[文章编号]1000-2782(1999) 06-0001-06

小麦 5-氨基酮戊酸脱水酶的纯化及部分性质研究

范 军[1,2],项 艳[2],李 纯[2],郭蔼光[1]
(1西北农业大学基础科学系,陕西杨陵 712100)
(2安徽农业大学生物技术研究中心,合肥 230061)

[摘 要] 以 30% ~ 60% 硫酸铵饱和度分级沉淀、DEAE Sepharose CL-6B Sephadex G-200 Phenyl Sepharose CL-4B和羟基磷灰石层析纯化了小麦 5-氨基酮戊酸脱水酶(ALAD),其在 pH 8.5时比活为 31 U·mg^{-1}蛋白;酶纯化了 91倍,得率 5%,酶亚基分子质量约 52 ku,全酶分子质量约 330 ku,表明酶由 6个亚基组成;酶的等电点为 4.8,在 400 nm有吸收峰,最适反应温度 45℃,Mg^{2+}激活酶,Zn^{2+}和磷酸吡哆醛抑制酶。纯化的 ALAD浓缩后,-20℃下在 0.1 mol·L^{-1},pH 8.5的 Tris-HCl,内含 50% 的甘油,5 mmol·L^{-1}的巯基乙醇和 $MgCl_2$中黑暗贮藏 30 d酶活不损失。

[关键词] 5-氨基酮戊酸脱水酶;小麦;酶活性
[中图分类号] S512.101; Q555+.6 [文献标识码] A

卟啉化合物如钴铵素、血红素和叶绿素等在生物界有着重要的作用。其生物合成的共同途径是从 5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinate, ALA)至尿卟啉原Ⅲ.催化第一步反应的酶是 5-氨基酮戊酸脱水酶(5-aminolevulinate dehydratase, ALAD, EC.4.2.1.24.),已从人血红细胞[1]、牛肝[2]和酵母中纯化。植物从斜生栅藻[4]中纯化,用单克隆抗体技术从菠菜纯化了 ALAD,发现其性质不同于动物的 ALAD[5].酶的反应机理研究表明,ALAD存在两个活性部位,A位酶活中心的赖氨酸与底物形成舍夫碱,然后两分子 ALA脱水合成一分子胆色素原(Porphobilinogen, PBG)[6]。本研究用经典层析方法纯化了小麦 ALAD,以合成昂贵的酶促产物胆色素原,它作为底物可用于其后的反应如胆色素原脱氨酶,尿卟啉原Ⅲ合酶和尿卟啉原Ⅲ脱羧酶的酶活测定。为研究突变体小麦返白系[7]的胆色素原脱氨酶和尿卟啉原Ⅲ合酶代谢奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦品种西安九号幼叶,采自西北农业大学实验田,层析装置和层析材料 Sephadex G-200、DEAE Sepharose CL-6B、Phenyl Sepharose CL-4B和电泳试剂为 Pha-

[收稿日期] 1999-07-12
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39570066)
[作者简介] 范 军(1963-),男,讲师,硕士,现在安徽农业大学生物技术研究中心工作,安徽合肥 230061

