

从酵母中制备辅酶 I 的简易方法

李清华 李慧萍 黄全荣

(宁波市医学科学研究所, 宁波 315000)

关键词 辅酶 I (NAD^+), 离子交换柱层析, 乙酸汞

辅酶 I (尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸, NAD^+) 是一种重要的生化试剂, 常从面包酵母中提取。前人报道的提取方法, 或是银盐沉淀方法^[1], 或是层析方法^[2], 由于成本昂贵, 操作繁复耗时, 反应体积大等缺陷, 不甚理想。本文报告一种以小体积汞盐试剂分离纯化 NAD^+ 的简易方法。

材料与方 法

酵母 新鲜压榨面包酵母, 杭州酵母厂产品。

阳离子交换树脂 苯酚甲醛型, 代号 HD-10 购自华东化工学院。

醇脱氢酶 (ADH) Sigma 产品。

乙酸汞 化学纯; 其他试剂为化学纯或分析纯。

NAD^+ 检测方法 如文献[2]所述, 以速率法测定 $\Delta A_{340\text{nm}}$ 值, 求得 NAD^+ 的量。

NAD^+ 的纯度测定 亦如文献[2]所述。

NAD^+ 制备步骤

1. 抽提: 2kg 新鲜面包酵母, 搓碎后快速投入至 3L 沸水中, 搅拌, 5min 后置冰水浴内, 加冰块使抽提液迅速降温至 30℃ 以下。离心分出上层液。

2. 按文献[3]方法, 抽提液作阳离子树脂柱层析,

用 0.5mol/L 氨水洗脱 NAD^+ 。合并峰组分, 6mol/L HCl 调 pH2, 离心去除不溶物。

3. 上液中加入 5 体积冷丙酮, 使 NAD^+ 沉淀。

4. 汞盐纯化: 以 20ml 0.5mol/L 乙酸溶液使 NAD^+ 沉淀复溶, 加入 1/40 体积 (0.5ml) 20% 乙酸汞溶液和 1/4 体积 (5ml) 95% 乙醇, 离心弃沉淀。上清液中加入 3/40 体积 (1.5ml) 乙酸汞液和 7/8 体积 (17.5ml) 乙醇液, 离心保留 NAD^+ 沉淀。

NAD^+ 沉淀用冷蒸馏水复溶, 6mol/L 硝酸酸化至 pH2, 通入硫化氢 (H_2S) 过量, 使 Hg^{2+} 以黑色硫化汞析出, 离心分离上清液。

重复一次汞盐分步沉淀操作, 提高纯度。

5. 收获 NAD^+ : 上步分得上清液置冰浴中, 氨水调至 pH6, 加入 2 体积乙醇, 离心除去不溶物。上清液仍置冰浴中, 6mol/L 硝酸调 pH2, 加入 5 体积无水乙醇, 静置数小时后离心。沉淀以无水乙醇洗涤, 真空干燥, 获得 NAD^+ 白色粉末。

结果与讨论

NAD^+ 与 AgNO_3 作用生成 $\text{NAD} \cdot \text{Ag}$ 盐, 在有机溶剂作用下以沉淀析出。 AgNO_3 的价格昂贵, 我

表 1 汞盐分步沉淀 NAD^+

步 骤	前步上清液中加入内容	各步上清液			各步沉淀 NAD^+ 含量 (mg)
		汞盐最终浓度 (%)	乙醇最终浓度 (%)	$A_{260\text{nm}}$	
I	20% 乙酸汞 0.2ml	0.22	—	321.4	1.0
II	20% 乙酸汞 0.2ml	0.44	—	280.2	1.1
III	20% 乙酸汞 0.2ml	0.65	—	240.6	1.0
IV	95% 乙醇 4.5ml	0.52	18.5	210.0	1.45
V	95% 乙醇 4.5ml	0.43	31.0	143.2	23.4
VI	20% 乙酸汞 0.2ml	0.42	50.0	29.6	47.6
	95% 乙醇 10ml				
VII	20% 乙酸汞 0.2ml	0.53	50.0	1.5	18.0

初始体积 18ml, NAD^+ 含量 100mg, $A_{260\text{nm}}$ 为 352.4

表2 汞盐纯化 NAD^+ 的复验

操 作 步 骤	溶液体积	Hg^{2+} 浓度(%)	乙醇浓度(%)	沉淀中 NAD^+ 量 (mg)	回收率(%)
初始溶液	32		—	265	—
加 20% 乙酸汞 0.8ml	32.8	0.49	—	4.7	1.8
再加 95% 乙醇 8ml	40.8	0.39	18.6	7.0	2.6
再加乙酸汞 2.4ml	71.2	0.9	48.2	250	94.3
乙醇 28ml					

