

## 小麦返白系胆色素原脱氨酶纯化 及编码 cDNA 序列分析

程冬梅<sup>1)</sup> \*\* , 范三红<sup>1)</sup> \*\* , 刘香莉<sup>1)</sup> , 陈根云<sup>3)</sup> , 邓志勇<sup>1)</sup> , 郭蔼光<sup>1)</sup> \*

(<sup>1)</sup>西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100; <sup>2)</sup>徐州师范大学生命科学学院,  
江苏 徐州 221116; <sup>3)</sup>中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200031)

**摘要** 以小麦 (*Triticum aestivum*) 返白系 F772 为材料, 通过粗提、加热处理、硫酸铵分级沉淀和凝胶柱层析等方法, 对胆色素原脱氨酶 (PBGD) 进行了提取纯化, 纯化倍数为 1092, 得率为 15%。纯化的 PBGD 约为 37 kD。对其部分生化性质的研究表明: 高浓度的  $\text{NH}_4^+$  对酶活性有强烈的抑制, 光照处理可以使酶活性降低。对纯化后的 PBGD N 末端氨基酸序列进行了测定。根据 N 端序列设计简并引物, 获得了 PBGD 的 cDNA 全部编码区序列。它编码一个 351 个氨基酸的前体蛋白, 有一个叶绿体导肽的序列。通过比较小麦 PBGD 与来自与其他物种的同源蛋白表明, 有些氨基酸残基非常保守。

**关键词** 小麦返白系; 胆色素原脱氨酶; N 末端氨基酸测序; 纯化; cDNA 克隆  
**中图分类号** Q946

## Purification and Sequence Analysis of cDNA Coding Region for Porphobilinogen Deaminase from a Stage Albinism Line of Wheat

CHENG Dong-Mei<sup>1)</sup> \*\* , FAN San-Hong<sup>1)</sup> \*\* , LIU Xiang-Li<sup>1)</sup> , CHEN Gen-Yun<sup>3)</sup> ,  
DENG Zhi-Yong<sup>1)</sup> , GUO Ai-Guang<sup>1)</sup> \*

(<sup>1)</sup> Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China; <sup>2)</sup> College of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China; <sup>3)</sup> Institute of Plant Physiology and Ecology, CAS, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Porphobilinogen deaminase (PBGD) was purified from F772, a mutant of 'the stage albinism line of wheat', following the procedures including crude extracts, heat treatment, ammonium sulfate fraction and column chromatography. The enzyme was purified 1 092 fold with a special activity recovery of 15%. The wheat PBGD is a 37 kD protein. The activity of enzyme could be greatly inhibited by high contents of ammonium ion as well as lighting treatment. The N-terminal amino acid sequence was determined for PBGD, based on which, PBGD cDNA was obtained with the degenerate primers. Sequence analysis of coding region of PBGD indicated that it encodes a precursor of 351 residues with a typical chloroplast-targeted peptide. In comparison of wheat PBGD and its homologs from other species, it was found that there are some highly conserved amino acid residues among these proteins.

**Key words** the stage albinism line of wheat; porphobilinogen deaminase; N-terminal amino acid sequencing; purification; cDNA cloning

收稿日期: 2006-05-29, 接受日期: 2006-09-27

国家自然科学基金项目 (No. 39570066); 教育部博士点基金 (No. 1998071233) 资助

\* 联系人 Tel: 029-87026171, E-mail: guoai-guang@yahoo.com.cn

\*\* 同为第一作者

Received: May 29, 2006; Accepted: September 27, 2006

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39570066) and Fund of Doctoral Unit from Ministry of Education (No. 1998071233)

