

# 植物鸟氨酸氨甲酰转移酶研究进展

贺 滢<sup>1</sup>, 苏珊珊<sup>2</sup>, 詹园凤<sup>1</sup>, 党选民<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; 2. 海南省农业学校, 海南 海口 571101)

**摘 要:** 鸟氨酸氨甲酰转移酶是植物瓜氨酸合成和尿素循环的关键酶。现综述了近年来对植物鸟氨酸氨甲酰转移酶的分离纯化、特性、蛋白结构及基因的研究成果, 并对其今后的研究进行展望。

**关键词:** 植物; 鸟氨酸氨甲酰转移酶; 分离纯化; 特性; 蛋白结构

**中图分类号:** Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)20-0193-05

瓜氨酸(Citrulline)是一种非蛋白质氨基酸, 因其由西瓜中首次提取获得而被称为瓜氨酸<sup>[1]</sup>。瓜氨酸是尿素循环中一个重要的代谢中间产物, 在调节人体机能方面可发挥一定的作用。研究表明, 瓜氨酸对于男性性功能障碍、高血压和冠心病具有一定的疗效, 可抑制细胞内弓形虫速殖子的增殖, 并可作为人体 NO 产生的评价因子, 且在脑血流的调节、提高身体免疫力和美容护肤中具有重要的作用<sup>[2-10]</sup>。最近的研究更证实, 瓜氨酸不仅可作为治疗某些疾病的特效药物, 还是一种非常高效的氧自由基清除剂。植物在干旱/强光照或盐碱条件下, 通过一系列调控增加植物体内瓜氨酸浓度以抵抗氧自由基等活性基团对于植物细胞的不利影响<sup>[11-14]</sup>。

鸟氨酸氨甲酰转移酶(OCTase/OCT, EC 2.1.3.3)是瓜氨酸合成代谢中的一个关键酶, 同时也是植物尿素循环第一步反应的催化酶, 它通过催化鸟氨酸和氨甲酰磷酸反应合成瓜氨酸和磷酸盐<sup>[15]</sup>。OCTase 广泛存在于动植物与微生物中, 并且广泛分布于生物生长发育的各个阶段。在原核生物和真菌中, OCTase 是一种双功能酶, 不仅可催化瓜氨酸的合成, 也催化瓜氨酸的降解<sup>[16-17]</sup>。在各种微生物中, OCTase 分子量差异也比较大。在酿酒酵母中, OCTase 分子量为 57 kD, 由 1 个分子量为 26 kD 的蛋白亚基和 1 个分子量为 31 kD 的蛋白亚基组成一种二聚体<sup>[18]</sup>; 在嗜盐菌中, OCTase 分子量为 200 kD, 是由 6 个相同亚基组成的同源六聚体<sup>[19]</sup>。在动

物中, OCTase 主要参与尿素循环, 是尿素循环的关键酶之一。人们已从多种动物体内及人体肝脏内纯化得到 OCTase, 并对其理化性质进行分析。不同种动物的 OCTase 理化性质也不一样。在赤蠵龟中, 纯化的 OCTase 分子量为 112 kD, 是由 3 个相同的蛋白亚基组成的同源三聚体<sup>[20]</sup>; 在大鼠肝脏内, 纯化的 OCTase 分子量为 110 kD, 也是由 3 个相同的蛋白亚基组成的同源三聚体, 并且该酶被定位在肝脏细胞线粒体内<sup>[21-22]</sup>。在人体内, OCTase 是肝脏尿素循环的必需酶, OCTase 的缺失常导致嗜睡、呕吐、精神发育迟缓等症状, 同时 OCTase 的缺失与否也可作为肝细胞癌的早期诊断指标之一<sup>[23-24]</sup>。在植物中, OCTase 不仅是瓜氨酸合成代谢的一个关键酶, 同时它也参与了高等植物中嘧啶和多胺的生物合成, 其活性的变化极大地影响着瓜氨酸、嘧啶以及多胺的合成。对植物 OCTase 的研究, 也有助于理解植物瓜氨酸合成代谢和植物抗逆代谢调控。文章对植物 OCTase 的研究进展进行了综述, 以期对植物 OCTase 及植物瓜氨酸合成代谢和植物抗逆代谢调控的研究提供参考和借鉴。

