

尿酸氧化酶基因的克隆、表达及其产物的应用

朱献军 刘建国* 黎高翔

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 克隆了产朊假丝酵母(*Candida utilis*) AS2.117 尿酸氧化酶(Urate Oxidase, Uricase, EC1.7.3.3)的基因。将此基因插入原核表达质粒 pET21a 后转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得高表达的重组转化子菌株。经 IPTG 诱导, 重组尿酸酶基因表达量可达菌体可溶性蛋白的 40%。重组尿酸氧化酶为有酶活性的可溶蛋白。Western 印迹分析证实表达产物有免疫学活性。经 DEAE DE52 纤维素离子交换柱层析纯化, 目的蛋白纯度可达 95%。重组蛋白和天然蛋白的理化特征比较证明重组蛋白的热稳定性有较大提高。酶盒配制和临床应用实验表明重组蛋白可代替天然蛋白进行临床血清尿酸的分析。

关键词 产朊假丝酵母 尿酸氧化酶 基因克隆和表达 尿酸分析

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0068-05

尿酸氧化酶(Urate Oxidase, EC1.7.3.3)是生物体内嘌呤降解代谢途径中的一种酶, 能催化尿酸氧化为尿囊素。许多物种中均发现有尿酸氧化酶存在, 但在高等哺乳动物(猿和人类)体内却缺乏有生物活性的尿酸氧化酶, 而以尿酸作为嘌呤代谢的终产物^[1]。尿酸及其盐类在水中溶解度很低, 血液中过多积累会导致痛风综合症。在临床上, 尿酸氧化酶可用于酶法测定尿酸浓度而诊断痛风症^[2], 还可以用于治疗血液高尿酸和痛风等疾病^[3]。微生物来源的尿酸氧化酶可用于临床诊断和治疗。但微生物产酶量较低, 限制了其广泛应用。通过 DNA 重组技术高效表达酶基因是一条提高产酶量的途径。迄今为止, 已有多个物种的尿酸氧化酶基因被克隆^[4~10]。本组曾报道了筛选的产朊假丝酵母 AS2.117 菌株产尿酸氧化酶的发酵和酶的分离、纯化以及临床分析应用的工作^[11, 12], 为了进一步提高发酵产酶量和了解该菌株酶基因与已知基因的差异, 进行了该菌株尿酸氧化酶基因克隆、表达以及表达产物性质和用于血清尿酸分析的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3),

质粒 pBluescript(KS) [pBS(KS)] 和产朊假丝酵母 AS2.117 由本组保存。质粒 pET21a 购自 Novogene 公司。

1.1.2 试剂和酶 寡核苷酸引物由上海生工公司合成。限制酶 *Nde* I 购自 Takara 公司, 其余工具酶和辣根过氧化物酶均购自华美公司。异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为宝泰克公司产品。氨苄青霉素和尿酸氧化酶(对照用)购自 Sigma 公司。尿酸由 Aldrich 公司提供。培养基成分购自 OXOID 公司。其余均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取、酶切、回收、连接、转化: 参考文献 [13]。

1.2.2 产朊假丝酵母 AS2.117 染色体 DNA 的提取 参考文献 [14]。

1.2.3 PCR 引物设计和扩增 根据已知的基因序列^[9] 用计算机辅助设计了一对引物。尿酸氧化酶基因的 5' 端引物 P1 5'-CGGAATTCCAT-ATGT-CAACAACGCTC-TCATC-3' 中引入了 *Eco*RI 和 *Nde* I 位点, 3' 端引物 P2 5'-GGGGATCCTTA-CAACTTGGTCTTCTCCTTA-3' 中引入了 *Bam*HI 位点。提取的产朊假丝酵母 AS2.117 染色体 DNA 用作 PCR 扩增模板, 30 个循环按 94 $^{\circ}$ C 变性 40s,

66℃复性 1min ,72℃ 延伸 1min ,最后 72℃ 10min 补平的条件进行。

1.2.4 表达质粒 pURO 的构建 :PCR 扩增产物和质粒 pBS(KS)分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后电泳回收纯化 ,经 T4DNA 连接酶连接构建成重组质粒 pBUO ,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。用 *Nde* I 和 *Bam*HI 消化重组质粒 pBUO 回收尿酸氧化酶基因片段 ,插入到 pET21a 的相同酶切位点上 ,构建成重组质粒 pURO。

