

# 产气肠杆菌 EAM-Z1 尿苷磷酸化酶的分离纯化及性质研究

阮期平 周长生 徐旭东 吴梧桐\*

(中国药科大学生物制药学院 南京 210009)

**摘 要:** 从产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 突变株 EAM-Z1 中分离出一种具有较高转移酶活性的尿苷磷酸化酶(UPase)。经测定这种 UPase 的分子量为  $12.8 \times 10^4$ , 亚基分子量为  $4.3 \times 10^4$ , 由 3 个同型亚基组成。N 端氨基酸序列为:MRMVDLIATKRDGGE。等电点为 4.46。对尿苷的  $K_m$  为 0.29mmol/L。酶反应的最适 pH 为 7.8, 最适温度为 50℃。该酶能磷酸化尿苷、胸苷、5-氟尿苷、2'-脱氧-5-氟尿苷及尿嘧啶-β-D-阿拉伯呋喃糖, 且具有较高的转移酶活性, 能将尿苷和 5-氟尿嘧啶转化成 5-氟尿苷(一种抗癌药物的中间体), 其转化率为 47%。该酶的这些特性对于酶法合成核苷类抗肿瘤药物和抗病毒药物是十分有用的。

**关键词:** 产气肠杆菌 EAM-Z1, 尿苷磷酸化酶, 分离纯化, 酶学性质

中图分类号: Q555+.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0354-07

嘧啶核苷磷酸化酶(PyNPase, EC2.4.2.2)是嘧啶核苷补救代谢途径中的关键酶。在许多有机体中, 存在两种嘧啶核苷磷酸化酶(a)尿苷磷酸化酶(EC2.4.2.3, 也称尿苷:1-磷酸-核糖转移酶, 简称 UPase), 这类酶催化下列可逆反应: 尿苷 +  $P_i \rightleftharpoons$  尿嘧啶 + α-D-核糖-1-磷酸, 除了对尿苷有活性外, 还保留了对脱氧尿苷和胸苷的某些活性(b)胸苷磷酸化酶(EC2.4.2.4, 也称胸苷:1-磷酸-脱氧核糖转移酶, 简称 TPase), 这类酶催化下列可逆反应: 胸苷 +  $P_i \rightleftharpoons$  胸腺嘧啶 + α-D-脱氧核糖-1-磷酸, 并且在真核生物和原核生物中, 这类酶对脱氧核糖核苷均表现出很高的特异性。此外, 这两类酶也催化下列转化反应: 戊糖-碱基(I) + 碱基(II)  $\rightleftharpoons$  戊糖-碱基(II) + 碱基(I)<sup>[1]</sup>。在肿瘤细胞中, 它们还能改变抗癌药物前体 5'-脱氧-5-氟尿苷(5'-DFUR)成为它的活性形式 5-氟尿嘧啶(5-FU)<sup>[2]</sup>。近年来, 随着利用能产生核苷磷酸化酶的微生物合成核苷类抗肿瘤、抗病毒药物技术的发展, 对于核苷磷酸化酶的研究越来越受到人们的关注<sup>[3~10]</sup>。通过物理化学方法诱变产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 筛选到一株具有高 5-氟尿苷(5'-脱氧-5-氟尿苷的中间体)转化率的突变株, 并研究了 5-氟尿苷的微生物转化条件<sup>[11]</sup>。本文首次报道了产气肠杆菌突变株 EAM-Z1 嘧啶核苷磷酸化酶的分离纯化和理化性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 突变株 EAM-Z1 由本实验室经诱变筛选。

基金项目: 前国家医药管理局资助项目(药-98-12)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-3321714; E-mail: zaowu@publicl.ptt.js.cn

