

经验交流

还原辅酶 I 钠盐的简易制备方法

季钟煜* 李文杰*

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

一般市售或提取制得的辅酶 I 常为氧化型。然而生化实验室中在研究细胞呼吸电子链传递工作时,都要使用还原辅酶 I。因之,怎样制备出纯度高的还原辅酶 I,成为实验室经常遇到的一个技术问题。早在 1954 年,伍钦荣,邹承鲁^[1]采用稀碱溶液维持了醇脱氢酶反应的最适 pH 环境,制得了还原辅酶 I 钠盐。其后, Rafter 等^[2]使酶反应在 Tris 缓冲液中进行,终了时加入醋酸钡,制得了还原辅酶 I 钡盐,产率为 70%,其纯度同所用的原料氧化辅酶 I 一样。但钡盐为重金属盐,在酶学研究时诸多不宜,最好制成钠盐。

我们就此二法作了比较,认为醇脱氢酶的还原反应,只有在 Tris 缓冲液中才能进行完全。若用稀碱溶液,则最后约有三分之一量辅酶 I 不能得到还原。因此,我们按 Rafter 等法制得钡盐后,直接利用人造沸石(Zeolite)使钡盐变成钠盐。此法操作简便,得率高,其纯度同所用的氧化辅酶 I 一样。

材料

1. 辅酶 I 东风生化试剂厂生产。纯度为 80%。
2. 还原辅酶 I 钡盐 按 Rafter 法^[2]制备。制得的湿钡盐,宜快速干燥之,若久置于空气中,则颜色变黄。
3. 人造沸石(Zeolite) 又称软水剂,化学组分为

硅酸铝钠(Sodium Aluminum Silicate)。使用前先用三倍柱体积饱和食盐溶液处理,使其充分转变为钠盐,然后用重蒸馏水彻底洗去滞留的氯化钠,即可备用。

实验

因还原辅酶 I 遇光会有些分解,变成黄色。实验宜在避光室中进行,方可得白色产品。

称取 3 克还原辅酶 I 钡盐,溶于 200 毫升水中,离心,除去不溶物。将清液以流速为 5ml/分钟,通过人造沸石柱(2.1 × 17cm),流出液以 20 ml 为一份分瓶收集,合并其 340 nm 光吸收值较高的部分,共得 170ml。将此溶液冷冻干燥后得干重为 2.5 克的白色粉末,产率为 94%,纯度为 80%,此即还原辅酶 I 钠盐,宜保存于低温避光干燥器中。

参 考 文 献

- [1] 伍钦荣,邹承鲁:《生理学报》,1954 年,第 19 期,第 183。
- [2] Rafter, G. W., and Colowick, S. P.: Methods in Enzymology, Vol.3, 887, 1957。

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]

* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。

链霉菌 (*St. roseofulvus* Kc13-375) 葡萄糖异构酶活力测定的改进

李桂琴 冯淑娛

(中国科学院兰州化学物理研究所)

关于用放线菌属生产葡萄糖异构酶活力的测定方法及酶活单位,国内外虽有很多报道,但很不统一,均自成体系。我们在 D-葡萄糖异构成 D-果糖动力学考察基础上,参照 Messing 等报道的方法,对目前国内所采用的高崎幸义所推荐的高渗法进行了改进。为有利于酶的激活,在反应系统中加入氯化钴溶液。改进后

的反应系统为: 60℃, 36% 葡萄糖作底物, 1.5 毫升, pH=6.9, 0.2M, pH=7.8 的磷酸缓冲液, 1.0 毫升, 0.1M 硫酸镁, 0.5 毫升, 0.005M 氯化钴, 0.5 毫升。反应体系的总体积为 10 毫升, 反应时间为 15 分钟。每毫升异构酶转化 1 个微克分子葡萄糖为果糖的酶活力规定成 1 个国际酶活单位 (IGIU)。测定方法: 第一步