These authors contributed equally to this work

\* Corresponding author Tel: 029-87026171, E-mail: guoai-guang@yahoo.com.cn

小麦返白系是从一个普通小麦矮源材料‘矮变一号’中产生的自然突变株,并经多年选育而形成的一个性状稳定的小麦特异型材料,它具有阶段性白化特性并且依赖于低温诱导。目前对返白系在返白期间的一系列生理生化变化及遗传特性已经进行了一系列研究<sup>[1~4]</sup>,对返白过程中叶绿素 a 生物合成各中间物含量变化及有关酶活性变化的分析表明<sup>[3,4]</sup>:返白原因是叶绿素合成受阻,受阻位点在叶绿素合成中的胆色素原(PBG)到尿卟啉原(urogen)的合成步骤。此合成步骤涉及到几个酶的参与,其中包括胆色素原脱氨酶(PBGD)。推测 PBGD 活性的降低可能与叶绿素合成受阻有关。

PBGD 是卟啉生物合成系列反应中的第二个酶,它催化 4 分子的胆色素原(PBG)以首尾相连的方式脱氨聚合,形成非常不稳定的线形排列的吡咯分子:1-羟甲基胆色素烷,即原尿卟啉原,该产物又在其他酶的催化下形成环状尿卟啉原,它在生物的代谢活动中充当重要角色,既是叶绿素、血红素、咕啉的共同前体,也是细胞色素、光敏色素及许多酶如过氧化物酶、过氧化氢酶的辅基<sup>[5]</sup>。因此,作为一种具有重要功能的酶 PBGD 广泛存在于生物界。目前,已经在大肠杆菌、纤细裸藻、人和植物等多种原核生物和真核生物中有较多研究<sup>[6~11]</sup>。在植物中已经从豌豆、拟南芥中分离到 PBGD 的基因<sup>[12,13]</sup>。但是有关单子叶植物的 PBGD 的研究报道还很少。我们曾试图用简并引物和豌豆 PBGD 的抗血清来研究小麦的 PBGD 未取得理想的结果。因此本实验从经典的生化方法入手,对小麦返白系的 PBGD 进行纯化和部分生化性质进行研究,基于蛋白质 N 末端测序的结果,用 RT-PCR 的方法对其进行 cDNA 克隆。为进一步揭示小麦返白系的阶段性白化机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

小麦返白系 F772 种子,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min,催芽萌发后,室温黑暗培养 5 d 再置于人工光照条件下培养 2 d,剪取上端幼嫩部分立即用液氮处理,再置 -70 备用。

### 1.2 小麦返白系 PBGD 的纯化

取上述材料按 1:2(W/V)加入提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0,含 7 mmol/L 巯基乙醇,1 mmol/L PMSF,2 mmol/L EDTA),4 下匀浆,尼龙纱网过滤,4 下 13 000 g 离心 20 min,上清液 65 加热

20 min,迅速冰浴冷却后 13 000 g 离心 20 min,弃沉淀,上清液加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 40% 饱和度,4 静置 30 min,13 000 g 离心 20 min,弃沉淀,上清液再加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 70% 饱和度,4 静置 30 min 后 13 000 g 离心 20 min,沉淀溶于少量 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 含 3.5 mmol/L 巯基乙醇,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L EDTA 的洗脱液中,用 Sephadex G-25 柱脱盐。然后,上预先用洗脱液平衡的 DEAE-Sephacrose 柱(5 cm × 10 cm),上样后分别用含 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L NaCl 的洗脱液阶段洗脱,收集酶活部分进行超滤,脱盐后的酶液上 Red-Sephacrose CL-6B 亲和层析柱,用含 0~1.5 mol/L NaCl 的洗脱液梯度洗脱,收集酶活高峰部分,加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 30% 饱和度后,上 Phenyl-Sephacrose 柱用含 30%~0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度的洗脱液梯度洗脱,洗脱峰分管收集,透析后测酶活性。酶活高峰部分上 Mono Q HR 5/5 柱,用 0~400 mmol/L NaCl 梯度洗脱收集酶活高峰部分并进行 SDS-PAGE 检测。以上所有层析分离都在 FPLC (Pharmacia) 层析装置上进行。

