇全部溶解，冷却后定容至 1000ml。小心倾倒清液 75ml，加 25ml 橄榄油用高速组织捣碎机搅动六分钟，即成乳白色聚乙烯醇橄榄油乳化液，低

温保存。

② 0.025M pH 7.5 磷酸缓冲液。

③ 0.0500N 氢氧化钠标准溶液。

④ 1%酚酞指示剂。

⑤ 20%牛磺胆酸钠水溶液，过滤后备用。

⑥ 95%乙醇。

⑦ 脂肪酶溶解于水，并稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在37℃恒温条件下，取二只三角烧瓶，按下表操作步骤加入试剂：

步　　骤	空白瓶(ml)	样品瓶(ml)
1. 加0.025M pH7.5 磷酸缓冲液	5.00	5.00
2. 加底物溶液	4.00	4.00
3. 加20%牛磺胆酸钠水溶液	0.40	0.40
4. 加95%乙醇	15.00	—
5. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时保温十分钟	0.10	0.10
6. 立即加95%乙醇	—	15.00
7. 加1%酚酞指示剂	0.1	0.1
8. 用试剂③滴定到微红色出现读出滴定体积	$V_{空}$	$V_{样}$

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{(V_{样}-V_{空})\times N}{10(分)\times 样品瓶中含酶的mg数}$$

式中：N为每ml氢氧化钠标准溶液微克分子数。

测定时使用聚乙烯醇的聚合度应以1000～1750为好，橄榄油的酸度必须小于2%，底物液必须新鲜配置。

应用范围 用于生化研究和工业生产。

参 考 文 献

中山大学生物系生化微生物学教研室。1978。生化技术导论，58。

19. 乙酰胆碱酯酶
ACETYLCHOLINESTERASE (AChE)

EC 3.1.1.7 Acetylcholine acetylhydrolase

催化反应

$$(CH_3)_3\equiv{}^{+}N\underset{\text{乙酰胆碱}}{-CH_2-CH_2-O-CO-CH_3}+H_2O\xrightarrow{AChE}$$

$$(CH_3)_3\equiv{}^{+}N\underset{\text{胆碱}}{-CH_2-CH_2-OH}+CH_3COOH$$

存在和性质

存在于动物的导电组织，一般从电鳗的电器官制备。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 干粉贮存于4℃，可保存半年不失活，在50 mM、pH7.2磷酸缓冲液中可稳定数天。

〔分子量〕 230,000(电鳗电器官)

〔最适 pH〕 7

〔等电点〕 pH4.5

〔抑制剂〕 天然氨基酸、大量胺类、二肽和有机磷化合物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=22.9$(1cm 光径)(电鳗的电器官)

活力测定

方法 I [1]

〔原理〕 乙酰胆碱酯酶作用于乙酰硫代胆碱，产生硫代胆碱。硫代胆碱与二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)反应，生成一种黄色化合物，进行比色测定。反应式如下：

$$\text{乙酰硫代胆碱} \xrightarrow{\text{AChE}} \text{硫代胆碱}+\text{乙酸盐}$$

$$\text{硫代胆碱}+\text{二硫代双硝基苯甲酸} \longrightarrow \text{硫代胆碱-硫代硝基苯甲酸二硫醚}+\text{硫代硝基苯甲酸}$$

〔单位定义〕 在 25℃, pH7.2 每分钟催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.156M 乙酰硫代胆碱碘化物溶液：45.1 mg 乙酰硫代胆碱碘化物溶于 1ml 水中。

② 0.01% DTNB 溶液：以 50mM pH7.2 磷酸缓冲液配置。

③ 待测酶溶液：用水稀释到适当的浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.12ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长 405nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加0.01% DTNB溶液	3.00	3.00
2. 加底物溶液	0.10	0.10
3. 加重蒸水	0.02	—
4. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.02

校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值为 $\Delta A_{405nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{405nm/分}}{13.3\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

硫代胆碱-硫代硝基苯甲酸二硫醚在405nm的克分子消光系数为 13.3×10^6。

方法II[2]

〔原理〕 利用乙酰胆碱酯酶催化水解乙酰胆碱产生醋酸，引起反应体系pH变化来测定酶活力。

〔试剂〕

① 底物溶液：$2.16\times10^{-2}M$ 氯化乙酰胆碱。

② 200mM NaCl溶液：含有40mM $MgCl_2$ 和0.02%牛血清白蛋白。

③ 待测酶液：用0.02%牛血清白蛋白配制成酶含量为10～50μg/ml。

④ 0.01000N 氢氧化钠标准溶液。

〔测定方法〕

取一只三角烧瓶，在自动 pH 滴定仪上操作，在 25℃ 恒温条件下，加入 4.0ml 试剂②，加 1.0ml 底物溶液，加 3.0ml 水，用试剂④调节至 pH 7.4。随即加入 10ml 试剂③，用试剂④回滴。记录溶液被回滴到 pH7.4 的时间 t(分)和所用标准氢氧化钠的体积 V(ml)。

同时配制几种不同浓度的酶溶液，求得各种酶浓度下，每分钟消耗氢氧化钠的体积 V/t (ml/分)。

〔计算〕

以各种酶浓度下得到的 V/t 对酶浓度作图得线性关系时，即可取任意一酶浓度的 V/t 值计算之。

$$\text{单位/mg} = \frac{V/t \times N_{NaOH} \times 10^3}{\text{反应液中含酶的 mg 数}}$$

式中：N_{NaOH} 为试剂④的准确当量浓度。

应用范围

可用于生化研究和临床检验。

参 考 文 献

[1] Ellman, G. L. et al. (1961), Biochem. Pharmacol. **7**, 88.

[2] Kremzner, L. T. and Wilson, I. B. (1963), J. Biol. Chem. **238**, 1714.

20. 果 胶 酶
PECTINESTERASE

EC 3. 1. 1. 11 Pectin pectylhydrolase

催化反应

$$\text{果胶} + n\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons n\text{甲醇} + \text{果胶酸盐}$$

存在和性质

果胶酶存在于植物和细菌中。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 在50℃稳定，但在62℃经30分钟，酶可全部失活，干粉在4℃可保存半年。

〔分子量〕 27,500(西红柿)

〔最适pH〕 4.5

〔激活剂〕 Mn^{++}、二价金属离子。

活力测定

〔原理〕 此酶水解果胶，生成半乳糖醛酸，其产物具有还原性醛基，可用次亚碘酸法定量测定所生成半乳糖醛酸的量以表示果胶酶的活力。

〔单位定义〕 在50℃，每小时催化分解果胶生成1毫克当量游离半乳糖醛酸的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 1% 果胶溶液：称取1克橘子果胶粉，加热水溶解、煮沸，冷却后过滤，调pH至3.5，定容至100ml。

② 0.0500N 标准硫代硫酸钠溶液。

③ 1M 碳酸钠溶液。

④ 0.10N 碘溶液：称取25g碘化钾溶于20 ml水中，另取碘12.7g溶于碘化钾溶液中，定容1000ml。

⑤ 2N 硫酸溶液。

⑥ 0.5%可溶性淀粉。

⑦ 待测酶液：用水稀释至适当浓度，调节pH至3.5。

〔测定方法〕

在50℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为20ml。然后，在50℃水浴中准确恒温二小

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加1%果胶溶液	10.00	10.00
2. 加重蒸水	10.00	5.00
3. 迅速加入待测果胶酶溶液立即混匀并记时	—	5.00

时，立即将这二支试管置沸水浴中煮沸3分钟，使酶灭活。冷却后，另取二只碘量瓶，分别依次加入如下试剂：上述二试管中的反应液5.00ml、1M碳酸钠溶液1.00ml、碘溶液5.00ml。盖上瓶塞，摇匀，于室温下放置20分钟后，分别加入2N硫酸溶液2.00ml，摇匀，再分别用标准硫代硫酸钠溶液滴定到淡黄色。然后，分别加入可溶性淀粉溶液1.0ml，继续用标准硫代硫酸钠溶液滴定到蓝色消失，记录标准硫代硫酸钠溶液的总用量：装有空白管溶液的碘量瓶用去B ml；装有样品管溶液的碘量瓶用去A ml。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(B-A)N\times 0.51\times 20}{5\times 2(\text{小时})\times \text{样品管中酶 mg 数}}$$

式中：A为滴定样品管用去试剂②的用量；

B为滴定空白管用去试剂②的用量；

N为试剂②的当量浓度；

0.51为表示1毫克当量硫代硫酸钠相当于0.51毫克当量游离半乳糖醛酸；

20 为反应液总体积(ml);

5 为吸取反应液体积(ml)。

应用范围 用于生化研究和食品工业。

参 考 文 献

中山大学生物系生化微生物学教研室编，1978。生化技术导论，64。

21. 碱性磷酸酶
ALKALINE PHOSPHATASE

EC 3.1.3.1 Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (alkaline optimum)

催化反应

$$\text{(正)磷酸单酯} + H_2O \xrightarrow{\text{磷酸酶}} \text{(正)磷酸盐} + \text{醇}$$

存在和性质

碱性磷酸酶广泛存在于动物的骨头、牛奶、猪肾、肠、胎盘和某些微生物中，一般从小牛的肠粘膜中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 最适稳定 pH 为 9.0～10.0 (肠)，血中碱性磷酸酶保存在 25℃ 较稳定。酶粗品冷冻干粉于 −20℃ 能保存二年，精品干粉于−20℃能保存半年。

〔分子量〕 100,000 (肠)； 80,000 (*E. Coli*)； 190,000 (牛肝)

〔最适 pH〕 8～10

〔等电点〕 pH4.4(牛肠)

〔激活剂〕 Mg^{++}、Mn^{++}(Mg^{++} 最适浓度为 $10^{-3}M$)。

〔抑制剂〕 螯合剂、无机磷酸酯、Zn^{++}、Be^{++}、CN^- 等。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=13.9$(1cm 光径)(猪肾)

$A^{1\%}_{280nm}=10$(1cm 光径)(牛肠)

活力测定

〔原理〕 碱性磷酸酶在碱性条件下能水解对硝基酚磷酸产生黄色的对硝基酚，该产物在 405nm 处有吸收峰，因此用测定每分钟 405nm 处光吸收值的增加计算酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.01M 对硝基酚磷酸：精确称取 105mg 对硝基酚磷酸二钠盐，溶于 40ml 试剂②中再加 0.4ml 0.1M 氯化镁溶液混合(新鲜配置)。

② 0.20M pH10.25 Tris 缓冲液。

③ 0.04M 氢氧化钠溶液。

④ 待测碱性磷酸酶：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 6.1ml。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{\Delta A_{405nm}\times 6.1(ml)}{18.8\times 5(分)\times \text{样品管中酶的 mg 数}}$$

式中：6.1 为反应总体积；5 为反应时间(分)；

$$\Delta A_{405nm}=A_{空}-A_{样};$$

对硝基酚于碱性溶液中在 405nm 处的克分子消光系数为 18.8×10^6。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	1.00	1.00
2. 加氢氧化钠溶液	5.00	—
3. 迅速加入待测酶液立即混匀并记时	0.10	0.10
4. 37°C准确反应5分钟		
5. 迅速加入氢氧化钠溶液	—	5.00
6. 混匀后在405nm处读光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$

应用范围　用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

Bessey, O. A. et al. (1946), J. Biol. Chem. **164**, 321.

22. 酸性磷酸酶
ACID PHOSPHATASE

EC 3.1.3.2 Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (acid optimum)

催化反应

$$\text{(正)磷酸单酯} + H_2O \xrightarrow{\text{磷酸酶}} \text{(正)磷酸盐} + \text{醇}$$

存在和性质

酸性磷酸酶广泛存在于植物、动物和微生物中，一般从小麦芽孢中提取。有四种同功异构酶具有不同的特性，能用层析方法分离纯化。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 在中性 pH 和高温下不稳定，pH<6.5 稳定性增加，在酶的水溶液中加入柠檬酸和乙酸降低 pH，能增加酶的稳定性。冷冻干粉贮存于－20℃可保存二年。

〔分子量〕 100,000(鼠肝); 23,000(牛脾)

〔最适 pH〕 4.8～5.0

〔激活剂〕 Mg^{++}

〔抑制剂〕 NaF、Cu^{++}、酒石酸盐、草酸盐、甲醛。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{278nm}=4.7$ (1cm 光径)(鼠肝)

活力测定

〔原理〕 酸性磷酸酶在酸性条件下能水解对硝基酚磷酸，产生黄色的对硝基酚。其产物在 405nm 处有吸收峰，因此用测定每分钟 405nm 处光吸收值的增加计算酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃，每小时催化释放出 1 微克分子对硝基酚的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.0055M 对硝基酚磷酸（用试剂②新鲜配制）。

② 0.05M pH4.8 柠檬酸钠。

③ 0.10M 氢氧化钠溶液。

④ 待测酸性磷酸酶：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入

试剂，反应总体积为 5.20ml。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	1.00	1.00
2. 加氢氧化钠溶液	4.00	—
3. 迅速加入酸性磷酸酶溶液，立即混匀并记时	0.20	0.20
4. 37°C准确反应一小时		
5. 迅速加入 0.1*M* 氢氧化钠溶液	—	4.00
6. 混匀在 405nm 处读光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{405nm}\times 5.2(ml)}{18.8\times 1(小时)\times 样品管中酶的mg数}$$

式中：5.2 为反应总体积；1 为反应时间(小时)；

$\Delta A_{405nm}=A_{样}-A_{空}$；

对硝基酚于碱性溶液中在 405nm 处的克分子消光系数为 18.8×10^{3}。

应用范围　用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

[1] Bessey, O. A. et al. (1946), J. Biol. Chem. **164**. 321.

[2] Sigma Chemical Co. (1960), Bulletin 104, St. Louis, Missouri.

23. 磷酸二酯酶 I
PHOSPHODIESTERASE I

EC 3. 1. 4. 1 Oligonucleate 5'-nucleotidohydrolase

催化反应

$$RNA(或\ DNA)+H_2O \xrightarrow{磷酸二酯酶\ I} 5'-核苷酸$$

从核酸分子的3'-末端开始逐个地将5'-核苷酸水解下来，因此磷酸二酯酶I也称作外切核酸酶。

存在和性质

磷酸二酯酶I分布较广泛，一般从毒蛇的毒液中提取。

〔溶解度〕 溶解于水或稀缓冲液中。

〔稳定性〕 耐热，在pH<5和pH>10时不稳定，冻干会引起失活，干粉在4℃保存六个月活力下降15%。

〔分子量〕 100,000～130,000(蛇毒)

〔最适pH〕 8.9～9.3

〔等电点〕 pH9

〔激活剂〕 Mg^{++}、Ca^{++}

〔抑制剂〕 半胱氨酸、谷胱甘肽、维生素C、Cu^{++}和KCN等。

活力测定

〔原理〕 双-对硝基酚磷酸$\xrightarrow{磷酸二酯酶}$单对硝基酚磷酸+对硝基酚。

磷酸二酯酶催化上述反应，测定产物对硝基酚的生成速

度表示酶活力。

〔单位定义〕 25℃，在测定条件下，能催化产生1微克分子产物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.001M 双-对硝基酚磷酸二钠盐。

② 0.10M pH8.9 Tris 缓冲液。

③ 0.005M 氯化钙溶液。

④ 待测酶液：用水稀释至 50μg/ml。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加试剂②Tris 缓冲液	1.00	1.00
2. 加试剂①底物液	1.20	1.20
3. 加试剂③氯化钙溶液	0.30	0.30
4. 加重蒸水	0.50	0.50
5. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	--	0.005

择波长为405nm，用1cm光径的比色杯测定光吸收值；以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{405nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A_{405nm/分}}{18.5 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

对硝基酚在405nm处的克分子消光系数为 18.5×10^6。

应用范围 用于生化分析、生化研究，如核酸的顺序测定等。

参 考 文 献

Sulkowski, E. and Laskowski, M. Sr. (1971), Biochim. Biophys. Acta. **240**, 443.

