

## 小麦尿卟啉原 III 合酶的分离和纯化

范 军<sup>1,2</sup>, 郭 嵩光<sup>1</sup>

(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)

S512.101

Q555.6

**[摘 要]** 以 40%~70% 饱和度硫酸铵分级沉淀、DEAE Sepharose CL-6B、Sephadex G-100、羟基磷灰石、Phenyl Sepharose CL-4B 和制备电泳分离纯化了小麦的尿卟啉原 III 合酶(UROS)。酶的亚基分子质量为 54 ku, 全酶分子质量为 66 ku, 酶的等电点 6.3, 在 pH 8.2 时比活为 257  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ , 最适反应温度 40℃, 5 mmol/L 的巯基乙醇和  $\text{Mg}^{2+}$  促进酶活, 纯化的小麦 UROS 在 -20℃ 下 0.1 mol/L, pH 8.5 的 Tris-HCl, 内含质量分数为 50% 的甘油, 5 mmol/L 的巯基乙醇和  $\text{MgCl}_2$  中贮藏 7 d 酶活损失 90%。

**[关键词]** 尿卟啉原 III 合酶; 小麦; 纯化; 分离; 代谢; 层析法

**[中图分类号]** S512.10; Q555+.6 **[文献标识码]** A

生物体内血红素和叶绿素等四卟啉化合物合成的共同前体尿卟啉原 III, 由四分子胆色素原在胆色素原脱氨酶和尿卟啉原 III 合酶(Uro-porphyrinogen III synthase, UROS, EC. 4. 2. 1. 75.) 共同催化下合成<sup>[1]</sup>。已从人红细胞<sup>[2]</sup>、小球藻<sup>[3]</sup>和大鼠<sup>[4,5]</sup>中纯化到 UROS, 高等植物中迄今未见 UROS 的纯化报道, 仅从小麦<sup>[6]</sup>和豌豆<sup>[7]</sup>部分纯化。由于 UROS 不稳定且在生物体内含量低, 现有人采用转入 UROS 基因的大肠杆菌<sup>[8]</sup>和枯草杆菌<sup>[9]</sup>研究 UROS 的性质。我国发现 1 种冬小麦突变体小麦返白系, 其 PBGD-UROS 代谢受阻<sup>[10]</sup>。为此用经典层析方法纯化了小麦的 UROS, 为研究小麦返白系的 UROS 代谢打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

小麦品种矮变 1 号幼叶, 采自西北农业大学实验田。层析装置和材料如 Sephadex G-100, DEAE Sepharose CL-6B 和 Phenyl Sepharose CL-4B 电泳试剂购自瑞典 Pharmacia 公司, 羟基磷灰石购自 Merck 公司, ALA 由 Fluka 公司生产, 巯基乙醇和胆色素原为 Sigma 公司产品, 部分胆色素原由自己合成。电泳和层析用标准分子质量蛋白是上海 Promega 公司产品, 其余试剂为国产分析纯产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 UROS 的纯化 除非说明, 所有操作均在 4℃ 下进行。取 500 g 小麦幼叶, 加

**[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, 硕士, 讲师。现在安徽农业大学生物技术研究中心工作

500 mL的 pH 8.2, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 内含 5 mmol/L 的巯基乙醇, 匀浆, 4 层纱布过滤, 10 000  $g \times 10$  min 离心, 弃沉淀; 上清液加入 40% 饱和度  $(NH_4)_2SO_4$ , 离心弃沉淀; 上清液再加入 70% 饱和度  $(NH_4)_2SO_4$ , 离心弃上清液; 沉淀用少量提取缓冲液溶解, 透析, 离心弃沉淀。上 DEAE Sepharose CL-6B 柱(2.6  $\times$  95 cm), 以提取缓冲液洗脱 2 个柱体后, 0~0.5 mol/L 的 KCl 梯度洗脱, 6 mL/管, 1.2 mL/min。收集酶活管, 70% 饱和度  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀, 离心(2 5000  $g \times 10$  min), 弃上清液, 少量提取缓冲液溶解, 透析。Sephadex G-100(2.6  $\times$  95 cm)层析, 10 mL/管, 流速 0.5 mL/min, 合并酶活管; 羟基磷灰石(2.6  $\times$  30 cm)层析, 以提取缓冲液洗脱 2 个柱体后, 以 0~0.3 mol/L 的  $K_2HPO_4$  梯度洗脱, 3 mL/管, 0.15 mL/min, 收集酶活高峰管; 在 0.05 mol Tris-HCl(pH 8.0)透析, 再放至 0.1 mol Tris-HCl(含 30% 饱和度  $(NH_4)_2SO_4$ , pH 8.0)中透析, Phenyl Sepharose CL-4B(1.6  $\times$  30 cm)层析, 以 30%~0 饱和度  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 mol Tris-HCl 梯度洗脱, 4 mL/管, 1 mL/min, 收集酶活管; 在提取缓冲液透析, 浓缩后制备电泳, 切下少量含有蛋白的胶条后酶促反应确定 UROS 的位置, 然后研碎凝胶, 加入 0.1 mol/L, pH 8.2 的 Tris-HCl, 内含质量分数 50% 的甘油, 5 mmol/L 的巯基乙醇和  $MgCl_2$ ,  $-20^\circ C$  保存。