为异构化过程，第二步按吡唑法测果糖含量。异构酶每活计算公式为：

GIU (国际酶活单位)/毫升(酶量)

$$= \frac{\text{反应总体积(毫升)} \times \text{微克/毫升(果糖量)} \times \text{稀释倍数}}{1.5 \text{ 毫升(酶量)} \times 180.17 \text{ (果糖量)} \times \text{反应时间(分)}}$$

本法的特点是：精密度较好，相对偏差为千分之

三，它克服了高渗法在遇到酶活力高的样品(例如半纯化的酶制剂)时不易测准的缺点，分析所需时间短，采用国际酶活计量。

[本文于 1980 年 10 月 20 日收到]

蛋白质样品水解方法的改进 ——盐酸水解中一种新保护试剂

徐 秀 璋

(中国科学院生物物理研究所)

在蛋白质样品水解过程中，如何减少氨基酸的损失，以获得精确结果，是大家非常关心的问题。目前用得最广泛的盐酸水解法使色氨酸全部破坏，苏氨酸、丝氨酸等也受到部份破坏。

近十年来，科学工作者对蛋白质样品的水解条件及方法进行了大量研究，如 Liu 和 Chang 的磺酸水解

法^[1]，Matsubara 和 Sasaki 用盐酸加少量巯基乙酸等作为保护剂水解法^[2]以及酶水解法^[3]，碱水解法^[4]等。这些方法各有所长，但也都存在某些不足。

另外，在水解中，由于色氨酸或样品中的碳水化合物等的破坏，产生有色素的分解产物，就会干扰氨基酸的正常测定，所以水解脱色也常被人们关注^[5]。

表 1 用不同方法水解溶菌酶测定的氨基酸含量的比较
(单位：氨基酸克分子数/1克分子溶菌酶)

氨基酸名称	溶菌酶 I		溶菌酶 II		文献值			理论值 (残基数)
水解方法	盐酸 巯基乙醇 草酸	盐酸 巯基乙酸 酚	盐酸 巯基乙醇 草酸	盐酸 巯基乙酸 酚	3NP-甲苯 磺酸内含3-(2-乙氨基) 吡啶 ^[1]	盐酸 ^[1]	盐酸 ^[2] 2%巯基 乙酸	
门冬氨酸	21.1	20.5	21.3	20.5	21.4	21.4	21.1	21
苏氨酸	6.9	6.5	6.8	6.8	6.95	6.75	7.35	7
丝氨酸	9.0	7.9	9.0	5.9	10.3	8.87	9.77	10
谷氨酸	5.2	5.4	4.5	5.2	4.90	4.84	4.98	5
甘氨酸	12.0	12.1	12.1	12.0	11.9	12.1	12.1	12
丙氨酸	12.0	11.9	12.1	12.0	12.0	12.0	12.2	12
半胱氨酸	—	—	—	—	7.64	7.36	—	8
缬氨酸	5.9	6.1	5.7	5.7	4.73	5.59	3.87	6
甲硫氨酸	1.9	2.2	1.8	1.7	1.95	1.89	1.93	2
异亮氨酸	6.0	6.1	5.5	5.4	4.71	5.78	4.52	6
亮氨酸	8.4	8.4	7.8	7.8	7.75	7.84	7.65	8
酪氨酸	2.8	2.9	2.9	3.9	2.96	2.94	3.24	3
丙苯氨酸	3.4	3.6	2.9	3.3	2.81	2.91	2.90	3
赖氨酸	5.8	5.8	5.9	5.9	6.0	6.0	6.08	6
组氨酸	0.8	0.8	1.0	0.9	1.0	0.6	1.00	1
色氨酸	5.5	10.8	4.1	10.5	5.5	—	5.04	6
精氨酸	11.2	11.2	11.1	10.9	11.3	9.01	10.9	11
脯氨酸	1.4	1.9	1.6	1.5	1.84	2.06	6.33	2

[1] Liu, T. Y. and Chang, Y. H.: J. Biol. Chem., 246, 2842-2848, 1971.

[2] Matsubara, H. and Sasaki, R. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 175, 1969.