24. 脱氧核糖核酸酶 I
DEOXYRIBONUCLEASE I (DNase I)

EC 3.1.21.1. Deoxyribonucleate (double stranded) 5′-oligonucleotidohydrolase

催化反应

$$(n-1)H_2O + DNA \xrightarrow{\text{DNase I}} n\text{-寡聚核苷酸(5′磷酸酯)}$$

该酶为内切核酸酶，产物为5′-核苷酸和5′磷酸寡聚核苷酸。

存在和性质

存在于动物组织中，特别是在胰脏中含量较高，一般从牛胰中提取。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 冷冻干粉在5℃可贮存5年。

〔分子量〕 30,000(牛胰)

〔最适 pH〕 6.0～7.0 (0.05M Mg^{++})

〔等电点〕 pH4.7(牛胰)

〔激活剂〕 Mg^{++}、Mn^{++}、Co^{++}

〔抑制剂〕 可以络合 Mg^{++} 的阴离子如：柠檬酸、溴化乙锭、放线菌素 D、牛脾抑制剂。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=12.8$(1 cm 光径)(牛胰)

活力测定

〔原理〕 该酶能降解脱氧核糖核酸形成寡聚核苷酸(5′-磷酸酯)，测量每分钟 260nm 处光吸收值的增加来表示酶活力。

〔单位定义〕 在25℃，每分钟使 260 nm 光吸收增加 0.001 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物 DNA 溶液：4mg DNA 加 50ml 重蒸水用匀浆器使其溶解，再加 10ml 试剂②和 10ml 试剂③混匀备用。

② 1.0M pH5.0 乙酸缓冲液。

③ 0.05M 硫酸镁溶液。

④ 待测酶液：用水配成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物 DNA 溶液	3.00	3.00
2. 加重蒸水	1.00	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	1.00

试剂，反应总体积为 4.0ml。

使用紫外分光光度计，选择波长为 260nm，用 1cm 光径的石英比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收（A），共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值（ΔA/分）为 $\Delta A_{260nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{260nm/分}}{0.001\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

应用范围 用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

Kunitz. M. (1950), J. Gen. Physiol. 33, 349, 363.

25. 核糖核酸酶 T_1
RIBONUCLEASE T_1 (RNase T_1)

EC 3. 1. 27. 3 Ribonucleate 3′-guanylo-oligonucleotido-hydrolase

催化反应

核糖核酸 $\xrightarrow{RNase\ T_1}$ 3′-鸟嘌呤核苷酸
+3′端为鸟嘌呤核苷酸的寡聚核苷酸

存在和性质

该酶是一种高度专一性的内切核糖核酸酶，是从米曲（*A.*

Dryzae) 中制得的。在其他多种细菌中也存在着类似性质的酶。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 对热较稳定，在 pH>9 的碱性溶液中不稳定，在 4℃ 保存一年不失活。

〔分子量〕 11,085

〔最适 pH〕 7.4～7.5

〔等电点〕 pH2.0

〔抑制剂〕 Zn^{++}、Cu^{++}、Hg^{++} 等。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=19$(1 cm 光径)

活力测定

〔原理〕 该酶能降解 RNA 为酸溶性的小分子寡聚核苷酸片段，引起 260nm 紫外吸收增加，以此表示酶活力。

〔单位定义〕 37℃，在测定条件下，使每 ml 反应液在 15 分钟内水解 RNA，产生 260nm 处光吸收增加 1.0 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物：酵母核糖核酸溶液（每 ml 含 12.0mg 核酸钠盐）。

② 0.20*M* pH7.5 Tris 缓冲液。

③ 0.020*M* pH7.5 EDTA 溶液。

④ 过氯酸-乙酸氧铀溶液（750mg 乙酸氧铀溶解于 100 ml 过氯酸溶液中，这一过氯酸溶液由 22.0ml 70% 过氯酸加 78ml 重蒸水配成）。

⑤ 待测酶液：用试剂②稀释成每 ml 溶液含 0.1 微克蛋白。

〔测定方法〕

在37℃恒温条件下，取二支3ml离心管，按下表操作步骤加入试剂：

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 在3ml离心管中加入0.20*M* pH7.5 Tris 缓冲液	0.25	0.25
2. 加0.020*M* pH7.5 EDTA溶液	0.10	0.10
3. 加重蒸水	0.40	0.30
4. 加待测酶液	—	0.10
5. 迅速加入试剂①底物液，立即混匀并记时	0.25	0.25
6. 在37℃保温15分钟后，立即加入过氯酸-乙酸氧油溶液	0.25	0.25
7. 离心后另外取二支10.0ml试管吸取离心管内上清液	0.20	0.20
8. 加重蒸水	4.80	4.80
9. 混匀后在260nm处测定光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A \times \frac{5}{0.2}}{1 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

式中：ΔA为 $A_{样} - A_{空}$；$\frac{5}{0.2}$为稀释倍数。

应用范围　用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

Takahashi, K. (1961), J. Biochem. (Japan) 49, 1.

26. 核糖核酸酶 A
RIBONUCLEASE A (RNase A)

EC 3. 1. 27. 5 Ribonucleate 3'-pyrimidino-oligonucleotidohydrolase

催化反应

核糖核酸 $\xrightarrow{\text{RNase A}}$ 3′-嘧啶核苷酸＋3′端为嘧啶核苷酸的寡核苷酸

核糖核酸酶A水解核糖核酸时，首先生成2′, 3′-环状核苷酸，然后再进一步水解2′,3′-环状核苷酸为3′-核苷酸。该酶的碱基专一性不是绝对的，它也能缓慢地水解聚腺苷酸等。

存在和性质

存在于牛的胰脏中，在哺乳动物的肝脏中也存在类似的核糖核酸酶。

〔溶解度〕 溶解于水或稀缓冲液。

〔稳定性〕 最稳定的pH是2.0～2.5，在4°C条件下，干粉在干燥情况下可保存数年。

〔分子量〕 13,683

〔最适pH〕 7.0～7.5

〔等电点〕 pH9.45

〔抑制剂〕 肝素、Cu^{++}、Zn^{++} 和巯基化合物等。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=6.95$

活力测定

〔原理〕 Kunitz 经典方法认为：当寡核苷酸或单核苷酸的环状磷酸被该酶水解时，此溶液在 300nm 处的光吸收随时间而下降(这称为减色效应)，用 300nm 光吸收减少的速度推算出此酶的活力单位。

〔单位定义〕 在按下述测定方法的条件下，能催化水解核糖核酸，使一级反应速度常数 K=1 的酶量为 1 单位。通常称作 Kunitz 单位。

〔试剂〕

① 底物：0.1%酵母核糖核酸(以试剂②配置)。

② 0.10*M* pH5.0 乙酸缓冲液。

③ 待测酶液：用重蒸水稀释至每 ml 含酶 0.15～0.25 单位。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 4.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.00	2.00
2. 加重蒸水	2.00	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	2.00

择波长为 300nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读 300nm 处光吸收，共

读3分钟，得到一组对应于时间t（分）的A_t值，当样品管反应进行三小时后，再测定300nm处光吸收A_f，A_f为最终的光吸收，分别求得一组对应于t的$\log(A_t-A_f)$，将$\log(A_t-A_f)$对t作图，应得到线性关系，画出直线，求出直线斜率的数值称为S，将S代入下述公式即可求出酶活力。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{S\times(-2.3)\times 4}{\text{样品管中含酶 mg 数}}$$

应用范围 用于生化分析和生化研究。

参 考 文 献

Kunitz, M. (1946), J. Biol. Chem. **164**, 563.

27. α-淀粉酶
α-AMYLASE

EC 3. 2. 1. 1 1, 4-α-D-Glucan glucanohydrolase

催化反应

在含有多个1, 4-α-D-葡萄糖单位的多糖链上，内切1, 4-α-D-糖苷键。

存在和性质

广泛存在于动物、植物、微生物中，例如在麦芽和动物的唾液、脾脏中都含有较多的α-淀粉酶。

〔溶解度〕 非常容易溶解于水和稀的缓冲液中。

〔稳定性〕 溶液保存于pH 4.8～10.6，加Ca^{++}可增加

酶的稳定性，干粉于－20℃保存，可放置一年。

〔分子量〕 45,000(猪胰)；51,000(*A. orgzae*)

〔最适 pH〕 6.9；5.5～7.0(细菌)

〔等电点〕 pH8.8(鼠胰)

〔激活剂〕 Na^+、K^+、Ca^{++}、Cl^-、Br^-、NO_3^-

〔抑制剂〕 重金属离子、Ag^+、Cu^{++}、Hg^{++}、尿素。

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=24$(猪胰)

活力测定

〔原理〕 以 3，5-二硝基水杨酸测定 α-淀粉酶水解淀粉产生的糖量来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃，每分钟能催化分解底物产生 1 微克分子麦芽糖的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：1%马铃薯支链淀粉——以 20m*M* pH6.9 磷酸钠(内含 6.7m*M* 氯化钠)的缓冲液配置。

② 3,5-二硝基水杨酸显色剂：1.60g 氢氧化钠溶于 70 ml H_2O 中，再加入 1.0g 3,5-二硝基水杨酸、30g 酒石酸钾钠，用水稀释到 100ml。

③ 麦芽糖标准溶液：1.0ml 溶液含有 0.360mg 麦芽糖(1 微克分子麦芽糖/ml)。

④ 待测 α-淀粉酶：用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取四支试管，按下表操作步骤加入试剂。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中麦芽糖的 }\mu\text{mole 数}}{(A_{标}-A_{标空})\times 3(\text{分})\times\text{样品管中酶 mg 数}}$$

步　骤	空白管 (ml)	样品管 (ml)	标准空白管 (ml)	标准管 (ml)
1. 加底物溶液	0.50	0.50	—	—
2. 加重蒸水	0.50	—	1.00	—
3. 迅速加入待测酶液，立即记时，25℃准确保温三分钟	—	0.50	—	—
4. 立即加入 3,5-二硝基水杨酸显色剂	1.00	1.00	1.00	1.00
5. 加麦芽糖标准溶液	—	—	—	1.00
6. 在 100℃水浴沸腾五分钟后冷却				
7. 加重蒸水	10.00	10.00	10.00	10.00
8. 测定 540nm 处光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$	$A_{标空}$	$A_{标}$

应用范围　用于生化分析和工业用酶。

参 考 文 献

Bernfeld, P. (1955), Methods in Enzymol. 1, 149 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N. Y.

28. β-淀 粉 酶
β-AMYLASE

EC 3. 2. 1. 2　1,4-α-D-Glucan maltohydrolase

催化反应

从多糖链的非还原端，水解 1,4-α-糖苷键，产物是麦芽糖。

存在和性质

存在于植物、细菌和牛乳中。例如：麦芽、麸皮、大豆、甘薯中都含有此酶，麦芽中含量最高，一般从麦芽中提取。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 干粉于－20℃可保存一年。

〔分子量〕 152,000±15,000; 57,200（面粉）

〔最适 pH〕 4～6(甘薯)

〔等电点〕 pH4.74～4.79

〔激活剂〕 K^+、Na^+

〔抑制剂〕 $HgCl_2$、Ag^+、Cu^{++}、Hg^{++}、对氯汞苯。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=17.7$(1cm 光径)(甘薯)

活力测定

〔原理〕 以 3,5-二硝基水杨酸测定 β-淀粉酶水解淀粉产生的糖量来表示酶活力。

〔单位定义〕 25℃，每分钟能催化分解底物产生 1 微克分子麦芽糖的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：1%马铃薯支链淀粉用 16mM pH4.8 的乙酸缓冲液配置。

② 3,5-二硝基水杨酸显色剂：1.60g 氢氧化钠溶于 70ml 水中，再加入 1.0g 3,5-二硝基水杨酸和 30g 酒石酸钾钠，用水稀释到 100ml。

③ 麦芽糖标准液：1.0ml 溶液含有 0.360mg 麦芽糖(1

微克分子麦芽糖/1.0ml)。

④ 待测 β-淀粉酶：用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取四支试管，按下表操作步骤加入试剂：

步　骤	空白管 (ml)	样品管 (ml)	标准空白管 (ml)	标准管 (ml)
1. 加底物溶液	0.50	0.50	—	—
2. 加重蒸水	0.50	—	1.00	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.50	—	—
4. 25℃准确保温三分钟				
5. 加 3,5-二硝基水杨酸显色剂	1.00	1.00	1.00	1.00
6. 加麦芽糖标准液	—	—	—	1.00
7. 在 100℃ 水浴中沸腾五分钟后冷却				
8. 加重蒸水	10.00	10.00	10.00	10.00
9. 测定 540nm 处光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$	$A_{标空}$	$A_{标}$

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中麦芽糖的 }\mu\text{mole 数}}{(A_{标}-A_{标空})\times 3(\text{分})\times\text{样品管中酶 mg 数}}$$

应用范围　用于生化分析和工业用酶。

参 考 文 献

Bernfeld, P. (1955), Methods in Enzymol. 1, 149 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N. Y.

29. 纤维素酶
CELLULASE

EC 3.2.1.4 1,4-(1,3; 1,4)-β-D-Glucan 4-glucanohydrolase

催化反应

能催化纤维素的β-1,4-糖苷键水解。

存在和性质

广泛存在于细菌、低等和高等动物中。可由木霉提取。纤维素酶是一种多组分的酶，一般认为有 C_L 酶、C_X 酶和β-葡萄糖苷酶，而不同类型的菌所显示的酶活性也不完全一样，为了综合表示纤维素酶的活性，可用不同方法测定。所谓 C_L 酶系指分解天然纤维素为短链纤维素或直链纤维素的纤维素酶。所谓 C_X 酶系指分解短链纤维素成纤维寡糖、纤维二糖等较小单位的纤维素酶。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 在 pH4～6 较稳定，干粉在 4℃ 贮存，可稳定一年。一般在 40～50℃反应，在 60℃以上失活。

〔分子量〕 63,000 (*Myrothecium verrucaria*)
35,500 (*Penicillium notatum*)

〔最适 pH〕 5～6

〔等电点〕 pH6.9(豌豆)

〔抑制剂〕 葡萄糖、苯基-β-葡萄糖苷、纤维二糖、Cu^{++}、Hg^{++}。

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=26$(1cm 光径) (*Penicillium notatum*)

活力测定

〔原理〕 纤维素酶水解滤纸中纤维素，产生纤维二糖、葡萄糖等还原糖，这些还原糖能将 3,5-二硝基水杨酸中硝基还原成橙黄色的氨基化合物，利用比色法测定其还原物生成量来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 40℃，每分钟催化分解滤纸产生相当于 1 微克分子葡萄糖的还原糖的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物：新华一号中速层析滤纸，剪成 $1\times1cm^2$小片备用。

② 3,5-二硝基水杨酸显色剂：称取 10g 3,5-二硝基水杨酸，溶于蒸馏水中，加入 20g 氢氧化钠，200g 酒石酸钾钠，加水 500ml。升温溶解后，加入重蒸酚 2g 和无水亚硫酸钠 0.5g，加热搅拌，待全溶后冷却，定容 1000ml。贮存于棕色瓶中，放置一周后使用。

③ 0.04M pH4.5 乙酸-乙酸钠缓冲液。

④ 待测纤维素酶溶液：用试剂③稀释至适当浓度。

⑤ 葡萄糖标准溶液：180mg 干燥葡萄糖溶于水中定容 100ml，则每 ml 溶液含葡萄糖 10 微克分子。

〔测定方法〕

在 40℃ 恒温条件下，取四支试管按下表操作步骤加入试

剂：

步　骤	空白管 (ml)	样品管 (ml)	标准空白管 (ml)	标准管 (ml)
1. 加葡萄糖标准溶液	—	—	—	0.50
2. 加待测酶溶液	1.00	1.00	—	—
3. 加乙酸缓冲液	1.00	1.00	2.00	1.50
4. 迅速加入底物，立即混匀并记时	—	6 片(6×1cm²)	—	—

上述试剂，混合均匀后置 40℃ 水浴中准确保温反应 60 分钟，立即取出。再加热煮沸 10 分钟，冷却后，分别在各试管中加入 3,5-二硝基水杨酸显色剂 3.00 ml，在空白管中加入 6 片新华一号中速层析滤纸 ($6\times1cm^2$)。然后将各试管置沸水浴中加热 15 分钟，冷却后分别在各管中加重蒸水 10.00 ml 并混合均匀，最后在 550nm处读光吸收值得 $A_{空}$、$A_{样}$、$A_{标空}$、$A_{标}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{(A_{样}-A_{空})\times 标准管中含葡萄糖的\ \mu mole\ 数}{(A_{标}-A_{标空})\times 60(分)\times 反应管中酶\ mg\ 数}$$

应用范围　用于植物细胞脱壁、细胞杂交、生化研究。

参 考 文 献

颜秋生，蒋传葵，1979。遗传，3，33。

30. 溶 菌 酶
LYSOZYME

EC 3. 2. 1. 17 Mucopeptide N-acetylmuramoylhydrolase

催化反应

溶菌酶能溶解很多细菌的细胞壁，对革兰氏阳性菌和产生 *M. Lutevs* 的小球菌比较敏感，对革兰氏阴性菌，几丁质和寡聚N-乙酰氨基葡萄糖也有作用。它作用于粘肽和粘多糖中N-乙酰胞壁酸和2-乙酰氨基-2-脱氧D-葡萄糖之间的 β-1, 4-键。

存在和性质

广泛存在于动植物组织、分泌物、卵白和微生物中，一般用鸡蛋白来提取。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 在pH4～5时很稳定，在碱性和中性条件下酶不稳定。干粉在4℃保存一年以上不失活。

〔分子量〕 14,388(鸡蛋白)

〔最适pH〕 6～7

〔等电点〕 pH 10.5～11.0

〔抑制剂〕 重金属离子、氧化剂、表面活性剂如十二烷基磺酸钠、咪唑和吲哚的衍生物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=26.2$(1 cm 光径)(鸡蛋白)

活力测定

〔原理〕 溶菌酶能水解 *Micrococcus Lysodeikticus* 菌的

悬浮液，使 450nm 处光吸收减少，以此测定酶活力。

〔单位定义〕 25℃，每分钟使 450nm 光吸收减少 0.001 的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：菌体悬浮液：将 *Micrococcus Lysodeikticus* 菌种接种于固体培养基上，35℃培养 48 小时。用蒸馏水将菌体洗下来，纱布过滤，滤液离心后，倾去上层清液，用蒸馏水洗菌体数次，以除去混杂的培养基，最后用少量水悬浮，冰冻干燥得黄色粉末备用。称取上述菌体冻干粉 10mg，加试剂②少许，在匀浆器内研磨 2 分钟，倾出后用试剂②稀释至 50ml，使此悬浮液的 A_{450nm} 为 0.7 左右。

② 0.10*M* pH6.24 磷酸钾缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释至适当浓度，即能使反应管每分钟 A_{450nm} 变化为 0.02～0.04 时的酶浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管，按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.50	2.50
2. 加 0.10*M* pH6.24 磷酸缓冲液	0.50	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.50

择波长为 450nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每

分钟A的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{450nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{450nm/分}}{0.001\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

应用范围 用于生化研究和作为生化药物。

参 考 文 献

Shugar, D. (1952), Biochim. Biophys. Acta. **8**, 302.

