

合大规模生产。

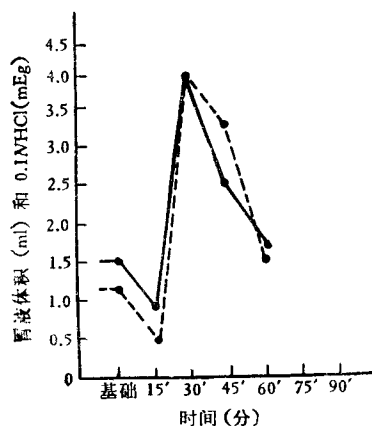


图 5

——胃液体积;-----0.1N 盐酸

参 考 文 献

[1] Gregory, R. A. et al.: *Gut.*, 5, 103, 1964.

- [2] 伊藤新: 细胞 (特集消化管的内分泌 I), 11(12), 22, 1979.
- [3] 矢内原升: 细胞 (特集消化管的内分泌 I), 11(12), 34, 1979.
- [4] 冯佑民、鲁子贤等: 《生物化学与生物物理进展》, 1979 年, 第 5 期, 第 1 页.
- [5] Guye, Abraham: *Clinical and Biochemical Analysis Handbook of Radioimmunoassay*, 469, 1977.
- [6] Danenport, H. W.: *Physiolog of the Digestive Tract*, 1971.
- [7] Rydon, H. N. et al.: *Nature (London)*, 169, 922, 1952.
- [8] Wingerson, Lois: *New Scientist*, 86, 1201, 16, 1980.
- [9] Barbara, E. Noyes et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76, 4, 1770, 1979.

[本文于1982年1月18日收到]

本工作承中国科学院上海生物化学研究所、上海化学试剂供应站、中国科学院原子能所、苏州医学院第一附属医院同位素室和中国医学科学院基础研究所给予大力支持, 特此致谢。

辅酶 I 的简易提纯方法

季 钟 煜*

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

辅酶 I 为一重要的生物化合物。二十年前我国已大量生产, 纯度为 60—80%^[1], 并曾用离子层析法加以提纯。国际上也分二步制成其纯品^[2]。

但据 Daziel 报告^[3], 市售 99% 纯辅酶 I 或结晶辅酶 I 奎宁盐中仍含有微量抑制剂, 若用二乙氨乙基纤维素 (DEAE-Cellulose) 分离得纯辅酶 I 溶液, 才可用于酶学研究。后来由 Winer^[4] 制成了结晶辅酶 I (100% 纯), 并将其紫外克分子消光系数修正为 17.8cm²/mol。

本文作者以 500mg 粗制品为一个操作单元, 其中辅酶 I 在树脂层析色谱上的分布较为集中, 回收率好, 操作方便, 无需特殊设备, 对一般生化实验室都能适用。

一、实验及结果

1. 吸附 500mg 辅酶 I (68.6% 纯, 东风生

化试剂厂出品) 溶于 20ml 水, 过滤。清液中滴加 1N NaOH 至 pH6, 在低于 20℃ 处时以 2ml/分流速通过甲酸型 Zerolit FF 柱 (1.6 × 13cm, 80—120 目, 树脂按前文^[1]方法处理)。吸毕后, 用 1 立升水流过柱洗至流出液的 260nm 光密度小于 0.1, 共需 20 小时。上柱排出液及水洗液内都不含辅酶 I (用醇脱氢酶测定)^[5]。

2. 梯度洗脱 按图 1 说明装配实验。先把 b 管插入 A 瓶, 以 1ml/分流速洗涤 5 分钟, 使体系恒定。再取出 b 管, 插入 B 瓶以同速洗脱。柱底与部分收集器相连, 分管收集流出液, 每管为 7ml。

