

地中海拟无枝酸杆菌甲基丙二酰 CoA 变位酶和消旋酶的纯化及性质

张蔚文 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘要 采用原生质体裂解方法确定甲基丙二酰 CoA 变位酶(MCM)和消旋酶(MCR)均是胞浆内酶。各经过四步纯化得到电泳纯酶。纯化 MCM 酶的比活力为 12.84u/mg, 纯化倍数为 528, 酶活回收为 60%, 纯化的 MCM 酶服从典型的米氏底物饱和曲线, 对琥珀酰 CoA 和辅酶 B₁₂ 的 K_m 值分别为 9.723 μ mol/L 和 0.1277 μ mol/L。经 Sephadex G-150 测定 MCM 分子量约为 134 000 \pm 2 000, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示两条分子量分别为 67 000 和 65 000 的蛋白带, 说明该酶由两个大小不等亚基组成。吸收光谱测定每摩尔纯化全酶含两摩尔辅酶 B₁₂。纯化 MCR 酶比活力为 2.305u/mg, 纯化倍数 96, 酶活回收 46.7%。MCR 酶由两个分子量均为 17 500 的亚基组成。MCR 酶活性能被二价金属离子 Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺ 和 Fe²⁺ 所促进。两酶的酶学性质和其他生物来源的 MCM、MCR 酶明显相似。

关键词 地中海拟无枝酸杆菌, 甲基丙二酰 CoA 变位酶, 消旋酶, 纯化, 酶学性质

环桥类抗生素力复霉素的主要结构包括芳香大环及多酮支链。早期通过 C¹³ 标记示踪已证明力复霉素的脂肪链是通过甲基丙二酰 CoA 和丙二酰 CoA 由二个醋酸和八个丙酸缩合而成^[1], 然而, 对这些前体的产生途径并不明确^[2]。近来通过 C¹³ 标记核磁共振分析发现力复霉素合成中的甲基丙二酰 CoA 可能来自琥珀酸^[2], 因此, 研究催化琥珀酰 CoA 异构化的甲基丙二酰 CoA 变位酶(简称 MCM, EC5.4.99.2)和甲基丙二酰 CoA 消旋酶(简称 MCR, EC5.1.99.1)将会有助于认识力复霉素合成的机理。

尽管来自丙酸菌和哺乳动物的 MCM 酶已得到纯化^[3, 4], 但对来自产生抗生素的放线菌的 MCM 酶的研究却很少。Hunaiti 等^[5]从红霉素产生菌 *Streptomyces erythreus* 中纯化得到电泳纯的 MCM 酶, 研究结果也证明了琥珀酰 CoA 是经 MCM 酶催化异构化成为甲基丙二酰 CoA 后才组入红霉素大环内酯中的。目前国内外对 MCR 酶的研究很少, 只有少数报道从 *Propionibacterium shermanii* 和哺乳类中纯化得到 MCR 酶^[6, 7], 至今尚未见到对抗生素产生菌 MCR 酶的研究。我们从力复霉素 SV 高产菌株地中海拟无枝酸杆菌 (*Amycolatopsis mediterranei*) U32 中纯化了 MCM 和 MCR 酶, 并对其部分酶学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

UV-120, UV-250 紫外可见光光度计(日本岛津产品)、高速冷冻离心机 J2-21M(美国贝克曼产品)、辅酶 B₁₂ 及其亲和柱,牛血清白蛋白和苹果酸脱氢酶为 Sigma 产品, SDS-分子量标准(LMW)和 Sephadex G-75 和 G-150 为 Pharmacia 产品, DEAE-纤维素(DE-32)为 Whatman 产品,载体两性电解质(pH3.5~10)和羟基磷灰石为东风试剂厂产品。其它均为分析纯或化学纯试剂。

1.2 菌种

地中海拟无枝酸杆菌(*Amycolatopsis mediterranei*)U-32。

1.3 菌体培养方法

按文献[8],采用培养 60h 的菌体制备无细胞粗提液。

1.4 一般分析方法

1.4.1 菌体生长测定:干重称重法。

1.4.2 力复霉素 SV 效价测定:杯碟法生物测定,以藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)为检定菌。