1.2.5 基因表达及产物活性测定 重组质粒 pURO 转化经氯化钙处理的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞 ,经酶切分析筛选得到 *E. coli*BL21(DE3)/pURO。该转化子接种于 3mL 含终浓度 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 ,37℃ 280r/min 培养过夜 ,次日以 2% 转接于 50mL LB 培养基 ,37℃ 280r/min 培养至对数生长中期 ,加入诱导物 IPTG 至终浓度 0.5mmol/L ,同样条件继续培养 3.5h ,离心收集菌体。用 0.1mol/L ,pH8.5Tris-Gly 缓冲液悬浮菌体 ,冰浴下超声波(200W ,15 次每次 20s ,间隔 30s)破菌 ,12000g 离心 15min 收集上清 ,得粗酶液。

在 3mL 比色杯中加入 2.5mL 溶于 0.1mol/L pH8.5 硼酸缓冲液的 0.001% 尿酸溶液 ,再加入 0.5mL 适度稀释的酶液并混匀 ,在 25℃ 下连续测定 293nm 处吸光度变化。酶活性单位定义^[12] :在 pH8.5 25℃ 时 ,每分钟催化 1μmol 尿酸氧化所需的酶量为 1 个酶单位。

1.2.6 表达产物的纯化和性质研究 超声波破菌所得粗酶液用 DEAE DE52 纤维素离子交换层析柱纯化。蛋白浓度测定用考马斯亮蓝方法^[14]。酶学性质的研究参照文献^[12]进行。

1.2.7 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析 :不连续 SDS-PAGE 按文献^[13]进行(12% 胶浓度 ,考马斯亮蓝 R250 染色)。

兔抗尿酸氧化酶抗体由中科院遗传所动物中心制备 ,辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔抗体购自邦定生物工程公司。Western 印迹分析按文献^[13]进行。

1.2.8 血清尿酸测定 :采用文献^[12]的方法。

2 结 果

2.1 尿酸氧化酶基因的分析

以产朊假丝酵母 AS2.117 的染色体 DNA 为模板用 P1 和 P2 引物经 PCR 反应扩增出大小为 0.9kb 的特征性片段(图 1)。该片段经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后插入质粒 pBS(KS) ,得到重组质

粒 pBUO(图 1)。经双脱氧法^[15]测序分析 ,插入片段的 DNA 序列与文献报道^[10]的产朊假丝酵母 IFO0988 尿酸氧化酶基因的 DNA 序列相同。

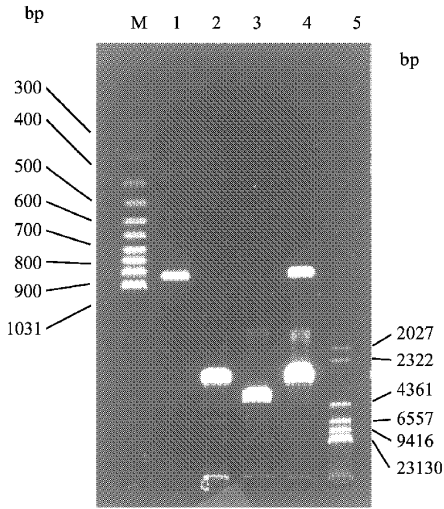


图 1 PCR 扩增产物和 pBUO 酶切鉴定的琼脂糖(1.2%)电泳分析

Fig.1 Agarose(1.2%)analysis of PCR product and enzymatic digestion of pBUO.

