

CHROM. 5964

QUANTITATIVE ANALYSE VON NUKLEOSID-5-MONO-, DI- UND TRIPHOSPHATEN IN MITOCHONDRIEN MIT HILFE DES FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHEN

V. I. DROBISHEV*, S. E. MANSUROVA UND I. S. KULAEV

Laboratorium für Bioorganische Chemie der Moskauer Staatlichen Universität, Moskau (U.S.S.R.)

(Eingegangen am 3. Januar 1972)

SUMMARY

Quantitative determination of beef heart mitochondria nucleotides using a liquid chromatograph

A procedure has been developed for the quantitative and qualitative estimation of nucleoside-5'-mono-, -di- and -triphosphates, nicotinamide and flavine nucleotides and nucleotides of beef heart mitochondria. The nucleotides were separated by ion-exchange chromatography on 0.6×10 cm Dowex 1 X8 (16–20 μ) columns, Cl^- form, using a concentration gradient of HCl-NaCl . The procedure gives a high degree of resolution of nucleotides. The analysis was performed at 25° , under a pressure of 8 atm, at a flow-rate of 120 ml/h and it was continued for $6\frac{1}{2}$ h. The total content of nucleotides of beef heart mitochondria was found to be 7.60 ± 0.36 μ moles per gram of protein, *i.e.* the AMP + ADP + ATP content was 4.76 ± 0.30 μ moles, NAD^+ + NADH content 1.47 ± 0.16 μ moles, the NADP^+ + NADPH content 0.64 ± 0.09 μ moles, and the FMN + FAD content 0.71 ± 0.03 μ moles per gram of protein.

EINLEITUNG

Eine der verbreitetsten Methoden bei Nukleotiduntersuchungen ist die Ionenaustauschchromatographie. Sie ermöglicht eine qualitative und quantitative Bestimmung dieser Verbindungen.

Die Ionenaustauschchromatographie ist erstmals von COHN¹ angewandt worden. In seinen Arbeiten wurde das Anionit Dowex-1 und als Elutionsmittel Salzsäure mit Natriumchlorid verwendet. Das gleiche System verwendeten CABIB UND LELOIR², KOTELNIKOVA und Mitarbeiter³ und andere Autoren. Weit verbreitet ist die Methode von HURLBERT und Mitarbeiter⁴, die erstmals Ameisensäure und Ammoniumformiat als Elutionsmittel verwendeten. Der Nachteil der genannten Methoden besteht darin,

* Gegenwärtige Adresse: Institut für Biochemie und Physiologie der Mikroorganismen, Puschino/Oka, Moskauer Gebiet, U.S.S.R.

dass eine grosse Nukleotidmenge eingesetzt werden muss, die Elution mit grossen Lösungsmittelmengen erfolgt und sehr zeitraubend ist.

Ausser Ionenaustauschern auf Polystyrolbasis sind auch modifizierte Zellulosen verwendet worden⁵⁻¹⁰.

Nach der Einführung automatischer Aminosäureanalysatoren in die Laborpraxis wurde mit Hilfe ähnlicher Geräte Versuche zur Beschleunigung der Nukleotidtrennung gemacht¹¹⁻¹⁷. Eines der bis heute wohl besten Verfahren ist die Ultramikromethode, die im Laboratorium von HELDT UND KLINGENBERG ausgearbeitet wurde¹⁴. Jedoch muss jenes Gerät bis heute als einziges seiner Art angesehen werden, d.h. dass diese Methode vorerst nicht ausgebreitet angewendet werden kann.

Unsere Aufgabe bestand darin, eine Methode der automatischen Analyse der in biologischen Objekten vorkommenden komplizierten Nukleotidgemische auszuarbeiten, und sie für die Untersuchung säurelöslicher Nukleotide von Rinderherzmitochondrien anzuwenden.

EXPERIMENTELLES

Für die Untersuchungen wurde ein Universal-Flüssigkeitschromatograph Typ 034 der Firma "Hitachi" verwendet, der in unseren Versuchen die optische Dichten bei 250, 260 und 280 nm registrierte.

Vorbereitung des Anionits

Die Analysen wurden in 0.6×14 cm Säulen durchgeführt, die bis zu 10 cm mit dem Anionit Dowex 1 X8 (16-20 μ) in Cl⁻-Form aufgefüllt wurden. Der Ionenaustauscher wurde vor dem Einfüllen in die Säule mit Azeton und Alkohol entfettet. Nach Waschen mit Wasser wurde das Austauscherharz mit 2 N NaOH behandelt, anschliessend wurde mit Wasser bis zur vollständigen Entfernung der Hydroxylionen gewaschen und nochmals mit 2 N HCl und Wasser gespült. Das Anionit wurde in Wasser suspendiert, dann in die Säule eingebracht und mit zehn Teilen Wasser aufgefüllt.