1.4.3 蛋白质含量测定:按 Bradford 的方法^[9],以牛血清白蛋白为标准。

1.4.4 甲基丙二酰 CoA 变位酶和消旋酶活力测定:分别按 Kellermeyer 等^[10]和 Allen 等的方法^[11]。28℃下每分钟转化 1 μ mol 底物所需酶量定义为一个酶活单位,比活力以每毫克酶蛋白所含酶活单位表示,底物琥珀酰 CoA 的化学合成按 Simon 等^[12]的方法。测定用甲基丙二酰 CoA 转羧基酶从 *A. mediterranei* U32 中纯化。

1.4.5 酶蛋白分子量及亚基分子量测定:采用 Sephadex G-150 柱层析法^[13]和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[13],浓缩胶浓度 4.0%,分离胶浓度 12.0%。考马斯蓝 G-250 染色。

1.4.6 酶的等电点测定:聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦电泳法^[13]。

1.4.7 原生质体的制备:按 Hopwood 等的方法^[14]。

1.4.8 甲基丙二酰 CoA 变位酶和消旋酶的紫外可见吸收光谱:在 UV-250 分光光度计上扫描。

1.5 MCM 酶的纯化

纯化方法参照 Hunaiti 等^[5]和 Murthy 等^[15]的方法并有部分修改。所有纯化步骤均在 0~5℃下进行。

1.5.1 无细胞粗提液的制备:菌体悬浮于 3 倍体积的缓冲液 A(pH7.0, 0.05mol/L KH₂PO₄-NaOH, 内含 1mmol/L 二硫赤藓糖醇)中。超声破碎后,于 4℃ 12000r/min 离心 30min 弃沉淀,收集上清液。

1.5.2 DEAE-纤维素(D-32)吸附及分部洗脱:经缓冲液 A 平衡的 DEAE-纤维素中加入无细胞粗提液,4℃下搅拌 1h 后用 1L 缓冲液 B(0.1mol/L, pH7.0 KH₂PO₄-NaOH)洗脱。洗脱后的 DEAE-纤维素再次悬浮于 500ml 缓冲液 C 中(0.3mol/L, pH7.0 KH₂PO₄-NaOH),4℃下搅拌 1h 后用布氏漏斗收集滤液,滤液中加入 (NH₄)₂SO₄ 至

90%饱和度,4℃冰箱中静置过夜后,17000r/min离心30min收集沉淀。沉淀用少量缓冲液A溶解后对1L同样缓冲液广泛透析至用0.5% Ba(OH)₂检验无沉淀出现。

1.5.3 B₁₂辅酶亲和层析:B₁₂辅酶亲和柱(ϕ 1.7×6.5cm, Sigma产品)4℃下用缓冲液A充分平衡。前一步骤得到的酶液避光上柱后保持5h,然后用缓冲液A洗脱,再用内含1.0mol/L NaCl的缓冲液A洗脱,流速0.5ml/min。然后加入3倍柱床体积的含1.0mol/L NaCl,3.0mmol/L辅酶B₁₂的缓冲液A。亲和柱在此缓冲液中保持过夜后洗脱。由于辅酶B₁₂红色的干扰,无法测定酶活,故全部收集洗脱液,对1L缓冲液A广泛透析。

1.5.4 DEAE-纤维素柱层析:透析除盐后的酶液仍带部分红色,需进行脱色才能进行酶活测定。酶液上DEAE-纤维素柱(ϕ 1.5×1.5cm),柱预先用缓冲液A平衡并洗至柱无色后,用缓冲液C以0.2ml/min的流速洗脱得到酶液。必要时酶液可经PEG6000反透析浓缩达到大约1.0mg/ml,此时酶液略显粉红色。