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

macia公司产品,羟基磷灰石为 Merck公司产品, ALA购自 Fluka公司,巯基乙醇、磷酸吡哆醛和胆色素原购自 Sigma公司,电泳和层析用标准分子质量蛋白购自上海 Promega公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 ALAD的纯化 除非特殊说明,所有操作均在 4℃下进行。取 400 g小麦幼叶,加入 400 mL提取缓冲液(pH 8.5的 0.05 mol·L^{-1}的 Tris-HCl,内含 8 mmol·L^{-1}的 $MgCl_2$和 5 mmol·L^{-1}的巯基乙醇)匀浆,4层纱布过滤,10 000 g×10 min离心,弃沉淀,上清液加入硫酸铵至 30%饱和度,离心弃沉淀,上清液再加入硫酸铵至 60%饱和度,离心弃上清,沉淀用少量提取缓冲液溶解,透析,上 DEAE Sepharose CL-6B柱(2.6×90 cm),以提取缓冲液洗脱 1个柱体积,再以内含 0.1 mol·L^{-1}的 NaCl提取缓冲液洗脱 1个柱体积,0.1~0.5 mol·L^{-1}的 NaCl梯度洗脱,10 mL·管$^{-1}$,1.2 mL·min^{-1},合并酶活管,加入硫酸铵至 60%饱和度,20 000 g×20 min离心弃上清,沉淀用少量提取缓冲液溶解,透析,Sephadex G-200(2.6×60 cm)层析,10 mL·管$^{-1}$,流速 0.5 mL·min^{-1},合并酶活管,Phenyl Sepharose CL-4B(1.6×30 cm)层析,以提取缓冲液(内含 0.1 mol·L^{-1}的 NaCl)洗脱 3个柱体积,以体积分数为 0~80%的乙二醇梯度洗脱,4 mL·管$^{-1}$,1 mL·min^{-1},合并酶活管,在 0.02 mol·L^{-1}的 PBS,pH 8.5缓冲液(内含 5 mmol·L^{-1}的 $MgSO_4$和 5 mmol·L^{-1}的巯基乙醇)透析,羟基磷灰石(1.6×10 cm)层析,先以上述 PBS缓冲液洗脱 2个柱体积,然后以 0~0.4 mol·L^{-1}的磷酸氢二钾洗脱,3 mL·管$^{-1}$,0.15 mL·min^{-1},收集酶活高峰管,用提取缓冲液透析,浓缩,备用。

1.2.2 ALAD的酶活测定 按 Mauzerall[8]方法加以改进:将低温贮藏的 0.2 mL的 ALAD在 37℃活化 10 min,加入 15μg的 ALA,反应终体积 0.5 mL,37℃反应 20 min后加入 0.5 mL 500 g·L^{-1}的 TCA和 10 g·L^{-1}的 $HgCl_2$混合液终止反应。离心弃沉淀,上清液加入 0.5 mL的 Ehrlich's试剂,555 nm比色,计算 PBG的含量,其吸光系数是 0.6 Mmol·L^{-1},一个 ALAD的酶活单位为上述条件下每毫克蛋白每小时催化产生 1μmol的 PBG.

1.2.3 SDS-PAGE和凝胶测 ALAD分子质量 采用 Laemmli系统,用 12.5%的分离胶,2.5%的浓缩胶,电泳后银染。ALAD全酶分子质量测定采用凝胶方法,在 Sephadex G-200(2.6×60 cm)纯化 ALAD后,先后分别加入铁蛋白(440 ku,马脾)、谷氨酸脱羧酶(310 ku,小麦)[9]、乳酸脱氢酶(140 ku,牛心)、血清红蛋白(67 ku,牛血)、血清红蛋白(67 ku,牛血),确定其洗脱体积,与纯化 ALAD时的洗脱体积相比较。

1.2.4 PBG的酶促合成 参照文献[1]的方法,有改进。按上述纯化程序,ALAD于 37℃上疏水层析后,以 0.1 mol·L^{-1}的 Tris-HCl内含 5 mmol·L^{-1}的 $MgCl_2$和巯基乙醇洗脱杂蛋白,未洗脱下来的 ALAD固定在苯基琼脂糖柱上。以 25 mL,0.1 mol·L^{-1} pH 8.5的缓冲液(内含 5 mmol·L^{-1}的巯基乙醇和 25 mg的 ALA)过该柱,流速 0.05 mL·min^{-1},再以上述洗脱缓冲液洗脱一个柱体积,检测 PBG的含量,合并含产物的试管,以 717树脂(1×10 cm)纯化。

1.2.5 蛋白质含量测定 采用考马斯亮兰法,以 BSA作对照

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

2 结果分析

DEAE层析表明,需要 0.25 mol·L⁻¹的 NaCl才能将小麦 ALAD洗脱。这与动物的 ALAD性质一致。苯基琼脂糖强烈吸附小麦 ALAD,须用乙二醇才能将其洗脱(图 1),纯化最有效,这与人血红细胞 ALAD层析性质一致。经此纯化后电泳仅有一条杂蛋白带。羟基磷灰石层析在 0.3 mol·L⁻¹的磷酸氢二钾将小麦 ALAD洗脱,与牛肝的 ALAD一致。纯化的小麦 ALAD比活 31 U·mg⁻¹蛋白,和斜生栅藻 ALAD的比活接近。纯化结果见表 1.