31. 神经氨酸苷酶(唾液酸酶)
NEURAMINIDASE (SIALIDASE)

EC 3. 2. 1. 18 Acylneuraminyl hydrolase

催化反应

神经氨酸苷酶水解各种粘多糖末端的N-乙酰神经氨酸和2-乙酰氨基-2-脱氧-D-半乳糖之间的 α-2,6-键。

粘多糖⟶脱N-乙酰神经氨酸粘多糖
+N-乙酰神经氨酸

存在和性质

广泛存在于微生物(病毒、细菌)和动物(鸟类和哺乳类)组织中。神经氨酸苷酶最好的来源是流感病毒颗粒和霍乱细菌。在病毒中,它是颗粒表面的镶嵌结构。与之不同,霍乱菌在生长过程中将此酶释放在培养基中。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲溶液。

〔稳定性〕 神经氨酸苷酶冻干粉在4℃干燥保存。鼠心

神经氨酸酶经纯化后极不稳定，0℃保存，在一星期内活力可损失一半。

〔分子量〕 130,000(流感病毒 A_2)

90,000(霍乱菌)

〔最适 pH〕 5.0(鼠心)

〔等电点〕 pH5.1 (*C. perfringens*)；pH7.0～7.3(鼠心)

〔抑制剂〕 N-乙酰神经氨酸和 N-取代的氨羰基甲酸可抑制鼠心神经氨酸酶。

活力测定

〔原理〕 神经氨酸苷酶作用于底物糖蛋白释放出游离的神经氨酸，游离的神经氨酸经高碘酸氧化，转化成 β-甲醛丙酮酸，后者和硫代巴比妥作用生成能被有机溶剂萃取的生色团，进行分光光度法测定。

〔单位定义〕 在 37℃、pH5.0 的条件下，每分钟能催化产生 1 微克分子 N-乙酰神经氨酸的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：2mg 胎球蛋白溶于 1ml 水中。

② 0.20M pH5.0 乙酸钾缓冲液。

③ 0.20M 高碘酸钠溶液：用 9M 磷酸配置。

④ 10%(重量/体积)砷酸钠溶液：用含有 0.5M 硫酸钠和 0.1N 硫酸的溶液配置。

⑤ 0.6%（重量/体积)硫代巴比妥溶液：用 0.5M 硫酸钠溶液配置。

⑥ 环己酮。

⑦ N-乙酰神经氨酸标准液：每 ml 溶液含 10 微克分子 N-乙酰神经氨酸。

⑧ 待测酶溶液：将神经氨酸苷酶用试剂②稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

取四支试管按下表操作步骤加入试剂：

步　骤	空白管 (ml)	样品管 (ml)	标准空白管 (ml)	标准管 (ml)
1. 加底物溶液	0.10	0.10	0.10	0.10
2. 加 0.20M pH5.0 乙酸缓冲液	0.10	0.10	0.10	0.10
3. 加 N-乙酰神经氨酸标准液	—	—	—	0.10
4. 加重蒸水	—	—	0.10	—
5. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10	—	—
6. 于 37°C 水浴准确保温 1 小时，立即加入高碘酸钠溶液终止反应				
7. 加 0.20M 高碘酸钠溶液	0.10	0.10	0.10	0.10
8. 加待测酶溶液	0.10	—	—	—
9. 每管混合均匀，室温放置 25 分钟				
10. 加 1% 砷酸钠溶液	1.00	1.00	1.00	1.00
11. 加 0.6% 硫代巴比妥溶液	3.00	3.00	3.00	3.00
12. 每管混合均匀，在沸水中加热 15 分钟，冷却到室温				
13. 加环己酮	2.00	2.00	2.00	2.00

接着振摇萃取有色化合物，取环己酮层在 549nm 或 532 nm 处进行比色测定，得到下列各值：$A_{空}$、$A_{样}$、$A_{标空}$、$A_{标}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{(A_{样} - A_{空}) \times \text{标准管中N-乙酰神经氨酸的}\mu\text{mole数}}{(A_{标} - A_{标空}) \times 60(\text{分}) \times \text{样品管中酶的 mg 数}}$$

应用范围

用于病毒学研究、粘多糖结构分析和临床检验。

参 考 文 献

Tallman, J. F. et al. (1972), Methods in Enzymol. **28**, 825. (Ginsburg V. ed.) Academic Press, N. Y.

32. β-葡萄糖醛酸苷酶
β-D-GLUCURONIDASE

EC 3. 2. 1. 31　β-D-Glucuronide glucuronosohydrolase

催化反应

β-D-葡萄糖醛酸苷 + H_2O = D-葡萄糖醛酸 + ROH

存在和性质

广泛存在于微生物、高等植物和动物的脾脏、肝脏、肾脏等组织中。一般从动物的肝脾组织中提取。

〔溶解度〕　溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕　酶的冷冻干粉 4℃ 贮存，半年内不失活，如果在 −20℃贮存可保存二年或更长时间。

〔分子量〕 280,000（牛肝）

〔最适 pH〕 4.0～5.0

〔等电点〕 pH5.8(鼠肾)

〔激活剂〕 Na^+、DNA。

〔抑制剂〕 Cu^{++}、Hg^{++}、Ag^+、D-葡糖醛酸内酯。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=17$（1cm 光径）（牛肝）

活力测定

〔原理〕 β-葡萄糖醛酸苷酶作用于底物酚酞葡糖醛酸苷释放出游离酚酞，用比色法测定游离酚酞的量表示酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟能催化生成 1 微克分子产物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.010*M* pH7.0 酚酞葡糖醛酸苷水溶液。

② 0.10*M* pH4.0 乙酸缓冲液。

③ 0.40*M* 氨基乙酸溶液：以氢氧化钠溶液调节 pH 至 10.7。

④ 酚酞标准溶液：准确称取 31.84mg 酚酞，用乙醇溶解并稀释至 100ml，每 ml 溶液相当于 1 微克分子酚酞。

⑤ 待测酶溶液：用重蒸水稀释到适当的浓度。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 1.0ml。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中酚酞的}\ \mu\text{mole数}}{(A_{标}-A_{空})\times 60(\text{分})\times\text{样品管中酶的mg数}}$$

应用范围

用于生化分析和生化研究。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)	标准管(ml)
1. 加底物溶液	0.10	0.10	0.10
2. 加 0.10*M* pH4.0 乙酸缓冲液	0.40	0.40	0.40
3. 加酚酞标准液	—	—	0.10
4. 加重蒸水	0.50	0.40	0.40
5. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10	—
6. 在 37°C 保温，准确反应一小时，立即终止反应。			
7. 加 0.40*M* 氨基乙酸溶液终止反应	4.00	4.00	4.00
8. 在 540nm 处比色测光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$	$A_{标}$

参 考 文 献

Fishman, W. H. et al. (1948), J. Biol. Chem. **173**, 449.

33. 透明质酸酶
HYALURONIDASE (HAse)

EC 3. 2. 1. 35　Hyaluronate 4-glycanohydrolase

催化反应

能催化透明质酸中 2-乙酰氨基-2-脱氧 β-D-葡萄糖和

D-葡糖醛酸残基相连接的键水解。

存在和性质

透明质酸酶广泛存在于动物组织中，如：睾丸、脾脏、皮肤、血液等，也存在于蛇毒和某些细菌的代谢产物中，一般用动物睾丸来提取。它由蛋白和2.17～5%氨基葡萄糖及5.0～5.2%甘露糖组成。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 酶的冷冻干粉在4℃贮存，可稳定一年以上，水溶液在4℃可稳定二星期。用pH 6.0缓冲液溶解该酶可增加其对热的稳定性。

〔分子量〕 61,000(牛睾丸) 89,000(兔肝)

〔最适pH〕 4.5～6

〔抑制剂〕 高分子量的多糖和重金属离子 Fe^{++}、Zn^{++}、Cu^{++}、Hg^{++}。

〔激活剂〕 聚氨基葡萄糖、多聚赖氨酸和1:10二氨基癸烷。

活力测定

〔原理〕 透明质酸酶能水解透明质酸，使其分子量变小并增加水溶性，一般以浊度降低来表示酶活性。

〔单位定义〕 底物为125 μg 透明质酸，在测定条件下被透明质酸酶水解，使该底物浊度降低50%的酶量为1单位(USP单位)。

〔试剂〕

① 底物溶液：透明质酸用试剂②配成悬浮液，其最终浓度为250μg/ml。

② 0.10M pH6.0 乙酸缓冲液：内含0.065M 氯化钠。

③ 0.035M 溴化十六烷基三甲铵盐：用0.50M pH4.2

乙酸缓冲液配置。

④ 待测酶液：用试剂②配置并稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在37℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为2.0 ml。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	0.50	0.50
2. 加0.10*M* pH6.0 乙酸缓冲液	1.50	1.40～1.00
3. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10～0.50
4. 37℃准确反应30分钟后立即加入试剂③终止反应	4.00	4.00
5. 离心后，取上清液，在400nm处测定光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$

如果不同酶浓度的样品管所得($A_{空}-A_{样}$)值和酶浓度成线性关系，即可进行活力单位计算。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{\dfrac{A_{空}-A_{样}}{A_{空}}}{0.5\times\text{样品管中酶的 mg 数}}$$

应用范围

可用作生化研究和作为生化药物。

参 考 文 献

Biochemica (1978), Merck, p. 24.

34. 氨肽酶（胞浆）
AMINOPEPTIDASE (CYTOSOL)

EC 3.4.11.1 α-Aminoacyl-peptide hydrolase (cytosol)

催化反应

$$L\text{-}(CH_3)_2CH\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{—}NH\text{--}R + H_2O \xrightarrow{\text{氨肽酶}}$$

$$L\text{—}(CH_3)_2CH\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{—}OH + NH_2\text{—}R$$

R 为 H、肽或其他基团。

存在和性质

氨肽酶（胞浆）广泛存在于动物组织、酵母、细菌中，在猪肾中含量较高，一般从猪肾中提取。它是含锌的蛋白质。

〔溶解度〕 溶解于水或稀缓冲液。

〔稳定性〕 最适稳定 pH 7～9，Mg^{++} 可使该酶水溶液稳定二天，该酶悬浮于 3M 硫酸铵（含 0.1M pH 8.0 Tris 缓冲液和 0.005M $MgCl_2$）中在 4℃ 可保存四个月，酶的干制剂在 0～4℃可稳定几个月。

〔分子量〕 300,000（猪肾）

〔最适 pH〕 8.2（0.005M Mg^{++}）

〔等电点〕 pH4～5

〔激活剂〕 Mg^{++}、Mn^{++}

〔抑制剂〕 Zn^{++}、Cu^{++}、Cd^{++}、Hg^{++}、Pb^{++}、螯合剂、甘

油和正丁醇。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{290nm}=8.4$(1cm 光径)(猪肾)

活力测定

〔原理〕 该酶能水解底物亮氨酰胺，使其在 238nm 处光吸收值增加，以 A_{238nm} 减少表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH 8.5 条件下，每分钟能催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.06*M* L-亮氨酰胺盐酸盐溶液（以试剂②配置）。

② 0.50*M* pH8.5 Tris 缓冲液。

③ 0.025*M* 氯化镁溶液。

④ 待测酶液：用试剂②稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.50	2.50
2. 加 Tris 缓冲液	0.30	0.20
3. 0.025*M* 氯化镁溶液	0.20	0.20
4. 迅速加入待测酶溶液，立即混匀并记时	—	0.10

波长为 238nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读

3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{238nm/分} = \Delta A_{样/分} - \Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg = \frac{\Delta A_{238nm/分}}{0.011 \times mg\,酶/ml\,反应混合液}$$

L-亮氨酰胺的酰胺键的克分子消光系数为 0.011×10^6。

应用范围

可用于蛋白质结构分析。

参 考 文 献

Binkley, F. and Torres, C. (1960), Arch. Biochem. Biophys. 86, 201

35. 氨肽酶（微粒体）
AMINOPEPTIDASE (MICROSOMAL)

EC 3.4.11.2 α-Aminoacyl-peptide hydrolase (microsomal)

催化反应

该酶催化肽链 N 端氨基酸水解。酶的专一性表示如下：$A \overset{\downarrow}{-} B$……其中箭头表示水解点，A—B……为肽链。亮氨酸氨肽酶水解肽链时，A为丙氨酸时水解速度最快，A为非极性残基时水解速度也很快。氨肽酶 M 能水解A为脯氨酸、碱性氨基酸及其他一般氨基酸。

存在和性质

广泛存在于动物脏器中，是含锌的蛋白质。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 该酶应贮存于干燥、避光和低温处。

〔分子量〕 75,000～80,000

〔最适 pH〕 8.0～9.2

〔等电点〕 pH4.6

〔抑制剂〕 L-正亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-亮氨酸。

活力测定

〔原理〕 该酶能水解亮氨酰 β-萘胺产生游离 β-萘胺，用比色法测定游离 β-萘胺量表示酶活力。

〔单位定义〕 在反应条件下，每分钟催化生成 1 微克分子 β-萘胺的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.20% L-亮氨酰-β-萘胺：称取 200mg L-亮氨酰-β-萘胺盐酸盐，溶解于少量甲醇中，再用重蒸水稀释到 100ml。

② 0.05*M* pH8.2 和 pH 7.4 Tris 缓冲液（测定氨肽酶 M 用 pH7.4，测定亮氨酸氨肽酶用 pH8.2）。

③ β-萘胺标准液：准确称取 17.97mg β-萘胺盐酸盐，溶于水中，用水稀释到 100ml，即每 ml 溶液含 1 微克分子 β-萘胺。

④ 20%（重量/体积）高氯酸溶液。

⑤ 0.20%（重量/体积）亚硝酸钠溶液。

⑥ 0.50%（重量/体积）氨基磺酸铵溶液（新鲜配置）。

⑦ 0.050%（重量/体积）N-1-萘基盐酸二氨基乙烯：用甲醇配置，在 4℃ 保存可用二周。

⑧ 0.10*M* 氯化镁溶液。

⑨ 待测酶溶液：用试剂②稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

取三支试管按下表操作步骤加入试剂：

步　骤	空白管(ml)	样品管(ml)	标准管(ml)
1. 加底物溶液	0.20	0.20	0.20
2. 加 0.10M 氯化镁溶液	0.20	0.20	0.20
3. 加 Tris 缓冲液	1.30	1.30	1.10
4. 加 β-萘胺标准液	—	—	0.20
5. 37°C平衡 10 分钟			
6. 加入待测酶液，混匀并记时	—	0.30	—
7. 准确反应 10 分钟后立即加入试剂④	1.00	1.00	1.00
8. 加待测酶液	0.30	—	0.30
9. 用定量滤纸滤去沉淀，另取一套试管，做上记号			
10. 取过滤后清液	1.00	1.00	1.00
11. 加试剂⑤，振摇 10 分钟	1.00	1.00	1.00
12. 加试剂⑥，振摇 5 分钟	1.00	1.00	1.00
13. 加试剂⑦后放置 30 分钟	2.00	2.00	2.00
14. 在分光光度计上测得 578nm 处的光吸收值	$A_{空}$	$A_{样}$	$A_{标}$

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中}\ \beta\text{-萘胺的微克分子数}}{(A_{标}-A_{空})\times 10(\text{分})\times\text{样品管中酶的 mg 数}}$$

应用范围

用于蛋白质结构分析。

参 考 文 献

Bergmeyer, H. U. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 830. Academic Press, N. Y.