### 1.3 分析方法

PBGD 活性测定按照 Anderson (1982)<sup>[14]</sup> 方法进行。蛋白质含量测定按 Bradford 法进行。SDS-PAGE 采用 Laemmli<sup>[15]</sup> 不连续电泳系统,分离胶浓度为 12.5%。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。N 末端氨基酸序列分析按 Matsudaira<sup>[16]</sup> 的方法进行,纯化后的 PBGD 用 SDS-PAGE 分离后,用 CAPS 缓冲液系统将其电转印至 PVDF 膜,然后在 Procise 491 型 (Applied Biosystems) 蛋白测序仪上进行微量测序(由北京大学生命科学院测定)。

### 1.4 RNA 提取

取幼嫩叶片 100 至 200 mg,加入液氮仔细研磨,然后用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA。

### 1.5 RT-PCR 及 5' RACE PCR

以 oligo (dT)<sub>17</sub> 作为引物,用 AMV (Promega) 进行反转录,根据蛋白质测序的结果,从 N 端保守的序列中设计简并引物(CTC ATC CGG ATT GGC/T ACG/C),与 N-oligo (dT)<sub>17</sub> 一起进行 RT-PCR (N 为 A, G, C)。扩增产物回收,连接到 pGEM-T Easy Vector (Promega) 上,对鉴定出阳性克隆测序。按 5' RACE system (Gibco BRL) 操作说明进行 cDNA 5' 末端扩增,所用的两条特异引物分别为: GSP1 (5'-TAACCGTGTCTGAACATTTCTC-3'); GSP2 (5'-TGCAATCAGGCATATGAATGCA-3')。

2 结果与分析

2.1 PBGD 的纯化

小麦返白系 PBGD 的纯化结果见 Table 1. 纯化步骤包括加热 (65 ℃, 20 min), 硫酸铵沉淀 (40 % ~ 70 % 饱和度), Sephadex G-25 柱脱盐, DEAE-Sephadex 离子交换柱层析, Red-Sephadex CL-6B 亲和柱层析, Phenyl-Sephadex 疏水柱层析, 及 Mono Q HR 5/5 高性能离子交换柱层析. 据文献 [6] 报道, PBGD 具有良好的耐热性, 通过对小麦幼嫩叶片粗酶提取液中 PBGD 酶活测定表明: 65 ℃ 加热处理 20 min 后, 未发现酶活有明显的降低. 所以在用柱层析分离之前, 先

对粗酶提取液进行 65 ℃ 加热处理, 这样可以除去约 90 % 杂蛋白. 可能所采集的幼叶中蛋白质含量丰富、类型复杂, 所以在经过 DEAE-Sephadex 离子交换柱层析和 Red-Sephadex CL-6B 亲和柱层析之后, 虽然 PBGD 的纯化倍数得到大大提高, 但是经 SDS-PAGE 检测, 发现仍有几种杂蛋白存在. 通过用 Phenyl-Sephadex 疏水柱层析, 及 Mono Q HR 5/5 高性能离子交换柱层析进一步纯化, 将从 Mono Q HR 5/5 柱收集的组分进行 SDS-PAGE 检测后证实 PBGD 得到了较好的分离. 纯化的酶比活为 2 129 U/mg 蛋白, 纯化倍数为 1 091.7, 得率为 15 %.

Table 1 Purification of porphobilinogen deaminase from ‘the stage albinism line of winter Wheat’

Purification steps	Total protein/mg	Protein content/mg · ml <sup>-1</sup>	Specific activity/U · mg <sup>-1</sup>	Total activity/U	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude extracts	3 300	6.00	1.95	6 437.7	1.0	100
Heat treatment (65 ℃)	268	0.53	22.37	5 997.0	11.5	93
40 % ~ 70 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractions	190	1.78	30.2	5 309.0	15.5	83
DEAE-Sephadex	60	1.00	81.8	4 909.2	41.9	76
Red-Sephadex	2.92	0.073	595.2	1 738.7	305.2	27
Phenyl-Sephadex	0.98	0.047	1 355.1	1 328.0	694.0	21
Mono Q	0.45	0.03	2 128.8	958.0	1 091.7	15

