

Table 2. Chromatographic and optical properties of orchicyanin from *Dactylorhiza maculata*

	Rf-value · 100 BAW	BHCl	1% HCl	AHCl	Colour	$\lambda_{\max}$ [nm]
Cyanin	26	07	16	42	red	511, 273
Orchicyanin I	06	02	14	39	red	513, (312), 267
Orchicyanin II	30	20	27	58	violet	526, (322), 350, 267

Rf-values of paper chromatograms on Schleicher u. Schüll, Nr. 2043a. BAW n-butanol-concentrated acetic acid-water (4:1:5, top layer); BHCl n-butanol-2N HCl (1:1, top layer); 1% HCl water-concentrated HCl (97:3); AHCl concentrated acetic acid-concentrated HCl-water (15:3:82). $\lambda_{\max}$ absorption maximum in 5% acetic acid; small peaks in parentheses.

by the blocking of the hydroxyl groups in the B-ring of cyanidin. Bayer and Wegmann⁸ found that a degradation of anthocyanins by the enzyme cyaninioxidase does not happen unless 2 free hydroxyl groups are present in the B-ring.

The optical and chromatographic properties of the orchicyanins from *Dactylorhiza maculata* are listed in table 2. Particularly the spectral investigations yielded, according to the orchid species, variable values. This finding points to different compounds associated with cyanin in the orchicyanins, and may be of taxonomic importance. Further investigations are being made in order to determine them in the various species.

The relative concentrations in table 1 (pigment contents referred to the sum of all anthocyanins) have, within the same species and at the same development stage of the flowers, almost constant values. Also plants of different origin show this typical relative anthocyanin concentration of the species, even though the variability is a little greater. The absolute concentrations (anthocyanin contents referred to the fresh plant material) are, of course, much lower. On application of the spectrophotometric method and cyanin for calibration, the following average total anthocyanin concentrations of fresh (about for 2 days opened) flowers (labellum, sepals, petals) were measured: *Dactylorhiza maculata* 0.2%; *Dactylorhiza majalis* 0.7%; *Gymnadenia conopsea* 0.15%; *Nigritella nigra* 2.0%. The absolute concentrations are much more variable within the same species, even in plants from the same place of growth.

All concentrations alter during the development of the flowers. Comparing investigations and determinations of variability must be made with this in mind.

The anthers of the European orchids contain either no anthocyanins at all or cyanidinglucosides with a simple structure: cyanidin 3-monoglucoside, cyanidin 3-diglucoside, and cyanidin 3,5-diglucoside. Cyanidin 3-monoglucoside occurs alone in the anthers of *Nigritella nigra* and *Ophrys insectifera*. Both, cyanidin 3-glucoside and the cyanidindiglucosides have been found in following species: *Dactylorhiza majalis*, *D. maculata*, *Orchis purpurea*, *O. simia*, *O. morio* and *O. mascula*.

These results indicate that the diglucosides occur mainly in the anthers of *Orchis* and *Dactylorhiza* which contain orchicyanin in the petals. In these species, at first the more simple structured chrysanthemin is formed. Therefore it occurs above all in the anthers of the buds. At the beginning of the anthesis, the biosynthesis of the diglucosides is accelerated, so that their highest concentration is reached in the anthers of flowers several days open.

- 1 J. Arditti, *Orchid Biology*, vol. 1. Cornell University Press, Ithaca and London 1977.
- 2 J.B. Harborne, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London and New York 1967.
- 3 J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry, ed., *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London 1975.
- 4 J. Arditti, *Am. J. Bot.* 56, 59 (1969).
- 5 R.F. Albach, R.E. Kepner and A.D. Webb, *J. Food Sci.* 30, 69 (1965).
- 6 A. George, C. Gonzales, M.S. Strauss and J. Arditti, *Biochem. Syst. I*, 45 (1973).
- 7 K. Yoshitama and K. Hayashi, *Bot. Mag., Tokyo* 87, 33 (1974).
- 8 E. Bayer and K. Wegmann, *Z. Naturf.* 12b, 37 (1957).

Purification de la S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase du foie de rat par chromatographie d'affinité¹

Rat liver S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase purification by affinity column chromatography

B. Chabannes, L. Cronenberger et H. Pachéco

Service de Chimie Biologique, Bât. 406, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 20 Avenue Albert Einstein, F-69621 Villeurbanne Cedex (France), 30 octobre 1978

Summary. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (EC 3.3.1.1) has been purified 240-fold from rat liver by affinity column chromatography on aminohexyl sepharose bound 6-mercaptapurine 9 D-ribose. The purified enzyme was homogeneous by gel electrophoresis.