36. 羧肽酶 A
CARBOXYPEPTIDASE A (CPA)

EC 3. 4. 17. 1 Peptidyl-L-amino acid hydrolase

催化反应

$$\text{肽链-L-氨基酸}+H_2O\xrightarrow{\text{羧肽酶A}}\text{肽链}+\text{L-氨基酸}$$

L-氨基酸一般为带有芳香环的氨基酸或羟基氨基酸。

存在和性质

存在于牛和猪的胰脏中，一般从牛胰中提取。该酶以酶朊形式存在于胰脏中，被胰蛋白酶激活后，能催化具有游离氨基、L-构型的酰胺、肽和酯的类似物的 C 端肽链的残基依次水解。每克分子酶含有 1 克分子锌。

〔溶解度〕 在 pH4.0～7.0 水中不溶解，溶于 10% 氯化锂(以 pH7.5 Tris 缓冲液配置)中可稳定几个星期。

〔稳定性〕 酶结晶悬浮于水中，在4℃保存较稳定。

〔分子量〕 34,600(牛胰)；34,300(猪胰)

〔最适pH〕 7.5～7.8

〔等电点〕 pH6.0

〔抑制剂〕 Cu^{++}、Pb^{++}、Fe^{+++}、柠檬酸、草酸、硫酸、某些肽、D-氨基酸和含有游离羧基的芳香族化合物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{278nm}=19.4$(1cm光径)

活力测定

〔原理〕 羧肽酶A水解底物马尿酰苯丙氨酸，改变了259nm处光吸收，以259nm处光吸收的变化表示酶活力。

〔单位定义〕 在25℃、pH7.5，每分钟能催化分解1微克分子底物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.001M 马尿酰苯丙氨酸(用新鲜试剂②配置)。

② 0.05M pH7.5 Tris 缓冲液：内含1.0M 氯化钠和10%氯化锂。

③ 10%氯化锂溶液。

④ 待测酶液：用冰过的试剂③配置，并稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为259nm，用1cm光径比色杯测定光吸收：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{259nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.90	2.90
2. 加 10% 氯化锂溶液	0.10	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A_{259\text{nm}/\text{分}}}{0.30 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

马尿酰苯丙氨酸在 259 nm 处的克分子消光系数为 0.30×10^6。

应用范围

用于蛋白质结构分析。

参 考 文 献

Folk, J. E. and Schirmer, E. W. (1963), J. Biol. Chem. **238**, 3884.

37. 羧 肽 酶B
CARBOXYPEPTIDASE B (CPB)

EC 3.4.17.2 Peptidyl-L-lysine (-L-arginine) hydrolase

催化反应

$$\text{肽链-L-氨基酸} + H_2O \xrightarrow{\text{CPB}} \text{肽链} + \text{L-氨基酸}$$

L-氨基酸为赖、精、鸟或类精氨酸。

存在和性质

存在于牛和猪的胰脏中，一般从猪胰中提取。它是含锌的酶蛋白。

〔溶解度〕 溶于稀缓冲液中。

〔稳定性〕 羧肽酶溶于 pH 7.5 稀 Tris 缓冲液的浓溶液或悬浮于水的结晶，在－10℃冰冻贮存，一年内不失活。

〔分子量〕 34,300(猪)

〔最适 pH〕 7.6～8.0

〔等电点〕 pH6.9(人胰)

〔抑制剂〕 碱性氨基酸及其衍生物、金属离子螯合剂如：2,2′-联二吡啶、1,10-二氮杂菲、8-羟基喹啉-5-磺酸。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=21.0$(牛胰)

活力测定

〔原理〕 羧肽酶B水解底物 N-马尿酰精氨酸，增加了 254nm 光吸收值，以此表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH7.8，每分钟能催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.002*M* N-马尿酰-L-精氨酸：称取 33.6 mg N-马尿酰-L-精氨酸溶于 50ml 重蒸水中。

② 0.05*M* pH7.8 Tris-冰乙酸缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 254nm，用 1cm 光径比色杯测定光吸收值：以重蒸水

	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	1.50	1.50
2. 加试剂②缓冲液	1.50	1.40
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{254nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{254nm/分}}{0.12\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

N-马尿酰-L-精氨酸在254nm处的克分子消光系数为 0.12×10^{3}。

应用范围

用于蛋白质结构分析。

参 考 文 献

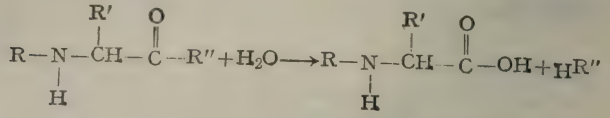
Wolff, E.C. et al. (1962), J. Biol. Chem. **237**, 3094.

38. 胰凝乳蛋白酶
CHYMOTRYPSIN

EC 3. 4. 21. 1.

催化反应

胰凝乳蛋白酶能催化水解芳香族氨基酸的羧基所组成的肽键、酰胺键和酯键。



R为L-氨基酸非极性侧链。

R′为色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的侧链。

R″为一般的氨基酸、肽或醇的残基。

存在和性质

存在于牛、猪等动物胰脏中，是从胰凝乳蛋白水解酶原A、B衍生出的一系列蛋白水解酶。胰蛋白酶可激活存在于胰脏中的胰凝乳蛋白水解酶原A、B，得到五种α、β、γ、δ、π胰凝乳蛋白酶。

〔溶解度〕 溶解于水和稀盐酸中。

〔稳定性〕 酶水溶液(pH2～6)于37℃贮存4小时活力损失20%；酶干粉4℃贮存一年不失活。

〔分子量〕 25,100(牛胰)

〔最适稳定pH〕 3.0

〔最适pH〕 7.0～8.0

〔等电点〕 pH 8.1～8.6(牛胰)

〔抑制剂〕 重金属离子、有机磷化合物和天然胰蛋白酶抑制剂。

〔激活剂〕 Ca^{++}

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=20.2$(1 cm 光径)(牛胰)

活力测定

〔原理〕 胰凝乳蛋白酶能水解底物L-酪氨酸乙酯，使其

234nm 光吸收减少，以此表示酶活性。

〔单位定义〕 在25℃、pH7.0，每分钟能催化产生1微克分子产物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.002M 酪氨酸乙酯溶液（内含0.02M Ca^{++}）：称取49.14mg L-酪氨酸乙酯溶于90ml试剂②，加入4.00ml 0.5M $CaCl_2$ 溶液，最后用试剂②稀释到100ml。

② 0.05M pH7.0 Tris 缓冲液。

③ 0.001N 盐酸。

④ 待测酶液：用试剂③溶解并稀释成适当浓度。

〔测定方法〕 在25℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为234nm，用1cm光径比色杯测定光吸收

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.90	2.90
2. 加0.001N 盐酸	0.10	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的减少值(ΔA/分) 为 $\Delta A_{234nm/分} = \Delta A_{样/分} - \Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{\Delta A_{234nm/分}}{0.672 \times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

酪氨酸乙酯和酪氨酸在 234nm 处克分子消光系数差值为 0.672×10^5。

应用范围

用作蛋白质结构分析和其他生化研究。

参 考 文 献

[1] Schwert, G. W. and Takenaka, Y. (1955), Biochim. Biophys Acta. **16**, 570.

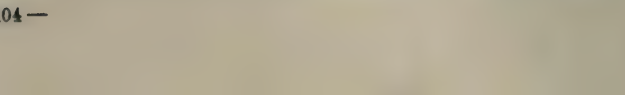
[2] Rick, W. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 802. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

39. 胰蛋白酶
TRYPSIN

EC 3. 4. 21. 4

催化反应

胰蛋白酶能催化水解碱性氨基酸的羧基所组成的肽键、酰胺键和酯键。



R为L-氨基酸非极性侧链。

R′为赖氨酸、精氨酸和组氨酸的侧链。

R″为一般的氨基酸、肽或醇的残基。

存在和性质

胰蛋白酶以胰蛋白酶原形式存在于动物胰脏中，一般从牛、羊、猪胰脏提取。它对天然蛋白质活性较低，不水解血红蛋白、卵清蛋白和胶原蛋白。

〔溶解度〕 溶解于0.01N盐酸。

〔稳定性〕 酶溶液在pH2最稳定，它保持在pH2.3～3条件下可稳定几天，酶干粉在4℃贮存几个月不失活。

〔分子量〕 23,800(牛胰)

〔最适pH〕 7.8～8.5

〔等电点〕 pH3.7、4.0（蝲蛄）

〔抑制剂〕 重金属离子、有机磷化合物和天然胰蛋白酶抑制剂。

〔激活剂〕 Ca^{++}

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=16.0$(1cm光径)(1mM盐酸)

活力测定

〔原理〕 胰蛋白酶能催化水解底物N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)的酯键，使其254nm光吸收增加，以此表示酶活性。

〔单位定义〕 在25℃、pH 8.0，每分钟能催化产生1微克分子产物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.001MN-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(用试剂②新鲜配置)。

② 0.10M pH8.0 Tris缓冲液(内含10mM Ca^{++})。

③ 0.001N 盐酸。

④ 待测酶液：用试剂③溶解并稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.90	2.90
2. 加0.001N 盐酸	0.10	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

波长为254nm，用1cm光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{254nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{254nm/分}}{1.15\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

苯甲酰精氨酸和BAEE在254nm处克分子消光系数差值为 1.15×10^{6}。

应用范围

广泛用于蛋白质顺序研究以及作为临床药物。

参 考 文 献

[1] Schwert, G. W. and Takenaka, Y. (1955), Biochim. Biophys. Acta. 16, 570.

[2] Rich, W. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 815. (Bergmeyer H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

40. 激肽释放酶
KALLIKREIN

EC 3. 4. 21. 8

催化反应

$$\text{激肽原} \xrightarrow{\text{激肽释放酶}} \text{激肽}$$

激肽释放酶属于动物来源的蛋白水解酶类。它可以从激肽原中释放出激肽而不分解其他蛋白质，它不能分解酰胺键但可以分解 N-取代的精氨酸和赖氨酸的酯，分解前者的速度比后者快。

存在和性质

存在于猪的胰脏、动物的唾液、血清和尿中。

〔溶解度〕 溶解于稀缓冲液中。

〔稳定性〕 在－50℃贮存可几个月内不失活。

〔分子量〕 108,000(人血)； 95,000(牛血)； 24,000(猪胰)

〔最适 pH〕 7.65(人血，对 TAME)； 8.8(牛血)

〔等电点〕 pH 4.0（人唾液）

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=20.5$(1 cm 光径)(猪胰)

活力测定

〔原理〕 激肽释放酶水解底物——对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐（TAME），释放出游离甲醇。用铬变酸测定释放甲醇的量来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃、pH7.6，每分钟催化分解释放出 1 微克分子甲醇的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.055M TAME 溶液：准确称量 208mg 对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐溶于 10ml 试剂②，使用前新鲜配置。

② 0.10M pH7.6 磷酸缓冲液(含 0.15M 氯化钠)。

③ 2%高锰酸钾溶液。

④ 10%亚硫酸钠溶液。

⑤ 铬变酸溶液：称取 400 mg 铬变酸溶解于 20 ml 双蒸水中，加入 180ml 65%硫酸，呈黄色备用之。

⑥ 15%三氯乙酸。

⑦ 待测酶溶液：用试剂②稀释成适当浓度。

⑧ 标准甲醇溶液：准确称取优级纯甲醇 160.20 mg 用水稀释到 200ml，溶液浓度为 25mM。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取四支试管按下表操作步骤加入试剂。

然后在沸水浴中加热 15 分钟（试管顶部加玻璃球防止溶液蒸发损失），冷却到室温，在 580nm 测定光吸收值得：$A_{空}$、$A_{样}$、$A_{标空}$、$A_{标}$。

步　骤	空白管 (ml)	样品管 (ml)	标准空白管 (ml)	标准管 (ml)
1. 加底物溶液	2.00	2.00	2.00	2.00
2. 加标准甲醇溶液	—	—	—	0.20
3. 加重蒸水	—	—	0.20	—
4. 加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.30	—	—
5. 在 37°C 准确反应 30 分钟				
6. 立即加入试剂⑥	0.50	0.50	0.50	0.50
7. 加待测酶液	0.20	—	—	—
8. 另取一套试管吸取上述反应液*	0.50	0.50	0.50	0.50
9. 加 2% 高锰酸钾溶液振摇	0.10	0.10	0.10	0.10
10. 加试剂④振摇呈无色	0.10	0.10	0.10	0.10
11. 加铬变酸溶液	4.00	4.00	4.00	4.00

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{(A_{样} - A_{空}) \times \text{标准管中甲醇的 } \mu\text{mole 数}}{(A_{标} - A_{标空}) \times 30(\text{分}) \times \text{样品管中酶的 mg 数}}$$

应用范围

用于生化或生化药物的研究。

---

* 如果反应液混浊可离心或过滤除去沉淀。

参 考 文 献

Colman, R. W. and Bagdasarian, A. (1976), Methods in Enzymology, 45. 303 (Lorand, L. ed.) Academic Press, N. Y.

41. 枯草杆菌蛋白水解酶
SUBTILISIN

EC 3. 4. 21. 14

催化反应

枯草杆菌蛋白水解酶水解蛋白质或多肽中的酰胺键。

存在和性质

存在于枯草杆菌中。

〔溶解度〕 溶于稀缓冲液中。

〔稳定性〕 在 pH6～10 最稳定，酶干粉 4℃保存，一年内不失活。

〔分子量〕 27,600

〔最适 pH〕 7～10

〔激活剂〕 Ca^{++}、Na^{+}、Mg^{++}。

〔抑制剂〕 重金属离子、有机磷化物如二异丙基氟磷酸等。

〔光谱性质〕$A^{1\%}_{280nm}=8.6$(1cm 光径)

活力测定

〔原理〕 该酶能水解 N-乙酰-L-酪氨酸乙酯产生游离的羧基，用标准氢氧化钠溶液滴定羧基的量表示酶活力。

〔单位定义〕 在30℃，每分钟能催化水解1微克分子底物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.020M N-乙酰-L-酪氨酸乙酯：用含有8%(体积比)二氧六圜的0.100M 氯化钾溶液配置，调pH至8.0。

② 0.020M pH7.5 乙酸钠缓冲液，含0.010M 乙酸钙。

③ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

④ 0.02000M 标准氢氧化钠溶液。

〔测定方法〕

在30℃恒温条件下，取一只50ml烧杯装在pH自动滴定仪上，加入10.00ml底物预热到30℃，待测酶溶液加入后立即记时，迅速用标准氢氧化钠溶液滴定反应液，在搅拌条件下保持终点pH 8.0，连续滴定，记下每分钟消耗试剂④的ml数。同时校正空白。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{N_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH/分} \times 10^3}{\text{反应液中酶的 mg 数}}$$

式中：N_{NaOH} 为试剂④的准确当量浓度。

$\Delta V_{NaOH/分}$ 为每分钟消耗试剂④的体积减去空白值 (ml/分)。

应用范围

用于生化研究或工业用酶。

参 考 文 献

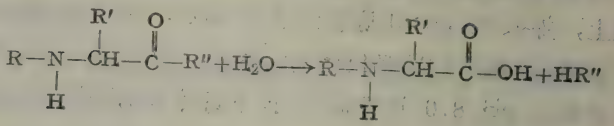
Glazer, A. N. (1967), J. Biol. Chem. 242. 433.