## 1 OCTase 分离纯化研究

蛋白酶分离纯化一般根据蛋白酶分子量的大小、溶解度的不同、等电点差异、酸碱性质不同及与配体分子特异性结合等性质将其分离, 采用的方法主要有离心、盐析、萃取、离子交换层析、分子筛层析、疏水层析及亲和层析等。OCTase 的分离提纯也是通过先将细胞破壁, 然后进行热处理、盐析、透析或分子筛过滤步骤得到初酶液, 再通过离子交换层析或亲和层析等技术纯化得到高纯度酶。OCTase 在植物中最早是由 Kleczkowski 等<sup>[25]</sup>从豌豆苗中提取获得, 纯化倍数接近 2 000 倍, 并对其理化性质进行了分析。Laliberté 等<sup>[26]</sup>通过细胞破碎、微孔过滤、阴离子交换层析等方法, 从 3 种微藻中分离

**第一作者简介:** 贺滢(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为蔬菜栽培及育科学。E-mail: hehuang\_@163.com.

**责任作者:** 党选民(1965-), 男, 本科, 研究员, 研究方向为蔬菜栽培及育科学。E-mail: evergreen088@163.com.

**基金项目:** 海南省自然科学基金资助项目(314129); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所)资助项目(1630032013390)。

**收稿日期:** 2014-07-14

纯化 OCTase。Boggess 等<sup>[27]</sup>通过超声波破碎、链霉素沉淀、热处理、硫酸铵盐析分离、氧化铝凝胶分离、离子交换层析及凝胶过滤等步骤,从念珠藻中分离纯化 OCTase。自从 Hoogenraad<sup>[28]</sup>发现, $\delta$ -PALO( $\delta$ -N-(phosphonoacetyl)-L-ornithine)作为 OCTase 的过渡态模拟抑制剂并可与 OCTase 特异结合以来, $\delta$ -PALO 就被应用到多种生物 OCTase 亲和层析技术中,并大大简化了 OCTase 的纯化步骤。Lee 等<sup>[29]</sup>利用  $\delta$ -PALO 亲和层析的方法,从菜豆中分离纯化出 8 540 倍纯化度的 OCTase,相较其它纯化方法而言,纯化倍数大大提高。

## 2 OCTase 酶促反应动力学研究

酶促反应动力学研究主要指酶反应最适 pH、最适温度、金属离子及抑制剂对酶反应的影响及米氏常数等方面的研究、酶反应动力学研究及酶反应活性等。

### 2.1 酶反应最适 pH 研究

酶反应最适 pH 是指在一定 pH 条件下酶的催化活性最大,该 pH 称为酶最适 pH。多种动物和微生物的 OCTase 最适 pH 一般为 7~9。例如,生盐杆菌的最适 pH 为 8.8,而在生盐杆菌生理 pH 为 7 时,其 OCTase 的活性仅为最适 pH 时的 30%<sup>[19]</sup>;Kalousek 等<sup>[30]</sup>从人肝脏提取的 OCTase 最适 pH 值经检测为 7.7,在 pH 值为 8.2 的情况下,OCTase 的活性仅轻微降低,甚至在 pH 值为 8.5 时,活性降低不到 15%,但 pH 6.8 时的活性仅为峰值时的 25%。众多植物 OCTase 最适 pH 多在 7~10 之间,如 Lee 等<sup>[31]</sup>从狭刀豆中提取的 OCTase,在刀豆酸作为底物的情况下最适 pH 为 8.0;而以鸟氨酸作为底物,则最适 pH 为 8.5。Boggess 等<sup>[27]</sup>从灰色念珠藻中提取的 OCTase,在 pH 9.0~10 时,活性变化不大;在 pH 为 9.5 时,活性值最高。Kleczkowski 等<sup>[25]</sup>从豌豆苗中提取的 OCTase,最适 pH 为 8.45,与狭刀豆中的 OCTase 最适 pH 近似。