2.2 分子量测定

将纯化得到的小麦 PBGD 用 SDS-PAGE 进行分析, 如 Fig. 1 所示, 该蛋白得到了高度纯化, 测算其分子量为 37 kD. 目前, 所有已经纯化的其他来源的 PBGD 分子量均在 35 ~ 44 kD 之间, 小麦 PBGD 也属于这一范围.

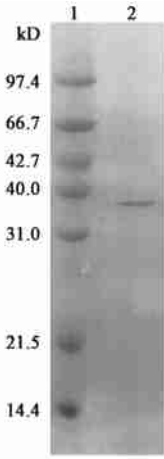


Fig. 1 The molecular mass of wheat PBGD determined by SDS-PAGE

1: Marker; 2: PBGD

2.3 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对酶活性的影响

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对 PBGD 酶活性的影响, 如 Fig. 2 所示, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对 PBGD 活性有抑制作用, 低浓度的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对酶活性抑制不明显, 而高浓度的则强烈抑制 PBGD 活性. 200 mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 抑制 PBGD 活性达 60 %.

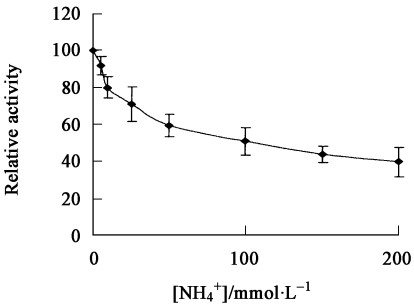


Fig. 2 The effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on the relative activity of porphobilinogen deaminase

The data were collected from triplicate measurements

2.4 光照对酶活性的影响

将纯化的 PBGD 置于一小试管中浸于冰浴中, 用一个 100 W 灯泡置于距试管 20 cm 处作为光源,

光照 1~15 min 后测 PBGD 的活性,以黑暗中放置的 PBGD 作为对照.如 Fig. 3 所示,随着光照时间延长,相对酶活性显著降低.光照 15 min,酶活损失达 85%.表明 PBGD 具有光不稳定性.

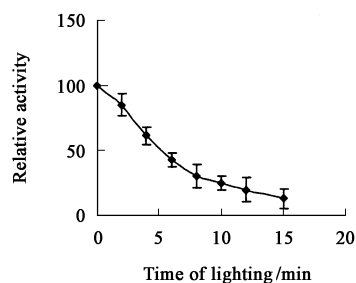


Fig. 3 The effect of Lighting on the relative activity of Porphobilinogen deaminase

The data were collected from triplicate measurements

## 2.5 小麦 PBGD 的活性分布

取经光照培养 7 d 的小麦的根、茎、叶,分别提取 PBGD 并测活性.结果表明,小麦根、茎、叶中均存在酶活性,但叶片中酶活性最高,根中的酶活性极低.相同重量的叶、茎、根中的酶活比为 28 10 1. PBGD 活性主要存在于叶中,可能是由于植物中此酶主要是参于叶绿素的合成.

## 2.6 N 末端氨基酸序列分析

将纯化 PBGD 电泳后转印于 PVDF 膜,测得其 N 末端 15 个氨基酸残基的顺序为:AEAEPKVS LIRIGIR,与来自其他几个物种的 PBGD N 末端顺序进行比较,发现不同物种的 PBGD 的 N 末端序列差别较大,但是有两个碱性氨基酸残基(Arg)保守性较强,尤其是第二个 Arg 在所有已知序列的 PBGD 中都完全相同. PBGD 的 LIRIGIR 这一序列在不同的物种间有一定的保守性.