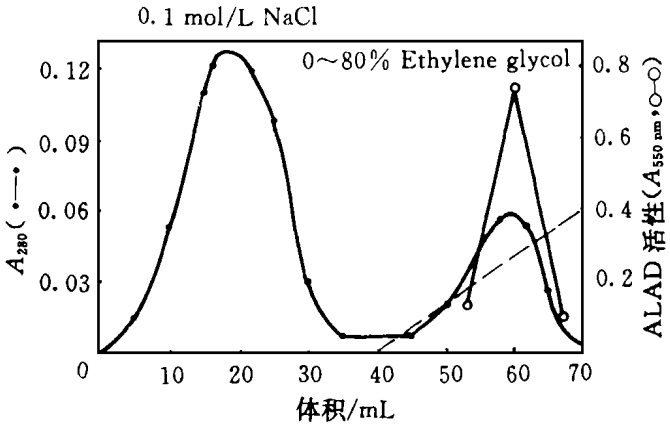

图 1　小麦 5氨基酮戊酸脱水酶的苯基琼脂糖洗脱图谱

表 1　小麦 5氨基酮戊酸脱水酶纯化结果

步　骤	总蛋白 / mg	总活力 / U	比活 / (U·mg⁻¹)	产率 / %	纯化倍数
离心上清液	8 233	2 800	0.34	100	1.0
AS 30%~60% fraction	2 654	2 362	0.89	84	2.6
DEAE Sephrose CL-4B	237	1 827	7.71	65	22.6
Sephadex G-200	74	1 149	15.53	41	45.7
Phenyl Sepharose CL-4B	25	668	26.75	24	78.7
羟基磷灰石柱	4.7	145	30.78	5	90.5

纯化的小麦 ALAD的 SDS-PAGE银染图谱(图 2)显示单点纯,其亚基分子质量约 51 ku,全酶分子质量 330 ku(图 3),表明酶由 6个亚基组成,这与斜生栅藻和菠菜的 ALAD分子结构一致。菠菜 ALAD的亚基分子质量约 50 ku,从其基因序列获得分子质量为 40 123 u[10];人和动物的 ALAD由 8个亚基组成,分子质量 340~350 ku,亚基分子质量 35~40 ku.小麦 ALAD的等电点约为 4.8(图 4),与其他生物来源的 ALAD相似。

小麦的纯 ALAD最适反应温度为 45℃,55℃加热 20 min酶活丧失 50%,纯酶浓缩后在 0.1 mol·L⁻¹,pH 8.5的 Tris-HCl缓冲液(内含 5 mmol·L⁻¹的 $MgCl_2$和巯基乙醇和 50%的甘油),-20℃下保存 30 d酶活不损失。

纯化的 ALAD呈黄色,经 BECKMEM DU-7扫描显示在 400 nm有吸收峰(图 5),这和人血红细胞 ALAD扫描性质一致。据推测人红细胞中含有磷酸吡哆醛(PLP),但 PLP

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

抑制小麦 ALAD的酶活。5 mmol· L^{-1}的 Mg^{2+}激活小麦 ALAD达 110%,而同等浓度的 Zn^{2+}抑制酶活达 95%,5 mmol· L^{-1}的 EDTA-Na_2抑制酶活达 45%,原因是它螯合了 ALAD中的 Mg^{2+},5 mmol· L^{-1}巯基乙醇对小麦 ALAD酶活有微弱激活作用,可以防止 PBG氧化,对拟南芥和大肠杆菌的 ALAD没有作用。