1.6 MCR酶的纯化

参照Leadlay^[7]的方法并作部分修改,所有纯化步骤均在0~5℃下进行。

1.6.1 无细胞粗提液的制备和DEAE-纤维素(D32)吸附及分部洗脱均同MCM酶。

1.6.2 羟基磷灰石层析:透析后的酶液上到经缓冲液D(0.01mol/L pH7.0 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄)平衡的羟基磷灰石柱(ϕ 1.8×60cm)上,上样后先用50ml缓冲液D冲洗,然后用0.01mol/L-0.2mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄(600ml)线性洗脱,流速0.6ml/min,合并MCR酶活性部分后,于4℃冰箱中用PEG6000反透析浓缩,浓缩液用缓冲液E(0.05mol/L, pH7.0, Tris/HCl)透析。

1.6.3 Sephadex G-75分子筛层析:透析后的酶液(大约10ml)上到经缓冲液平衡的Sephadex G-75柱(ϕ 2×80cm)上,用缓冲液E洗脱,合并含有MCR酶活力的部分洗脱液,PEG6000反透析浓缩,酶液经对缓冲液E透析后于4℃冰箱中保存。

2 结果

2.1 MCM酶和MCR酶的定位

通过制备原生质体并利用渗透压使之温和裂解的方法,分别获得了无细胞粗提液可溶性部分及沉淀部分,蛋白测定表明它们各占总蛋白的12.363%和87.637%。酶活性测定可溶性部分表现MCM酶和MCR酶活力,比活力分别为0.05418u/mg和0.04064u/mg,而沉淀部分未检测到MCM酶和MCR酶活力。这一结果说明*A. mediterranei* U32中MCM酶和MCR酶是定位于细胞质内的两种可溶性蛋白。

2.2 MCM酶和MCR酶的纯化

将纯化最后一步得到酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦电泳鉴定为均一的蛋白带,证明MCM酶和MCR酶已被纯化。纯化过程中酶活力及蛋白质含量的变化见表1、表2,图1和图2。

2.3 MCM酶和MCR酶的一般性质

2.3.1 分子量测定:纯化得到的MCM酶按Andrews法^[16]进行Sephadex G-150和G-75分子筛过滤,分别求得MCM酶分子量为134 000±2 000, MCR酶的分子量为

33 500 ± 1500。按 Laemmli 的方法^[17]用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 MCM 亚基分子量为 67 000 和 65 000, MCR 酶由两个分子量为 17 500 的等大小亚基组成(图 3)。

表 1 从 *A. mediterranei* U32 纯化 MCM 酶

Table 1 Purification of MCM from *A. mediterranei* U32

步骤 Step	总蛋白 Total protein / mg	总活力 Total activity / u	比活力 Specific activity / u · mg ⁻¹	全酶比例 Proportion of holomutase /(%)	活力回收 Activity recovery /(%)	纯化倍数 Purification (fold)
Crude extract	1100	26.75	0.0243	100	100	1
DEAE-Cellulose	84	22.47	0.2675	16.67	84	11
B ₁₂ coenzyme sepharose/ DEAE -cellulose	1.25	16.05	12.84	100	60	528

表 2 从 *A. mediterranei* U32 纯化 MCR 酶

Table 2 Purification of MCR from *A. mediterranei* U32

步骤 Step	总蛋白 Total protein / mg	总活力 Total activity / u	比活力 Specific activity / u · mg ⁻¹	活力回收 Activity recovery /(%)	纯化倍数 Purification (fold)
Crude Extract	1069	25.66	0.024	100	1
DEAE-Cellulose	195	19.26	0.0988	75.1	4.1
Hydroxyapatite	14.0	14.98	1.070	58.4	44.6
Sephadex G-75	5.2	11.985	2.2048	46.7	96

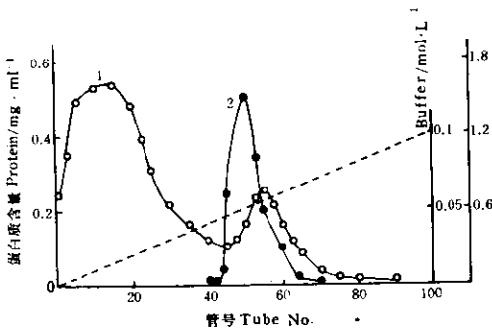


图 1 MCR 酶在羟基磷灰石柱上的洗脱曲线

Fig.1 MCR chromatography on hydroxyapatite. The column was eluted with linear gradient of sodium phosphate (—), Protein (1), Activity (2).