Elutionssystem

In der Arbeit wurde als Elutionssystem HCl-NaCl verwendet, das ohne vorhergehende Reinigung die Spektrographie aller die Säule durchwandernden Nukleotide gestattet. Da jedoch dieses System im Unterschied zum Formiat keine Pufferkapazität besitzt, müssen Ausgangs- und Arbeitslösung mit grosser Genauigkeit bereitet werden.

Der Konzentrationsgradient, der die Trennung des komplizierten Nukleotidgemisches gestattet, wurde mittels eines sechskammerigen "gradient device" geschaffen, in dessen einzelne Sektoren je 120 ml der in Tabelle I gegebenen Lösungen eingefüllt wurden.

Aufbereitung der Probe

Die Mitochondrien wurden nach der von CRANE und Mitarbeiter ausgearbeiteten Methode aus dem Rinderherzen gewonnen¹⁸. Die Eiweisskonzentration der Präparate wurde mit der Biuretmethode bestimmt¹⁹.

Die Extraktion der Nukleotide aus den Mitochondrien wurde mit Hilfe von 0.5 N HClO₄ bei 0° ausgeführt. Die Extraktion wurde dreimal wiederholt, die dena-

TABELLE I

LÖSUNGEN FÜR DEN "GRADIENT DEVICE"

	Konzentration (M)	
	NaCl	HCl
A	—	5×10^{-4}
B	—	1×10^{-3}
C	—	8×10^{-3}
D	1×10^{-3} in	1×10^{-2}
E	1×10^{-2} in	1×10^{-2}
F	4×10^{-1} in	1×10^{-2}

turierten Eiweisse jeweils abzentrifugiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden vereint und mit Hilfe eines Büchner-Papierfilters gefiltert. Danach wurde das Gesamtvolumen bestimmt und die optische Dichte gemessen, mit 4 N KOH bei 0° vorsichtig neutralisiert und anschliessend das Extraktgemisch 0.5 bis 1 Std. in der Kälte stehengelassen. Der KClO_4 -Niederschlag wurde abgetrennt, mit einer geringen Menge Wasser gewaschen, die Lösungen vereint und von Neuem die optische Dichte des Extraktgemisches gemessen. Nukleotidverluste waren bei dieser Überarbeitung minimal.

Es hatte sich gezeigt, dass in die Säule nicht mehr als 5 ml der Probe eingebracht werden konnte. Die für die Chromatographie optimale Nukleotidkonzentration beträgt für den Extrakt 40/100 Einheiten optischer Dichte. Deshalb wurde der Extrakt durch Lyophilisierung bis auf 15–20 Einheiten optischer Dichte im Milliliter konzentriert. Bei der Lyophilisierung fand eine weitere Entsalzung statt. Das in der Probe verbleibende Kaliumperchlorat hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Trennung. Unmittelbar vor der Analyse wurde mit 1 N Ammoniaklösung ein pH-Wert von 9.8 eingestellt.

Die Nukleotide* wurden für die Eicharbeiten und bei der Verwendung als Tracer in Wasser gelöst, das mittels Ammoniak auf einen pH-Wert von 9.6–9.8 gebracht wurde. Die Standardmischungen bestanden im wesentlichen aus den Nukleotiden, die von uns früher in den Mitochondrien gefunden worden waren^{20–22}.

Verlauf der Analyse

Nach der Adsorption der Nukleotide am Anionit in der Säule wurde 30 min lang zwecks Entfernung des nichtadsorbierten Materials, der Nukleoside und der freien Basen mit deionisiertem Wasser gewaschen, daran anschliessend begann die Elution der Nukleotide. Die gesamte Analyse dauerte bei einer Temperatur von 25°, einem Druck von 8 atm und einer Elutionsgeschwindigkeit von 120 ml/Std., 6½ Std. Unmittelbar nach der Analyse wurde der Ionenaustauscher innerhalb von 10–15 min mit 0.2 N HCl regeneriert und anschliessend 30–40 min mit Wasser gewaschen.