### 2.2 酶反应最适温度研究

在其它条件相同的情况下,酶在最适温度下反应活性最高;如果温度降低或者增加,都会对酶促反应造成不利影响。植物 OCTase 的最适温度一般在 30~40℃ 之间,是一个热不稳定蛋白,但是在温度升高时可被底物保护而免于热失活<sup>[32]</sup>。Boggess 等<sup>[27]</sup>比较了念珠藻 OCTase 在 29、33、37℃ 下的活性,发现在同样条件下,OCTase 在 37℃ 下活性最高。Roubelakis 等<sup>[33]</sup>报道,葡萄中 OCTase 最适温度为 38~40℃;当温度处于 20℃ 时,OCTase 反应速度比在 38℃ 时低 15%;当温度高于 45℃ 时,OCTase 迅速失活。Lee 等<sup>[34]</sup>对菜豆 OCTase 进行研究,发现菜豆 OCTase 最适温度为 35℃;当温度为 35℃、pH 为 8.0 时活性最高,达到 526 U。动物 OCTase 最适温度与植物相近,如 Lusty 等<sup>[35]</sup>报道,大鼠肝脏

OCTase 在 37℃、pH 为 8.1 时,酶活力最高。

### 2.3 酶促反应动力学常数研究

酶促反应动力学研究主要是测定酶的  $K_m$  和  $K_{cat}$ 。 $K_m$  表示酶促反应速度达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度,是酶的特征常数之一。 $K_m$  值越小,表示酶与底物的亲和力越强; $K_m$  值越大,则表示酶与底物的亲和力越小。 $K_{cat}$  称为催化常数,又叫做转换数(TN 值),它的单位为  $S^{-1}$ , $K_{cat}$  值越大,表示酶的催化速率越高<sup>[36]</sup>。Bellocco 等<sup>[32]</sup>测定了菠菜 OCTase 的  $K_m$  值,该酶对于鸟氨酸的  $K_m$  为 0.19 mmol/L,而对于氨甲酰磷酸则为 13.1  $\mu$ mol/L,并测得 OCTase 与氨甲酰磷酸复合物的电离常数为 19  $\mu$ mol/L。de Ruiter 等<sup>[37]</sup>测定豌豆中 OCTase 的鸟氨酸  $K_m$  为 1.2 mmol/L,而氨甲酰磷酸则为 0.2 mmol/L,竞争性抑制剂磷酸盐的抑制常数  $K_i$  值为 1.1~1.3 mmol/L。Spencer 等<sup>[38]</sup>测定了不同 pH 条件下鸟氨酸和氨甲酰磷酸的  $V_{max}$  和  $K_m$  值:在 pH 值为 8.6 时, $K_m$  值分别为 4.8 和 6.0, $V_{max}$  分别为 6.9 和 7.5;在 pH 值为 7.8 时, $K_m$  值分别为 1.22、1.9 mmol/L, $V_{max}$  分别为 4.1 和 4.25。OCTase 与氨甲酰磷酸的亲和力大于与鸟氨酸的亲和力,该酶的酶促反应需要比较高的底物浓度<sup>[39]</sup>。