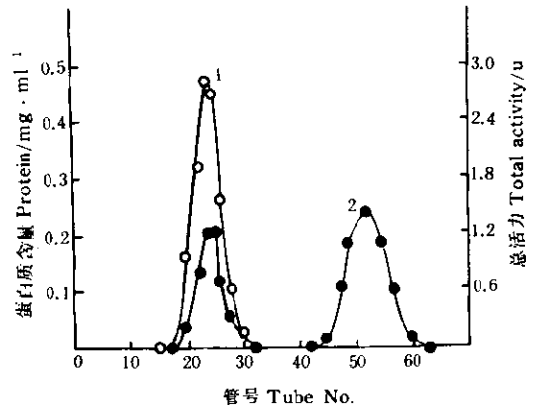


图 2 MCR 酶在 Sephadex G-75 上的洗脱曲线

Fig.2 MCR chromatography on sephadex G-75. Activity (1); Protein (2).

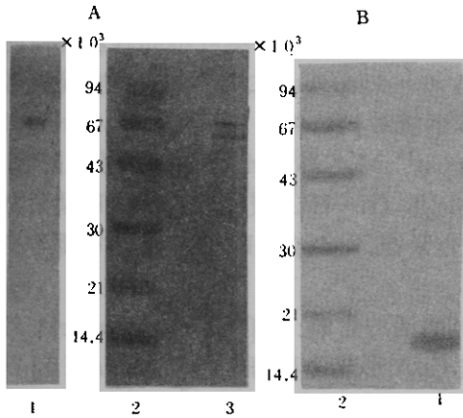


图3 纯化 MCM 和 MCR 酶的 PAGE 及 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 PAGE and SDS-PAGE of pure MCM and MCR

A: 1. Native MCM on PAGE:

2. Molecular mass standard;

3. MCM on SDS-PAGE.

B: 1. MCR on SDS-PAGE:

2. molecular mass standard.

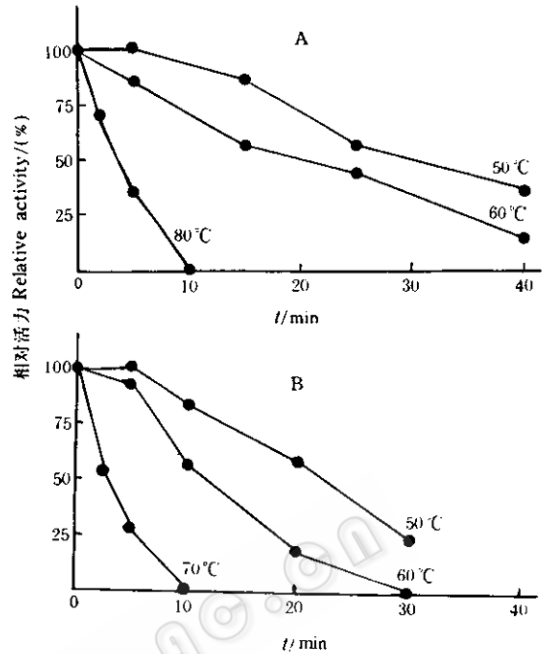


图4 MCM(A)和 MCR(B)酶的热稳定性

Fig.4 Stabilities of MCM(A), MCR enzymes(B) exposed to elevated temperature

2.3.2 等电点测定: MCM 酶的等电点 pI 为 4.2, 是一个偏酸性蛋白质。这和测定纯化 MCM 酶氨基酸组成结果相符(结果未显示)。MCR 酶的等电点 pI 大约为 5.6。