作者简介: 阮期平(1961-)男, 四川绵阳市人, 副教授, 在职博士研究生, 主要从事生物化学及分子生物学研究。

收稿日期: 2002-09-02, 修回日期: 2002-12-25

## 1.2 试剂

尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-氟尿嘧啶、胸苷、尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷、5-氟尿苷、5-氟-2'-脱氧尿苷、尿嘧啶- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖、低分子量标准蛋白、丙烯酰胺、牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品;DEAE-纤维素( DE-52 )、DEAE-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose CL、Sephacryl S-200 为 Whatman 公司产品;Mono-Q 为 Pharmacia 公司产品;SDS 为日本进口分装; $\beta$ -巯基乙醇为 E.merk 公司产品;Tris 为 Promega 公司产品;N,N'-亚甲基双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品;两性电解质( pH3.0 ~ 9.5 )为军事医学科学院产品;GF254 高效硅胶板为浙江四青生化厂产品;其余试剂均为国产分析纯。

## 1.3 菌体培养

参照阮期平等<sup>[11]</sup>的方法。产气肠杆菌 EAM-Z1 接种于含蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母浸膏 5g 及 NaCl 5g 定容至 1L, pH7.0。培养基 10L 于 31.5℃ 200 r/min 全自动发酵罐培养 24h, 发酵液于 4℃、8 000r/min 下离心 20min, 10mmol/L 磷酸缓冲液(含 1mmol/L EDTA, pH7.0)洗涤, 离心得湿菌体, 于-20℃下冷冻保存。

## 1.4 酶活性测定

**1.4.1 磷酸化酶活性:**参照 Yamauchi 等<sup>[12]</sup>的方法。1mL 反应混合液:30mmol/L 磷酸钾盐( pH7.8 )、5mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、1mmol/L EDTA、30mmol/L 尿苷及一定量样品液, 于 50℃ 下保温 30min, 加入 0.1mL 1mol/L HCl 终止反应。尿嘧啶的增加用 HPLC 测定。一个酶活力单位( U )定义为:在上述反应条件下, 每分钟产生 1 $\mu$ mol/L 尿嘧啶所消耗的酶量。此方法用于各个分离纯化步骤中酶活力的测定, 以及 pH、温度、底物浓度等对酶活性的影响。

**1.4.2 转移酶活性:**参照阮期平等<sup>[11]</sup>的方法。1mL 反应混合液:30mmol/L 磷酸钾盐( pH7.8 )、5mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、1mmol/L EDTA、30mmol/L 5-氟尿嘧啶、10mmol/L 尿苷及 50 $\mu$ L 纯酶液, 在 50℃ 下保温 30min 后, 加入 0.1 mL 1mol/L HCl 终止反应。转移酶活性通过分析尿苷转变成 5-氟尿苷的量来测定。将反应液点于 GF254 硅胶板上, 用二氯甲烷/四氢呋喃溶剂系统( 二氯甲烷:四氢呋喃 = 4:1 )展开, 在 254nm 紫外光下检测尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟尿苷及尿苷的斑点。转化率确定采用 HPLC 方法。

## 1.5 蛋白质含量测定

按 Lowry 法<sup>[13]</sup>进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

## 1.6 电泳分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳( SDS-PAGE )按 Laemmli 等<sup>[14]</sup>的方法。

## 1.7 分子量的测定

**1.7.1 凝胶过滤:**按 Andrews 等<sup>[15]</sup>的方法。样品上高效液相凝胶色谱柱, 以出峰时间对分子量对数作图, 然后从图中求出该 UPase 的表观分子量, 并以免磷酸化酶 B、牛血清白蛋白、兔肌动蛋白、胰蛋白酶抑制剂、鸡蛋清溶菌酶作标准蛋白。

**1.7.2 SDS-PAGE 电泳:**将样品及标准蛋白( 兔磷酸化酶 B( 97400 )、牛血清白蛋白( 66200 )、兔肌动蛋白( 43000 )、牛碳酸酐酶( 31000 )、胰蛋白酶抑制剂( 20100 )、鸡蛋清溶菌酶( 14400 ) )进行 SDS-PAGE, 然后以相对迁移率对分子量作图, 从图中求出该 UPase 的分子量。