1.2.2 UROS 酶活测定 参考文献[11]。在 pH 8.2, 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 内含约 20 个单位纯化的小麦胆色素原脱氨酶<sup>[11]</sup>, 0.1 mL 的 4 mmol/L 胆色素原, 尿卟啉原 III 合酶溶液的体积视纯化程度而定, 为 0.05~0.4 mL, 反应终体积为 1 mL,  $37^\circ C$  反应 5 min 后加入 0.03 mL 的  $I_2/KI$  溶液(即体积分数为 5% 的  $I_2$ /体积分数为 1% 的  $KI$  溶液),  $37^\circ C$  下保温 5 min, 加入 0.05 mL 新鲜配制质量分数为 1% 的  $Na_2S_2O_3$  溶液, 然后加入 0.1 mL 的三氯乙酸溶液, 沉淀蛋白, 8 000  $g \times 10$  min 离心, 上清液用 Beckmen DU7 分光光度计, 405 nm 下比色。对照试验中不加尿卟啉原 III 合酶,  $37^\circ C$  反应 5 min 后加入 0.03 mL 的体积分数为 5% 的  $I_2$ , 然后加酸沉淀蛋白, 比色, 所测值为 UROS 底物羟甲基胆色素原的合成速率。1 个 UROS 酶活单位为上述条件下每小时生成 1 nmol 的尿卟啉原 III。

1.2.3 SDS-PAGE 和凝胶测 ALAD 分子质量 采用 Laemmli 系统<sup>[12]</sup>, 质量分数 12.5% 的分离胶, 质量分数 2.5% 的浓缩胶, 电泳后银染<sup>[13]</sup>。UROS 全酶分子质量测定采用凝胶方法, 在 Sephadex G-100(1.6  $\times$  90 cm)柱上分别加入牛心乳酸脱氢酶(140 ku), 牛血清红蛋白(67 ku), 鸡卵清蛋白(43 ku)和牛细胞色素 C(12 ku), UROS 粗品由上述 Sephadex G-100 纯化获得, 确定其洗脱体积。

1.2.4 蛋白质含量测定 采用考马斯亮兰法, 以 BSA 作对照。凝胶中的蛋白质采用 280 nm 紫外分光法。

## 2 结果与分析

在 UROS 纯化中, 硫酸铵分级沉淀后进行离子交换层析, 不但上样量大, 且能除去粗酶液中的胆色素原脱氨酶, 这样才能测定 UROS 的酶活。比活从这一步开始计算。纯化最有效的步骤是苯基琼脂糖层析, 洗脱图谱见图 1。小麦 UROS 的 SDS-PAGE 电泳图谱(图 2)表明亚基分子质量约 54 ku, Sephadex G-100 测得全酶分子质量约 66 ku(图 3), 表明小麦 UROS 是单亚基酶, 2 种方法测定值有差异, 和其他生物的 UROS 相似, 推测可能是

UROS 的分子形状非球状体蛋白所致。纯化结果见表 1, 纯化的小麦 UROS 的比活约  $257 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$  蛋白。

表 1 小麦尿卟啉原Ⅲ合酶纯化结果

| 纯化步骤                   | 总蛋白/mg | 总活力/<br>( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | 比活/<br>( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | 产率/% | 纯化倍数 |
|------------------------|--------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------|------|
| Centrifuge extract     | 10 250 |                                                   |                                                                       |      |      |
| AS 40%~70% fraction    | 2 654  |                                                   |                                                                       |      |      |
| DEAE Sephrose CL-4B    | 252    | 1 613                                             | 6.4                                                                   | 100  | 1    |
| Sephadex G-100         | 32     | 1 068                                             | 33.4                                                                  | 66   | 5.3  |
| Hydroxylatite          | 5.8    | 369                                               | 63.6                                                                  | 23   | 10.1 |
| Phynel Sepharose CL-4B | 0.34   | 81                                                | 238                                                                   | 5    | 37.5 |
| Electrophoresis *      | 0.07   | 18                                                | 257                                                                   | 1    | 40.8 |