Identifikation und quantitative Bestimmung der Nukleotide

Das eluierte Nukleotidmaterial wurde durch Vergleich der Nukleotidpikanordnung auf dem Extraktchromatogramm mit dem Chromatogramm der Standard-

* Präparate der Firmen Calbiochem, Serva und Reanal.

mischung, ausserdem durch Zugabe von bekannten Nukleotiden zur Probe und auf Grund des UV-Absorbtionsspektrums identifiziert.

Die Lage der Nukleotidpiks auf der Elutionskurve hängt sowohl vom pH-Wert der untersuchten Probe, als auch von der in ihr enthaltenen Salzkonzentration ab. In Verbindung damit kann sich die Nukleotidpikanordnung im Chromatogramm des Gewebes etwas von der Pikanordnung des Standardgemisches unterscheiden. Eine bessere Entsalzung der Proben, z.B. durch Adsorbtion der Nukleotide an Aktivkohle mit anschliessender Elution mit alkalischem Äthanol, gibt mit den entsprechenden Nukleotiden der Standardmischung ein genaueres Übereinstimmen sowohl der Piklage der Verbindung auf der Elutionskurve, als auch des Ausflusszeitpunktes. Das kann wesentliche Bedeutung für die Identifikation der Verbindungen haben.

Für die Identifikation des NAD⁺ wurde ausserdem eine die Verbindung mittels Alkoholdehydrogenase zu NADH reduzierende Methode angewandt²³.

Es ist bekannt, dass das NADH und NADPH unter den Bedingungen einer Säureextraktion völlig zur Adenosin-5'-diphosphatribose bzw. zur Adenosin-2'-phosphat-5'-diphosphatribose abgebaut werden²⁴. Deshalb wurde das NADH und NADPH in dieser Arbeit anhand der Zerfallprodukte bestimmt.

Die Menge der Nukleotide in den Mitochondrienextraktproben wurde mit Hilfe der Fläche der Piks auf den Chromatogrammen nach folgender in der quantitativen Aminosäurenanalyse allgemein verwendeten Formel berechnet²⁵:

$$Q = \frac{H \times W}{C}$$

wobei

Q = Nukleotidgehalt in μMol

H = logarithmische Pikhöhe, gemessen von der Basislinie (Angaben des automatischen Schreibers)

W = Pikbreite (angegeben in Intervallen zwischen den Messpunkten) bei einer Wellenlänge von 260 nm in der Höhe $1/2 H + H_0$, wobei H_0 die Höhe der Basislinie angibt

C = mikromolarer Koeffizient, dabei ist die Grösse C gleich der Fläche, die einem μMol des Nukleotides entspricht.

Die Koeffizienten für das vorgeschlagene Elutionssystem wurden von uns auf Grund der Ermittlung der Pikflächen und der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung der Standardnukleotide berechnet (Tabelle II).

TABELLE II

GRÖSSEN DER MIKROMOLAREN NUKLEOTIDKOEFFIZIENTEN

Nukleotid	Koeffizient	n	Fehler (%)
AMP	7.85 ± 0.12	9	1.5
ADP	6.87 ± 0.26	5	3.8
ATP	5.19 ± 0.18	6	3.5
NAD ⁺	9.31 ± 0.42	4	4.5
NADH	7.07 ± 0.19	5	2.7
NADP ⁺	8.32 ± 0.33	5	4.0
NADPH	5.14 ± 0.28	4	5.5

Zu bemerken wäre, dass die Verwendung dieser Koeffizienten sehr kleine Fehler ergibt, die für die Arbeit mit biologischem Material zu vernachlässigen sind.

Es soll betont werden, dass die Grösse der Koeffizienten stark vom Gradienten abhängt und dass deshalb die Koeffizienten für jedes Elutionssystem getrennt bestimmt werden müssen.

Es gelang nicht, bedingt durch die Form des Piks dieser Verbindungen, die Koeffizienten für FMN und FAD zu bestimmen, da letztere stark vom Anionit adsorbiert werden. Deshalb wurde die Menge der Flavinkofermente im Eluat, das mit Hilfe eines automatischen Fraktionskollektors gesammelt wurde, spektrophotometrisch bestimmt²⁶.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus Fig. 1 hervorgeht, gelingt es mit dem von uns vorgeschlagenen Elutionssystem, das komplizierte aus sechzehn Komponenten—AMP, ADP, ATP, UMP, UDP, UTP, GMP, GDP, CMP, IMP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, FMN, FAD—bestehende Nukleotidstandardgemisch zu trennen. Wie ersichtlich ist, werden mit Hilfe dieses Systems fast alle Komponenten getrennt. Unter den gegebenen Bedingungen ist nur das IMP und GMP nicht, das GDP und UDP nur ungenügend getrennt. Da aber der Anteil dieser Verbindungen in den Mitochondrien sehr gering ist, ist die erreichte Trennung bei der Zielstellung der Arbeit befriedigend. Fig. 1 ist ausserdem ersichtlich, dass die Flavine, bedingt durch deren starke Adsorption am Anionit, in zwei unscharfen Piks auftreten.