42. 木瓜蛋白酶
PAPAIN

EC 3. 4. 22. 2

催化反应

能催化水解肽键、酯键、酰胺键。



R为L-氨基酸非极性侧链。

R′为精、赖、组、酪氨酸和谷氨酰胺的侧链。

R″为一般的氨基酸、肽或醇的残基。

存在和性质

木瓜蛋白酶存在于番木瓜的胶乳中。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 酶干粉在4℃保存，可稳定六个月。

〔分子量〕 20,700

〔最适pH〕 6～7

〔等电点〕 pH 8.75

〔抑制剂〕 Hg^{++}等重金属离子、抗坏血酸和破坏巯基的试剂。

〔激活剂〕 EDTA、弱还原剂(半胱氨酸、硫化物、亚硫酸盐和氰化物等)。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{278nm}=25.0$(1 cm 光径)

活力测定

〔原理〕 木瓜蛋白酶水解底物——N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯,释放出N-苯甲酰-L-精氨酸,用标准氢氧化钠溶液滴定,以此表示酶活力。

〔单位定义〕 在25℃,每分钟内催化分解1微克分子底物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物溶液:80 mM N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯:准确称取N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐1.42g,加2.6ml试剂②、2.6ml试剂③,加适当水,用0.1N氢氧化钠调节pH至6.2,最后用水稀释到50.0ml。

② 10mM EDTA溶液。

③ 50mM 半胱氨酸溶液。

④ 3M 氯化钠溶液。

⑤ 0.01000N 氢氧化钠标准溶液。

⑥ 待测木瓜蛋白酶:稀释成适当浓度,调节pH至6.2。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下,取25ml烧杯装在pH自动滴定仪上,加入底物溶液3.75ml、3M氯化钠溶液2.50ml、重蒸水1.25 ml,混合后在25℃恒温。然后加入待测酶液后立即记时,用标准氢氧化钠溶液在电磁搅拌的条件下保持终点pH 6.2连续滴定,记下每分钟消耗试剂⑤的ml数。同时校正空白。

〔计算〕

$$\text{单位/mg} = \frac{N_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH/分} \times 10^3}{\text{反应液中酶的 mg 数}}$$

式中：N_{NaOH} 为试剂⑤的准确当量浓度。

$\Delta V_{NaOH/分}$为每分钟消耗试剂⑤的体积减去空白值。

应用范围

用于蛋白质结构分析。

参 考 文 献

Smith, E. L. and Parker, M. J. (1958), J. Biol. Chem. **233**, 1387.

43. 胃蛋白酶 A
PEPSIN (A)

EC 3. 4. 23. 1

催化反应

胃蛋白酶 A 催化水解含有芳香环或二羧酸的氨基酸形成的肽键。

存在和性质

存在于所有脊椎动物的胃液中。

〔溶解度〕 溶解于 pH 低于 6 的水或缓冲液中。

〔稳定性〕 酶水溶液 pH 高于 6，则易失活，酶干制剂在 4℃贮存，可稳定一年。

〔分子量〕 33,367(牛)； 34,000(人)

〔最适 pH〕 1.5～2

〔等电点〕 pH 2.2、2.8（猪）

〔抑制剂〕 某些醇和多聚赖氨酸。

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%}=14.81$（1 cm 光径）（牛）

$A_{280nm}^{1\%}=17.3$（1 cm 光径）（人）

活力测定

〔原理〕 磷钨酸和磷钼酸的混合物（即福林酚试剂）在碱性溶液中极不稳定，易被酚类化合物还原为蓝色化合物（钼蓝和钨蓝混合物）。用蛋白酶催化水解血红蛋白（底物）游离出含酚基的氨基酸，与福林酚试剂呈蓝色反应，可从蓝色的深浅测定酶活力的大小。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟，胃蛋白酶A分解血红蛋白产生的溶于三氯乙酸的物质，与福林酚试剂反应后在 660 nm 的光吸收值相当于 1 微克分子酪氨酸所给出的光吸收值则为 1 单位。

① 底物溶液：2% 血红蛋白：1g 血红蛋白溶于 50 ml 0.06N 盐酸。

② 1N 福林酚试剂（见附录一蛋白质浓度测定部分）。

③ 0.5N 氢氧化钠溶液。

④ 5%三氯乙酸。

⑤ 0.01N 盐酸、0.06N 盐酸、0.2N 盐酸。

⑥ 酪氨酸标准液：精密称取干燥到恒重的酪氨酸 18.12 mg，用 0.2N 盐酸溶解并稀释到 100ml，此溶液每 ml 含酪氨酸 1 微克分子。

⑦ 胃蛋白酶溶液：用 0.01N 盐酸稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂：

步　骤	空白管(ml)	标准管(ml)	样品管(ml)
1. 加酪氨酸标准液	—	0.30	—
2. 加待测酶液	—	—	0.10
3. 加 0.01N 盐酸	0.50	0.20	0.40
4. 在37℃保温数分钟			
5. 迅速加入底物溶液，立即记时并混匀	2.50	2.50	2.50
6. 准确反应 10 分钟，立即加入试剂④	5.00	5.00	5.00
7. 用离心或过滤的方法除去沉淀，另取一套试管			
8. 取离心后上清液	2.50	2.50	2.50
9. 加 0.5N 氢氧化钠溶液	5.00	5.00	5.00
10. 加 1N 福林酚试剂	0.50	0.50	0.50

最后混匀，在 25℃放置 30 分钟后，在 660nm 测定光吸收(A)值得：$A_{空}$、$A_{标}$、$A_{样}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{(A_{样}-A_{空})\times 标准管中酪氨酸的\ \mu mole\ 数}{(A_{标}-A_{空})\times 10(分)\times 样品管中酶的\ mg\ 数}$$

应用范围

用于蛋白质结构分析，也可作生化药物。

参 考 文 献

中山大学生物系生化微生物学教研室，1978。生化技术导论，53。

44. 尿素酶（脲酶）
UREASE

EC 3. 5. 1. 5 Urea amidohydrolase

催化反应

$$(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{\text{尿素酶}} 2NH_3 + CO_2$$

存在和性质

广泛存在于微生物和动植物的组织中，1926 年由 Sumner 最早制得结晶，酶蛋白由六个亚基组成，一般从巨豆中提取。

〔溶解度〕 溶解于水或稀缓冲液中。

〔稳定性〕 纯酶不太稳定，粗酶较稳定，该酶在 50% 甘油溶液中 2℃ 保存，可稳定几个月，干粉 4℃ 保存可稳定一年。

〔分子量〕 483,000（巨豆）

〔最适 pH〕 6～7.3（在马来酸盐缓冲液中最适 pH 是 6.5，在 Tris 缓冲液中最适 pH 是 7.5）。

〔等电点〕 pH 4.9（巨豆）

〔抑制剂〕 羟基脲、羟胺、硫脲、苏拉明、重金属离子。

〔激活剂〕 蛋白质、氨基酸和无机磷。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=5.89$(1 cm 光径)(巨豆)

活力测定

〔原理〕 利用纳氏试剂测定该酶水解尿素时放出的氨来表示酶活力。

〔单位定义〕 在25℃，每分钟催化产生1微克分子氨的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物：3%尿素(用试剂②新鲜配置)。

② 0.68M pH7.0 磷酸缓冲液。

③ 1M 硫酸溶液。

④ 纳氏试剂：称取145 g NaOH，溶于700ml水中，称取50g红色碘化汞和40g碘化钾溶于200ml水中，将后者溶液倾入前者溶液中并稀释至1000ml，静置，取上清液用之。

⑤ 硫酸铵标准液：精密称取在60℃干燥至恒重的分析纯硫酸铵2.643 g溶于水中稀释至500ml，此溶液每毫升含有80微克分子 NH_3。

⑥ 待测酶液：用0.02M pH7.0 (含0.001M EDTA)的磷酸缓冲液稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中 }NH_3\text{ 的 }\mu\text{mole 数}}{(A_{标}-A_{空})\times 5(\text{分})\times\text{样品管中酶的 mg 数}}$$

应用范围 用于测定尿素和精氨酸酶等。

步　骤	空白管(ml)	标准管(ml)	样品管(ml)
1. 加待测酶液	1.00	1.00	1.00
2. 加硫酸铵标准液	—	1.00	—
3. 加重蒸水	1.00	—	1.00
4. 加 1*M* 硫酸溶液	1.00	1.00	—
5. 迅速加入底物溶液，立即混匀并记时	1.00	1.00	1.00
6. 在 25°C 精确反应 5 分钟后迅速加入试剂③	—	—	1.00
7. 另取一套试管准确吸取上述三管溶液	0.40	0.40	0.40
8. 加重蒸水	8.60	8.60	8.60
9. 加纳氏试剂	1.0	1.0	1.0
10. 混匀后在480nm处测光吸收值	$A_{空}$	$A_{标}$	$A_{样}$

参 考 文 献

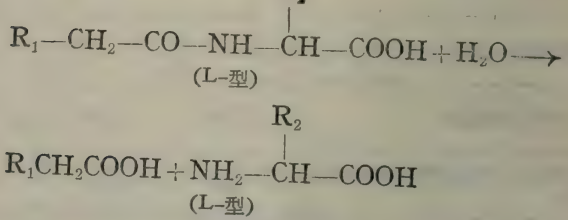
Sumner, J. B. (1955), Methods in Enzymol, 2, 378 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N. Y.

45. 氨基酰化酶
AMINOACYLASE

EC 3. 5. 1. 14　N-Acylaminoacid amidohydrolase

催化反应

氨基酰化酶能催化水解并释放肽链C端的L-氨基酸。



其中 R_1=Cl、H、NH_2

R_2=氨基酸的侧链

存在和性质

存在于动物、植物和微生物中，一般从猪肾和米曲霉菌中制备。

该酶以水解底物的专一性不同而分为酶Ⅰ和酶Ⅱ，氨基酰化酶Ⅰ能水解酰化单羧基的L-氨基酸，酰化酶Ⅱ能水解酰化二羧基的L-氨基酸。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中。

〔稳定性〕 酶干粉在－20℃贮存，可稳定二年，在中性pH、70℃时可放置60分钟，但pH低于5时立即失活。

〔分子量〕 76,500(猪肾)

〔最适pH〕 ～7.0

〔激活剂〕 Co^{++}

〔抑制剂〕 马尿酸、乙酰-D-甲硫氨酸。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=9.96$(1 cm 光径)

活力测定

方法 I[1]

〔原理〕 利用氨基酰化酶水解 N-乙酰-L-甲硫氨酸后引起 238nm 光吸收减少的性质进行测定。

〔单位定义〕 25℃，每分钟催化水解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物：0.015*M* N-乙酰-L-甲硫氨酸：用试剂②配置，调节 pH 至 7.0。

② 0.10*M* pH7.0 磷酸钾缓冲液。

③ 待测酶液：用试剂②稀释成适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.10ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	3.00	3.00
2. 加磷酸缓冲液	0.10	—
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

波长为 238nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{238nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{238nm/分}}{0.018\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

N-乙酰-L-甲硫氨酸在238nm处的克分子消光系数为0.018×10^6。

方法Ⅱ[2]:

〔原理〕 利用茚三酮比色法测定该酶水解N-乙酰-L-甲硫氨酸后，释放出L-甲硫氨酸的量来表示酶活力。

〔单位定义〕 在37℃，每分钟催化水解1微克分子底物的酶量为1单位。

〔试剂〕

① 底物：0.025M pH7.0，N-乙酰-L-甲硫氨酸。

② 0.10M pH7.0磷酸缓冲液。

③ 0.20M pH5.0柠檬酸缓冲液。

④ 茚三酮乙二醇甲醚溶液：85mg茚三酮加还原型茚三酮*(自制)15mg，溶于10ml乙二醇甲醚(重蒸)中。

⑤ 60%乙醇溶液。

⑥ 待测氨基酰化酶：用试剂②稀释至适当的浓度。

⑦ 标准L-甲硫氨酸溶液：准确称取2.98mg干燥L-甲硫氨酸溶于水中，用水稀释至100ml，每ml溶液含0.20微克分子L-甲硫氨酸。

〔测定方法〕

在37℃恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂。混匀后在37℃准确反应30分钟后，立即从各管中取出0.100ml反应液加入预先准备好的含有1.0ml试剂③和1.0ml试剂④的硬质试管中终止反应，将这些硬质试管分别用玻

---

* 还原型茚三酮的制备：5g茚三酮加250ml水并加热溶解，将2%维生素丙水溶液滴加入茚三酮溶液内，避光冷却使结晶析出，过滤、洗涤、干燥、置棕色瓶中备用。

步　骤	空白管(ml)	样品管(ml)	标准管(ml)
1. 加底物溶液	1.00	1.00	1.00
2. 加 0.10M pH7.0 磷酸缓冲液	2.00	1.00	1.00
3. 加标准 L-甲硫氨酸溶液	—	—	1.00
4. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	1.00	—

璃泡盖上(防止内部溶液蒸发)，在 100℃水浴中煮沸 15分钟，在流动水中冷却 10 分钟，待颜色稳定后，加入 3.0ml 60% 乙醇，混匀，于 570nm 处比色测定，得到 $A_{空}$、$A_{样}$、$A_{标}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中 L-甲硫氨酸微克分子数}}{(A_{标}-A_{空})\times 30(\text{分})\times\text{样品管酶的 mg 数}}$$

方法 III[3]

〔原理〕 利用三硝基苯磺酸(TNBS) 比色测定此酶水解 N-乙酰-L-甲硫氨酸后，释放出 L-甲硫氨酸的量表示酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃，每分钟催化水解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.025M pH 7.0，N-乙酰-L-甲硫氨酸。

② 0.10M pH7.0 磷酸缓冲液。

③ 4% 碳酸钠水溶液。

④ 0.01M 亚硫酸钠水溶液。

⑤ 0.1% TNBS 水溶液。

⑥ 待测氨基酰化酶：用试剂②稀释至适当浓度。

⑦ 标准L-甲硫氨酸溶液：准确称取2.384mg干燥L-甲硫氨酸溶于水中，用水稀释至100ml，每ml溶液含0.16微克分子L-甲硫氨酸。

〔测定方法〕

在37℃恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂：

步　骤	空白管(ml)	样品管(ml)	标准管(ml)
1. 加0.10M pH7.0磷酸缓冲液	2.00	1.00	1.00
2. 加底物溶液	1.00	1.00	1.00
3. 加标准L-甲硫氨酸溶液	—	—	1.00
4. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	1.00	—

混匀后，在37℃准确反应30分钟，立即于沸水浴中加热10分钟，冷却至室温。另取一套试管，从上述各试管中各取出0.10ml分别加入新的一套试管中，再分别加入重蒸水0.90ml、4%碳酸钠溶液1.00ml、0.1% TNBS溶液1.00ml，然后在40℃避光恒温60分钟，加入0.01M亚硫酸钠溶液1.00ml，混匀后，使用比色计，选择波长为420nm测定各管的光吸收值A，空白管的光吸收值为$A_{空}$、样品管的光吸收值为$A_{样}$、标准管的光吸收值为$A_{标}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{(A_{样}-A_{空})\times\text{标准管中L-甲硫氨酸的微克分子数}}{(A_{标}-A_{空})\times 30(\text{分})\times\text{样品管中酶的mg数}}$$

应用范围　由于该酶有光学特异性，因此可用于消旋氨基酸的拆分。

参 考 文 献

[1] Mitz, M. A. and Schlueter, J. (1958). Biochim. Biophys. Acta 27, 168.