注:蛋白质含量测定由 280 nm 推算。

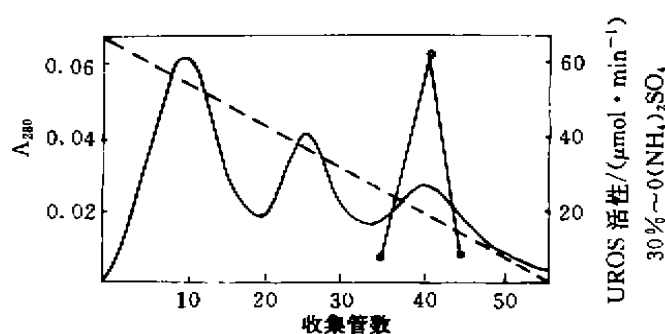


图 1 小麦尿卟啉原Ⅲ合酶的苯基琼脂糖洗脱图谱

—  $A_{280}$ ; - - - UROS 活性; ····  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

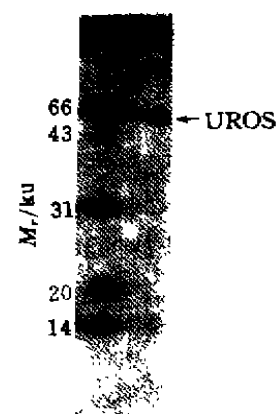


图 2 小麦 UROS 的 SDS-PAGE 图谱

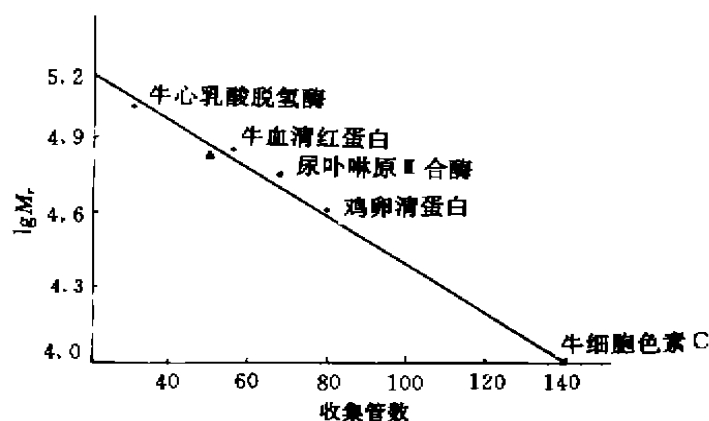


图 3 小麦 UROS 的全酶分子质量测定



图 4 小麦 UROS 的 IEF-PAGE 图谱

纯化的小麦 UROS 对热极不稳定,  $45^\circ\text{C}$  保温 15 min 酶活全部丧失, 在  $-20^\circ\text{C}$  下,  $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} 8.5$  的 Tris-HCl, 内含质量分数 50% 的甘油,  $5 \text{ mmol/L}$  的巯基乙醇和

MgCl<sub>2</sub>中贮藏 7 d,酶活损失 90%。

UROS 的等电点约 6.3(图 4),比其他生物来源的 UROS 略高,5 mmol 的巯基乙醇和 Mg<sup>2+</sup> 对小麦 UROS 作用分别达 105% 和 130%,说明有激活作用,这和人血红细胞的 UROS 性质相似。

### 3 讨 论

由于尿卟啉原 III 合酶在生物体内含量少且不稳定,加之尚未发现有效的亲和层析方法,纯化一直是个难题。本研究经过 1 次硫酸铵分级沉淀、4 次层析和 1 次制备电泳才获得均一的酶,费时费力。

以往报道的小麦 UROS 纯化中缓冲液加 EDTA-Na<sub>2</sub>,本研究发现小麦的 UROS 可被 5 mmol/L 的镁离子激活,故在提取缓冲液中省去 EDTA-Na<sub>2</sub>。镁离子是催化合成胆色素原的酶 5-氨基酮戊酸脱水酶的激活剂,而胆色素原脱氨酶被二价金属离子抑制,但该浓度的镁离子对其抑制率仅 10%,这对于联合酶活法测定 UROS 有利。