M:marker(1031 900 800 700 600 500 400 300 200bp);
1. PCR product 2. pBS(KS)/*Eco*RI ; 3. pBUO/*Eco*RI ;
4. pBUO/*Eco*RI + *Bam*HI ; 5. λ DNA/*Hin*dIII marker

2.2 尿酸氧化酶基因的表达

以 *Nde* I 和 *Bam*HI 双酶切重组质粒 pBUO ,回收 0.9kb 片段 ,并插入质粒 pET21a 的相同酶切位点得到重组质粒 pURO(图 2)。该质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到 *E. coli*BL21(DE3)/pURO。用 1.2.5 方法检测了一组转化子的重组尿酸氧化酶产量 ,最高可达 10u/mL 发酵液 ,比原始菌株酶产量高 20 倍^[21]。经 SDS-PAGE 分析 ,表达产物占菌体可溶性蛋白的 40%(图 3)。

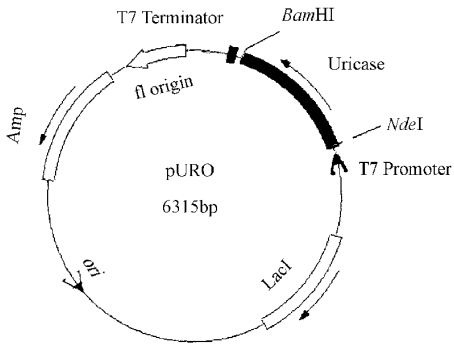


图 2 尿酸氧化酶基因重组质粒 pURO

Fig.2 The recombinant plasmid pURO
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

2.3 表达产物的纯化

超声波破菌所得粗酶液上样于经 0.1mol/L , pH8.5 Tris-Gly 缓冲液平衡的 DEAE DE52 纤维素柱 ,并用 1.5 倍柱体积的同样缓冲液淋洗柱 ,得到一个洗脱峰 ,再用 0~0.4mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱 ,得到 2 个洗脱峰。测定各洗脱组分的酶活性 ,重组尿酸氧化酶集中于第一个洗脱峰 ,即透过峰 ,回收率约 50%。SDS-PAGE 分析各洗脱组分的结果表明 ,透过峰中重组尿酸氧化酶纯度达 95% 左右。在此种离子交换层析条件下 ,重组尿酸氧化酶不被吸附直接透过 ,而其它杂蛋白均被吸附 ,达到了较好的分离纯化效果(图 3)。

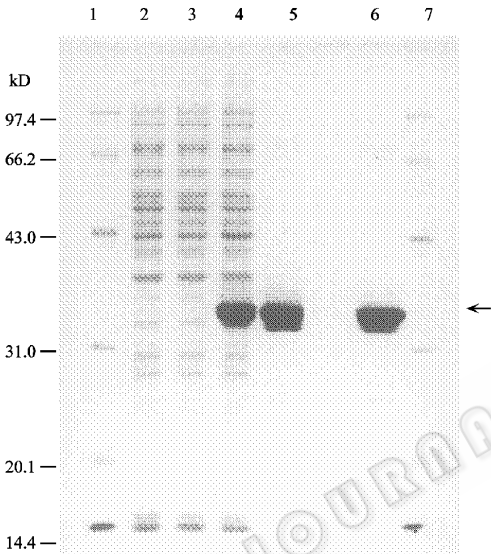


图 3 重组尿酸氧化酶及其纯化产物的 SDS-PAGE(12%)电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE(12%)analysis of uricase produced by *E. coli*BL21(DE3)pURO as well as the purification result

1 and 7. Low molecular weight marker ; 2. *E. coli* BL21(DE3)pET21a ; 3. *E. coli* BL21(DE3)pURO without IPTG ; 4. *E. coli* BL21(DE3)pURO induced by 0.5mmol/L IPTG ; 5 and 6. Recombinant uricase purified by DEAE DE52 an arrow indicates the recombinant uricase

2.4 Western 印迹分析

以免抗原始菌株尿酸氧化酶的抗体作为第一抗体 ,偶联辣根过氧化物酶的羊抗兔抗体作为第二抗体 ,进行了 Western 印迹分析^[13]。 *E. coli*BL21 (DE3) pURO 经 0.5mmol/L IPTG 诱导产生的重组蛋白能与兔抗原始菌株尿酸氧化酶的抗体产生免疫性结合 ,其结合强度同原始菌株尿酸氧化酶与这一抗体的免疫结合强度相似(图 4)。结果表明重组蛋白与原始菌株尿酸氧化酶的免疫学活性一致。

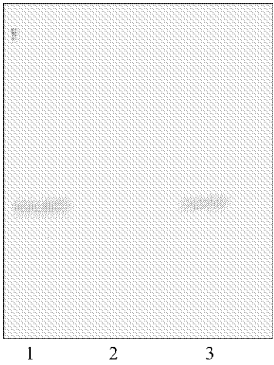


图 4 重组尿酸氧化酶的 Western 印迹分析

Fig.4 Western blot analysis of recombinant uricase

1. Purified uricase from *Candida utilis* AS2.117 ; 2. Crude extract of *E. coli* BL21(DE3)pET21a induced by 0.5mmol/L IPTG ; 3. Purified uricase from *E. coli* BL21(DE3)pURO induced by 0.5mmol/L IPTG.