## 2.7 PBGD 的 cDNA 克隆

根据蛋白质 N 端测序结果,我们搜索到几个同源的水稻 EST. 然后根据这些 EST 并结合豌豆的 PBGD 序列,设计了几条简并性引物,进行 RT-PCR. PCR 电泳结果见 Fig. 4. 扩增得到了一条 1.2 kb 左右的条带,对 PCR 产物进行回收,克隆测序. 进一步通过 5 RACE, 获得了 PBGD 的完整的编码序列 (GenBank 登录号:AY052154,AY052155). PBGD N 端测序结果除了第 4 位是 E 而不是 Q 外,其他 14 个氨基酸都和由 cDNA 预测的氨基酸顺序完全一样. 根据蛋白质测序的结果推测,其 N 端有一段长为 33 个氨基酸的叶绿体导肽存在,导肽与蛋白质合成后的

靶向有关,也说明这个酶在合成后需要运送到叶绿体中而起作用.成熟肽由 318AA 组成,预测的分子量为 34 kD.

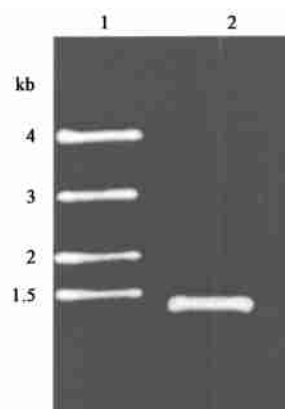


Fig. 4 The electrophoresis pattern of the cDNA fragment from PBGD amplified by RT-PCR

1:Marker; 2:RT-PCR product

## 2.8 序列特征

通过对几个物种 PBGD 氨基酸序列同源性的多重比较和进化分析可以看出 (Fig. 5, Fig. 6):来自不同物种的 PBGD 在序列结构和氨基酸长度上都存在很大的差异,植物的 PBGD 聚在一类,单子叶植物小麦和水稻处于一个进化分支,而双子叶植物豌豆和拟南芥处于另一个分支(水稻 PBGD 蛋白序列是通过序列同源分析从基因组序列中推测的).这与物种的亲缘关系是一致的.还注意到一些氨基酸残基在所有 PBGD 中高度保守.来自对大肠杆菌 PBGD 进行定点突变的研究的结果表明<sup>[17]</sup>,在大肠杆菌的 11、131、149、155、176 和 232 位的 Arg 参与底物的结合,而 Cys<sup>242</sup>直接与联吡咯甲烷辅因子相连接, PBGD 需要利用这个辅因子作为引物依次将四个底物分子 PBG 以首尾相连的方式共价连接在一起,从而进行催化反应<sup>[18]</sup>. 这些残基在包括小麦在内的所有 PBGD 中都是保守的,说明它们是维持 PBGD 的功能所必需的.

## 3 讨论

### 3.1 分子量差异

已经报道的多个物种 PBGD 分子量的范围在 35~44 kD 之间,小麦的也 PBGD 属于这个范围.但是由基因序列预测的分子量与由 SDS-PAGE 测定的小麦 PBGD 的表观分子量存在差异,这种情况在其他基因的研究中也有报道.天然状态的 PBGD 中存在有联吡咯甲烷 (dipyrromethane) 的辅因子,可能会影

