

中^[5], 都得到较满意结果。最近我们重复了这一方法, 所得酶制品经酵母丙氨酸 tRNA 3'-端单加 ³²P Cp 后的长链 RNA 和 CpGpU³²pCp 的检查, 未检测到 RNase 的存在。

参 考 文 献

[1] Torriani, A. et al.: *J. Bacteriol.*, **81**(5), 835, 1961.

- [2] Torriani, A. *Methods in Enzymology* Vol. XII, Part B 212, 1968.
- [3] 人工合成核酸组: 《中国科学》1978 年, 第 6 期, 第 679 页。
- [4] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组: 《微生物学报》1978 年第 18 卷第 3 期第 210 页。
- [5] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组 (上海) 中国科学院生物物理研究所二室核酸研究组 (北京)《微生物学报》, 1978 年第 18 卷第 3 期第 202 页。

[本文于 1981 年 5 月 27 日收到]

辅酶 I、辅酶 II 和辅酶 A 的各别分离

季 钟 煜*

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

酵母和哺乳动物的肝脏分别为制备辅酶 I、辅酶 A^[1,2] 和辅酶 II^[3] 的好材料, 而且, 若将辅酶 I 制剂经过专一的转磷酸反应, 则可以制备辅酶 II^[4]。但这些制法都存在一个如何将三个辅酶从彼此互存的生物组织中分别分离成为单组份的问题。早在 1954 年, 王德宝等^[4]以甲酸型强碱性阴离子交换树脂为吸附剂, 利用同一种浓度的甲酸缓冲液, 可把辅酶 I 与辅酶 II 分离开。后来 Pastore 等^[5]用二乙氨基乙纤维素 (DEAE-Cellulose) 为分离材料, 以 NaCl 溶液进行浓度梯度洗脱, 也能分离它们。根据我厂工作^[2], 可用 717 甲酸型树脂优先吸附酵母抽提液中的辅酶 A, 将辅酶 A 与辅酶 I 分开, 但在这一过程里, 同时也吸附了一些抽提液中的辅酶 I, 因此分离不完善。1978 年南京大学生物系等^[6]用 717 氯型树脂吸附辅酶 A 发酵液中的辅酶 A, 再用 0.01 N HCl-0.02 N NaCl 溶液洗去吸附在树脂上的杂质, 最后用 0.01 N HCl-0.5 N NaCl 溶液将辅酶 A 从树脂上解吸下来, 但此树脂很难使辅酶 A 与 ATP 以及辅酶 A 前体物质分离开。从 Mitz 的报道中^[7]可知, 一个含有辅酶 I, 辅酶 II 和辅酶 A 的混合溶液, 流过甲酸型强碱性阴离子交换树脂柱时, 三个辅酶都同时吸附于树脂上, 辅酶 I 能被 pH 6 甲酸缓冲液单独解吸下来, 辅酶 II 被 pH 3 甲酸缓

冲液洗脱下来, 最后用 pH 2 甲酸缓冲液可洗出辅酶 A。但报道的条件不明确。

我基于前人工作, 通过浓度梯度的探索试验, 建立这一各别分离方法。

材 料 和 方 法

辅酶 I、辅酶 II 和辅酶 A 均系东风生化试剂厂产品。其中辅酶 I 和辅酶 II 的纯度为 60—80%。每毫克辅酶 A 粗制品含 70 Lipmann 单位。

各辅酶的测定法 辅酶 I 用醇脱氢酶法测定^[8]。辅酶 II 用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法测定^[9]。辅酶 A 则用 Kaplan-Lipmann 法测定^[10]。

强碱性阴离子交换剂处理法

717 树脂处理成氯型, De Acidit FF 树脂处理成甲酸型。处理方法见文献 [1]。以上二树脂颗粒均为 80—160 目。

0.1 M 甲酸盐溶液之配制 0.1 M 甲酸溶液与 0.1 M 甲酸钠溶液以等体积混合。

0.5 M 甲酸盐溶液之配制 0.1 M 甲酸溶液与 0.9 M 甲酸钠溶液以等体积混合。

辅酶 A 与辅酶 I、辅酶 II 的分离

吸附 800 毫克辅酶混合物, (内含 210 毫

* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。

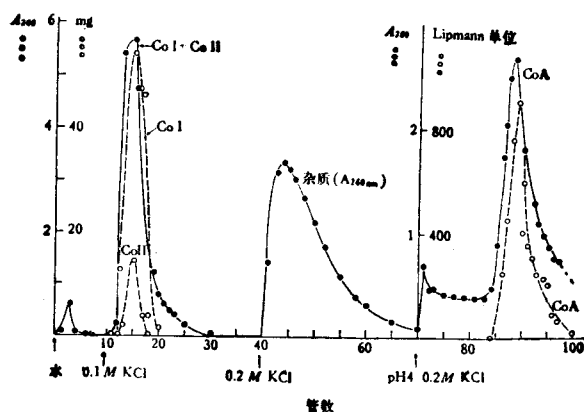


图 1 CoI、CoII 和 CoA 在 717 氯型树脂上的分离效果

图中 260 nm 光吸收曲线,系由分管收集液于 1 cm 光径比色杯中的观察值绘制而成(有时加水稀释)。其含量曲线则绘自每管收集液经酶法测定得出的辅酶总含量

克 CoI、44 毫克 CoII 和 5700 单位 CoA) 溶于 50 毫升水,滴加 0.5 M KOH 至 pH 6—7,低速离心,收集清液。将此清液以流速 2 毫升/分通过 717 氯型树脂柱(2×30 cm)。吸毕后,用水洗涤此柱至流出液无 260 nm 光吸收。经酶法测定,排出液和水洗液内均无三辅酶活力。