2.5 重组蛋白性质研究

经不连续 SDS-PAGE 分析 ,重组蛋白的分子量为 34.041kD ,与从其基因序列推测的 303 个氨基酸的理论分子量 34kD 相符 ,同时与原始菌株尿酸氧化酶的亚基分子量相同^[12]。用 Linweaver-Burk 作图法测得重组蛋白对尿酸的米氏常数 K_m 为 1.56×10^{-6} mol/L ,此值比原始菌株尿酸氧化酶的 K_m (5.26×10^{-6} mol/L)^[12]稍小。重组尿酸氧化酶催化尿酸氧化反应的最适 pH 值是 8.0 ,比原始菌株尿酸氧化酶(pH8.5)的稍小^[12]。

2.6 重组蛋白的热稳定性

纯化后的重组尿酸氧化酶在不同温度下保温 15min ,12 000g 离心 15min 以除去变性蛋白 ,测定剩余酶活性 ,绘出变化曲线(图 5)。结果表明 ,重组蛋白在低于 60℃ 时稳定 ,65℃ 处理 15min 后 ,酶活性剩余 50% ,比原始菌株来源的尿酸氧化酶有更高的热稳定性^[12]。

Koyama Y 等^[10]曾报道尿酸氧化酶的 Cys168 被氧化会引起酶活性损失 ,β-巯基乙醇可抑制此种热失活。含有 10mmol/L β-巯基乙醇时 ,重组蛋白经 65℃ 加热 30min 后剩余酶活性为 90% ,而无 β-巯基乙醇时的同样处理 ,重组蛋白则失去 50% 的酶活性 ,在热处理后失活的重组蛋白中加入 10mmol/L β-巯基乙醇使酶活性恢复至初始活性的 90%(表 1)。此实验结果证实了酶分子中的自由巯基是酶具有催化活性的重要基团。

2.7 重组尿酸氧化酶用于血清尿酸分析

纯化后的重组尿酸氧化酶电泳纯(图 3)23μg

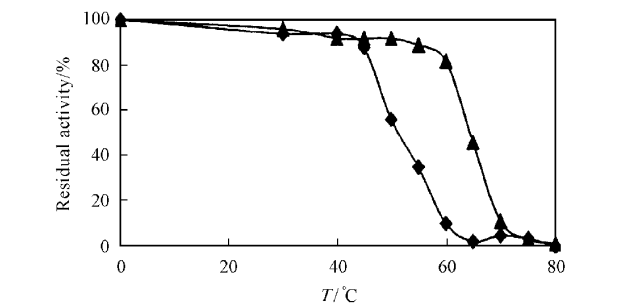


图 5 重组尿酸氧化酶和原始菌株尿酸氧化酶的热稳定性比较

Fig. 5 Thermostabilities of the uricase purified from *E. coli* BL21(DE3)pURC(▲) and *Candida utilis*(◆) The enzyme(about 3u of uricase activity per mL in 0.1mol/L Tris-Gly buffer pH8.5)was treated for 15 min at various temperatures and the residual activity was determined. The residual activity at 4℃ was defined as 100 % .