La S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (EC 3.3.1.1) est très répandue²⁻⁶. Chez l'animal elle existe dans presque tous les organes, dont le foie et le cerveau⁷⁻¹⁰. Elle catalyse l'hydrolyse en adénosine et en homocystéine de la S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) elle-même formée à partir de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) dans les réactions

de transméthylation, mais la synthèse de la SAH est thermodynamiquement favorisée²⁻¹¹. Comme la SAH est un inhibiteur puissant des méthyltransférases¹¹ et présente des propriétés neurotropes récemment mises en évidence¹², il apparaît que la SAH-hydrolase doit jouer un rôle régulateur. Afin de préciser ce rôle, nous avons entrepris

Purification de la SAH hydrolase du foie de rat

	Protéines (mg)	Activité totale (unité*)	Activité spécifique (unité/mg protéines)	Rendement global en activité totale (%)**	Taux de purification
Homogénat brut	9750	108	0,011		
Surnageant à 20000×g	2150	69	0,032	64	3
Fraction 40-50% SO ₄ (NH ₄) ₂	548	57	0,10	53	9
Affinité sur mercaptopurine riboside-aminohexyl sepharose	7	18	2,60	17	240

* Une unité est la quantité d'enzyme catalysant la formation de 1 μ M de SAH par min. ** Les rendements sont calculés à partir de l'activité totale de l'homogénat brut.

l'isolement de l'enzyme du foie de rat et mis au point une méthode originale de purification par chromatographie d'affinité. Depuis sa découverte², elle a déjà été purifiée d'abord partiellement à partir du foie de rat², de la levure⁶ ou des feuilles de *Beta vulgaris*⁷, puis jusqu'à homogénéité à partie du foie de bœuf¹³, et enfin récemment cristallisée à partir de foie de veau¹⁴.

Matériel et méthodes. Nous avons employé des rats mâles de souche Wistar pesant 250-300 g au moment du sacrifice et nourris ad libitum. L'activité de la SAH hydrolase a été déterminée comme suit: dans un volume final de 2 ml, 5 μ M d'adénosine, 10 μ M de dl-homocystéine, 10 μ M de thiodiglycol et 100 μ M de tampon phosphate de sodium (pH 6,8) sont incubés avec 0,2-1 unité (U) d'enzyme. Après 10-30 min d'incubation à 37 °C, la réaction est stoppée par chauffage au bain-marie bouillant et le milieu réactionnel filtré sur disque millipore (HAWP 02 500). L'excès d'adénosine et la SAH sont séparées par chromatographie sur colonne de Dowex 1×8 (CO₃H⁻) (h=10 mm; $\varnothing$ 12 mm)¹⁵. L'adénosine est éliminée par lavage avec 100 ml d'eau distillée puis la SAH éluée par le tampon HCl-KCl 0,1 M, pH 2,5 et dosée par spectrophotométrie à 260 nm.

Pour préparer le support biospécifique, 7 g d'aminohexylsepharose 4 B (Pharmacia) sont d'abord bromoacétylés suivant la technique de Cuatrecasas¹⁶ par action de l'O-bromoacétyl-N-hydroxysuccinimide obtenue par condensation de l'acide bromoacétique sur le N-hydroxysuccinimide en présence de dicyclohexylcarbodiimide. Le bromoacétylamino-hexylsepharose est alors versé dans 30 ml d'une solution de 6-mercaptopurine 9 D-riboside (500 μ M) en tampon bicarbonate 0,1 M à pH 9,0¹⁷. L'atome de brome du dérivé bromoacétylé est éliminé avec l'hydrogène du groupement sulphydrique en 6 du nucléoside. Après 5 jours d'agitation à la température ambiante, le gel est traité 2 h à 30 °C par 700 μ l de 2-mercaptoéthanol dans le même tampon bicarbonate pour éliminer les atomes de brome résiduel. Après lavage (NaCl 0,2 M et eau distillée) le gel est conservé en suspension dans le tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,1 en présence de mercaptoéthanol (10⁻³M) et d'azide de sodium (0,02%). Dans ces conditions environ 8 μ M du mercaptopurine riboside sont fixés par g de gel humide.