### 2.4 金属离子及激活剂和抑制剂对酶促反应的影响

不同的金属离子对于酶的作用不同,有的金属离子对酶起激活作用,有些金属离子则抑制酶活性;同样,同种金属离子对于不同的酶作用也不同。酶的激活剂对酶促反应起激活作用,抑制剂对酶促反应起抑制作用,并且常具有特异性。Laliberté 等<sup>[26]</sup>研究了多种金属离子及多种氨基酸和 ATP 等对微藻 OCTase 的作用,发现: $Ba^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mo^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Se^{2+}$  对于 OCTase 起激活作用, $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对于 OCTase 起抑制作用;天冬酰胺、谷氨酸盐、甘氨酸等氨基酸和 ATP、GTP、CTP 对于 OCTase 也有明显的激活作用。磷酸被证实是氨甲酰磷酸的一种竞争性抑制剂<sup>[27]</sup>,de Ruiter 等<sup>[37]</sup>发现豌豆叶绿体中提取的 OCTase 的磷酸抑制常数  $K_i$  为 1.1~1.3 mmol/L。Ferguson 等<sup>[40]</sup>用菜豆丁香假单胞杆菌毒素涂抹到 10 种不同植物叶片上,发现每种植物叶片上的鸟氨酸含量增加,同时 OCTase 活性也被强烈抑制。Oliver 等<sup>[41]</sup>和 Turner 等<sup>[42]</sup>也对菜豆丁香假单胞杆菌毒素对于 OCTase 的抑制机理进行了研究。此外,精氨酸作为 OCTase 催化反应步骤的后续反应产物对于 OCTase 也有反馈抑制作用<sup>[43]</sup>。 $\delta$ -PALO 也是 OCTase 的抑制剂,它是一种稳定的过渡态模拟物,是氨甲酰磷酸的竞争性抑制剂,但是结合能力是氨甲酰磷酸的 250 倍<sup>[28]</sup>,因其与 OCTase 结合能力强,也常被用作 OCTase 亲和层析的介质<sup>[44]</sup>。

### 3 OCTase 酶理化性质研究

#### 3.1 酶等电点研究

等电点  $pI$  是指在某一 pH 的溶液中,酶蛋白解离成阳离子和阴离子的趋势或程度相等,成为兼性离子,呈电中性,此时溶液的 pH 成为该酶蛋白的等电点。酶的等电点特性经常被应用于酶的沉淀和纯化。酶的等电点测定常用等电聚焦电泳技术。Slocum 等<sup>[45]</sup>运用等电聚焦电泳技术测定拟南芥 OCTase,测得其  $pI$  值为 6.8。Lee 等<sup>[34]</sup>利用变性等点聚焦电泳技术测得菜豆 OCTase 等电点为 6.6,且该酶就只有这一个等电点,从而推测菜豆 OCTase 蛋白亚基可能相同。

#### 3.2 OCTase 分子量研究

从已有的研究看,植物 OCTase 一般由 2 个或多个亚基组成,且多为同源多聚体蛋白。Glenn 等<sup>[39]</sup>利用分子筛层析技术测定甘蔗 OCTase 的分子量,发现其分子量为 224 kD。Martin 等<sup>[46]</sup>利用聚丙烯梯度凝胶电泳技术测得赤杨根瘤 OCTase 分子量为 200 kD。de Martinis 等<sup>[47]</sup>测得豌豆 OCTase 二聚体、三聚体、四聚体和五聚体分子量分别为 74、111、148、222 kD。Acaaster 等<sup>[48]</sup>对 9 种植物 OCTase 分子量进行测定,发现其 OCTase 分子量分布在 148~167 kD 之间;利用变性聚丙烯凝胶电泳技术分析野生燕麦 OCTase,发现只有 1 条大小为 38 kD 的蛋白条带,证实了野生燕麦的 OCTase 为同源四聚体蛋白。Baker 等<sup>[49]</sup>报道,胡萝卜 OCTase 分子量为 158 kD,也是一个同源四聚体蛋白。

### 4 OCTase 分子生物学研究

Williamson 等<sup>[50]</sup>使用文库筛选技术分离得到 1.4 kb 大小的编码豌豆 OCTase 的 cDNA 片段。经分析发现,该 cDNA 片段包含了 375 个氨基酸的阅读框,并且与其它 OCTase 高度同源;同时通过分析其分子量,推断该酶首先作为胞质前体蛋白而合成。Quesada 等<sup>[51]</sup>报道,拟南芥核基因组中 OCTase 和 AUL1 (auxilin-like1) 基因汇聚和部分重叠现象,并将 OCTase 基因定位于第 1 条染色体上。Lee 等<sup>[52]</sup>使用免疫筛选的方法从狭刀豆中分离得到 2 个大小分别为 1 323、1 433 bp 的编码 OCTase 的基因,命名为 *CIOCT1* 和 *CIOCT2*,二者分别编码含 359 个氨基酸和 369 个氨基酸序列的 OCTase,同时对 2 个 OCTase 的鸟氨酸和氨甲酰磷酸结合位点进行了分析。植物 OCTase 多为同源多聚体,如胡萝卜 OCTase 即为同源四聚体。对 OCTase 三维结构的研究多集中在微生物和动物上,如 de Las 等<sup>[53]</sup>对希氏乳杆菌三维结构的解析,Shi 等<sup>[54-55]</sup>对人类 OCTase 与氨甲酰磷酸的结合复合体和野油菜黄单胞菌结晶结构的解析等,对于植物 OCTase 蛋白三维结构和底物结合位点的研究还比较少。