表 1 β-巯基乙醇对重组尿酸氧化酶热稳定性的影响
Table 1 Effect of β-Mercaptoethanol on thermostability of recombinant uricase *

Treatment	Residual activity/(u/mL)	Residual rate/ %
Initial enzyme	2.5	100
+ ME ^a	2.25	90
- ME	1.25	50
ME - added later ^b	2.25	90

* Purified enzyme was incubated at 65℃ for 30 min and residual activity was measured.
β-Mercaptoethanol was added to final concentration of 10mmol/L ^a before heat treatment and ^b after heat treatment

蛋白)按照文献 [12] 的方法配制成酶试剂盒 ,在北京医院检验科生化室进行了血清尿酸的分析。

2.7.1 血清尿酸测定标准曲线 配置的酶试剂盒在血清尿酸浓度为 1.0~25mg/dL 范围内呈较好的线性(图 6)。血清中尿酸的正常浓度范围(2.5~7 mg/dL)已被较好地涵盖。

2.7.2 精确度 所配试剂进行了批内和日间的重复性测定实验。批内重复性测定的标准方差和变异系数分别是 0.13~0.17mg/dL 和 1.8%~5%。3 日内的批间重复性测定的标准方差和变异系数分别是 0.13~0.20mg/dL 和 2.2%~4.6%(表 2)。

2.7.3 准确度 所配试剂进行了回收实验和对比实验。实验测定的回收率在 99%~104%(表 2),符合临床尿酸批量检测的要求。用所配酶试剂盒与北京医院临床检测试剂盒(Nobis Enzymatic Kit ,Germany)方法进行了对比实验 ,30 份血清样品分别用两种方法测定 ,其测定值有良好的线性相关性。

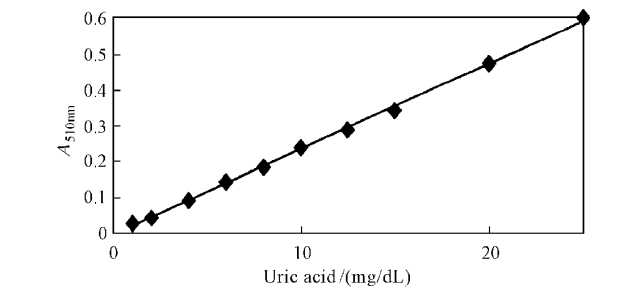


图 6 血清尿酸测定的线性范围

Fig.6 Linear range of working curve for serum uric acid analysis

表 2 本方法配制的尿酸酶试剂盒评价结果
Table 2 The result of evaluation of prepared enzymatic reagent

Precision	Within-batch	Between-batch
	SD(mg/dL) 0.13~0.17 CV% 1.8~5.0	SD(mg/dL) 0.13~0.20 CV% 2.2~4.6
Recovery ratio	99%~104%	
Linear range	1.0~25.0 (mg/dL)	
Correlation and regression	$r = 0.98$ $Y = 1.25X - 0.16$	

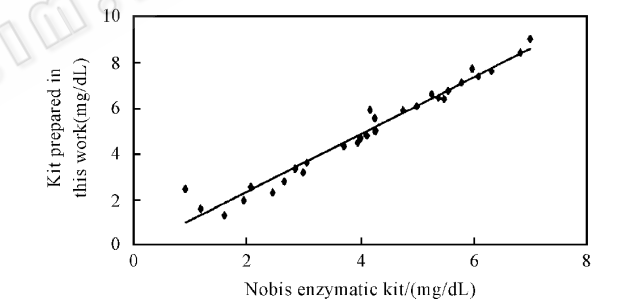


图 7 本方法与 Nobis 公司酶试剂相关散点图

Fig.7 Correlation curve between enzymatic kits of Nobis and prepared in this work
 $N = 30$ $r = 0.98$ $Y = 12.5X - 0.16$

2.7.4 试剂稳定性 所配工作试剂在室温可以放置 24h 不影响测定值。

3 讨论

通过 DNA 序列测定发现 ,本实验克隆的 *Candida utilis* AS2.117 尿酸氧化酶基因与 Koyama Y 等 [10] 报道的 *Candida utilis* IFO0988 尿酸氧化酶基因在 DNA 序列上完全一致 ,由此证明这两株菌株亲缘关系很近。

利用 DNA 重组技术表达外源基因时 ,大肠杆菌表达系统由于操作简易、成本低廉 ,是理想的首选工具。采用 T7RNA 聚合酶启动子表达系统在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达假丝酵母尿酸氧化酶基因