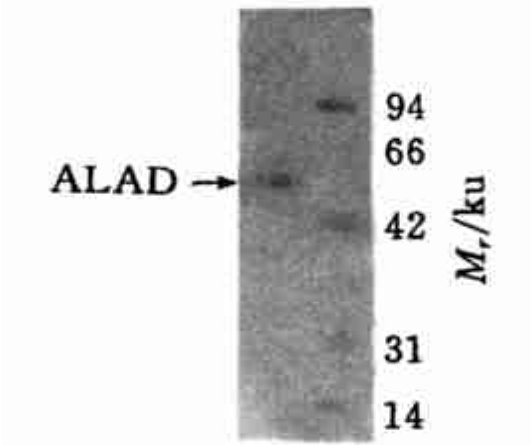

图 2 小麦 ALAD的 SDS-PAGE图谱

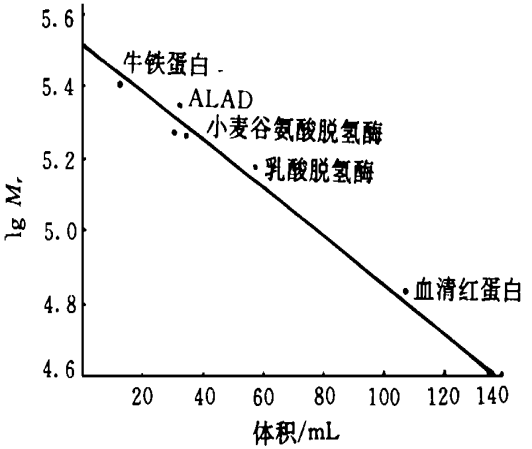

图 3 小麦 ALAD的全酶分子量测定

图 4 小麦 ALAD的 IEF-PAGE图谱

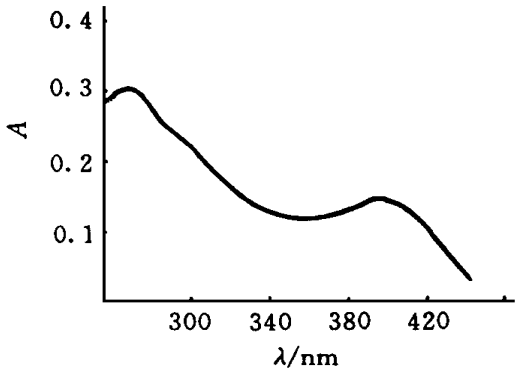

图 5 小麦 ALAD的吸收光谱扫描

用 250 mg的 ALA经酶促合成 100 mg的 PBG,比以人和动物的 ALAD酶促合成得率略低,经阴离子交换树脂 717提纯后可用于尿卟啉原Ⅲ合酶的测定。

3 讨 论

小麦 ALAD的层析性质与人及动物的 ALAD相似,不同于斜生栅藻,但分子结构和酶的性质与菠菜、斜生栅藻的 ALAD一致。酶需要 Mg^{2+}激活,人和动物的 ALAD需要 Zn^{2+}激活,微生物的 ALAD需要 K^{+}激活,有人据此将 ALAD划分为 3大类[11]。植物 ALAD中以 Asp残基[12]结合 Mg^{2+},而人和动物的酶以 His和 Cys残基结合 Zn^{2+},作者曾尝试用 Mg^{2+}螯合层析纯化 ALAD,但发现不吸附(资料未出示),推测酶中 Asp残基对 Mg^{2+}亲和力太小。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

从人和牛的 ALAD吸收光谱断定其 ALAD中含有磷酸吡哆醛 (PLP),作者也发现小麦 ALAD在 380 nm有吸收峰,但对于酶中是否含有 PLP,还有待深入研究,因为 PLP抑制酶活。在含有 PLP的小麦谷氨酸脱羧酶中 PLP激活酶, PLP可以和酶活中心的赖氨酸残基结合[13],在人血红细胞 ALAD中发现 PLP是竞争性抑制剂。这进一步证明了 ALAD的作用机理。在 ALAD后催化反应的胆色素原脱氨酶和尿卟啉原Ⅲ合酶中都发现 PLP抑制酶活,并据此推断赖氨酸为酶活中心必需氨基酸残基。

与牛 ALAD相比,小麦 ALAD合成 PBG得率偏低。原因是小麦酶的最适 pH在 8.0 ~ 9.0,而牛 ALAD最适 pH在 6.7左右, ALAD在碱性条件下易形成二聚体。但以小麦 ALAD合成 PBG也有优点。首先 5 mmol· L^{-1}的 Mg^{2+}激活小麦 ALAD,对催化下一步的酶抑制作用仅 10%,在酶活联合测定法中, ALAD催化 ALA生成 PBG,它又被 PBGD所催化,可有效利用 ALA.动物 ALAD以 Zn^{2+}为辅基,它强烈抑制 PBGD,须螯合除去 Zn^{2+}.其次,小麦 ALAD比牛 ALAD稳定,不易氧化。合成的 PBG用于联合酶活法测定 PBGD酶活,可以定量,效果比 ALAD粗品好[14]。

本研究虽然纯化了小麦 ALAD,但步骤繁杂,简化纯化步骤,寻找新亲和层析材料,有待以后研究。

[参考文献]

[1] Anderson P M, Desnick R J. Purification and porperties of 5-aminolevulinate dehydratase from human erythrocytes[J]. J Biol Chem, 1980, 254: 6924~ 6930.