### 5 OCTase 亚细胞定位研究

了解 OCTase 在细胞或亚细胞中的定位有助于研究瓜氨酸在生物中所起的作用及更深入了解尿素循环,多个研究者对于瓜氨酸在动物和植物中的亚细胞定位进行了深入研究。动物 OCTase 主要定位于线粒体<sup>[56]</sup>,而 OCTase 在植物叶绿体和线粒体中均有发现。如 Ruiter 等<sup>[37]</sup>从豌豆叶绿体中提取到 OCTase,并发现 OCTase 只存在于叶绿体中。Shargool 等<sup>[57]</sup>研究了大豆中 ATCase (天冬氨酸氨甲酰基转移酶)、OCTase 等几种与精氨酸合成有关的酶,发现 OCTase 存在于大豆叶绿体中。Taylor 等<sup>[58]</sup>也对豌豆中 OCTase 的亚细胞定位进行了试验研究,发现 OCTase 存在于豌豆叶绿体中。Glenn 等<sup>[40]</sup>通过试验研究证明了 OCTase 存在于植物线粒体内,并从甘蔗线粒体中提取到 2 种 OCTase, Borrell 等<sup>[59]</sup>试验证实桉木线粒体中存在 OCTase。此外,已有报道证实瓜氨酸合成代谢相关酶如 AODase (乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶)、GATase (谷氨酰胺氨基转移酶)等都定位于植物叶绿体内<sup>[60]</sup>,OCTase 的定位可能与这些酶的定位有一定的相关性。

### 6 OCTase 研究展望

OCTase 是一种重要的功能性蛋白酶,广泛分布于各种植物体内,是植物瓜氨酸合成和尿素循环的关键酶之一。OCTase 在长期的进化过程中具有保守性,多个物种之间如细菌、酵母、牛肝脏、大鼠肝脏和植物的 OCTase 都具有一定的相似性<sup>[41,61-63]</sup>。对 OCTase 的特性及结构的研究有助于植物瓜氨酸合成代谢及植物抗逆的研究,但是目前对植物 OCTase 的研究多集中于分离纯化及特性的研究,研究还不够深入,对于 OCTase 基因功能、催化反应的机理研究及其进化研究尚少见,通过这些研究,能从整体上对 OCTase 有一个清晰的认识并能揭示 OCTase 在瓜氨酸循环及植物抗逆中的作用机理。因此,有必要从以下几方面对 OCTase 展开研究:植物 OCTase 氨基酸序列及蛋白三维结构的分析;多种植物 OCTase 基因的克隆及序列分析,并进行外源表达研究;利用绿色荧光蛋白标记技术对某些作物 OCTase 蛋白亚细胞定位进行分析;植物 OCTase 与金属离子结合位点的分析及点突变研究;植物 OCTase 进化研究等。

#### 参考文献

- [1] Guo S G, Zhang J G, Sun H H, et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions[J]. Nature Genetics, 2013, 45(1): 51-58.
- [2] 万学闯, 刘文革, 阎志红, 等. 无籽西瓜果实不同部位维生素 C 和番茄红素含量测定[J]. 中国瓜菜, 2009, 22(3): 4-9.
- [3] 程志强, 刘文革, 邓云, 等. 西瓜果实中 L-瓜氨酸的提取与测定[J]. 果树学报, 2010, 27(4): 650-654.
- [4] Liu W G, Yan Z H, Zhao S J, et al. Triploid seed-less watermelon production in China[C]. Cucurbitaceae, 2006: 296-300.