2.3.3 温度对酶活力的影响: 分别在不同温度下用常规方法测定酶比活力, 求得 MCM 酶和 MCR 酶反应的最适温度均为 35°C 。

2.3.4 pH 对酶活力的影响: 用 $pH 3.0$ 的 Gly-HCl 缓冲液, $pH 4.0 \sim 5.0$ 的乙酸-乙酸钠缓冲液, $pH 6.0, 7.0, 8.0$ 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液和 $pH 9.0, 10.0$ 的 Gly-NaOH 缓冲液分别配制反应体系, 常规方法测定酶比活力。测得 MCM 酶和 MCR 酶的最适反应 pH 均为 7.5。

2.3.5 酶的温度稳定性: 将酶液加入 $pH 7.0$ 的缓冲液 A 中, 不同温度分别保温一定时间, 取出冷却后用常规方法测定酶比活力, 结果见图 4。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存溶于缓冲液 A 中的 MCM 酶, 25d 仍无明显酶活损失, 半寿期为 43d。MCR 酶热稳定性不高, 50°C 保温 20min 酶活下降一半。溶于缓冲液 E 中 MCR 酶于 4°C 保存 30d 无明显活力损失, 但之后酶活开始迅速下降, 40d 时仅残存 28.6% 的酶活力。

2.3.6 金属离子和其他化合物对酶活力的影响: 将各种金属阳离子加入酶活测定体系中, 按常规方法测定酶活力, 以不加任何阳离子者为对照。结果发现在无离子水和 EDTA 处理后, MCM 酶活保持不变, 说明 MCM 酶催化功能的实现并不必需任何金属离子, 但 5mmol/L 的 Mg^{2+} 可以明显激活 MCM 酶, 使酶活力提高 2 倍。MCR 酶经 EDTA 处理后酶活完全丧失, 说明其催化功能的实现必需金属离子的参与。EDTA 处理

失活的 MCR 酶在 4℃ 对 1L 缓冲液 E 透析 24h 又可以恢复酶活力(数据未显示)。在所测定的金属离子中,二价阳离子 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 均可不同程度地促进 MCR 酶活,其中以 Co^{2+} 促进作用最佳。为研究 *A. mediterranei* U32 MCR 酶中金属离子结合的紧密程度,我们参照 Leadlay 的方法,取酶液对 pH2.4 的 0.05mol/L Gly-HCl 透析 24h 后,酶活力完全丧失,加入 0.5mmol/L Co^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 也并不能恢复酶活,但将此酶再对不含金属离子的 pH7.0 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液透析 48h,酶活力又可恢复 65%,说明 MCR 酶中的金属离子结合紧密,以至在 pH2.4 广泛透析都不丧失。

2.3.7 MCM 酶和 MCR 酶蛋白量、反应时间对酶活的影响: 来自 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶催化反应中,产物(2R)-甲基丙二酰 CoA 形成量和酶蛋白在 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下时成直线关系。反应速度可以在 30min 内保持线性关系。MCR 酶催化(2S)-甲基丙二酰 CoA 形成量和酶蛋白量在 31.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下时呈现直线关系,反应速度可以在 20min 内保持线性关系:

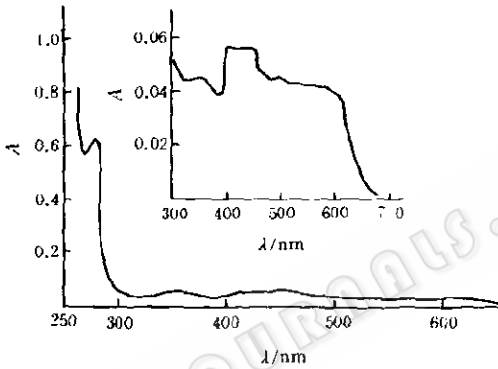


图5 纯化 MCM 的紫外-可见光谱
(中间图案放大 10 倍)

Fig.5 Ultraviolet-visible spectrum of pure
MCM (0.4mg/ml).