## 1.8 等电点的测定

参照赵永芳<sup>[16]</sup>的方法。胶浓度 5%, 上样量 100 $\mu$ L。先用电压 300V 聚胶 4h, 然后调电

压至 600V 聚胶 4h。以空白胶条作对照 ,并作 pH 梯度标准曲线。

1.9 酶的分离和纯化

1.9.1 细胞提取液的制备 称 170g 湿菌体 ,加入 5 倍体积缓冲液 A( 缓冲液 A :30mmol/L 磷酸盐、5mmol/L β-巯基乙醇、1mmol/L EDTA ,pH7.8 )和 85mg 溶菌酶( 0.5mg/g 湿菌体 ) ,于 37℃ 温浴 30min ,超声波处理 1h ,离心( 16 000r/min ,30min ) ,得细胞提取液( 部分 I )。

1.9.2 硫酸铵分级沉淀 加入固体( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 于部分 I 中至饱和度 30% ,4℃ 过夜后离心( 12 000r/min ,30min )。继续加入固体( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 于上清液中至饱和度 80% ,4℃ 过夜后离心( 12 000r/min ,30min )。收集沉淀 ,用缓冲液 A 溶解沉淀并用此缓冲液彻底透析 ,得粗酶液( 部分 II )。

1.9.3 DEAE-纤维素( DE-52 )柱层析 将部分 II 直接上 DEAE-纤维素柱( C = 1.6cm × 28cm ,此柱预先用缓冲液 A 平衡 ) ,用 0 ~ 1mol/L KCl 线性梯度洗脱( 总体积 300mL ) ,流速 30mL/h ,收集酶活性部分( 部分 III )。

1.9.4 Phenyl-Sepharose 柱层析 将部分 III 用缓冲液 A 充分透析 ,加入固体( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至饱和度 30% ,混匀后于 4℃ 下静置 2h ,离心( 12 000r/min ,30min ) ,上清液直接上 Phenyl-Sepharose 柱( C = 1cm × 18cm ,此柱预先用缓冲液 A 平衡 ) ,先用缓冲液 A 淋洗 ,然后先后用 50% 乙二醇和 70% 乙二醇阶段洗脱 ,流速 20mL/h ,收集酶活性部分( 部分 IV )。

1.9.5 DEAE-Sepharose FF 柱层析 将部分 IV 用缓冲液 A 充分透析后直接上 DEAE-Sepharose FF 柱( C = 1.6cm × 28cm ,此柱预先用缓冲液 A 平衡 ) ,用 0 ~ 0.8mol/L NaCl 线性梯度洗脱( 总体积 300mL ) ,流速 30mL/h ,收集酶活性部分( 部分 V )。

1.9.6 Mono-Q FPLC :将部分 V 用缓冲液 A 充分透析、PEG20000 浓缩后上 Mono-Q FPLC 柱 ,用 0 ~ 0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱 ,流速 0.5mL/min ,收集酶活性部分( 部分 VI )。

1.9.7 Sephacryl S-200 柱层析 :将部分 V 用缓冲液 A 充分透析、PEG20000 浓缩后上 Sephacryl S-200 柱( C = 1cm × 80cm ,此柱预先用缓冲液 A 平衡 ) ,用缓冲液 A 洗脱( 总体积 300mL ) ,流速 9mL/h ,收集酶活性部分( 部分 VII ) ,用 PEG20 000 浓缩到一定体积贮存于 4℃ 下备用。

上述所有操作过程均在 0 ~ 4℃ 下完成。

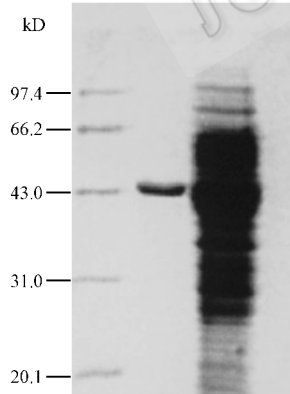


图 1 纯化的尿苷磷酸化酶 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE of purified UPase.