[2] 潘家秀等，1962。蛋白质化学研究技术，27。

[3] 生化所四室，1976。生物化学与生物物理进展，3，19。

46. 精 氨 酸 酶
ARGINASE

EC 3. 5. 3. 1　L-Arginine amidinohydrolase

催化反应

$$\text{L-精氨酸} + H_2O \xrightarrow{\text{精氨酸酶}} \text{L-鸟氨酸} + \text{尿素}$$

存在和性质

精氨酸酶广泛存在于动物的脏器和植物中，酵母和细菌中也有。

〔溶解度〕　溶于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕　干粉贮存于 4℃ 可以稳定半年。

〔分子量〕　110,000（兔肝）

〔最适 pH〕　9.2～10.2

〔等电点〕 pH6.5(兔肝); pH9.4(鼠肝)

〔激活剂〕 Mn^{++}、Fe^{++}、Co^{++}、Ni^{++}。

〔抑制剂〕 Ag^{+}、Hg^{++}、Zn^{++}、L-鸟氨酸、L-赖氨酸、柠檬酸和硼酸盐。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=10.9$(1 cm 光径)(鼠肝)

活力测定

〔原理〕 精氨酸酶催化分解精氨酸为尿素和鸟氨酸，测定单位时间内底物精氨酸的减少量，计算酶活力。

〔单位定义〕 在 37℃、pH 9.4 反应 1 小时，从精氨酸的最初量 1 毫克分子分解 0.1 微克分子所需要的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.010M 精氨酸水溶液：含有 0.00025M 氯化锰（21.07 mg L-精氨酸盐酸盐溶于少量水，加 0.01M $MnCl_2$ 2.5ml，用水稀释至 100ml)。

② 0.10M pH9.4 巴比妥钠盐缓冲液。

③ 2.5%氢氧化钠溶液。

④ 4.5%氢氧化钠溶液。

⑤ 次亚溴酸钠溶液：1g 溴溶于 100ml 5% 氢氧化钠水溶液中，可于棕色瓶(4℃)保存数周。

⑥ 显色剂：5% 磺酸水杨酸 50ml 加 0.01M 甘氨酸 50 ml，混合后加入 8-羟基喹啉 0.05g 使其溶解后置棕色瓶备用。

⑦ 16%三氯乙酸水溶液。

⑧ 精氨酸酶：用重蒸水配置并稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 37℃ 恒温条件下，取四支试管按下表中操作步骤加入

试剂:

步　　骤	S 管 (ml)	Eo 管 (ml)	E_1 管 (ml)	E_2 管 (ml)
1. 加 0.10*M* pH9.4 巴比妥缓冲液	0.50	0.50	0.50	0.50
2. 加底物溶液	1.00	1.00	1.00	1.00
3. 加水	1.00	0.50	0.50	0.50
4. 加 16% 三氯乙酸水溶液	—	2.00	—	—
5. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.50	0.50	0.50
6. 37℃准确反应一定时间			5 分钟	10 分钟
7. 加 16% 三氯乙酸溶液	2.00	—	2.00	2.00

各反应管于 37℃ 放置 10 分钟，离心，保留上清液。再另取一套试管，按右表中的操作步骤继续进行实验。

〔计算〕

设反应遵守一级反应的规律。

$$y=\frac{A_{E_0}-A_E}{A_S-A_B} \qquad Z=9.491\ \ln\frac{1}{1-y}$$

$$\text{单位/mg}=\frac{Z}{t\times\text{样品管中酶 mg 数}}$$

式中：9.491 为常数(见参考文献)。

t 为反应时间，以小时为单位，A_E 和 t 是对应的。

应用范围　用于生化分析和生化研究。

	S 管 (ml)	E_0 管 (ml)	E_1 管 (ml)	E_2 管 (ml)	B 管 (ml)
1. 取上述上清液	1.00	1.00	1.00	1.00	—
2. 加显色剂	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3. 加 4.5% 氢氧化钠溶液	1.0	1.0	1.0	1.0	—
4. 加 2.5% 氢氧化钠溶液	—	—	—	—	1.0
5. 加水	6.0	6.0	6.0	6.0	7.0
6. 在冰浴里放置 15 分钟					
7. 加次亚溴酸钠溶液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
8. 立即摇匀记时，2 分钟后即比色测定500nm 处光吸收值	A_S	A_{E_0}	A_{E_1}	A_{E_2}	A_B

参 考 文 献

前田昌利(1962)。生化学，34(5)，8。

47. 醛 缩 酶
ALDOLASE (ALD)

EC 4. 1. 2. 13 D-Fructose-1, 6-bisphosphate D-glyceraldehyde-3p-hosphatelyase

催化反应

果糖-1,6-二磷酸 $\overset{ALD}{\rightleftharpoons}$ 磷酸二羟丙酮+3-磷酸甘油醛

存在和性质

广泛存在于动物组织和酵母中。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 该酶在 pH<4 和 pH>10 情况下是不稳定的，pH7.6 时该酶悬浮于 3.2*M* 硫酸铵中，于 4℃可稳定六个月，干粉于 4℃ 可贮藏十二个月不失活。

〔分子量〕 158,000(兔骨骼肌)； 75,000(面包酵母)

〔最适 pH〕 7.0

〔等电点〕 pH 6.1

〔激活剂〕 K^+

〔抑制剂〕 Cu^{++}、Zn^{++}、Ag^+、邻菲绕啉； 竞争性抑制剂的抑制次序为： ATP>ADP>AMP。

活力测定

〔原理〕 利用酶偶联法测定 340nm 光吸收变化表示酶活力。偶联酶反应如下：

$$\text{果糖-1,6-二磷酸} \xrightarrow{ALD} \text{磷酸二羟丙酮}+\text{3-磷酸甘油醛}$$

$$\text{3-磷酸甘油醛} \xrightarrow{\text{磷酸丙糖同分异构酶}} \text{磷酸二羟丙酮}$$

$$\text{磷酸二羟丙酮}+NADH+H^+ \xrightarrow{\text{磷酸甘油脱氢酶}} \text{甘油-1-磷酸}+NAD^+$$

〔单位定义〕 在 25℃，每分钟催化水解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：果糖-1,6-二磷酸四钠盐溶液：30mg 果糖-1,6-二磷酸四钠盐溶于 1ml H_2O 中。

② 0.10*M* pH7.6 三乙胺缓冲液。

③ 还原辅酶 I 溶液：每 ml 水溶液中含还原辅酶 I 10 mg。

④ 混合酶液：每 ml 水溶液含磷酸丙糖同分异构酶和磷酸甘油脱氢酶各 2mg。

⑤ 待测酶液：用试剂②稀释到适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂：

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 0.10*M* pH7.6 三乙胺缓冲液	2.83	2.81
2. 加还原辅酶 I 溶液	0.05	0.05
3. 加底物溶液	0.10	0.10
4. 加混合酶溶液	0.02	0.02
5. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.02

然后，使用紫外分光光度计，选择波长 340nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收 (A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值(ΔA/分)为 $\Delta A_{340/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$\text{单位/mg}=\frac{\Delta A_{340nm/分}}{6.22\times \text{mg 酶/ml 反应混合液}}$$

还原辅酶 I 在 340nm 处的克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围 用于测定果糖-1，6-二磷酸的含量及醛缩酶活力，对血液中醛缩酶活力的测定可用于诊断一些疾病。

参 考 文 献

Biochemica Catalogue (1978), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim-Germany.

48. 柠檬酸合成酶
CITRATE (*si*)-SYNTHASE (CS)

EC 4. 1. 3. 7 Citrate oxaloacetate-lyase (*pro*-3S-CH_2 COO^-⟶acetyl CoA)

催化反应

H_2O+乙酰辅酶 A+草酰乙酸 $\overset{CS}{\rightleftharpoons}$ 柠檬酸+辅酶 A

存在和性质

广泛存在于动物、植物、酵母和细菌中。一般从猪心制备。

〔溶解度〕 溶于水和缓冲液。

〔稳定性〕 在 pH5.5～10.0 溶液中较稳定，在离子强度 $\mu=0.2$ 时酶很稳定，酶干粉一般于 4℃ 贮存。

〔分子量〕 87,000(猪心)

〔最适 pH〕 9.0(鼠肝); 7.0～8.0(酵母)

〔抑制剂〕 一价阳离子、硫氰酸根、ATP 和长链酰基辅酶A的衍生物。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{230nm}=17.8$(1cm 光径)(猪心)

活力测定

〔原理〕 用 5,5′二硫基双-2-硝基苯甲酸盐 (DTNB) 试剂,测定释放出的辅酶A表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH 8.1, 每分钟催化形成 1 微克分子辅酶A的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液: 10m*M* 草酰乙酸用 100m*M* pH8.1 Tris-HCl 缓冲液配置。

② 1m*M* DTNB 溶液: 用 1.0*M* pH8.1 Tris-HCl 缓冲液配置。

③ 13 m*M* 乙酰辅酶 A: 用重蒸水配置。

④ 待测酶溶液: 用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 1m*M* DTNB 溶液	0.10	0.10
2. 加乙酰辅酶A溶液	0.02	0.02
3. 加待测酶溶液	—	0.10
4. 加重蒸水	0.85	0.75
5. 迅速加入底物溶液,立即混匀并记时	0.03	0.03

在25℃恒温条件下，取二支试管按表中操作步骤加入试剂，反应总体积为1.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长412nm，用1cm光径比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读3分钟，以A对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{412nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{412nm/分}}{13.6\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

DTNB 和辅酶A的反应产物在412nm处克分子消光系数为 13.6×10^6。

应用范围

可用于生化研究和生化分析工作。

参 考 文 献

Jangaard, N. O. (1968), Biochim. Biophys. Acta. **151**, 225.

49. 碳酸酐酶
CARBONATE DEHYDRATASE (CHL)

EC 4. 2. 1. 1 Carbonate hydro-lyase

催化反应

$$H_2CO_3 \overset{CHL}{\rightleftharpoons} CO_2+H_2O$$

存在和性质

存在于动物的红血球、胃粘膜、肾脏皮质、鱼鳃和植物的

绿叶中。每克分子酶含 1 克分子的锌。

〔溶解度〕 溶于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 酶溶液在 pH 5.0～10.0 较稳定，浓溶液 5℃ 可保存一年。干粉在－20℃保存，至少可稳定 2 年。

〔分子量〕 30,000(牛)

〔最适 pH〕 6～10

〔等电点〕 pH4.5(鲨鱼红血球)

〔抑制剂〕 大多数一价的阴离子 I^-、NO_3^-、Br^-、Cl^- 和 Cu^{++}、Ag^+、Zn^{++} 等阳离子。

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=19.0$(1 cm 光径)(牛)

活力测定

〔原理〕 碳酸酐酶能分解对硝基酚乙酸酯引起 348nm 处光吸收增加，以此表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃、pH7.6，每分钟催化分解 1 微克分子底物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.003M 对硝基酚乙酸酯(13.60mg 对硝基酚乙酸酯溶于 1ml 丙酮中，用水稀释至 25ml)，必须新鲜配制避光保存。

② 0.015M pH7.6 Tris-硫酸缓冲液。

③ 待测酶液：用水稀释至适当浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 348nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	2.00	1.90
2. 加底物溶液	1.00	1.00
3. 迅速加入待测酶液，立即混匀并记时	—	0.10

钟A的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{348nm/分}=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$单位/mg=\frac{\Delta A_{348nm/分}}{5.0\times mg\ 酶/ml\ 反应混合液}$$

上述条件下对硝基酚的克分子消光系数为 5.0×10^6。

应用范围　可催化二氧化碳和羰基化合物可逆水合。

参 考 文 献

Armstrong, J. McD. et al. (1966), J. Biol. Chem. **241**, 5137.

50. 胰蛋白酶抑制剂
TRYPSIN INHIBITOR (TPI)

催化反应

胰蛋白酶抑制剂可抑制胰蛋白酶水解蛋白质或肽等底物的反应。

存在和性质

胰蛋白酶抑制剂从大豆、鸡蛋白、牛胰中提取。

〔溶解度〕　溶于水和稀缓冲液。

〔稳定性〕 该抑制剂干粉贮存于4℃可保存一年。

〔分子量〕 21,000(大豆); 28,000(鸡蛋白);
6,155(牛胰)

〔等电点〕 pH 4.5(大豆); pH 3.8～4.5(鸡蛋白)

〔光谱性质〕 $A^{1\%}_{280nm}=9.1$(1 cm 光径)(大豆)
$A^{1\%}_{280nm}=5.9$(1 cm 光径)(牛胰)

活力测定

〔原理〕 胰蛋白酶可催化水解N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE),引起254nm光吸收值的增加,而胰蛋白酶抑制剂加入上述体系后,抑制了胰蛋白酶的活力,使254nm光吸收值增加的幅度有所减少,以它的减少程度表示此抑制剂的抑制能力。

〔试剂〕

① 0.10M pH8.0 Tris 缓冲液(含 10mM Ca^{++})。

② 0.001N 盐酸。

③ 结晶胰蛋白酶溶液: 用试剂②配成每 ml 溶液含 1.0 mg 结晶胰蛋白酶。

④ 胰蛋白酶底物溶液: 0.001M N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(用试剂①新鲜配置)。

⑤ 待测抑制剂溶液: 用试剂②配成每 ml 溶液含有 1.0 mg 胰蛋白酶抑制剂。

〔测定方法〕

在25℃恒温条件下,取三支试管按下表操作步骤加入试剂。上述试剂混合均匀后在25℃恒温30分钟,然后从各管中取出0.100ml分别注入另外三支试管。在三支试管中各加2.90ml胰蛋白酶底物溶液,立即混匀并记时,再使用紫外分光光度计,选择波长为254nm,用1cm光径的比色杯测定光

步　　骤	空白管(ml)	标准管(ml)	样品管(ml)
1. 加重蒸水	7.00	7.00	6.00
2. 加 0.001N 盐酸	1.00	—	—
3. 加 Tris 缓冲液	2.00	2.00	2.00
4. 加胰蛋白酶溶液	—	1.00	1.00
5. 加待测抑制剂溶液	—	—	1.00

吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的增加值(ΔA/分)为 $\Delta A_{254nm/分}$(样品)＝$\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$，$\Delta A_{254nm/分}$(标准)＝$\Delta A_{标/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$\%\text{抑制程度}=\frac{\Delta A_{254nm/分}(\text{标准})-\Delta A_{254nm/分}(\text{样品})}{\Delta A_{254nm/分}(\text{标准})}\times 100$$

应用范围

用于生化研究、生化分析和作为生化药物。

参 考 文 献

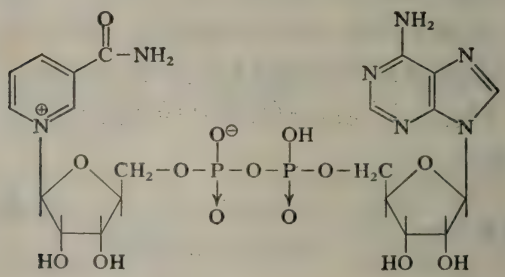
Laskowski, M. (1955), Methods in Enzymol, **2**, 36 (Colowick, S. P and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N. Y.

51. 辅 酶 I
NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE (NAD) DIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE (DPN)

分子式: $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$

分子量: 663.5

结构式:



性质

辅酶 I 易溶于水、易吸潮，应避光、干燥、4℃ 存放。

$[\alpha]_D^{23} = -34.8$ (c=1, H_2O)

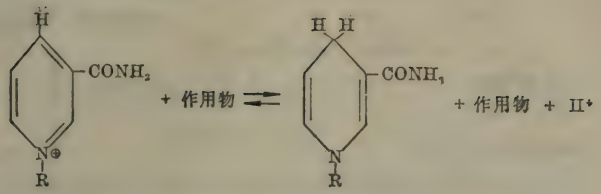
$F'_0 = -0.318$ 伏 (pH 7, 30℃)

pH 7.5, $\lambda_{极大259nm}$ $\quad \epsilon^{1cm}_{259nm} = 17800$

pH 7.5, $\lambda_{极小230nm}$ $\quad \epsilon^{1cm}_{280nm} = 8000$

pH 7, $A_{250nm}/A_{260nm} = 0.83$, $\quad A_{280nm}/A_{260nm} = 0.22$

催化反应



氧化型辅酶 I　　还原型辅酶 I

R 代表　核糖-二磷酸-核糖-腺嘌呤

含量测定

〔原理〕　辅酶 I 参于如下反应：

$$DPN^{+}+CH_3CH_2OH \xrightleftharpoons{\text{醇脱氢酶}} DPNH+H^{+}+CH_3C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}$$

测定还原辅酶 I 在 340nm 处的特征吸收峰值即可计算出辅酶 I 的含量。

〔试剂〕

① 底物溶液：0.5*M* 乙醇，用 0.1*M* Tris 缓冲液配置（称取 4.6g 无水乙醇加 2.4g Tris 用水溶解，调 pH 8.8，用水稀释到 200ml）。

② 醇脱氢酶溶液：稀释成每 ml 酶含 1mg 酶蛋白。

③ 待测辅酶 I 溶液：用水配成每 ml 溶液含 1mg 样品。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，加试剂 ② 之前测各管光吸收值（A^{0}_{340nm}），加试剂②之后每隔一分钟测各管光吸收值（A_{340nm}），直到 A_{340nm} 不再随时间增加为止，最终的光吸收值为 A'_{340nm}。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加底物溶液	2.00	2.00
2. 加待测辅酶 I 溶液	—	0.20
3. 加重蒸水	0.90	0.70
4. 加醇脱氢酶溶液	0.10	0.10

〔计算〕

$$\Delta A = (A'_{样} - A^{0}_{样}) - (A'_{空} - A^{0}_{空})$$

$$\beta\text{-DPN 含量} = \frac{\Delta A \times \text{分子量}}{6.22\times10^{3}\times \text{mg 辅酶/ml 反应混合液}} \times 100\%$$

6.22×10^{6} 为还原辅酶 I 的克分子消光系数。

应用范围

辅酶 I 可作为多种酶系的辅酶，是用途极广的生化试剂和生化药物。

参 考 文 献

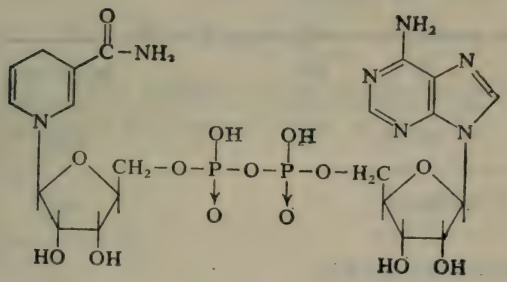
Klingenberg, M. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 528. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

52. 还原辅酶 I
NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE REDUCED (NADH) DIHYDRODIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE (DPNH)