The insert shows region from 300nm to 700nm
at 10-fold expansion of the absorbance scale.

定蛋白量,计算出 MCM 酶的平均 A_{280} (1%, 1cm) 为 15.25。

以辅酶 $\text{B}_{12}\epsilon_{520}$ 为 $8000\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [19] 和 ϵ_{458} 为 $8650\text{mol} / \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [21] 计算 MCM 酶中的辅酶含量,分别得到每 1mol 辅酶结合到 75 750g 和 61 728g 蛋白中,以 MCM 酶亚基分子量为 67 000 计算,这一数值大约相当于 1 个 MCM 酶亚基结合 1 个辅酶 B_{12} 或每个活性 MCM 酶二聚体分子结合两分子辅酶 B_{12} 。

纯化的 MCR 酶在 UV-250 分光光度计上进行紫外和可见光扫描,未发现 MCR 酶有特征性的吸收峰, MCR 酶 $A_{275:260}$ 大约为 1.17。

2.5 MCM 酶对底物和辅酶的 K_m 值

根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶对底物

2.4 MCM 和 MCR 酶的吸收光谱及其辅基含量

MCM 酶对无离子水广泛透析后,在 UV-250 双波长,双光路分光光度计上测定其紫外,可见光谱(图 5)。MCM 酶除在 280nm 的蛋白峰外,在 260nm、400nm~450nm 处均有明显的吸收峰,在 340nm~360nm 和 500nm 处也有较小的吸收峰,这和文献[4, 12, 18, 19]报道的以腺苷 B_{12} 为辅酶的酶类的特征性吸收峰基本相等。来源 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶 $A_{280:260}$ 大约为 0.75, 260nm 处的高吸收值可能归因于辅酶 B_{12} 的腺苷基团,类似现象也在人胎盘的 MCM 酶中发现,其 $A_{280:260}$ 大约为 0.9 [20]。根据吸收光谱及 Bradford 法测

琥珀酰 CoA 的表观米氏常数 K_m 为 $9.723\mu\text{mol/L}$ (图 6)。

利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶对辅酶 B_{12} 的表观米氏常数 K_m 为 $0.1277\mu\text{mol/L}$ (图 7)。

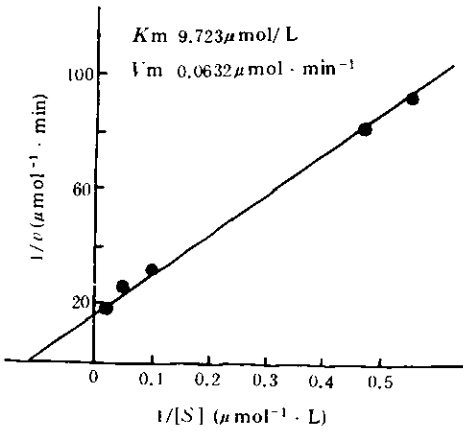


图 6 Lineweaver-Burk 作图求 MCM 酶对琥珀酰 CoA 表观米氏常数

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of the saturation kinetics of pure MCM with respect to succinyl-CoA

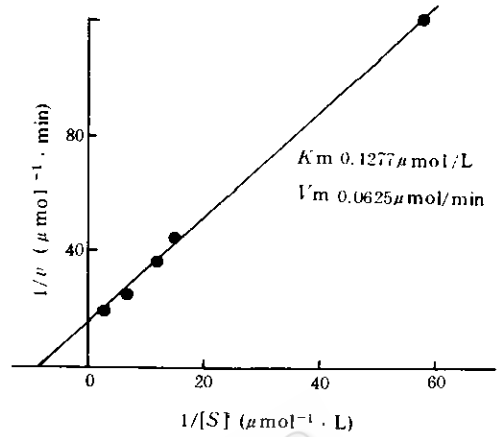


图 7 Lineweaver-Burk 作图求 MCM 酶对辅酶 B_{12} 的表观米氏常数

Fig.7 Lineweaver-Burk plot of the saturation kinetics of pure MCM with respect to coenzyme B_{12}