1. Molecular markers ; 2. Purified UPase ; 3. Cell extract.

2 结果

2.1 产气肠杆菌 EAM-Z1 尿苷磷酸化酶的分离纯化

产气肠杆菌 EAM-Z1 尿苷磷酸化酶的分离纯化结果见表 1。这种酶被纯化了 132 倍 ,活力回收率为 4% ,比活力为 250U/mg 蛋白。经 Sephacryl S-200 柱层析后的活性峰经 SDS-PAGE 分析显示出单一谱带( 图 1 线 2 ) ,表明已达到电泳纯。

2.2 产气肠杆菌 EAM-Z1 尿苷磷酸化酶的分子量

来自产气肠杆菌 EAM-Z1 UPase 经液相色谱柱测定的分子量为 12.8 × 10<sup>4</sup> ,而通过 SDS-PAGE 测定的分子量为 4.3 ×

表 1 来自产气肠杆菌 EAM-Z1 UPase 的分离纯化

Table 1 Purification of UPase from *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1

Procedures	Total/mg	Total activity/U	Specific activity/ ( U/mg Protein )	Purification/ fold	Yield/%
Crude extract	4698	8732	1.9	1	100
Ammonium sulphate( 30% ~ 80% )	3173.7	8610	2.7	1.42	98
DEAE-cellulose	451	6590	14	7.37	75.5
Phenyl-sepharose CL	119.6	2300	19	10	26.3
DEAE-sepharose FF	21.1	1790	85	44.3	20.5
Mono-Q FPLC	10.2	930	91	47.9	10.7
Sephacryl S-200	1.4	350	250	132	4.0

10<sup>4</sup> ,可见该酶为同型三聚体。

2.3 等电点

等电聚胶测定结果表明 ,该酶的等电点为 4.46。

2.4 温度对尿苷磷酸化酶活性的影响及酶的热稳定性

实验结果表明 ,该酶的最适反应温度为 50℃左右 ,该酶于 50℃下热处理 1、2、3、4、5h 后 ,其活性基本不丧失 ,而高于 60℃时酶活力明显下降 ,这表明该酶对温度具有较高的耐受性(图 2)。

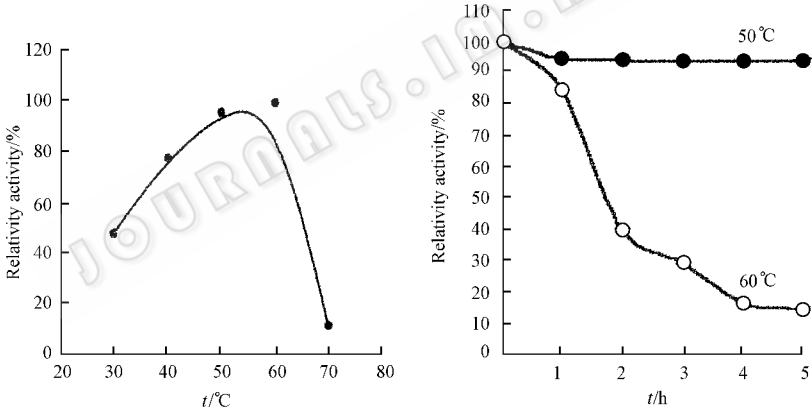


图 2 温度对 UPase 活力的影响及酶的热稳定性

Fig.2 Effect of temperature on the activity and stability of UPase

Left. Effect of temperature on the enzyme activity ; Right. Relative stability.