表3 NAD 制备过程各步情况

步 骤	体积 (ml)	NAD^+ (mg)	回收率(%)	$A_{340\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$	纯度(称重法)
2kg 酵母抽提液	4000	320	100	0.076	—
阳离子柱层析洗脱液	160	290	90.6	0.206	—
第一次汞盐纯化	20	260	81.3	0.250	—
第二次汞盐纯化	15	225	70.3	0.255	70.3%

们经过试验,发现乙酸汞与 NAD^+ 有类似 AgNO_3 的反应。乙酸汞与 NAD^+ 发生即时反应,生成 $\text{NAD}\cdot\text{Hg}$ 盐,它不再是 ADH 的底物,所以以酶法检测时 $A_{340\text{nm}}$ 无改变。

由表1的数据可知, $A_{260\text{nm}}$ 有吸收的杂质与 NAD^+ 可在不同 Hg^{2+} 与乙醇浓度时分步沉淀。乙酸汞最终浓度达 0.5% 时,较低浓度的乙醇(18.5%)使杂质沉淀,继续增加乙醇浓度可使大部分 NAD 沉淀,在乙酸汞与乙醇的最终浓度分别达 0.5% 与 50% 时,绝大部分 NAD^+ 以及其他 $A_{260\text{nm}}$ 有吸收物质均已沉淀析出,最终上清液中的 $A_{260\text{nm}}$ 仅是初始溶液的 0.4%, NAD^+ 的回收率 > 90%。

前节介绍的 NAD^+ 制备的汞盐纯化步骤是通过上述实验(表1)确定的。表2验证了这一条件的条件,这一步的 NAD^+ 回收率 > 90%。从 $A_{340\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ 由 0.20 增至 0.25 (表3),提示所得 NAD^+ 纯度大于

65%^[4]。重复一次操作,此比值达 0.255,纯度提高为 70% (表3),最后得到白色粉状物。若要达到更高的纯度,可参照文献4的方法精制。

表3是一次典型的提取过程。本法的特点是很小的操作体积,简便的方法和较好的回收率,适合大量生产一般纯度的 NAD^+ 。

参 考 文 献

- 1 Kornberg A. *Method in Enzymology*. New York: Acad Press, 1957; 3:876
- 2 上海东风生化试剂厂. 生物化学与生物物理学报, 1965; 5 (5): 535.
- 3 Okunuki K, Hagihara B, Sekuzu I et al. *J Biochem*, 1955; 42(2):389
- 4 季钟煜. 生物化学与生物物理进展, 1982; (6): 53

[本文于 1989 年 8 月 19 日收到]

会议简讯

生物发光和化学发光学术讨论会在苏州召开

1990 年 5 月 22—24 日由中国生物物理学会光生物专业委员会和中国物理学会发光分科学会联合举办的生物发光和化学发光学术讨论会在苏州举行,参加会议的代表 100 多人,其中中青年科学工作者包括研究生过半数,代表来自全国 16 个省市,交流的论文达 120 篇(宣读了 64 篇),论文的内容覆盖面广,有生物发光、生物的超微弱发光、细胞化学发光、体表发光、化学发光和荧光标记、化学及荧光免疫分析及测量发光的仪器仪表等。从人数、论文数来看,比 1987 年苏州光生物学会会议增加了 4 倍,说明生物发光和化学发光这一新兴学科已在我国生根,并得到了迅速发展。

研讨的论文有几项特别引人注目:(1) 国际上研究得极少的淋巴细胞化学发光,尤其是人血淋巴细胞的发光,我国已经展开,对发光机理作了初步的探索,临床应用也有进展;(2) 发光法分析活性氧(自由基)和抗氧化剂(自由基的清除剂),它具有灵敏、快速、简便、价廉、能测自由基发生发展早期时相的特点,虽然方法还不甚成熟,但已显示出苗头,可部分地取代 ESR 法,成为 ESR 法的一项重要辅助手段。用发光法筛选出一部分抗自由基和抗氧化药物,尤其是中草药和饮料,具有中国自己的特色,并用所选药物作器官缺血、重灌损伤、衰老的防护药之用;(3) Eu^{3+} 标记的时间