在人血红细胞<sup>[14]</sup>、大豆和小麦中发现胆色素原脱氨酶和尿卟啉原 III 合酶结合在一起,用加热法可除去尿卟啉原 III 合酶。据此将纯化的小麦胆色素原脱氨酶偶联在有 8 个碳原子的活化琼脂糖介质,但未发现它对 UROS 有专一性亲和作用。要获得大量的 UROS,需要高效率表达的转基因工程菌和高效层析系统。

### 〔参考文献〕

- [1] Battersby A R, Leeper F J. Biosynthesis of the pigments of life: mechanistic studies on the conversion of porphobilinogen to uroporphyrinogen III [J]. Chem Rev, 1990, 90: 1261~1274.
- [2] Tsai S F, Bishop D F, Desnick R J. Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from human erythrocytes [J]. Bio Chem J, 1987, 262: 1268~1273.
- [3] Harr G J, Batterby A R. Purification and properties of uroporphyrinogen synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis* [J]. Biochem J, 1985, 232: 151~160.
- [4] Kohashi M, Clement R P, Tse J, et al. Rat hepatic uroporphyrinogen III cosynthase. Purification and evidence for a bound folate coenzyme participation in the biosynthesis of uroporphyrinogen III [J]. Bio Chem J, 1984, 220: 755~765.
- [5] Smythe E, Williams D C. Rat liver uroporphyrinogen III synthase has similar properties to the enzyme from *Euglena gracilis*, including absence of a requirement for a reversibly bound cofactor for activity [J]. Bio Chem J, 1988, 253: 275~279.
- [6] Higuchi M, Bogorad L. The purification and properties of uroporphyrinogen III synthase and uroporphyrinogen III cosynthase. Interactions between the enzymes [J]. Ann N Y Acad Sci, 1975, 244: 401~418.
- [7] Llamias E D C, Barile A. Studies on the porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen cosynthetase system of cultured soybean cells [J]. Bio Chem J, 1971, 121: 327~340.
- [8] Alwan A F, Mgbeje B I A, Jordan P M. Purification and properties of uroporphyrinogen synthase (co-synthetase) from an over producing recombinant strain of *Escherichia Coli* K12 [J]. Bio Chem J, 1989, 264: 397~402.
- [9] Stamford N P J, Capretta A, Battersby A R. Expression, purification and characterisation of the product from the *Bacillus subtilis hemD* gene, uroporphyrinogen III synthase [J]. Eur J Bio Chem, 1995, 231: 236~241.
- [10] 王保莉, 郭嵩光, 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.

- [11] 范 军,郭嵩光.小麦胆色素原脱氨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(6): 808~811.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970,227:680~685.
- [13] Blum H,Beier H,Gross H J. Improved silver staining of plant proteins,RNA and DNA in polyacrylamide gels [J]. Electrophoresis,1987,8:93~99.
- [14] Frydman R B,Feinstein G. Studies on porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen Ⅲ cosynthetase from human erythrocytes[J]. Biochem Biophys Acta,1974,350:358~373.

## Isolation and purification of uroporphyrinogen Ⅲ synthase from wheat leaf

FAN Jun<sup>1,2</sup>,GUO Ai-guang<sup>1</sup>

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

(2 Anhui Agricultural University,Hefei 230061,China)

**Abstract:** Uroporphyrinogen Ⅲ synthase (UROS) is isolated and purified from wheat leaves by 40%—70% ammonium sulphate fractionation and followed by chromatography DEAE Sepharose CL-6B, Sephadex G-100, hydroxylatite, Phenyl Sepharose CL-4B and finally by electrophoresis. The purified enzyme has a specific activity of 257  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$  protein at pH of 8.5. It shows homogeneity and has a subunit Mr of 54 ku by SDS-PAGE. The whole enzyme has about a relative Mr of 66 ku by Sephadex G-100 and thus appears to be monomeric. Its pI is about 6.3. It was maximally active at a temperature of 40°C and activated by 2-mercaptoethanol and  $\text{Mg}^{2+}$ . The purified enzyme after concentrated is stored with a loss of 90% activity for a week at -20°C in the dark in 0.1 mol/L Tris-HCl buffer (pH 8.5), including 50% of glycerol, 5 mmol/L 2-mercaptoethanol and  $\text{MgCl}_2$ .

**Key words:** uroporphyrinogen Ⅲ synthase (UROS); purification; wheat