2.5 pH 对尿苷磷酸化酶活性的影响

尿苷磷酸化酶对尿苷的磷酸化活性在 pH4.0 ~ 11.0 范围内测定 ,并且采用 30mmol/L 下列缓冲液 :乙酸钠缓冲液( pH 4 ~ 6 )、磷酸钾缓冲液( pH 6 ~ 9 )、Tris-HCl 缓冲液( pH 9 ~ 11 )。结果表明 ,在磷酸钾缓冲液中 ,当 pH7.8 时 ,酶的相对活性达到 100% ,而高于或低于此 pH 酶活性都将迅速下降 ,这说明 pH7.8 为该酶的最适 pH。

2.6 动力学常数

用 Lineweaver-Burk 作图法求得该酶对尿苷的 *K<sub>m</sub>* 值为 0.29mmol/L(图 3)。

2.7 尿苷磷酸化酶的底物特异性

实验结果表明 ,在磷酸盐存在下 ,该酶不仅能够使尿苷和胸苷降解为相应碱基和核糖

或脱氧核糖,而且也能够磷酸化 5-氟尿苷、5-氟-2'-脱氧尿苷及尿嘧啶-β-D-阿拉伯呋喃糖。此外,该酶还具有较高的转化反应活性,例如它能使 5-氟尿嘧啶和尿苷相互转化为 5-氟尿苷和尿嘧啶,其转化率为 47%(表 2、图 4)。

3 讨论

UPase 是一类差异较大的转移酶类,许多文献已报道了不同来源的 UPase 研究。我们首次从产气肠杆菌突变株 EAM-Z1 中分离到一种 UPase。与已有的报道相比较,该酶在分子量大小、亚基数目、等电点、酶反应的最适 pH、最适温度、底物特异性以及转化反应活性等方面均存在着差异。纯化的 UPase 用 Sephadex G-200 估计分子量为  $12.8 \times 10^4$ ,通过 SDS-PAGE 估计分子量为  $4.3 \times 10^4$ ,这说明,来自产气肠杆菌突变株 EAM-Z1 的 UPase 是一个亚基分子量为 43 000 的同型三聚体,不同于已在 *E. coli* K12(八聚体,176 000)<sup>[17]</sup>、*E. coli* B(四聚体,130 000)<sup>[18]</sup>、*Klebsiella* sp. LF120(五聚体,125 000)<sup>[19]</sup>、*Salmonella typhimurium*(六聚体,165 000)<sup>[20]</sup>等菌株中发现的 UPase。

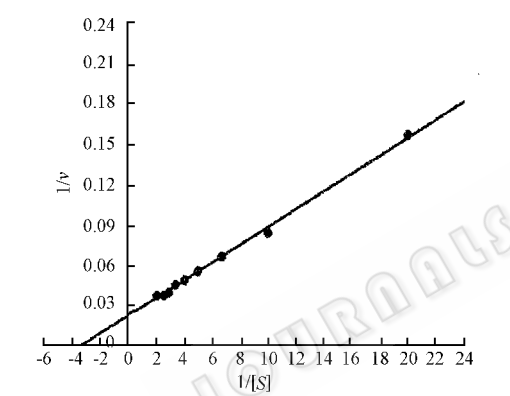


图 3 UPase 的 Lineweaver-Burk

Fig.3 Double reciprocal Lineweaver-Burk plots of the concentrations of uridine against velocity  
The optical assay described in "Materials and Methods" was used with 50μL purified enzyme. Uridine = 0.29mmol/L estimated from the replot.