<i>E.coli</i>	.....	0
yeast	.....	0
wheat	.....MATLRCTMHTLLCSPTCLARPRRAV...VRA	28
rice	.....MPPPPCAATTATHSLGSPTCCLARPRCCVRA	35
pea	.....MENTLYSSSSFSLSAPENPSLSLFTSSFRSSFKTSFFSKCRIRAS	47
<i>A.thaliana</i>	NDIASSSLQAHKVVLTDQPSRVNTCSLGSVSAIGFSLPQISSPALGHCPRQSSCFV	60
Human	.....MSGNGN	6
Consensus		
<i>E.coli</i>	.....MLDNVLRATPSPLALQAHYVDFKLMASHPCVVVELVPMVTRGDV....	47
yeast	.....MGPETLHICRRSSSLAVTOSNHV/LKLEEKYPPDYDCKVFTLQTLGDQIQPK	51
wheat	AVAVQAHAQPHVSLIPITGTGSPPLALQAADPTDREKAAHTEAEAGATRIIVITNTGDM	89
rice	AVAVQAHAQARVSLIPITGTGSPPLALQAHEHTDKKKAHSELAEEGAVEIVIIINTGDM	95
pea	LAVEQQTQMQNTALIPITGTGSPPLALQAHEHTDKKKAHSELAEEGAVEIVIIINTGDM	107
<i>A.thaliana</i>	KACVAEQRTRTATIPITGTGSPPLALQAETPERKKGQHPHVEDGCAIHIEIINTGDK	120
Human	AAATAENSPHNEVLEVTGTRSSPLARITDQSVVATDKAEYPCQFEEIIMSTTGDKILDT	66
Consensus	.....r s l a q	
<i>E.coli</i>	IDDTPLAKVGGKGLFVKELVALLLENPADIIVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	107
yeast	HYSPGCKALWTKLEDHLVHDDPSKRLDLVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	111
wheat	DDKPLADIGGKGLFTRKIDDAALLQGSIDIAVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	148
rice	DDKPLADIGGKGLFTRKIDDAALLQGSIDIAVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	155
pea	DDKPLADIGGKGLFTRKIDDAALLQGSIDIAVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	167
<i>A.thaliana</i>	DDKPLADIGGKGLFTRKIDDAALLQGSIDIAVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	180
Human	DDKPLADIGGKGLFTRKIDDAALLQGSIDIAVHSKDKDPVVDQGLGVTICERDPRD	122
Consensus	.....v h s k d p p r d	
<i>E.coli</i>	FVSNNYDSLDALPAGSI...VGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	164
yeast	LVMPPYSAYKSLDLDLPGGIVGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	171
wheat	FICLTARTLGLPAGSV...VGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	204
rice	FICLTARTLGLPAGSV...VGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	211
pea	FICLTARTLGLPAGSV...VGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	224
<i>A.thaliana</i>	FICLTARTLGLPAGSV...VGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	237
Human	WVHPKPVGKTLITLPEKSVVGTSSDPQCLAEPRPPLIIPSLRGVGTPLSKLDNGEY	182
Consensus	.....l s r v q y l	
<i>E.coli</i>	D.A.IIPAVAGLKPLGLESRTGAALPPTISIPAVVQGAQVIECRDSDTMEALLAINH	222
yeast	PYQCIIIPASAGLWMLGNITQTFHSDTTHVAVGUALCEIIPKGDITNKKILDEICDL	231
wheat	V.K.ATPLALAGLRLNLTATSV/SVDEMLPAVAQCAIGITCRSDDDMMTEYLSLNH	262
rice	V.H.ATPLALAGLRLNLTATSV/SVDEMLPAVAQCAIGITCRSDDDMMTEYLSLNH	269
pea	V.K.ATPLALAGLRLNLTATSV/SVDEMLPAVAQCAIGITCRSDDDMMTEYLSLNH	282
<i>A.thaliana</i>	V.Q.ATPLALAGLRLNLTATSV/SVDEMLPAVAQCAIGITCRSDDDMMTEYLSLNH	295
Human	FSA.IIPATAGLQPMGHNEVQTLHPFECNYAVGQCALGVETRAKDQDILDVGV/LHP	241
Consensus	.....g	
<i>E.coli</i>	ETALWTAEPAMHTLEGCCQVPIGSAELIDCEIWLPAIVGAPGCSQIINGEIRGAPQD	282
yeast	NATCCSLSPALMHTLEGCCQVPIGSAELIDCEIWLPAIVGAPGCSQIINGEIRGAPQD	291
wheat	EDTRLAVACREFFLSVLDCNCPPIAAYATDQDGNCSFBCLLASPDGSIYVETSRGCTY	322
rice	EDTRLAVACREFFLSVLDCNCPPIAAYATDQDGNCSFBCLLASPDGSIYVETSRGCTY	329
pea	EDTRLAVACREFFLSVLDCNCPPIAAYATDQDGNCSFBCLLASPDGSIYVETSRGCTY	342
<i>A.thaliana</i>	EDTRLAVACREFFLSVLDCNCPPIAAYATDQDGNCSFBCLLASPDGSIYVETSRGCTY	355
Human	EDTRLAVACREFFLSVLDCNCPPIAAYATDQDGNCSFBCLLASPDGSIYVETSRGCTY	301
Consensus	.....g	
<i>E.coli</i>	AEQM.....GISLAHELNNGAREILAEVYNGDAP	312
yeast	ENVVEDSMACGKILAEHRIADGAPHTLDHEDRIN	327
wheat	SFDD.....MVALGQDACHELKSACGPFDDCLQ	351
rice	DFDI.....MVENGKQDACHELKSACGPFDDCLQ	358
pea	TYED.....MNUICKDACHELKSACGPFDDCLQ	369
<i>A.thaliana</i>	VYED.....MUTICKDACHELKSACGPFDDCLQ	382
Human	PAQHEDGPEDDPQLVGITARNIPGQPLAACNGLGISLANLLSRGAKNILDVABQLMDA	360
Consensus		