3 讨论

本文中由于采用辅酶 B_{12} 亲和柱, 纯化过程中较高浓度的辅酶存在以及最后步骤得到的是全酶, 这均有助于减少酶的失活。实验结果发现, Cl^- 能抑制 MCM 酶活, 改用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲体系代替了前人广泛使用的 Tris-HCl 缓冲液。由于辅酶 B_{12} 亲和柱能很好地吸附脱辅基酶, 因此在酶液上亲和柱之前含脱辅基酶的比例愈高酶活回收无疑也将愈高, Hunaiti 等^[5] 发现在他们的纯化过程中, 有一半以上的酶未被亲和柱吸附, 而随大量杂蛋白被缓冲液冲走, 使酶活回收受到很大影响。我们利用了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 促使辅酶脱落的特性, 上亲和柱之前的酶液用 90% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 使上柱之前酶液的全酶含量仅为 16.7%。应用以上几点改进, 达到目前从抗生素产生菌中纯化 MCM 酶的最好水平。对 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶的性质研究发现其和其它来源的 MCM 酶很相似。

MCR 酶纯化方法和前人^[4] 的相比, 缩短了纯化时间, 并获得了很好的酶活回收。该 MCR 酶的主要酶学性质和其他来源的 MCR 酶相似。

A. mediterranei U32 的 MCM 酶对底物琥珀酰 CoA 的 K_m 值低于丙酸菌 MCM 酶的 $34.5\mu\text{mol/L}$ ^[22] 和羊肝的 $62\mu\text{mol/L}$ ^[22] 数倍, 我们推测在 *A. mediterranei* U32 中的 MCM 酶对底物琥珀酰 CoA 的高亲合性可能和次生代谢产物的合成有关系。在丙酸菌和哺乳类中, MCM 酶催化的变位可逆反应倾向于琥珀酰 CoA, 反应平衡常数为 18~23^[23], 而在抗生素合成中, MCM 酶主要催化琥珀酰 CoA 向甲基丙二酰 CoA 的转化, 因此 MCM 酶对琥珀酰 CoA 的高亲合力应有一定生理代谢意义。类似现象在其他抗生素

产生菌中亦有发现^[5]。

为了研究 MCM 酶对辅酶 B₁₂ 的表观米氏常数,首先必需获得能恢复活力的脱辅基酶, Kolhouse 等^[20]和 Ochoa 等^[10]曾分别试图脱除人胎盘和羊肝的 MCM 全酶上的辅酶 B₁₂, 所用方法包括在含 0.7mmol/L KCN 的 0.5mol/L pH4.5 的醋酸钠中加热 45min 和链霉蛋白酶水解等剧烈的方法,均未获得成功,只有用酸水解才可导致辅酶 B₁₂ 的去除,但此过程同时伴随着酶活力的丧失。我们曾作了几种方法来获得脱辅基酶,结果发现来源 *A. mediterranei* U32 的 MCM 酶辅基和酶蛋白结合较松散,容易脱落。全酶液在 4℃ 冰箱中对缓冲液 A 透析 15d 即可得到脱辅基酶,加入辅酶 B₁₂ 又可以 100% 恢复酶活。