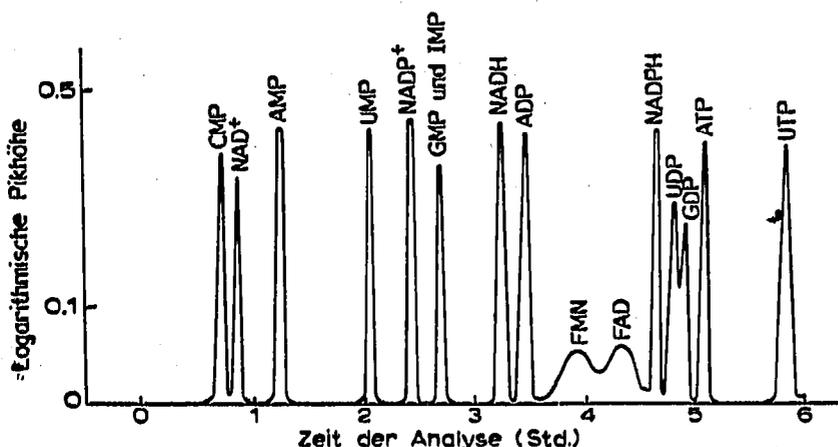


Fig. 1. Schema der chromatographischen Trennung eines Standardnukleotidgemisches mit dem Flüssigkeitschromatographen Typ 034. Dowex 1 X8 (16–20 μ) in Cl⁻-Form, Höhe des Austauschers in der Säule 10 cm, Temperatur 25°, Elutionsgeschwindigkeit 120 ml/Std., Elutionssystem HCl-NaCl (Konkrete Angaben im Text). Nur die optische Dichte bei 260 nm ist angegeben. o = Basislinie und Elutionsbeginn.

Mit dem verwendeten Elutionssystem erhielten wir eine gute Auftrennung der Mitochondriennukleotide von Rinderherzen (Fig. 2). Aus Fig. 2 und Tabelle III ist ersichtlich, dass in dem Extrakt, ebenso wie früher^{20–22}, AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, FMN, FAD, GMP, UMP, GDP, Inosin und Hypoxanthin gefunden wurden.

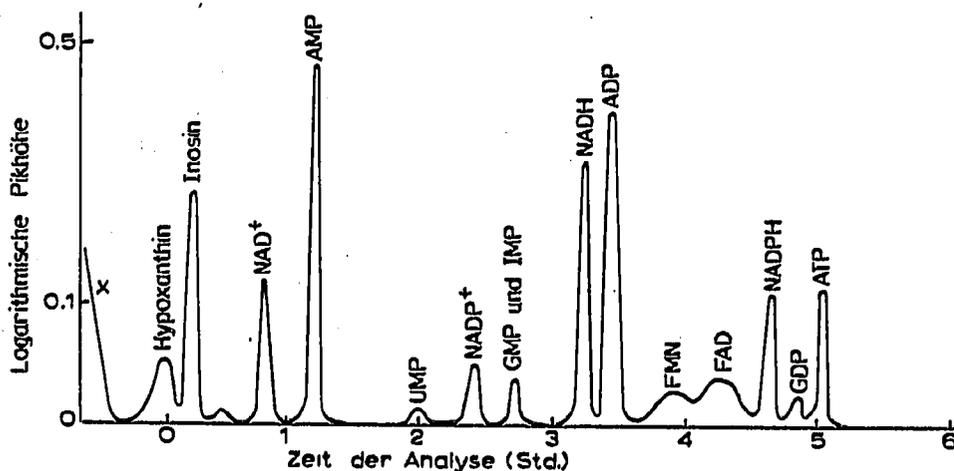


Fig. 2. Schema der chromatographischen Trennung der Nucleotide von Rinderherzmitochondrien mit dem Flüssigkeitschromatographen. o = Basislinie und Elutionsbeginn; x = UV-absorbierende Verunreinigungen. Analysenbedingungen wie in Fig. 1.