Fig.5 Alignment of PBGD amino acid sequences from wheat and other species

The putative gene of rice PBGD was deduced from homologous sequences in rice genomic sequence database.

The other sequences were extracted from GenBank

响 SDS-PAGE 电泳迁移率,从而造成这种差异.

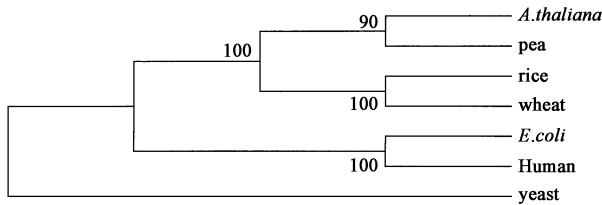


Fig.6 The phylogenetic trees derived from the amino acid sequences of PBGD from wheat and other species( NJ tree , Bootstrap replications = 500)

3.2 基因序列的差异性及其功能的保守性的关系

PBGD 是细胞代谢的基本酶,在血红素、叶绿素、细胞色素等生物合成中起关键作用,在低等和高等生物中都普遍存在.该基因的突变会引起严重的后果,如人类的遗传病 AIP(间歇性卟啉疼痛症)就是由这个基因的单碱基突变所致.但是在不同的物种当中它的氨基酸顺序的差异较大,小麦和人的相比只有 24.6 %的一致性,与双子叶植物豌豆相比一致性是 65.5 %,有 18 个氨基酸长度的差异.与水稻相比一致性达到 86 %,由此推测,在生物进化中

PBG受到了较大的选择压力.然而,参与和底物结合的6个Arg残基,以及与辅因子共价结合的Cys残基在所有已知的PBG中都是高度保守的,这些结构特征将有利于维持它的基本催化功能.

### 3.3 蛋白质差异的原因

从纯化的蛋白质N端测序得到的结果与由cDNA推断出来的成熟的蛋白序列有一个氨基酸不同,即由核苷酸顺序推测的蛋白质第四位是Q而不是E,对蛋白质测序结果的色谱图重新分析后认为:由于测序反应产生的氨基酸衍生物PTC-Q和PTC-E的保留时间不同,出峰的位置相差明显,不易产生判读失误,所以PBG蛋白质测序结果应该是可信的.由于小麦是异源六倍体,很多基因存在3个拷贝,分别位于一个同源群的A、B、D三条染色体上,通常这些基因彼此间的序列存在不同程度的差异,PBG可能也属于这种情况.我们对水稻EST分析发现,这两种序列都存在.提示小麦的PBG出现这种序列也是可能的.