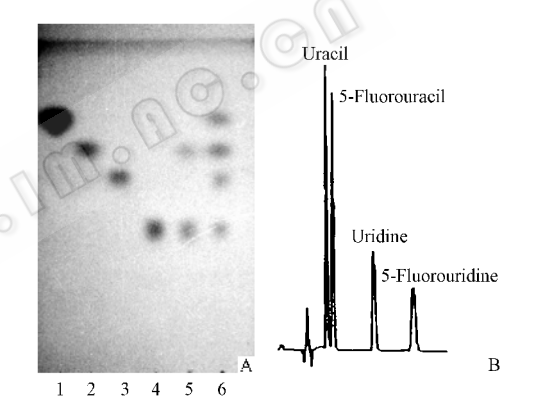


图 4 尿苷磷酸化酶的磷酸化酶活性和转移酶活性

Fig.4 Phosphorylase activity and transferase activity of the purified enzyme  
A :UPase-reaction products were separated by thinlayer chromatography. 1. 5-fluorouracil ; 2. Uracil ; 3. 5-Fluorouridine ; 4. uridine ; 5. Phosphorylase activity of UPase ; 6. transferase activity of UPase. B : UPase-transferred products was absorbed with a C<sub>18</sub>-HPLC column , and eluted with 0.075 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 98 : 2 (flow rate : 1mL/min ).

表 2 UPase 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of UPase from *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1

Nucleosid	Amount of base formed(μmol/mL)	Relative active/%
Uridine	0.254	100
Thymidine	0.186	72.8
5-Fluorouridine	0.122	48.8
5-Fluoro-2'-deoxyuridine	0.120	48.0
Uracil-β-D-arabino-furanosine	0.049	19.6
Adenosine	0	0
Guanosine	0	0
Inosine	0	0

在酶学性质方面,该酶尚具有如下特点:第一,底物特异性不甚强,对嘧啶核糖核苷和嘧啶脱氧核糖核苷,如尿苷、胸苷、2'-脱氧-5-氟尿苷、5-氟尿苷、尿嘧啶- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖等均有催化反应;第二,转移酶活性较高,研究发现,这种酶能将戊糖基从尿苷转移至5-氟尿嘧啶,形成5-氟尿苷(一种抗癌药物的中间体),转化率为47%左右,其戊糖基的转移属磷酸依赖型。而一般UPase的转移酶活性为0.2%(非磷酸依赖型)或12.2%(磷酸依赖型)<sup>[1]</sup>;第三,热稳定性较强,该酶的最适温度为50℃左右,且在20℃~55℃范围内,酶活性下降不明显或不丧失。该酶这些特性对于利用酶促生产核苷类抗肿瘤、抗病毒治疗药物,寻找新的、能够用于在化学治疗某些不同肿瘤期间选择性地抑制人UPase或TPase的化合物是十分有用的。在利用蛋白质工程研究UPase的转化反应机制方面,该酶也是一个很好的模型。但由于来自*Enterobacter aerogenes*突变株EAM-Z1的UPase表达量低,致使采用微生物转化法合成核苷类抗肿瘤、抗病毒治疗药物的工业化,以及该酶的结构与功能研究受到限制。目前,我们已分析了该酶N端的15个氨基酸序列(此序列为:MRMVDLI-ATKRDGGE),并正在进行该酶的基因克隆与表达研究,以期获得一个UPase高效表达的工程菌株,为核苷类抗肿瘤、抗病毒药物的规模化生产提供一条新途径。