A. mediterranei U32 酶能被多种二价金属离子所激活,类似现象在其它类型消旋中亦有发现^[24],金属离子的作用涉及到酶负碳离子过渡态的形成,这对完成酶催化功能十分重要。

参 考 文 献

- [1] White R J, Martinell E, Gallo G G *et al.* *Nature* (London), 1973, **243**: 273~278.
- [2] Corcoran J M. *Antibiotics*, 1981, **4**: 133~174.
- [3] Zagalak B, Retej J. *Eur J Biochem*, 1974, **44**: 529~535.
- [4] Mazumder R, Ochoa S. *J Biol Chem*, 1963, **238**: 50~53.
- [5] Hunaiti A A, Kolattukudy P. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 1984, **25**: 173~178.
- [6] Allen S H G, Kellermeyer R, Stjernholm R. *J Biol Chem*, 1963, **238**: 1637~1642.
- [7] Leadley P F. *Biochem J*, 1981, **197**: 413~419.
- [8] 倪榴英, 焦瑞身. *微生物学报*, 1988, **28**: 340~345.
- [9] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254.
- [10] Kellermeyer R W, Wood H G. *Methods in Enzymology*, 1969, **13**: 207~215.
- [11] Allen S H G, Kellermeyer R W, Wood H G. *Methods in Enzymology*, 1969, **13**: 194~198.
- [12] Simon B J, Shemin D. *J Am Chem Soc*, 1953, **75**: 2520.
- [13] 王重庆, 李云兰, 李德昌, 等. *高级生物化学实验教程*. 北京: 北京大学出版社, 1994. 42~63.
- [14] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. Norwich: The John Innes Foundation, 1985. 8~12.
- [15] Leadley F D, Lumetta M, Nguyen P H *et al.* *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 1988, **85**: 3518~3521.
- [16] Andrews P. *Biochem J*, 1965, **96**: 595~606.
- [17] Laemmli U K. *Nature* (London), 1970, **227**: 15.
- [18] Kellermeyer R W, Allen S H G, Stjernholm R *et al.* *J Biol Chem*, 1964, **239**: 2562~2569.
- [19] Fenton W A, Hach A M, Willard H F. *Arch Biochem Biophys*, 1982, **214**: 815~823.
- [20] Barker H G, Smyth R D, Weissbach H *et al.* *J Biol Chem*, 1960, **235**: 181~190.
- [21] Kolhouse J F, Vtley C, Allen R H. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 2708~2712.
- [22] Cannata J J B, Focesi A, Mazumder R *et al.* *J Biol Chem*, 1965, **240**: 3249~3257.
- [23] Dolphin D. B12. Vol 2. In: *Biochemistry and Medicine*. New York: John Wiley & Sons, 1982. 367.
- [24] Kenyon G L, Hegeman G D. *Biochemistry*, 1970, **9**: 4035~4043.

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
METHYLMALONYL-CoA MUTASE AND METHYLMALONYL-
CoA RACEMASE FROM A RIFAMYCIN SV-PRODUCING
AMYCOLATOPSIS MEDITERRANEI U32**

Zhang Weiwen Jiao Ruishen

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract Early studies have shown that the polyketide chain of rifamycin is formed by condensation of eight propionate and two acetate units via malonyl-CoA and methylmalonyl-CoA, which could be generated by the isomerization of succinyl-CoA. Thus methylmalonyl-CoA mutase (MCM) and methylmalonyl-CoA racemase (MCR), the two key enzymes in the succinyl-CoA isomerization pathway, are important in rifamycin synthesis. By osmotic lysis of protoplast of *A. mediterranei* U32, MCM and MCR were determined as cytosolic enzymes. The MCM and MCR were purified as electrophoretically homogenous enzymes from the crude extract with four steps of purification. The purified MCM showed a typical Michaelis-Menten type substrate saturation pattern, with K_m of $9.723\mu\text{mol/L}$ and $0.1277\mu\text{mol/L}$ for succinyl-CoA and B_{12} coenzyme, respectively. The molecular weight of MCM was determined as $134\,000 \pm 2\,000$ by sephadex G-150 chromatography. SDS-PAGE showed the purified MCM was a heterodimer with molecular weight of 67 000 and 65 000. Coenzyme B_{12} concentration was estimated as about 2 moles of coenzyme B_{12} per mole purified holoenzyme from absorption spectrum. The molecular weight of MCR was $33\,500 \pm 1\,500$ by sephadex G-75 chromatography measurement. SDS-PAGE showed that the enzyme was a homodimer of 17 500. The activity of MCR was increased by Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{2+} . The properties of the purified MCM and MCR enzymes appear to be fairly similar to those of previously obtained from other sources.

Key words *A. mediterranei* U32, Methylmalonyl-CoA mutase, Methylmalonyl-CoA racemase, Purification, Characterization.