- [5] 张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992:35-60.
- [6] 王晶,赵晶. 一氧化氮的生物学效应[J]. 中国基层医药,2003,10(12):1316-1318.
- [7] 郑春福,林建银. L-精氨酸和 L-瓜氨酸在体外活化巨噬细胞抗弓形虫感染中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1998(5):326-331.
- [8] Lagerwerf F M, Wever R M F, van Rijn H J M, et al. Assessment of nitric oxide production by measurement of [ $^{15}\text{N}$ ] citrulline enrichment in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 1998, 257(1):45-52.
- [9] Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system[J]. Progress in Neurobiology, 2001, 64(4):365-391.
- [10] Pappas P A, Tzakis A G, Saudubray J M, et al. Trends in serum citrulline and acute rejection among recipients of small bowel transplants[J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36(2):345-347.
- [11] Akashi K, Miyake C, Yokota A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger[J]. FEBS Letters, 2001, 508(3):438-442.
- [12] Dasgan H Y, Kusvuran S, Abak K, et al. The relationship between citrulline accumulation and salt tolerance during the vegetative growth of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant, Soil and Environment, 2009, 55(2):51-57.
- [13] Yokota A, Kawasaki S, Iwano M, et al. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon [J]. Annals of Botany, 2002, 89(7):825-832.
- [14] Akashi K, Yoshimura K, Nanasato Y, et al. Wild plant resources for studying molecular mechanisms of drought/strong light stress tolerance[J]. Plant Biotechnology, 2008, 25(3):257-263.
- [15] Thompson J F. Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. In: Mifflin B J. The Biochemistry of Plants. Vol5[M]. New York: Academic Press, 1980:375-402.
- [16] Legrain C, Halleux P, Stalon V, et al. The dual genetic control of ornithine carbamoyltransferase in *Escherichia coli*. A case of bacterial hybrid enzymes[J]. European Journal of Biochemistry, 1972, 27(1):93-102.
- [17] Eisenstein E, Osborne J C, Chaiken J I M, et al. Purification and characterization of ornithine transcarbamoylase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(8):5139-5145.
- [18] Liu Y S, Van H R, Høj P, et al. Purification and characterization of ornithine acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 228(2):291-296.
- [19] Ruepp A, Müller H N, Lottspeich F, et al. Catabolic ornithine transcarbamoylase of *Halobacterium halobium* (*salinarium*): purification, characterization, sequence determination and evolution[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(5):1129-1136.
- [20] Bellocco E, Di S C, Laganà G, et al. Purification and properties of ornithine carbamoyltransferase from loggerhead turtle liver [J]. Physiological Research, 2002, 51(2):151-158.
- [21] Mori M, Miura S, Tatibana M, et al. Characterization of a protease apparently involved in processing of pre-ornithine transcarbamoylase of rat liver [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(12):7044-7048.
- [22] Gamble J G, Lehninger A L. Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(2):610-618.
- [23] 高华,李巍,闫宗合,等. 一种新的鸟氨酸氨基甲酰转移酶基因突变 E122G 的鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(1):19-22.
- [24] 梁彬,程大也,孔虹,等. 鸟氨酸氨基甲酰基转移酶/丙氨酸氨基转移酶和甲胎蛋白联合检测在肝细胞癌中的诊断价值[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(7):1200-1202.