La première étape de la purification de la SAH-hydrolase a été réalisée suivant la méthode de la Haba et Cantoni². A 4 °C, les foies de rat (50 g) sont homogénéisés au polytron dans 3 volumes d'acide acétique 0,01 M. L'homogénat est centrifugé et le surnageant est précipité entre 40 et 50% de la saturation au sulfate d'ammonium (pH 5,85). Toutes les centrifugations sont effectuées 20 min à 20000×g à 2-4 °C. Le culot final est dissous dans 50 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M à pH 6,8. 5 ml de cette préparation enzymatique sont dialysés une nuit à 4 °C contre 1 l de tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,1 contenant EDTA 10⁻³ M, 2-mercaptoéthanol 10⁻³ M et azide de sodium 0,02% et le dialysat est déposé à température

ambiante sur une colonne d'adsorbant biospécifique (h=4 cm; $\varnothing$ =1,5 cm). Après lavage avec 130 ml de tampon de dialyse contenant en plus 0,25 M de NaCl, la SAH-hydrolase est éluée après addition de SAH (5,5·10⁻⁴ M). Les fractions contenant cette enzyme sont réunies et son activité spécifique déterminée. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry. Après concentration de la solution enzymatique jusqu'à 0,5 ml dans une cellule Amicon B 15, l'homogénéité de l'enzyme est contrôlée par électrophorèse en disques de polyacrylamide (7,5% d'acrylamide) suivant la technique de Bloemendal¹⁸ et en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) suivant celle de Weber et Osborn¹⁹.

Résultats et discussion. Notre méthode permet de purifier en 2 étapes la SAH-hydrolase du foie de rat environ 240 fois (tableau). L'enzyme est apparemment homogène après électrophorèse en l'absence et en présence de SDS. L'étude de la répartition de l'activité enzymatique sur le gel d'acrylamide après électrophorèse en l'absence de SDS n'indique qu'un seul pic d'activité correspondant à la bande révélée au bleu de Coomassie. La comparaison de la mobilité de la protéine correspondant à la bande révélée après électrophorèse en présence de SDS à celle de sous-unités de protéines de poids moléculaire connu¹⁹ montre que la SAH-hydrolase doit être formée par l'union de sous-unités identiques de poids moléculaire égal à 48000 (2 déterminations); mais le poids moléculaire de l'enzyme native n'est pas encore connu avec précision. La simplicité de cette méthode de purification est vraisemblablement due à la haute spécificité du système d'affinité employé: immobilisation de l'un des substrats, l'adénosine, et élution par l'autre, la SAH. La méthode employée ici permet de fixer l'adénosine sur un support insoluble sans modifier le ribose. La chromatographie d'affinité de la SAH-hydrolase sur l'époxy-sepharose où l'adénosine a été fixée par l'hydroxyle en position 2' du ribose, suivant la méthode de Schraeder et al.²⁰, retarde seulement l'enzyme: de plus, la protéine éluée n'est pas homogène²¹. Le ribose a donc une très grande importance dans la fixation de la SAH-hydrolase sur ses substrats; ces résultats sont en accord avec ceux de Palmer et Abeles²² qui ont montré par RMN le rôle de ce sucre dans la réaction enzymatique.

- 1 Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS (ERA 560) et de l'INSERM (FRA 5).
- 2 G. de la Haba et G. L. Cantoni, J. biol. Chem. 234, 603 (1959).
- 3 J. A. Duerre, Archs Biochem. Biophys. 124, 422 (1968).
- 4 W. A. Dodd et E. A. Cossins, Archs Biochem. Biophys. 133, 216 (1969).
- 5 R. D. Walker et J. A. Duerre, Can. J. Biochem. 53, 312 (1975).
- 6 R. C. Knudsen et I. Yall, J. Bact. 112, 569 (1972).
- 7 J. E. Poulton et V. S. Butt, Archs Biochem. Biophys. 172, 135 (1976).

- 8 J.D. Finkelstein et B. Harris, *Archs Biochem. Biophys.* 159, 160 (1973).
- 9 J.D. Finkelstein et B. Harris, *Archs Biochem. Biophys.* 171, 282 (1975).
- 10 R.A. Schatz, C.R. Vunnam et O.Z. Sellinger, *Life Sci.* 20, 375 (1977).
- 11 T. Deguchi et J. Barchas, *J. biol. Chem.* 246, 3175 (1971).
- 12 P. Fonlupt, M. Roche, L. Cronenberger et H. Pacheco, Brevet français déposé le 28 Avril 1978, n° 78-12711.
- 13 J.L. Palmer et R.H. Abeles, communication personnelle.
- 14 H.H. Richards, P.K. Chiang et G.L. Cantoni, *J. biol. Chem.* 253, 4476 (1978).
- 15 S.K. Shapiro et D.J. Ehninger, *Analyt. Biochem.* 15, 323 (1966).
- 16 P. Cuatrecasas, *J. biol. Chem.* 245, 3059 (1970).
- 17 S. Barry et P. O'Carra, *FEBS Lett.* 37, 134 (1973).
- 18 H. Bloemendal, dans: *Electrophoresis*, vol. 2, p. 379. Ed. M. Bier. Academic Press, New York 1967.
- 19 K. Weber et M. Osborn, *J. biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
- 20 W.P. Schrader, A.R. Stacy et B. Pollara, *J. biol. Chem.* 251, 4026 (1976).
- 21 B. Chabannes et L. Cronenberger, travaux non publiés.
- 22 J.L. Palmer et R.H. Abeles, *J. biol. Chem.* 251, 5817 (1976).