由于以前的研究认为从PBG到urogenin的反应过程,除了PBG参与外,还涉及到尿卟啉原合成酶(Uros),对于这些酶与突变体白化发生之间的关系正在进一步研究中.

### 参考文献 (References)

- [1] 王永吉,苏小静,汪沛洪,等.小麦突变体返白系生长后期某些生理变化[J].植物生理学报(Wang Yong-Ji, Su Xiao-Jing, Wang Pei-Hong, et al. Some physiological changes of the mutant line with early albinism in the late growth period [J]. Acta Phytophysiol Sin), 1994, **20**(1): 39-45
- [2] 徐恒平,汪沛洪.小麦返白期间 Poly(A) RNA 与蛋白质水平的变化[J].植物生理与分子生物学报(Xu Heng-Ping, Wang Pei-Hong. The changes of Poly(A) RNA and protein levels during the albinic stage of a wheat mutant [J]. Acta Photophysiol Sin), 1992, **18**(4): 337-340
- [3] 郭蔼光,王振镒,王保莉,等.小麦返白系返白阶段叶片蛋白质变化与叶绿素含量的关系[J].植物生理学报(Guo Ai-Guang, Wang Zhen-Yi, Wang Bao-Li, et al. Relationship between the change of protein and the content of chlorophyll in the leaves of albescent line of wheat during the time when the plants were turning albescent [J]. Acta Phytophysiol Sin), 1996, **22**(2): 130-136
- [4] 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(Wang Bao-Li, Guo Ai-Guang, Wang Pei-Hong. Changes of chlorophyll metabolism during the albinic stage of a wheat mutant [J]. Acta Bot Sin), 1996, **38**(7): 557-562
- [5] Shoolingin-Jordan P M. Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen synthase: structure, molecular biology, and mechanism [J]. J Bioenerg Biomembr, 1995, **27**(2): 181-195
- [6] Jordan P M, Thomas S D, Warren M J. Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12 [J]. Biochem J, 1988, **254**(2): 427-435
- [7] Williams D C, Morgan G S, McDonald E, et al. Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics [J]. Biochem J, 1981, **193**: 301-310
- [8] Anderson P M, Desnick R J. Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes [J]. J Biol Chem, 1980, **255**: 1993-1999
- [9] Mazzetti M B, Tomio M J. Characterization of porphobilinogen deaminase from rat liver [J]. Biochim Biophys Acta, 1988, **957**: 97-104
- [10] Spano A J, Timko M P. Isolation, characterization and partial amino acid sequence of a chloroplast localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, **1076**(1): 29-36
- [11] Jones R M, Jordan P M. Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochem J, 1994, **299**: 895-902
- [12] Witty M, Wallace-Cook A D, Albrecht H, et al. Structure and expression of chloroplast-localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum sativum* L.) isolated by redundant polymerase chain reaction [J]. Plant Physiol, 1993, **103**(1): 139-147
- [13] Lim S H, Witty M. Porphobilinogen deaminase is encoded by a single gene in *Arabidopsis thaliana* and is targeted to the chloroplasts [J]. Plant Mol Biol, 1994, **26**: 863-872
- [14] Anderson P M. Porphobilinogen deaminase. methods and principles of the enzymatic assay [J]. Enzyme, 1982, **28**(2-3): 146-157
- [15] Laemmli U K. Active-staining cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, **227**: 680-682
- [16] Matsudaira P. Sequence from Picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes [J]. J Biol Chem, 1987, **262**: 10035-10038
- [17] Jordan P M, Woodcock S C. Mutagenesis of arginine residues in the catalytic cleft of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase that affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation [J]. Biochem J, 1991, **280**: 445-449
- [18] Miller A D, Hart G J, Packman L C, et al. Evidence that the pyrrromethane cofactor of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is bound to the protein through the sulphur atom of cysteine-242 [J]. Biochem J, 1988, **254**: 915-918