分子式：$C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$

分子量：665.5

结构式：



性质

还原辅酶 I 易溶于水、易吸潮，应避光、干燥 4℃ 存放。

pH7.5 $\lambda_{极大259nm}$ $\epsilon^{1cm}_{259nm}=16,900$

pH7.5 $\lambda_{极大338nm}$ $\epsilon^{1cm}_{338nm}=6,220$

pH7.5 $\lambda_{极小234nm}$ $\epsilon^{1cm}_{234nm}=6,600$

pH7.5 $\lambda_{极小290nm}$ $\epsilon^{1cm}_{290nm}=1,300$

含量测定

〔原理〕 利用乳酸脱氢酶催化丙酮酸钠还原为乳酸，同

时将还原辅酶 I 氧化成辅酶 I，测定 340nm 光吸收值的减少计算其含量。

〔试剂〕

① 0.05M pH7.5 Tris 缓冲液。

② 0.05M 丙酮酸钠水溶液。

③ 乳酸脱氢酶溶液：用试剂① 配成每 ml 溶液含 1mg 蛋白。

④ 待测还原辅酶 I 样品溶液：用水配成每 ml 溶液含 1 mg 样品。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	2.00	2.00
2. 加丙酮酸钠溶液	0.10	0.10
3. 加待测还原辅酶 I 溶液	—	0.20
4. 加重蒸水	0.80	0.60
5. 加乳酸脱氢酶溶液	0.10	0.10

然后，使用紫外分光光度计，选择波长 340nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，加试剂③之前测各管光吸收值（A^{0}_{340nm}），加试剂③之后每隔一分钟测各管光吸收值（A_{340nm}），直到 A_{340nm} 不再随时间减少为止，最

终的光吸收值为 A'_{340nm}。

〔计算〕

$$\Delta A = (A^0_{样} - A'_{样}) - (A^0_{空} - A'_{空})$$

$$\beta\text{-DPNH 含量} = \frac{\Delta A \times \text{分子量}}{6.22 \times 10^3 \times \text{mg 辅酶/ml 反应混合液}} \times 100\%$$

还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

还原辅酶 I 用于多方面生化研究工作。

参 考 文 献

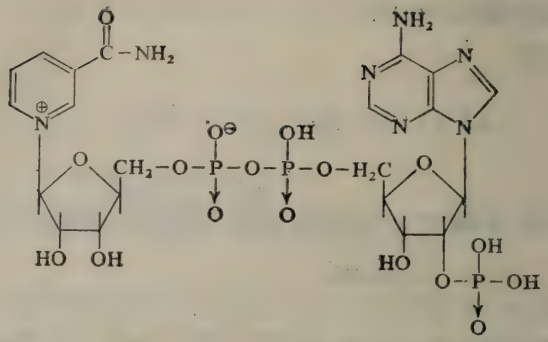
Klingenberg, M. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 531. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

53. 辅 酶 II
NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NADP) TRIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE (TPN)

分子式：$C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3$

分子量：743.4

结构式：



性质

辅酶Ⅱ易溶于水、易吸潮，应避光干燥、4℃ 存放。

pK_a ①3.9 ②6.1

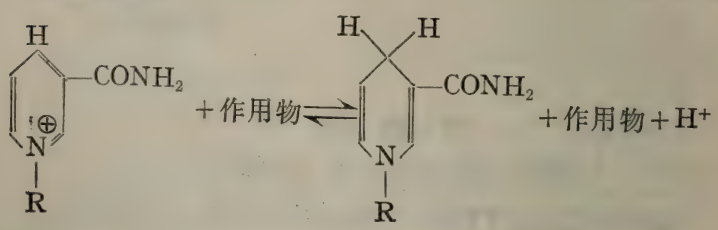
$E'_0 = -0.317$ 伏(pH 7, 30℃)

pH7 $\lambda_{极大259nm}$ $\epsilon^{1cm}_{259nm} = 18,000$

pH7 $\lambda_{极小231nm}$ $\epsilon^{1cm}_{231nm} = 8,100$

pH7 $A_{250}/A_{260} = 0.83$, $A_{280}/A_{260} = 0.21$

催化反应



氧化型辅酶Ⅱ　　还原型辅酶Ⅱ

R 代表　核糖-二磷酸-核糖-腺嘌呤
　　磷酸

含量测定

〔原理〕 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化葡萄糖-6-磷酸氧

化，同时将辅酶Ⅱ还原为还原辅酶Ⅱ，测定还原辅酶Ⅱ在 340 nm 处的特征吸收峰值，可计算出辅酶Ⅱ的含量。

〔试剂〕

① 1.0M pH8.0 Tris 缓冲液。

② 0.10M 氯化镁溶液。

③ 0.030M 葡萄糖-6-磷酸钠溶液。

④ 待测辅酶 Ⅱ 溶液：用水配成每 ml 溶液含 1.0mg 辅酶Ⅱ。

⑤ 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液：用重蒸水配成每 ml 溶液含 1mg 酶蛋白。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	0.50	0.50
2. 加氯化镁溶液	0.20	0.20
3. 加葡萄糖-6-磷酸溶液	0.10	0.10
4. 加待测辅酶 II 溶液	—	0.20
5. 加重蒸水	2.10	1.90
6. 加试剂⑤葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液	0.10	0.10

波长 340nm，用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，加试剂⑤之前测各管光吸收值(A^{0}_{340nm})，

加试剂⑤之后每隔一分钟测各管光吸收值（A_{340nm}），直到A_{340nm}不再随时间增加为止，最终的光吸收值为A'_{340nm}。

〔计算〕

$$\Delta A = (A'_{样} - A^0_{样}) - (A'_{空} - A^0_{空})$$

$$\beta\text{-TPN 含量} = \frac{\Delta A \times \text{分子量}}{6.22 \times 10^3 \times \text{mg 辅酶/ml 反应混合液}} \times 100\%$$

还原辅酶 II 在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

该辅酶在生化研究、生化分析和临床生化测定中都有重要的用途。

参 考 文 献

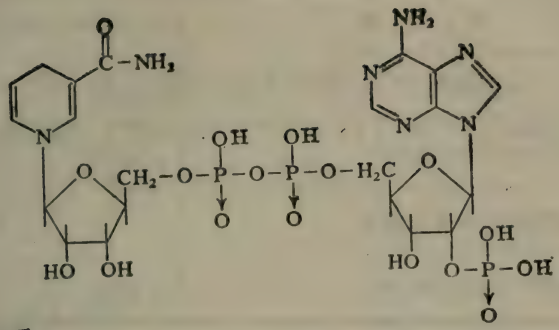
Klingenberg, M. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 535. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

54. 还原辅酶 II
NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE REDUCED (NADPH) DIHYDROTRIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE (TPNH)

分子式：$C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3$

分子量：745.4

结构式：



性质

还原辅酶Ⅱ易溶于水，易吸潮，应避光、干燥、4℃ 存放。

pH7.5 $\lambda_{极大259nm}$ $\epsilon^{1cm}_{259nm}=16,900$

pH7.5 $\lambda_{极大339nm}$ $\epsilon^{1cm}_{339nm}=6,200$

pH7.5 $\lambda_{极小236nm}$ $\epsilon^{1cm}_{236nm}=7600$

pH7.5 $\lambda_{极小290nm}$ $\epsilon^{1cm}_{290nm}=1400$

含量测定

〔原理〕 谷胱甘肽还原酶催化氧化型谷胱甘肽还原，同时还原辅酶Ⅱ被氧化为辅酶Ⅱ，测定 340nm 光吸收值的减少来计算还原辅酶Ⅱ的含量。

〔试剂〕

① 0.10*M* pH7.5 Tris 缓冲液。

② 0.10*M* 氧化型谷胱甘肽溶液。

③ 谷胱甘肽还原酶：用试剂①配成每 ml 溶液含 1mg 蛋白。

④ 待测还原辅酶Ⅱ溶液：用水配成每 ml 溶液含 1.0mg 还原辅酶Ⅱ。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取二支试管按下表操作步骤加入试

步　　骤	空白管(ml)	样品管(ml)
1. 加 Tris 缓冲液	2.80	2.40
2. 加氧化型谷胱甘肽溶液	0.10	0.10
3. 加待测还原辅酶 II 溶液	—	0.40
4. 加谷胱甘肽还原酶溶液	0.10	0.10

剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到0点，加试剂③之前测各管光吸收值(A^0_{340nm})，加试剂③之后每隔一分钟测各管光吸收值 (A_{340nm})，直到 A_{340nm}不再随时间减少为止，最终的光吸收值为 A'_{340nm}。

〔计算〕

$$\Delta A = (A^0_{样} - A'_{样}) - (A^0_{空} - A'_{空})$$

$$\beta\text{-TPNH 含量} = \frac{\Delta A \times \text{分子量}}{6.22 \times 10^3 \times \text{mg 辅酶/ml 反应混合液}} \times 100\%$$

还原辅酶II在 340nm 处克分子消光系数为 6.22×10^6。

应用范围

用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

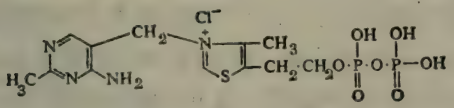
Ciotti, M. M. and Kaplan, N. O. (1957), Methods in Enzymology **3**, 894 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. ed.) Academic Press, N.Y.

55. 氯化硫胺素焦磷酸盐（辅羧酶）
THIAMINE PYROPHOSPHATE (CHLORIDE), COCARBOXYLASE (TPP)

分子式：$C_{12}H_{19}N_4O_7P_2SCl$

分子量：460.78

结构式：



性质

辅羧酶易溶于水，熔点为 242～244°C（分解）

pK_a 5.0

$A^{1\%}_{1cm}=252$（233nm，在 pH7 磷酸缓冲液中）

$A^{1\%}_{1cm}=186$（266nm，在 pH7 磷酸缓冲液中）

pH 7　　$\epsilon_{233nm}=11,600$

pH 7　　$\epsilon_{266nm}=8,600$

含量测定

〔原理〕 辅羧酶是丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸脱羧反应的必不可少的辅酶，将丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶偶联，用分光光度法测定辅羧酶的含量。偶联反应如下：

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH \xrightarrow{\text{丙酮酸脱羧酶}} CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H+CO_2\uparrow$$

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H+NADH+H^+\xrightarrow{\text{醇脱氢酶}}CH_3CH_2OH+NAD^+$$

〔试剂〕

① 0.02M pH6.6 顺丁烯二酸缓冲液：2.32g 顺丁烯二酸溶解在 70ml 重蒸水中，用氢氧化钠溶液调节 pH 到 6.6，并用水稀释到 100ml。

② 0.50M 硫酸镁溶液。

③ 1.0M 丙酮酸钠溶液。

④ 0.014M 还原辅酶 I 溶液。

⑤ 醇脱氢酶溶液：每 ml 酶溶液含 1mg 酶蛋白。

⑥ 待测 TPP 样品液：配成每 ml 溶液含 1μg TPP。

⑦ 丙酮酸脱羧酶溶液：每 ml 酶溶液含 1mg 酶蛋白。

⑧ TPP 标准品：配成每 ml 溶液准确含 1.0μg TPP。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下，取三支试管按下表操作步骤加入试剂，反应总体积为 3.0ml。然后，使用紫外分光光度计，选择波长为 340nm，用 1cm 光径的比色杯，测定光吸收值：以重蒸水校正光吸收到 0 点，每隔半分钟读取各管光吸收(A)，共读 3 分钟，以 A 对时间作图，取反应最初线性部分，计算出每分钟 A 的减少值 (ΔA/分) 为 $\Delta A_{340nm/分}$(样品)$=\Delta A_{样/分}-\Delta A_{空/分}$；$\Delta A_{340nm/分}$(标准)$=\Delta A_{标/分}-\Delta A_{空/分}$。

〔计算〕

$$\text{TPP 含量}=\frac{\Delta A_{340nm/分}(\text{样品})\times\text{标准管中 TPP 准确 }\mu g\text{ 数}}{\Delta A_{340nm/分}(\text{标准})\times\text{样品管中 TPP 称量 }\mu g\text{ 数}}\times 100\%$$

应用范围

步　骤	空白管(ml)	标准管(ml)	样品管(ml)
1. 加顺丁烯二酸缓冲液	1.50	1.50	1.50
2. 加 TPP 标准液	—	0.50	—
3. 加待测 TPP 样品液	—	—	0.50
4. 加硫酸镁溶液	0.05	0.05	0.05
5. 加还原辅酶 I 溶液	0.06	0.06	0.06
6. 加醇脱氢酶溶液	0.06	0.06	0.06
7. 加丙酮酸脱羧酶液	0.05	0.05	0.05
8. 加重蒸水	1.18	0.68	0.68
9. 在 25℃ 保温 30 分钟			
10. 加丙酮酸钠溶液立即记时	0.10	0.10	0.10

用于生化研究和生化分析。

参 考 文 献

Holzer, E. et al. (1963), Methods of Enzymatic Analysis, p. 602. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press, N. Y.

三、附　录

(一)蛋白质浓度的测定方法

测定酶制剂中蛋白质的含量通常有下列几种方法:

1. 紫外吸收法[1,2]　该方法是根据构成酶蛋白的某些氨基酸(酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸等)具有吸收紫外光的特性而建立起来的。酶蛋白溶液吸收紫外光的数值与酶中酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的含量有关;酶蛋白吸收紫外光的最大值在波长 280nm 处。吸收值与浓度之间的关系在一定范围内是符合 Beer-Lambert 定律的。

$A = E \cdot d \cdot C$

A 为一定波长下的光吸收值。

E 为酶蛋白溶液的消光系数。

d 为紫外分光光度计比色杯的光径长度。

C 为酶蛋白浓度。(如果E是克分子消光系数,则C为克分子浓度;如果E是 $E^{1\%}$, 即 1% 蛋白浓度下的E值,则C为百分比浓度,就是每 100ml 溶液中酶的克数。)假设标准比色杯的光径 d=1cm,则蛋白浓度计算可简化为 C=A/E。

利用紫外吸收法测定蛋白质浓度已有很多人总结了许多经验公式,常用的有以下几种:

蛋白质浓度(mg/ml) $= 1.45A_{280nm} - 0.74A_{260nm}$

蛋白质浓度(mg/ml) $= 0.144(A_{215nm} - A_{225nm})$

蛋白质浓度(μg/ml) $= 183A_{230nm} - 75.8A_{260nm}$

一般来说，使用的波长较长则测定的灵敏度较低，但较长的波长对于样品中含有紫外吸收杂质的干扰较小。具体使用时可以酌情选择。该方法简便、快速，不损坏被测样品，但对于不同种类的蛋白质其测定的准确度往往不同，这往往是因为各种蛋白质含有紫外吸收的氨基酸的量不同而引起的，为了克服这一缺点，人们又采用了其他方法。

2. 双缩脲法[1] 蛋白质中的肽键在碱性溶液中与 Cu^{++} 络合显示蓝色，这是蛋白质的特异反应，称作双缩脲反应。游离的氨基酸、小的肽或核酸不产生这种反应。人们利用这个反应来测定蛋白质中肽键的数量，以此表示蛋白质的含量。

试剂 1 配制：0.175g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 溶于 15ml 蒸馏水中，置于 100ml 容量瓶中，加入 30ml 浓氨水、30ml 冷蒸馏水和 20ml 饱和氢氧化钠溶液。摇匀后，置室温 1～2 小时，然后将水加至刻度，摇匀备用，一般可用 3～4 个月。

操作过程：3.0ml 蛋白溶液（内含蛋白 0.10～1.25mg/ml）于试管中，加入 20ml 试剂 1，充分混匀后，呈现紫红色，立即于 540nm 处测定其光吸收 A，从标准蛋白质浓度与 A 的关系曲线上，求得样品的蛋白质浓度。

该方法比较简便，适合于各种蛋白质的测定，但灵敏度较差。

3. 福林酚试剂法[1] 根据蛋白质中的酪氨酸和色氨酸在碱性溶液中易将磷钼酸和磷钨酸的混合物还原为蓝色化合物（通常称作钼蓝或钨蓝）的原理，来测定蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量。

试剂 2 配制（福林酚试剂）：在 1.5 升容积的磨口回流瓶中，加入 100g 钨酸钠、25g 钼酸钠、700ml 蒸馏水、50ml 85% 磷酸和 100ml 浓盐酸。充分混合，接上回流冷凝管，以小火

回流 10 小时。回流完毕，再加入 150g 硫酸锂，50ml 蒸馏水和数滴液体溴。开口继续沸腾 15 分钟，以便去除过量的溴。冷却后稀释至 1 升，过滤，滤液呈黄色，置于棕色瓶中保存，使用时用标准氢氧化钠滴定，用水稀释到 1N 备用。

试剂 3 配制：50ml 溶液 (a) 和 1ml 溶液 (b)，用前混合，可使用一天。溶液(a)为 1g Na_2CO_3 溶解于 50ml 0.1N NaOH 溶液中；溶液(b)为 0.5g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 溶解于 100ml 1%酒石酸钾溶液中。