Ein Durchspülen der Säule mit Wasser nach dem Einbringen der Probe führt zur Abtrennung des vom Anionit nicht adsorbierten UV-absorbierenden Materials und zur Auftrennung von Inosin und Hypoxanthin.

Schnelligkeit und Genauigkeit der Methode ermöglichen es, eine ganze Serie von Analysen der Mitochondriennucleotide durchzuführen und den Mittelwert für jedes der Nucleotide zu bestimmen. Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

Aus der Tabelle III ist ersichtlich, dass der mittlere Gehalt an säurelöslichen Nucleotiden in den Mitochondrien um $8 \mu\text{Mol}$ pro Gramm Eiweiss schwankt. Von den Adeninnucleotiden sind $5 \mu\text{Mol}$ (etwa 65% der Gesamtmenge an Nucleotiden) in den Mitochondrien der Rinderherzen enthalten, was sowohl mit den von uns früher gemachten Befunden²⁰⁻²², als auch mit denen von KLINGENBERG²⁷, übereinstimmt. Die gleiche Größenordnung für den Gehalt an Adeninnucleotiden wurde von ALLMANN *et al.*²⁸ und BRIERLY UND O'BRIEN²⁹ für die Herzmitochondrien gefunden, obwohl in

TABELLE III

GEHALT SÄURELÖSLICHER NUCLEOTIDE VON RINDERHERZMITOCHONDRIEN (μMOL PRO GRAMM EIWEISS)

Nucleotid	Gramm Eiweiss									Mittelwert	Fehler (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
AMP	2.10	2.52	1.95	3.20	1.84	3.67	3.66	2.20	2.94	2.68 ± 0.24	8.9
ADP	2.30	1.93	1.37	1.25	1.26	1.18	1.45	0.93	2.19	1.54 ± 0.17	11.0
ATP	0.50	0.58	0.89	0.48	0.26	0.38	0.55	0.38	0.82	0.54 ± 0.07	12.9
AMP+ADP+ATP	4.90	5.03	4.21	4.99	3.36	5.23	5.66	3.51	5.97	4.76 ± 0.30	6.3
NAD+	0.72	0.77	—	—	—	—	—	0.67	0.66		
NADH	0.17	0.39	1.90	1.31	1.38	2.46	1.13	0.89	0.75		
NAD++NADH	0.89	1.16	1.90	1.31	1.38	2.46	1.13	1.56	1.41	1.47 ± 0.16	10.9
NADP+	0.23	0.16	0.11	0.23	0.12	0.31	—	0.18	0.25		
NADPH	0.21	0.26	0.35	0.27	0.46	0.45	0.50	0.75	0.91		
NADP++NADPH	0.44	0.42	0.46	0.50	0.58	0.76	0.50	0.93	1.16	0.64 ± 0.09	14.0
FMN+FAD	0.80	0.82	0.80	0.64	0.65	0.67	0.46	0.83	0.70	0.71 ± 0.03	4.2
Summe der Nucleotide	7.03	7.43	7.37	7.44	5.97	9.31	7.74	6.83	9.25	7.60 ± 0.36	4.7

ihrem Falle, hervorgerufen durch die Verwendung eines Stufenkonzentrationsgradienten, in der Fraktion der Adeninnukleotide Pyridinkofermente und deren Zerfallsprodukte anwesend waren.

Der Gehalt an NAD^+ und NADH beträgt etwa $1.5 \mu\text{Mol}$ (19% der Mitochondriennukleotide), an NADP^+ und NADPH etwa $0.6 \mu\text{Mol}$ (8%) und an Flavinen etwa $0.7 \mu\text{Mol}$ (9%) pro Gramm Mitochondrien-Eiweiss.

Auf den Nukleotidanteil, der in der Tabelle III nicht enthalten ist (modifizierte Uridinsäure, Guaninsäure und Inosinsäure), entfällt etwa 3% der Gesamtmenge der Mitochondriennukleotide.