稀盐洗脱 以 0.1 M KCl 溶液洗脱层析柱,流速同上,流出液按分部收集,每 100 毫升为一份,一直洗至收集液无 260 nm 光吸收。经酶测定,各收集液内含有 CoI 和 CoII,回收率为 98%。

浓盐洗脱 按同法再以 0.2 M KCl 溶液洗脱该柱,收集液内无三辅酶活力。

pH 4 浓盐洗脱 按同法,以 pH 4 0.2 M KCl 溶液洗脱该柱,每 20 毫升收集一份。收集液的 260 nm 光吸收稍作升降后迅即上升,当收集液 pH 下降至小于 5 时,即有 CoA 活力出现。此步收集液内只含 CoA 活力,总回收率为 81%。以上三步洗脱结果见图 1。

辅酶 I 与辅酶 II 之分离

吸附 将 6.6 毫克 CoI (纯度为 60%) 与 4.5 毫克 CoII (纯度为 80%) 混和,溶于 20 毫

升水中,滴加 0.5 M KOH 至 pH 6—7,低速离心,收集清液。将清液以流速 2 毫升/分通过 De Acidit FF 甲酸型树脂柱 (1×20 cm)。吸毕后,用水洗涤此柱至流出液无 260 nm 光吸收。经酶法测定,排出液和水洗液内均无二辅酶活力。

0.1 M 甲酸盐溶液的洗脱效果 以 0.1 M 甲酸盐溶液洗脱层析柱,流速同上,分部收集流出液,每份 5 毫升,一直洗至 260 nm 光吸收小于 0.1 为止。经酶法测定,各收集液内只含 CoI,回收率为 91%。

0.5 M 甲酸盐溶液的洗脱效果 按同法,再以 0.5 M 甲酸盐溶液洗脱此柱,经酶法测定,收集液内只含 CoII,回收率为 75%。

以上二步的洗脱情况见图 2。

综上所述,当人们使用酵母抽提液制备这类生化试剂时,就要考虑如何将其中含有的 CoI 与 CoA 彼此分离开。或者 CoI 在磷酸激酶反应中接受从腺三磷 (ATP) 上转来的磷酸根因而生成为 CoII 时,如何将平衡反应液中的 CoII 与剩留的 CoI 分离开。在生化研究室里,有时只需要其中之一的辅酶,而手头现有的市售辅酶制剂中却含有另外的辅酶时,也需进行分离与提纯因此本法有一定的实用价值。

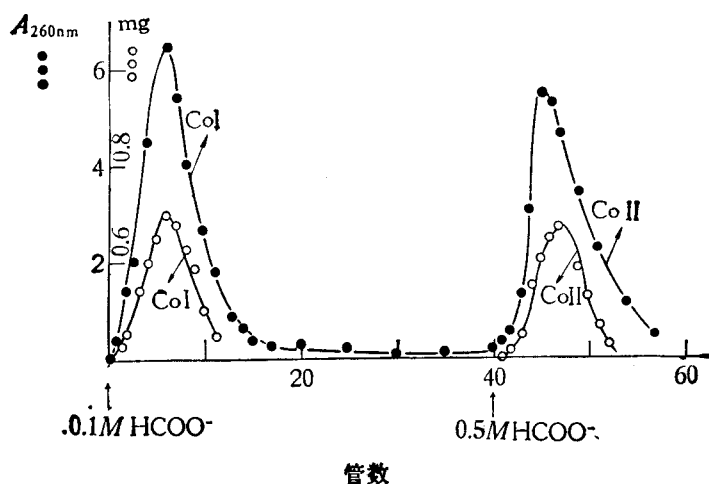


图2 Co I 与 Co II 的分离

图中 260 nm 光吸收曲线系自分管收集液于 1 cm 光径比色杯中的观察值。其含量曲线则为每管收集液经酶法测定得出的辅酶总毫克量

参 考 文 献

- [1] 东风生化试剂厂:《生物化学与生物物理学报》1965年第5期第535页。
- [2] 东风生化试剂厂等:《生物化学与生物物理进展》1975年第3期第13页。
- [3] Lepage, G. A. et al.: *J. Biol. Chem.* 180, 975, 1949.
- [4] Wang, T. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 211, 465, 1954.
- [5] Pastore, E. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 236, 2314, 1961.
- [6] 南京大学生物系等:《生物化学与生物物理进展》1978年第5期第9页。
- [7] Mitz, M. A. US 2828302. 1958.
- [8] Ciotti, M. M., et al.: *Methods in Enzymology*. Vol. 3, 891, 1957.
- [9] Horecker, B. L. et al.: *Methods in Enzymology* Vol. 3, 879, 1957.
- [10] Kaplan, N. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 174, 37, 1948.

[本文于 1981 年 5 月 27 日收到]

科技消息

动物与低频电场相互作用的一般性质分析结果

1. 体外电场包括体表电荷以及通过颈部或四肢的总电流完全取决于所用低频电场、体形、它与地或其他

导体等的特征。

2. 所有上述特全可在动物模型中进行。
3. 体外电场大小与诱导的体表电荷密度都与频率无关(在低频电场范围——绝缘与接地)。
4. 电流密度与体内电场可以被影响。

摘自 *Bioelectromagnetics* 2(1):1, 1981.