- [25] Kleczkowski K, Cohen P P. Purification of ornithine transcarbamylase from pea seedlings[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1964, 107(2):271-278.
- [26] Laliberté G, Hellebust J A. Partial characterization of ornithine carbamoyltransferase in three microalgae, anabolic role only[J]. Plant Physiology, 1990, 93(1):62-66.
- [27] Boggess S F, Naylor A W. Partial purification and properties of ornithine transcarbamoylase from *Nostoc muscorum* Kützinger[J]. Plant Physiology, 1975, 56(5):640-644.
- [28] Hoogenraad N J. Synthesis and properties of  $\delta$ -N-(phosphonacetyl)-l-ornithine; A transition-state analog inhibitor of ornithine transcarbamylase [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1978, 188(1):137-144.
- [29] Lee Y, Lee C B, Kim S G, et al. Purification and characterization of ornithine carbamoyltransferase from the chloroplasts of *Canavalia lineata* leaves [J]. Plant Science, 1997, 122(2):217-224.
- [30] Kalousek F, François B, Rosenberg L E. Isolation and characterization of ornithine transcarbamylase from normal human liver[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1978, 253(11):3939-3944.
- [31] Lee Y, Kwon Y M. Identification of an isoform of ornithine carbamoyltransferase that can effectively utilize canaline as a substrate from the leaves of *Canavalia lineata* [J]. Plant Science, 2000, 151(2):145-151.
- [32] Bellocco E, Di S, Laganà G, et al. Ornithine carbamoyltransferase from *Spinacea oleracea*: purification and characterization[J]. Biologia Plantarum, 2002, 45(4):533-538.
- [33] Roubelakis K A, Kliewer W M. Enzymes of krebs-henseleit cycle in *Vitis vinifera* L. I. Ornithine carbamoyltransferase; isolation and some properties[J]. Plant Physiology, 1978, 62(3):337-339.
- [34] Lee Y, Jun B O, Kim S G, et al. Purification of ornithine carbamoyltransferase from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves and comparison of the properties of the enzyme from canavanine-containing and -deficient plants[J]. Planta, 1998, 205(3):375-379.
- [35] Lusty C J, Jilka R L, Nietsch E H. Ornithine transcarbamylase of rat liver; kinetic, physical, and chemical properties[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(20):10030-10036.
- [36] 王萍,吴燕燕,李来好,等. 虾类胰蛋白酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(2):42-46, 97.
- [37] de Ruiter H, Kollöffel C. Properties of ornithine carbamoyltransferase from *Pisum sativum* L. [J]. Plant Physiology, 1985, 77(3):695-699.
- [38] Spencer P W, Titus J S. The occurrence and nature of ornithine carbamoyltransferase in senescing apple leaf tissue [J]. Plant Physiology, 1974, 54(3):382-385.
- [39] Glenn E, Maretzki A. Properties and subcellular distribution of two partially purified ornithine transcarbamoylases in cell suspensions of sugarcane [J]. Plant Physiology, 1977, 60(1):122-126.
- [40] Ferguson A R, Johnston J S. Phaseolotoxin; chlorosis, ornithine accumulation and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in different plants[J]. Physiological Plant Pathology, 1980, 16(2):269-275.
- [41] Oliver C H K, Harry A, Suresh S P. Inactivation of bean ornithine carbamoyltransferase by phaseotoxin; effect of phosphate[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1979, 89(4):1361-1368.
- [42] Turner J G, Mitchell R E. Association between symptom development and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in bean leaves treated with