洗脱时, C 瓶内甲酸浓度渐增, 柱底流出液 pH 渐降。测定各管 260nm 光密度及用酶法定出辅酶 I 含量。绘此三曲线于图 2。可知柱底

* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。

占总量一半, A_{340}/A_{260} 比值已达 0.38。见表 1。

表 1 分步收集液中辅酶 I 含量及其纯度

收集液管号	辅酶 I 含量 (mg)	$\frac{A_{340}}{A_{260}}$	纯度 (%)
18	0.40	0.153	40
19	3.25	0.320	84.4
20	8.56	0.320	84.4
21	13.6	0.346	91
22	20.1	0.340	89.7
23	27.1	0.366	96.5
24	35.2	0.359	94.7
25	51.8	0.381	100
26	67.1	0.381	100
27	49.3	0.327	86.3
28	23.2	0.253	66.7

$$\text{纯辅酶 I 的 } \frac{A_{340}}{A_{260}} = 0.379^{[1]}$$

3. 丙酮沉淀

(1) 合并第 21 至 27 管, 共 60ml, 滤清后放于 P_2O_5 中真空干燥过夜。清液中滴加 4N HNO_3 至 pH1.7—2, 边搅边加 7 倍体积 $-15^\circ C$ 丙酮, 放于 $-15^\circ C$ 过夜; 离心, 沉淀用 $-15^\circ C$ 丙酮洗涤, 真空干燥后, 干重 295mg, 91% 纯辅酶 I (未测定含水量), 回收率 78%。

(2) 若单独合并第 25、26 管, 如法可制得极纯的辅酶 I。

本法分离得到的纯辅酶 I 溶液不含有盐类, 和 Daziel、Winer 方法相比, 体积大为减少, 后处理较方便。从洗脱色谱看, 又和 Daziel、Winer 方法类似, 可见应用本法是能除去一些杂质的。

参 考 文 献

- [1] 东风生化试剂厂:《生物化学与生物物理学报》1965 年 5 期 535 页。
- [2] Kornberg, A. *Methods in Enzymology*, Vol. 3, 876, 1957.
- [3] Dalziel, K. *J. Biol. Chem.*, 233, 1538, 1963.
- [4] Winer, A. D. *J. Biol. Chem.*, 239, 3598, 1964.
- [5] Ciotti, M. M. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 3, 891, 1957.

[本文于 1982 年 3 月 29 日收到]

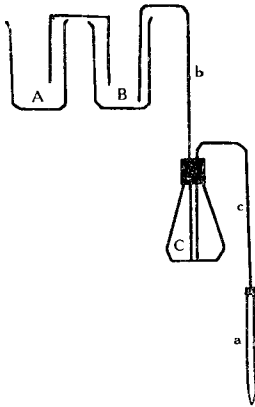


图 1 浓度梯度洗脱装置示意图

A 瓶内装 1 立水, B 瓶内装 1 立升甲酸水溶液(1 立升水内加入 10.4 克 84% 甲酸), 此 A、B 二瓶液面应在同一水平线上。

密闭式 C 瓶内装 300ml 水, 放于电磁搅拌器上。b 虹吸管(内径 0.5cm, 长 150—180cm, 弯端不计入)装满水。c 管连接着 C 瓶和层析柱。

流出液 pH 低于 3 时, 辅酶 I 开始解吸, A_{240}/A_{260} 比值渐增。辅酶 I 集中于第 25 和 26 管, 约

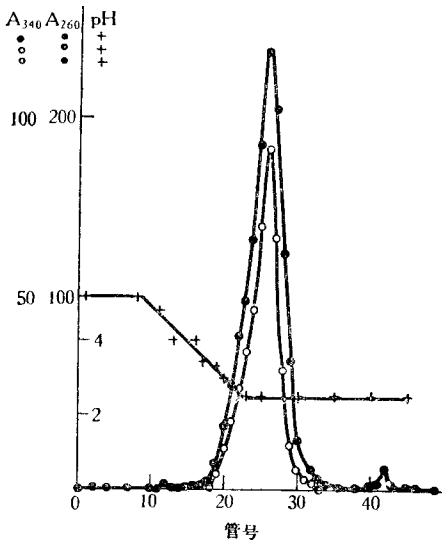


图 2 对于辅酶 I 的层分离情况

纵坐标分别表示 260nm、340nm 光密度和收集液 pH 值。横坐标表示分管收集液的管号。

测定第 17—22 管和 23—30 管收集液的 260nm 光密度时, 应分别稀释 50 倍和 250 倍。而用酶法测定时, 则分别吸取 50 μ l 和 20 μ l, 酶反应总体积为 3.25ml。以上均用 1cm 光径比色杯。