## 参 考 文 献

- [1] Krenitsky T A. Pentosyl transfer mechanisms of the mammalian nucleoside phosphorylases. *J Biol Chem*, 1968, **243**: 2871 ~ 2875.
- [2] Armstrong R D, Diasio R B. Metabolism and biological activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine, a novel fluoropyrimidine. *Cancer Res*, 1980, **40**: 3333 ~ 3338.
- [3] Asai K, Hiranishi K, Kaneko S, et al. A novel glial growth inhibitory factor, gliostatin, derived from neurofibroma. *J Neurochem*, 1992, **59**: 307 ~ 317.
- [4] Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, et al. A angiogenic activity of enzymes. *Nature*, 1994, **368**: 198 ~ 199.
- [5] Komissarov A A, Romanova D V, Debabov V G. Complete inactivation of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by modification of asp5 with woodward's reagent K. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 10050 ~ 10055.
- [6] Watanabe S I, Uchida T. Cloning and expression of human uridine phosphorylase. *Bioch Biophys Res Comm*, 1995, **216**: 265 ~ 272.
- [7] Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*, 1999, **283**: 689 ~ 692.
- [8] Okuyama K, Hamamoto T, Noguchi T, et al. Molecular cloning and expression of pyrimidine nucleoside phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**: 1655 ~ 1659.
- [9] Veiko V P, Chebotaev D V, Ovcharova I V, et al. Protein engineering of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12. I. Cloning and expression of uridine phosphorylase genes from *Klebsiella aerogene* and *Salmonella typhimurium* in *E. coli*. *Bioorg Khim*, 1998, **24**: 381 ~ 387.
- [10] Russell R L, Zhao D L, Zhang D K, et al. Uridine phosphorylase association with vimentin. intracellular distribution and localization. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 13302 ~ 13307.
- [11] 阮期平, 周长林, 窦洁, 等. 5-氟尿苷的微生物转化. *微生物学报*, 2001, **42**: 117 ~ 120.
- [12] Yamauchi H, Utsugi H, Midokawa Y. International Patent Publication Number WO 90/10080 (Sep. 7, 1990).
- [13] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 1970, **227**: 680 ~ 685.

- [ 15 ] Andrews P , The gel-filtration behaviour of protein related to their molecular weights over a wide range. *Biochem J* , 1965 , **96** : 595 ~ 606.
- [ 16 ] 赵永芳编著 生物化学技术原理及其应用. 第二版. 武汉 : 武汉大学出版社 , 1994.
- [ 17 ] Leer J C , Hammer-Jespersen K , Schwartz M. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* physical and chemical characterization. *Eur J Biochem* , 1977 , **75** : 217 ~ 224.
- [ 18 ] Vita A , Amici A , Cacciamani T , *et al* . Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* B. Enzymatic and molecular properties. *Int J Biochem* , 1986 , **18** : 431 ~ 435.
- [ 19 ] Ling F , Inoue Y , Kimura A. Purification and characterization of a novel nucleoside phosphorylase from a *Klebsiella* sp. and its use in the enzymatic production of adenine arabinoside. *Appl Environ Microbiol* , 1990 , **56** : 3830 ~ 3834.
- [ 20 ] Molchan O K , Dmitrieva N A , Romanova DV , *et al* . Isolation and initial characterization of the uridine phosphorylase from *Salmonella typhimurium* . *Biochemistry( Mosc )* , 1998 , **63** : 195 ~ 199.

## Purification and Characterization of a Uridine Phosphorylase from *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1

Ruan Qiping   Zhou Changlin   Xu Xudong   Wu Wutong\*

( School of Biopharmaceutics , China Pharmaceutical University , Nanjing 210009 , China )

**Abstract** : A uridine phosphorylase ( UPase ) was isolated from *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1 and purified by means of ammonium sulfate precipitation , DEAE-cellulose , Phenyl-Sepharose , DEAE-Sepharose , FPLC ion exchange , and Sephacryl S-200 column chromatography. The purified UPase showed homogeneity on the native polyacrylamide gel electrophoresis. The UPase is a trimer of 43 kD subunits. Fifteen residues from the amino terminal end of UPase were identified as MRMVDLIAT-KRDGGE. The isoelectric point was pH4.46. Michaelis constant for uridine was 0.29 mmol/L. The UPase has a maximal activity at a pH value of 7.8 and 50°C. The UPase could catalyze the phosphorylation of uridine , thymidine , 5-Fluorouridine , 5-Fluoro-2'-deoxyuridine , uracil- $\beta$ -D-arabinofuranoside , and could also catalyze the synthesis of 5-Fluorouridine , a better prodrug form of the anticancer drug 5-fluorouracil , from 5-fluorouracil and uridine , and 47 % uridine was converted to 5-Fluoro-uridine.

**Key words** : *Enterobacter aerogenes* EAM-Z1 , Uridine phosphorylase , Isolation and purification , Characterization