操作过程：1.0ml 蛋白质溶液(0.005～0.2mg/ml)中加入 5.0ml 试剂 3，0.5ml 试剂 2，室温放置 30 分钟后，于 500 nm*处测定光吸收值 A，从标准蛋白浓度与 A 的关系曲线上，求得样品的蛋白质浓度。

该方法测定蛋白质含量时灵敏度比缩脲法高得多，但它与紫外法类似，测定的是蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量，若被测蛋白与标准蛋白中这二种氨基酸的含量不同时会产生误差，因而它的通用性没有缩脲法好。

4. 缩脲福林法[3,5] 缩脲法和福林法联用，既具有福林法较高的灵敏度，又具有缩脲法比较广泛的通用性。

试剂 4 的配制（稀缩脲试剂）：1 份体积的试剂 5 加 7 份体积 2.3% Na_2CO_3 溶液，可稳定一个月。

试剂 5 的配制：将 150mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$和 600mg酒石酸钾钠溶于 50ml 水中，在不断搅拌的条件下，加入 30ml 10% NaOH 溶液并用水稀释到 100ml。

操作过程：取 1.0ml（内含 0.05～0.6mg 蛋白）蛋白质溶液，加 4.0ml 试剂 4，室温下放置 10 分钟，加 0.25ml 试剂

---

* 反应体系中蛋白质含量在 25μg 以上时，选用 500nm 比色；蛋白质含量在 5～25μg 之间选用 755nm 比色测定。

2，摇匀，30 分钟后在 680nm 处测定光吸收A。从标准蛋白浓度与A的关系曲线上，求得样品蛋白质的浓度。

5．加热缩脲福林法[4,5] 加热缩脲福林法比缩脲福林法具有更高的灵敏度。在 100℃ 加热 10 分钟，可使各种蛋白质在 660nm 的光吸收值趋于一致，从而使测定误差降低。

试剂 6 配制：10ml(a)，10ml(b)，80ml 蒸馏水，1.0ml (c)和 1.0ml (d)混合。其中(a)为 20% Na_2CO_3；(b)为 1*N* NaOH；(c)为 20% 酒石酸钾钠；(d)为 5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (用前稀释 10 倍)。

操作过程：取 1.0ml 蛋白质溶液(含 0～0.01mg 氮)，加入 5.0ml 试剂 5，在沸水浴上加热 100 分钟(试剂顶部放一小玻璃球，防止水分蒸发)，加热完毕，趁热每管中加入 0.50ml 试剂 2，振荡，放入 10℃ 水中冷却 15 分钟，然后平衡到室温，在 660nm 比色测定光吸收值 A。从标准蛋白浓度与A的关系曲线上，求得样品的蛋白质浓度。

参 考 文 献

[1] 潘家秀等，1962。蛋白质化学的研究技术，第 11 页。

[2] CRC, Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed.

[3] Ohnishi, S. T. (1978), Anal. Biochem. **86**, 193.

[4] Thomas, E. D. (1977), Anal. Biochem. **78**, 156.

[5] 蒋传葵，1980。化学试剂，**3**，48。

(二)常用缓冲液的配置

由酶催化的化学反应的速度受 pH 的影响很大，因此，酶反应的体系中均需加入一定浓度的缓冲液，使反应过程中 pH 值保持恒定。所谓缓冲液就是指在瞬时“酸”或“碱”的变

化并不影响该溶液的 pH 值的溶液，缓冲作用的大小依缓冲容量(β)来决定。$\beta = dCb/dpH = -dCa/dpH$(Cb、Ca为"碱"或"酸"的浓度)，也可写为

$$\beta \approx 2.303\left[\frac{C \cdot K \cdot C_H}{(K+C_H)^2} + C_H + C_{OH}\right]$$

其中C为弱酸 HA 和它的盐 MA 的总克分子浓度；K 为弱酸 HA 的解离常数；C_H 和 C_{OH} 分别表示 H_3O^+ 的浓度和 OH^- 的浓度。当 $C_H = K$ 时，即 pH = pK 时，$\beta_{最大} = \frac{2.303}{4}C$，此时溶液的缓冲能力最大。例如：在 25℃ 时乙酸的 pK = 4.756，乙酸缓冲液在 pH = 4.7 时缓冲能力最大。任何缓冲液的缓冲范围均在 pK 附近，乙酸缓冲液的缓冲范围在 pH 3.7～5.6 之间，超出此范围即失去缓冲作用。所以我们要根据所需的 pH 来选择适当的缓冲液。

缓冲液之配制方法

1. 甘氨酸-HCl 缓冲液 (0.05*M*)

*X*ml 0.2*M* 甘氨酸 + *Y*ml 0.2*N*HCl 加水稀释至 200ml

pH(25℃)	*X*	*Y*	pH(25℃)	*X*	*Y*
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸分子量 = 75.07。

0.2*M* 甘氨酸溶液含 15.01g/l。

2. 邻苯二甲酸-HCl 缓冲液(0.05*M*)

*X*ml 0.2*M*-KH-邻苯二甲酸+*Y*ml 0.2*N* HCl 加水稀释至 20ml

pH(20°C)	*X*	*Y*	pH(20°C)	*X*	*Y*
2.2	5	4.670	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	3.6	5	0.597
2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.032			

KH-邻苯二甲酸分子量=204.23。

0.2*M* KH-邻苯二甲酸溶液含 40.85g/l。

3. Na_2HPO_4-柠檬酸缓冲液

pH	0.2*M* Na_2HPO_4 (ml)	0.1*M* 柠檬酸 (ml)	pH	0.2*M* Na_2HPO_4 (ml)	0.1*M* 柠檬酸 (ml)
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 分子量=178.05; 0.2*M* 溶液含 35.61g/l。

柠檬酸 · H_2O 分子量=210.14; 0.1*M* 溶液含 21.01g/l。

4. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（0.1*M*）

pH	0.1*M* 柠檬酸 (ml)	0.1*M* Na_3 柠檬酸 (ml)	pH	0.1*M* 柠檬酸 (ml)	0.1*M* Na_2 柠檬酸 (ml)
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸 · H_2O 分子量＝210.14；0.1*M* 溶液含 21.0g/l。

Na_3-柠檬酸 · $2H_2O$ 分子量＝294.12；0.1*M* 溶液含 29.4g/l。

5. 醋酸缓冲液（0.2*M*）

pH(18°C)	0.2*M* NaAc (ml)	0.2*M* HAc (ml)	pH(18°C)	0.2*M* NaAc (ml)	0.2*M* HAc (ml)
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

NaAc·$3H_2O$ 分子量＝136.09；0.2*M* 溶液含 27.22g/l。

冰 HAC 相当于 17*N*；0.2*M* 溶液含 11.8ml/l。

6. 磷酸缓冲液 (0.2*M*)

pH(25℃)	0.2*M* Na_2HPO_4 (ml)	0.2*M* NaH_2PO_4 (ml)	pH	0.2*M* Na_2HPO_4 (ml)	0.2*M* NaH_2PO_4 (ml)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 分子量=178.05; 0.2*M* 溶液含 35.61g/l。

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 分子量=358.22; 0.2*M* 溶液含 71.64g/l。

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 分子量=138.0; 0.2*M* 溶液含 27.6g/l。

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 分子量=156.03; 0.2*M* 溶液含 31.21g/l。

7. KH_2PO_4–NaOH 缓冲液 (0.05*M*)

X ml 0.2*M* KH_2PO_4 + *Y* ml 0.2*N* NaOH 加水稀释至 20ml

pH(20℃)	*X* (ml)	*Y* (ml)	pH(20℃)	*X* (ml)	*Y* (ml)
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

8. 巴比妥缓冲液

pH(18°C)	0.04*M* 巴比妥钠盐(ml)	0.2*N* HCl (ml)	pH(18°C)	0.04*M* 巴比妥钠盐(ml)	0.2*N*HCl (ml)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21		100	

巴比妥钠盐 (Na diethylbarbiturate) 分子量=206.2; 0.04*M* 溶液含 8.25g/l。

9. 三乙醇胺盐酸盐-NaOH 缓冲液(0.05*M*)

50.0ml 0.1*M*三乙醇胺盐酸盐溶液+*X*ml 0.1*N* NaOH 用水稀释至 100ml

pH(20°C)	*X*ml 0.1*N* NaOH	pH(20°C)	*X*ml 0.1*N* NaOH
6.8	6.00	7.8	26.00
7.0	9.00	8.0	31.50
7.2	12.15	8.2	36.00
7.4	15.80	8.4	40.00
7.6	20.05	8.6	46.00

dpH/dt=−0.020 pH 单位/°C。

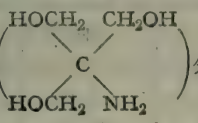
三乙醇胺盐酸盐 $C_6H_{15}NO_3 \cdot HCl$ 分子量=185.7。

0.1*M* 三乙醇胺盐酸盐溶液含 18.57g/l。

10. Tris-缓冲液(0.05*M*)

*X*ml 0.2*M* 三羟甲基氨基甲烷＋*Y*ml 0.1*N* HCl 加水稀释至 100ml

pH		0.2*M* Tris	0.1*N* HCl	pH		0.2*M* Tris	0.1*N* HCl
23°C	37°C			23°C	37°C		
9.10	8.95	25	5	8.05	7.90	25	27.5
8.92	8.78	25	7.5	7.96	7.82	25	30.0
8.74	8.60	25	10.0	7.87	7.73	25	32.5
8.62	8.48	25	12.5	7.77	7.63	25	35.0
8.50	8.37	25	15.0	7.66	7.52	25	37.5
8.40	8.27	25	17.5	7.54	7.40	25	40.0
8.32	8.18	25	20.0	7.36	7.22	25	42.5
8.23	8.10	25	22.5	7.20	7.05	25	45.0
8.14	8.00	25	25.0				

三羟甲基氨基甲烷  分子量＝121.14；0.2*M* 溶液含 24.23g/l。

11. 硼酸缓冲液(0.2*M* 硼酸盐)

pH	0.05*M*硼砂 (ml)	0.2*M* 硼酸 (ml)	pH	0.05*M*硼砂 (ml)	0.2*M* 硼酸 (ml)
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，分子量＝381.43，0.05*M* 溶液(＝0.2*M* 硼砂)含 19.07g/l。

硼酸分子量＝61.84；0.2*M* 溶液含 12.37g/l。

硼砂易失去结晶水，必须在带塞的瓶中保存，硼砂溶液也可以用半中和的硼酸溶液代替。

12. 甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.05*M*)

*X*ml 0.2*M* 甘氨酸＋*Y*ml 0.2*N* NaOH 加水稀释至 200ml

pH	*X*	*Y*	pH	*X*	*Y*
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸分子量＝75.07；0.2*M* 溶液含 15.01g/l。

13. 硼砂-NaOH 缓冲液 (0.05*M* 硼酸根)

*X*ml 0.05*M* 硼砂＋*Y*ml 0.2*N* NaOH 加水稀释至 200ml

pH	*X*	*Y*	pH	*X*	*Y*
9.3	50	0.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

14. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1*M*)

Ca^{++}, Mg^{++} 存在时不得使用

pH		0.1*M* Na_2CO_3 (ml)	0.1*M* $NaHCO_3$ (ml)	pH		0.1*M* Na_2CO_3 (ml)	0.1*M* $NaHCO_3$ (ml)
20°C	37°C			20°C	37°C		
9.16	8.77	1	9	10.14	9.90	6	4
9.40	9.12	2	8	10.28	10.08	7	3
9.51	9.40	3	7	10.53	10.28	8	2
9.78	9.50	4	6	10.83	10.57	9	1
9.90	9.72	5	5				

$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$分子量＝286.2；0.1*M* 溶液含 28.62g/l。

$NaHCO_3$ 分子量＝84.0；0.1*M* 溶液含 8.40g/l。

英 文 索 引

1. Acetylcholinesterase 乙酰胆碱酯酶 ……54
2. Acid phosphatase 酸性磷酸酶 ……62
3. Alcohol dehydrogenase 醇脱氢酶……9, 139, 149
4. Aldolase 醛缩酶 ……128
5. Alkaline phosphatase 碱性磷酸酶 ……8, 60
6. Amine oxidase 胺氧化酶 ……31
7. D-Amino acid oxidase D-氨基酸氧化酶 ……29
8. L-Amino acid oxidase L-氨基酸氧化酶 ……27
9. Amino acylase 氨基酰化酶……119
10. Aminopeptidase (cytosol) 氨肽酶(胞浆)……92
11. Aminopeptidase (microsomal) 氨肽酶(微粒体)……94
12. α-Amylase α-淀粉酶 ……74
13. β-Amylase β-淀粉酶 ……76
14. Arginase 精氨酸酶……118, 125
15. Carbonate dehydratase 碳酸酐酶……133
16. Carboxypeptidase A 羧肽酶 A ……97
17. Carboxypeptidase B 羧肽酶 B ……99
18. Catalase 过氧化氢酶 ……36
19. Cellulase 纤维素酶……79
20. Chymotrypsin 胰凝乳蛋白酶 ……101
21. Citrate synthase 柠檬酸合成酶 ……131
22. Cocarboxylase (Thiamine pyrophosphate, Diphosphothiamine) 辅羧酶(硫胺焦磷酸)……149
23. Coenzyme I (NAD, DPN, CoI) 辅酶 I ……7, 9, 12, 14, 22, 41, 49, 129, 138
24. Coenzyme II (NADP, TPN, CoII) 辅酶II……7, 16, 44, 143

25. Creatine kinase 肌酸激酶 ……48
26. Deoxyribonuclease I 脱氧核糖核酸酶 I ……67
27. Diphosphothiamine (Thiamine pyrophosphate, Cocarboxylase) 硫胺焦磷酸(辅羧酶) ……149
28. DPN (NAD, Co I) 辅酶 I ……7, 9, 12, 14, 22, 41, 49, 129, 138
29. DPNH (NADH, 还原 Co I) 还原辅酶 I ……7, 9, 12, 14, 16, 47, 141
30. Glucose oxidase 葡萄糖氧化酶 ……19
31. Glucose-6-phosphate dehydrogenase 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶…16, 44, 144
32. β-Glucuronidase β-葡萄糖醛酸苷酶 ……87
33. Glutamic pyruvic transaminase 谷丙转氨酶 ……7, 40
34. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ……22, 129
35. Hexokinase 己糖激酶 ……43
36. Hyaluronidase 透明质酸酶……89
37. Kallikrein 激肽释放酶 ……107
38. Lactic dehydrogenase 乳酸脱氢酶……7, 11, 41, 47, 49, 141
39. Lipase 脂肪酶 ……51
40. Lysozyme 溶菌酶……82
41. Malate dehydrogenase 苹果酸脱氢酶……14
42. Neuraminidase (sialidase) 神经氨酸苷酶(唾液酸酶)……84
43. NAD (CoI, DPN) 辅酶 I ……7, 9, 12, 14, 22, 41, 49, 129, 138
44. NADH (还原 CoI, DPNH) 还原辅酶 I ……7, 9, 12, 14, 16, 47, 141
45. NADP (CoII, TPN) 辅酶 II ……7, 44, 143
46. NADPH (还原 Co II, TPNH) 还原辅酶 II ……7, 16, 44, 146
47. Papain 木瓜蛋白酶 ……112
48. Pectinesterase 果胶酶 ……57
49. Pepsin (A) 胃蛋白酶(A) ……114
50. Peroxidase 过氧化物酶 ……38
51. Pyruvate Kinase 丙酮酸激酶 ……46, 49
52. Ribonuclease A 核糖核酸酶 A ……72
53. Ribonuclease T_1 核糖核酸酶 T_1 ……69
54. Sialidase (Neuraminidase) 唾液酸酶(神经氨酸苷酶)……84

55. Snake venom phosphodiesterase 蛇毒磷酸二酯酶 ……8, 65
56. Subtilisin 枯草杆菌蛋白酶……110
57. Thiamine pyrophosphate (Diphosphothiamine, Cocarboxylase)
硫胺焦磷酸(辅羧酶)……149
58. TPN (Co II, NADP) 辅酶II ……7, 44, 143
59. TPNH (还原 Co II, NADPH) 还原辅酶II ……7, 44, 146
60. Trypsin 胰蛋白酶……102, 104, 135
61. Trypsin inhibitor 胰蛋白酶抑制剂……135
62. Urease 脲酶, 尿素酶……117
63. Uricase 尿酸酶 ……33
64. Xanthine oxidase 黄嘌呤氧化酶 ……25

中科院植物所图书馆
S0011920
北京植物所
收到期 83.2.23.
来源 西单新
书价 0.64元
单据号 028467
开票日期 83.2.23.

23117 58.17435
720

二异酚的活力测定.

1982年

借者 借期 借者 借期

58.17435
720

23117

科技新书目：　34 · 188
统一书号：13119 · 1033
定　价：(科五)0.64元