DANK

Die Autoren danken Herrn Dr. V. P. KORSCHENKO, Abteilung Chromatographie des Laboratoriums für Bioorganische Chemie, für die liebenswerte Unterstützung bei der Durchführung eines Teiles der chromatographischen Arbeiten, desweiteren Herrn L. I. STREICHER für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode für die quantitative und qualitative Bestimmung von Nukleosid-5'-mono-, -di- und -triphosphate, Nikotinamid, Flavinnukleotid und der Nukleotide von Rinderherzmitochondrien ausgearbeitet. Die Nukleotidtrennung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Säule $0.6 \times 10 \text{ cm}$) an Dowex 1 X8 ($16\text{--}20 \mu$) in Cl^- -Form mit Hilfe eines $\text{HCl}\text{--}\text{NaCl}$ -Gradienten. Die Methode erlaubt eine gute Trennung der Nukleotide. Die Trennung wurde durchgeführt bei 25° , einem Druck von 8 atm und einer Elutionsgeschwindigkeit von 120 ml/Std. über einen Zeitraum von $6\frac{1}{2}$ Std. Die Totalnukleotidgehalt der Rinderherzmitochondrien beträgt $7.60 \pm 0.36 \mu\text{Mol}$ pro Gramm Protein, d.h. der $\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}$ Gehalt $4.76 \pm 0.30 \mu\text{Mol}$, der $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$ Gehalt $1.47 \pm 0.16 \mu\text{Mol}$, der $\text{NADP}^+ + \text{NADPH}$ Gehalt $0.64 \pm 0.09 \mu\text{Mol}$ und der $\text{FMN} + \text{FAD}$ Gehalt $0.71 \pm 0.03 \mu\text{Mol}$ pro Gramm Protein.

LITERATUR

- 1 W. E. COHN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471.
- 2 E. CABIB UND L. F. LELOIR, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 777.
- 3 A. V. KOTELNIKOVA, V. V. SOLOMATINA UND I. A. GORSKAYA, *Biochimia*, 34 (1960) 1085.
- 4 R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. E. BRUMM UND V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.
- 5 R. NILSON UND M. SJUNNESSON, *Acta Chem. Scand.*, 15 (1961) 1017.
- 6 C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 538.
- 7 P. A. OCKERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 588.
- 8 M. STAHELIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 49 (1961) 11.
- 9 D. D. CHRISTIANSON, J. W. PAULIS UND J. S. WALL, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 35.
- 10 I. C. CALDWELL, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 331.
- 11 E. JUNOWICZ UND J. H. SPENCER, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 342.
- 12 R. E. BLATTNER UND H. B. ERICKSON, *Anal. Biochem.*, 18 (1970) 220.
- 13 PH. R. BROWN, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 257.
- 14 H. W. HELDT UND M. KLINGENBERG, *Biochem. Z.*, 343 (1965) 433.
- 15 F. MURAKAMI, S. ROKUSHIKA UND H. HATANO, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 584.
- 16 N. G. ANDERSON UND F. C. LADD, *Biochim. Biophys. Acta*, 55 (1962) 275.
- 17 M. HORI UND E. KONICHI, *J. Biochem.*, 56 (1964) 375; *Methods Enzymol.*, 12 (1967) 381.

- 18 F. L. CRANE, J. L. GLENN UND D. E. GRENN, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 475.
- 19 A. D. GORNALL, C. J. BARDAWILL UND M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- 20 S. E. MANSUROVA UND I. S. KULAEV, *Biochim. Biophys. Acta*, 172 (1969) 328.
- 21 S. E. MANSUROVA, I. S. KULAEV, V. P. KHOLODENKO, V. YU. POLYAKOV, UND V. V. CHISTYAKOV, *Biokhimiya*, 34 (1969) 800.
- 22 I. S. KULAEV, S. E. MANSUROVA UND V. I. DROBISHEV, *Mitochondria. Biochemical Function in the Systems of Cellular Organella*, Nauka, Moscow, 1969, S. 140.
- 23 L. D. ZELEZNICK, S. M. ROSEN, M. SALMARSH-ANDREW, M. J. OSBORN UND B. L. HORECKER, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 53 (1965) 207.
- 24 H. W. HELDT, M. KLINGENBERG UND K. PAPENBERG, *Biochem. Z.*, 342 (1965) 508.
- 25 D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN UND S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.
- 26 K. YAGI, *Methods Biochem. Anal.*, 10 (1962) 319.
- 27 M. KLINGENBERG, in E. QUAGLIARIELLO, S. PAPA, E. C. SLATER UND J. M. TAGER (Herausgeber), *Mitochondrial Structure and Compartmentation*, Adriatica Editrice, Bari, 1967, S. 320.
- 28 D. W. ALLMANN, R. A. HARRIS UND D. E. GRENN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 122 (1967) 766.
- 29 G. BRIERLEY UND R. L. O'BRIEN, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4532.

J. Chromatogr., 69 (1972) 317-324