A spectrophotometric method for the determination of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate

C. Salerno, A. Giacomello and E. Messina

Institute of Biological Chemistry and Institute of Rheumatology, University of Rome, and Center of Molecular Biology of Consiglio Nazionale delle Ricerche, I-00185 Rome (Italy), 7 November 1978

Summary. A new, sensitive, specific and simple spectrophotometric method for the determination of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) is presented. PRPP is reacted with excess hypoxanthine in the presence of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. At the end of the reaction, PRPP concentration is measured from the extent of conversion of hypoxanthine to inosinate. The concentration of the purine base is determined spectrophotometrically in the presence of xanthine oxidase.

5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) is an essential substrate for several different pathways involved in the synthesis of purine, pyridine, and pyrimidine ribonucleotides¹.

Most of the currently used assays for PRPP are radiochemical and utilize the reaction of this compound with a labelled purine base in the presence of the appropriate, purified phosphoribosyltransferase. The corresponding isotopically labelled nucleotide (end product of the reaction) is separated by means of techniques such as paper² or thin-layer³ chromatography or high-voltage electrophoresis⁴.

The reaction of PRPP and hypoxanthine in the presence of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) can be followed spectrophotometrically at 245 nm⁵. However, a direct spectrophotometric assay of PRPP at this wavelength is hardly useful for measuring the intracellular concentration of this compound owing to the high absorption of biological samples at 245 nm.

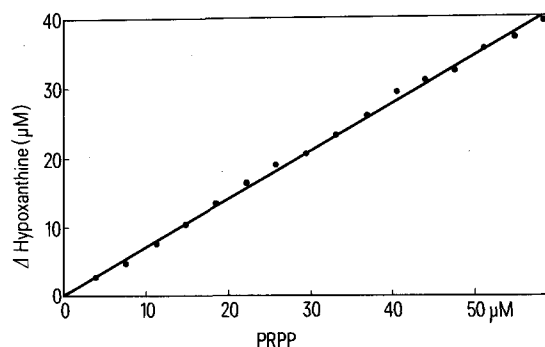
The assay described by Kornberg et al.⁶ based on the release of ¹⁴CO₂ from orotic acid in the presence of a mixture of orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidine-5'-monophosphate decarboxylase (ODC) is also employed. The OPRT-ODC reaction has been used^{6,7} to measure PRPP concentration with a spectrophotometric technique but this method has not found much application. One reason for this might be that some investigators⁸ found a linear response only in the range from 0.01 to 0.1 μmoles of PRPP per ml of reaction mixture. In the present paper, a new, sensitive, specific and simple spectrophotometric assay for PRPP is described.

Materials. HGPRT was purified from human erythrocytes to apparent electrophoretic homogeneity as previously described⁵. PRPP, tetrasodium salt, was purchased from Sigma Inc. 1 mg of the commercial sample contained 1.7 μmoles of PRPP as determined using the enzymatic assay of Kornberg et al.⁶. Paper chromatography according to Wood⁹ showed no significant impurity in the commercial sample of PRPP after staining with ammonium molybdate⁹. Xanthine oxidase (XOD) and hypoxanthine were obtained from Boehringer AG. All other reagents were high purity commercial samples from Merck AG.

Methods. PRPP was assayed by the following procedure. PRPP was reacted with excess hypoxanthine in the presence of HGPRT to form the corresponding nucleotide. At the end of the reaction, PRPP concentration was measured from the extent of conversion of hypoxanthine to IMP. Hypoxanthine was determined by the enzymatic, spectrophotometric assay of Kalckar¹⁰.

Step 1: HGPRT catalyzed reaction. The reaction mixture, designed after published procedures⁵, contained 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.01 M MgCl₂, 8 × 10⁻⁵ M hypoxanthine, 0.05 ml of a standard preparation of HGPRT⁵, and PRPP ranging from 0 to 5.8 × 10⁻⁵ M in a final volume of 1 ml. PRPP was added last to initiate the reaction. All incubations were conducted at 37 °C. The sample containing no PRPP was used as the blank.

Under the experimental conditions employed the reaction went to completion after 15 min when followed as previously described⁵. At the end of the reaction, 0.2 ml of 0.25 M ethylenediamine tetraacetate, sodium salt, pH 7.4, were added to the incubation mixture. This was necessary in order to prevent the HGPRT catalyzed IMP pyrophosphorolysis during step 2⁵.



Calibration curve for the PRPP assay. The experimental conditions are described in the text.