[2] Jordan P M, Seehra J S. Purification of porphobilinogen synthase from bovine liver[J]. Methods in Enzymology, 1986, 123: 427~ 434.

[3] Borralho L M, Ortiz C H D, Panek A D, et al. Purification of δ-aminolevulinate dehydratase from genetically engeneered yeast[J]. Yeast, 1990, 6: 319~ 330.

[4] Stolz M, Dornemann D. Purification, mental cofactor, N-terminal sequence and subunit composition of a 5-aminolevulinic acid dehydratase from the unicellular green alga scenedesmus obliquus, mutant C-2A′[J]. Eur J Biochem, 1996, 236: 600~ 608.

[5] Lieden W, Lutz C, Schneider H A W. Molecular properties of 5-aminolevulinate dehydratase from *Spinacia oleracea*[J]. Eur J Biochem, 1983, 135: 75~ 79.

[6] Spencer P, Jordan P M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A-and P-sites of 5-aminolevulinate dehydratase from *Escherichia coli*[J]. Biochem J, 1995, 305: 151~ 158.

[7] 王保莉,郭蔼光,汪沛洪.小麦突变体返白系返白阶段叶绿素代谢的变化[J].植物学报, 1996, 38(7): 557~ 562.

[8] Mauzerall D, Granick S. The occurence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine[J]. J Biol Chem, 1956, 219: 435~ 446.

[9] 范　军,李　纯,朱苏文,等.小麦谷氨酸脱羧酶的纯化及部分性质研究[J].中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(5): 641~ 644.

[10] Schaumber A, Schneider-Poetsch H A W, Eckerskorn C. Characterization of plastid 5-aminolevulinate dehydratase (ALAD, EC 4.2.1.24.) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non-plant ALAD enzymes[J]. Z Naturforsch Sect C Biosci, 1992, 47: 77~ 84.

[11] Matterrs G I, Beale S I. Structure and expression of the Chlamydomonas reinhardtii alad gene encoding the chorophyll biosynthetic enzyme δ-aminolevulinilic acid dehydratase (porphobilinogen synthatase)[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 607~ 617.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

[12] Boese Q F, Spano A J, Li J et al. Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.) Indentification of an unusual mental-binding domain in the plant enzyme[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 17060~ 17066.

[13] Rippa M, Spano L, Pontremoli S A. Specific interaction of pyridoxal 5′-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenase[J]. Arch Biochem Biophys, 1967, 118: 48~ 57.

[14] 范 军,郭蔼光.小麦胆色素原脱氨酶的联合酶活测定[J].安徽农业大学学报, 1998, 25(1): 76~ 80.

Purification and some properties of 5-aminolevulinate dehydratase from wheat leaf

FAN Jun[1], **XIANG Yan**[2], **LI Chun**[2], **GUO Ai-Guang**[1]

(1 *Department of Basic Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

(2 *Biotechnology Centre, Anhui Agricultural University, Hefei* 230061, *China*)

Abstract 5-aminolevulinate dehydratase(ALAD) is purified to homogeneity from wheat leaves with 30%~ 60% ammonium sulphate fractionation, chromatography DEAE Sepharose CL-6B, Sephadex G-200, Phenyl Sepharose CL-4B and hydroxylatite. The purified enzyme has a specific activity of 31 U/mg protein at pH 8.5 with a fold of 91 and yield of 5%. It has a relative Mr of 330 ku and subunit Mr of 52 ku, thus showing six identical subunits. IEF confirms its pI is about 4.8. The enzyme has an absorption maximum at 400 nm in Tris-HCl buffer, pH 8.5. It is maximally active at a temperature of 45℃ and activated by Mg^{2+}, but inhibited by Zn^{2+}. The purified enzyme after concentrated is stored without a loss of activity for a month at -20℃ in the dark in the 0.1 mol·L^{-1} Tris-HCl buffer, pH 8.5, including 50% glycerol 5 mmol·L^{-1} 2-mercaptoethanol and $MgCl_2$.

Key words 5-aminolevulinate dehydratase (ALAD); wheat; enzyme activity

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w