时,由于宿主菌 BL21(DE3)染色体上整合有可用 IPTG 诱导的 T7RNA 聚合酶基因,而且 T7RNA 聚合酶合成 RNA 速度较快,仅识别本身的启动序列,因而,此种系统表达基因产物的产量较高。本实验中表达的重组尿酸氧化酶可达到细胞总蛋白的 40%,发酵产酶量是原始菌株的 20 倍,并且是有生物活性的可溶性蛋白。与原始菌株尿酸氧化酶比较,在底物亲和性、反应最适温度和热稳定性方面略有差异。用构建的基因工程菌生产的重组尿酸氧化酶经分离纯化后,配制成测定血清尿酸的酶试剂盒。临床实验证明,各项测定技术指标符合临床检验的要求,测定值与进口尿酸测定酶试剂盒的测定值有良好的相关性($r = 0.98$)。证明用此种技术生产的重组尿酸氧化酶可代替原始菌株产生的尿酸氧化酶用于临床血清尿酸的分析。此方法酶产量高、且易于纯化、成本低廉、有很好的市场前景。

致 谢 北京医院检验科生化室李义龙主任帮助进行临床尿酸分析实验,特此致谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wu X, Lee C C, Muzny D M *et al.* Urate oxidase: Primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(23): 9412~9416
- [2] Duncan Patricia H, Gochman N, Cooper T *et al.* *Clin Chem*, 1982, **28**(2): 284~293
- [3] Pui C H, Relling M V, Lascombes F *et al.* *Leukemia*, 1997, **11**(11): 1813~1816
- [4] Motajima K, Kanaga S, Goto S *et al.* Nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat liver uricase. *Eur J Biochem*, 1988, **173**: 459~463
- [5] Wallrath L L, Burnett J B, Friedman T B *et al.* *Mol Cell Bio*, 1990, **10**: 5114~5127
- [6] Nguyen T, Zelechowska M, Foster V *et al.* Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc Natl Sci USA*, 1985, **82**(15): 5040~5044
- [7] Legoux R, Delpech B, Dumont X *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding aspergillus flavus urate oxidase. *J Biol Chem*, 1992, **267**(12): 8565~8570
- [8] Oestreicher N, Scazzocchio *et al.* Sequence regulation and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in aspergillus nidulans. *J Biol Chem*, 1993, **268**(31): 23382~23389
- [9] Yamamoto K, Kojima Y, Kikuchi T *et al.* Nucleotide sequence of the uricase gene from *Bacillus sp.* TB-90. *J Biochem*, 1996, **119**(1): 80~84
- [10] Koyama Y, Ichikawa T, Nakana E *et al.* Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the candida utilis urate oxidase(uricase). *J Biochem*, 1996, **120**(5): 969~973.
- [11] LIU J G(刘建国), LI G X(黎高翔). Culture conditions for uricase formation of *Candida utilis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1989, **29**(1): 45~50
- [12] LIU J G, LI G X, LIU H *et al.* Purification and properties of uricase from *Candida sp.* and its application in uric acid analysis in serum. *Appl Biochem Biotech*, 1994, **47**(1): 57~63
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 1989
- [14] Frederick M Ausubel *et al.* *Short protocols in molecular biology*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., 523
- [15] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(12): 5463~5467

Cloning and Expression of Urate Oxidase and Its Application in Serum Uric Acid Analysis

ZHU Xian-Jun LIU Jian-Guo* LI Gao-Xiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Anurate oxidase(uricase EC 1.7.3.3) gene from *Candida utilis* AS2.117 was cloned by PCR amplification with primers derived from conserved regions of published uricase DNA sequence. The DNA sequence of cloned uricase gene was determined and a high homology compared to the reported gene was found. The cloned gene was inserted into *Bam* H I and *Nde* I sites of pET21a to create the recombinant plasmid pURO. In *Escherichia coli* BL21(DE3) host, the expression level of uricase reached to about 40% of total soluble proteins of the cell. The western blot analysis confirmed the result of expression. Properties of the enzyme protein produced by *E. coli* BL21(DE3)/pURO were determined and similar with those of original protein from *Candida utilis* AS2.117. Furthermore, the thermostability of the expressed protein was enhanced. The purified recombinant uricase was used in serum uric acid analysis.

Key words *Candida utilis* AS2.117, uricase gene cloning and expression, uric acid analysis

Received: April 18, 2000

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(39990570).

* Corresponding author. Tel 86-10-62550184; Fax 86-10-62560912; E-mail: jing@sun.im.ac.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>