- phaseolotoxin[J]. Plant Physiology, 1985, 79(2):468-473.
- [43] Morita T, Mori M, Ikeda F, et al. Transport of carbamyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase into mitochondria. Inhibition by rhodamine 123 and accumulation of enzyme precursors in isolated hepatocytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(18):10547-10550.
- [44] Slocum R D, Richardson D P. Purification and characterization of ornithine transcarbamylase from pea (*Pisum sativum* L.)[J]. Plant Physiology, 1991, 96(1):262-268.
- [45] Slocum R D, Nichols H F, Williamson C L. Purification and characterization of *Arabidopsis* ornithine transcarbamoylase(OTCase), a member of a distinct and evolutionarily-conserved group of plant OTCases[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(4):279-288.
- [46] Martin F, Hirel B, Gadal P. Purification and properties of ornithine carbamoyl transferase 1 from *Alnus glutinosa* root nodules[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1983, 111(5):413-422.
- [47] de Martines M L, McIntype P, Hoogenraad N. A. Rapid batch method for purifying ornithine transcarbamylase based on affinity chromatography using immobilized transition-state analog[J]. Biochemistry International, 1981(3):371-378.
- [48] Acaster M A, Scott-White S, Weitzman P D J. Carbamoyltransferase reactions in plants, a survey for enzymic diversity and the potential for herbicidal activity of transition state analogue inhibitors[J]. Journal of Experimental Botany, 1989, 40(219):1121-1125.
- [49] Baker S R, Yon R J. Characterization of ornithine carbamoyltransferase from cultured carrot cells of low embryogenic potential[J]. Phytochemistry, 1983, 22(10):2171-2174.
- [50] Williamson C L, Lake M R, Slocum R D. Isolation and characterization of a cDNA encoding a pea ornithine transcarbamoylase(*argF*) and comparison with other transcarbamoylases[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(6):1087-1092.
- [51] Quesada V, Ponce M R, Micol J L. OTC and AUL1, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letters, 1999, 461(1-2):101-106.
- [52] Lee Y, Choi Y A, Hwang I D, et al. cDNA cloning of two isoforms of ornithine carbamoyltransferase from *Canavalia lineata* leaves and the effect of site-directed mutagenesis of the carbamoyl phosphate binding site[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46(6):651-660.
- [53] de Las R B, Fox G C, Angulo I, et al. Crystal structure of the hexameric catabolic ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus hilgardii*; structural insights into the oligomeric assembly and metal binding[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 393(2):425-434.
- [54] Shi D S, Morizono H, Yu X L, et al. Human ornithine transcarbamylase: crystallographic insights into substrate recognition and conformational changes[J]. Biochemical Journal, 2001, 354(3):501-509.
- [55] Shi D S, Morizono H, Yu X L, et al. Crystal structure of *N*-acetylornithine transcarbamylase from *Xanthomonas campestris*; a novel enzyme in a new arginine biosynthetic pathway found in several eubacteria[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(15):14366-14369.
- [56] Lithgow T, Ristevski S, Höj P, et al. High-level expression of a mitochondrial enzyme, ornithine transcarbamylase from rat liver, in a baculovirus expression system[J]. DNA and Cell Biology, 1991, 10(6):443-449.
- [57] Shargool P D, Steeves T, Weaver M, et al. The localization within plant cells of enzymes involved in arginine biosynthesis[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1978, 56(4):273-279.
- [58] Taylor A A, Stewart G R. Tissue and subcellular localization of enzymes of arginine metabolism in *Pisum sativum* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1981, 101(4):1281-1289.
- [59] Borrell A, Culiñez-Macià F A, Altabella T, et al. Arginine decarboxylases is localized in chloroplasts[J]. Plant Physiology, 1995, 109(3):771-776.
- [60] Takahara K, Akashi K, Yokota A. Purification and characterization of glutamate *N*-acetyltransferase involved in citrulline accumulation in wild watermelon[J]. The FEBS Journal, 2005, 272(20):5353-5364.
- [61] Legrain C, Stalon V, Noullez J P, et al. Structure and function of ornithine carbamoyltransferases[J]. European Journal of Biochemistry, 1977, 82(2):401-409.
- [62] Neway J O, Switzer R L. Purification, characterization, and physiological function of *Bacillus subtilis* ornithine transcarbamylase[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 155(2):512-521.
- [63] Tsuji S. Chicken ornithine transcarbamylase: purification and some properties[J]. Journal of Biochemistry, 1983, 94(4):1307-1315.

## Research Progress on Plant Ornithine Carbamoyltransferase

HE Huang<sup>1</sup>, SU Shan-shan<sup>2</sup>, ZHAN Yuan-feng<sup>1</sup>, DANG Xuan-min<sup>1</sup>

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737; 2. Hainan Agricultural School, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract:** Ornithine carbamyltransferase is the key enzyme of plant citrulline synthesis and the urea cycle. This paper reviewed isolation and purification, characteristics, structure and the gene of the plant ornithine carbamyltransferase, pointed out the future research.

**Keywords:** plant; ornithine carbamoyltransferase; purification; characteristic; protein structure