

尿酸氧化酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性鉴定

朱 蕾 王庆民 武国栋 薛彤彤 孙丽霞 王晶翼*

(齐鲁制药有限公司药物研究院 济南 250100)

摘要 尿酸氧化酶(urate oxidase, Uricase, EC. 1.7.3.3)是一种能将尿酸氧化为尿囊素的蛋白酶。合成黄曲霉(*Aspergillus flavus*)尿酸氧化酶基因,构建表达载体 pET43.1a/uox,重组质粒经双酶切鉴定和序列分析,证明插入序列正确,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109,菌株经诱导表达尿酸氧化酶蛋白,目的蛋白经过超声破碎,经检测以可溶性蛋白为主;菌体经超声破碎后,上清经过阴离子柱和阳离子柱两步纯化,得到尿酸氧化酶纯品,纯品以分光光度法进行体外酶活性测定。结果显示:尿酸氧化酶在大肠杆菌中获得高效表达,目的蛋白占菌体总蛋白的50%;表达产物经过两步层析柱纯化,获得电泳扫描纯度为95%的纯品;在体外活性测定中具有分解尿酸的能力,在临床检测和治疗中有重要意义。

关键词 尿酸氧化酶 大肠杆菌 高效表达 纯化

中图分类号 Q786

尿酸氧化酶是生物体内嘌呤降解途径中的一种酶,能催化尿酸氧化成无活性、可溶的尿囊素和过氧化氢,尿囊素是除人和猿类以外其它哺乳动物嘌呤代谢的排泄物。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)体内却缺乏有生物学活性的尿酸氧化酶,而以尿酸作为嘌呤代谢的终产物。尿酸及其盐类在血液中溶解度很低,如果体内嘌呤代谢紊乱,产生过量尿酸,或者尿酸排泄受阻,血液中尿酸浓度增高,形成高尿酸血症,长期尿酸过高就引起痛风。在临床上,尿酸氧化酶被用于痛风、高尿酸血症和肿瘤溶解综合症的治疗,因此尿酸氧化酶是一种重要的医药用酶^[1]。

尿酸氧化酶在自然界广泛存在,已经发现了多种来源的尿酸氧化酶,并对其理化性质进行了研究,发现天然来源的尿酸氧化酶由于受产酶条件及产酶水平的影响,而限制了其在商业化生产中的有效应用,因此,尿酸氧化酶的异源表达逐渐成为研究热点^[2]。已经有黄曲霉(*A. flavus*)、假丝酵母(*Candida utilis*)的尿酸氧化酶基因在大肠杆菌中进行了异源表达,并获得了有

生物学活性的蛋白;国外黄曲霉尿酸氧化酶基因在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达,尿酸氧化酶的表达量占到了菌体总蛋白的13%^[3]。

本实验中合成黄曲霉尿酸氧化酶基因,并在大肠杆菌中高效表达,目的蛋白表达量占菌体总蛋白的50%以上,并且以可溶形式表达;纯化工艺简单,节省了成本,获得目的蛋白的纯度高,纯品具有生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 实验中所用菌株 JM109 购自华美公司;菌株 DH5 α 为本实验室保存;所用表达载体 pET43.1a 购自 Novagen 公司。

1.1.2 试剂 所有限制性内切酶、聚合酶、连接酶均购自 Promega 公司;胶回收试剂盒 GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit 购自 GE Healthcare 公司;质粒抽提试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。

DNA 分子量 Marker DL2000、DL15000 购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白分子量 Marker 购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化 质粒 DNA 提取采用博大泰克质粒小提试剂盒,酶切、连接、转化等方法参照分子克隆指南。

1.2.2 黄曲霉尿酸氧化酶基因的合成 黄曲霉尿酸氧化酶基因(uox)序列来自于 Genebank, cDNA 编码 303 个氨基酸。在合成的 uox 序列两端分别加酶切位点 *EcoRI* (GAATTC)、*NdeI* (CATATG) 和 *Pst I* (CTGCAG)、*SalI* (GTCGAC), 以便连接表达载体, 该序列由上海生工生物技术公司合成。

1.2.3 表达载体 pET43.1a/uox 的构建 上海生工公司提供 pUC57/uox 质粒, 利用限制性内切酶 *Nde I-Sal I* 双酶切 pUC57/uox 质粒, 凝胶电泳回收目的片段, 然后与相同酶切的表达载体 pET43.1a 连接, 经 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 在 LB 平板(含氨苄青霉素 Amp)筛选阳性克隆, 随机挑取菌株抽提质粒, 以 4 组双酶切验证重组质粒 pET43.1a/uox, 正确的质粒送上海生工进行序列测定。

1.2.4 重组蛋白的表达 重组质粒 pET43.1a/uox 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 涂布于 LB(含 Amp)平板筛选阳性克隆, 挑取转化子接种于 2ml LB(含 Amp)培养基中, 37℃, 220r/min 过夜振荡培养, 次日以 1:100 比例转接于 4ml LB(含 Amp)培养基中, 37℃ 培养 2.5~3h, 至 $OD_{600} \approx 0.6$; 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 诱导 5h; 菌体处理后以 SDS-PAGE 进行检测。

1.2.5 表达形式的鉴定 菌株 JM109/pET43.1a/uox 接种于 5ml LB(含 Amp)培养基中, 37℃, 220r/min 过夜振荡培养, 次日以 1:100 比例转接于 50ml LB(含 Amp)培养基中, 37℃ 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$; 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 诱导 5h; 以 8000r/min, 5min 离心收集菌体, 将菌体重悬于 8ml 裂解液 [50mmol/L Tris-HCl (pH8.0); 0.1% Triton; 5mmol/L EDTA-NaOH (8.0)], 超声破碎 (200W, 2s/2s, 8min), 菌体变清, 取 100 μ l 破碎液体, 12000r/min, 离心 5min, 取上清, 沉淀溶于等体积裂解液, 通过 SDS-PAGE 检测上清和沉淀中目的蛋白的表达量。

1.2.6 目的蛋白的分离纯化 以摇瓶发酵 JM109/pET43.1a/uox, 离心收集 200ml 菌体, 菌体湿重 10.1g, 超声破碎, 将菌体破碎后上清以硫酸铵沉淀, 先以 30% 硫酸铵浓度, 离心取上清, 再将上清以 50% 硫酸铵浓度, 离心取沉淀, 以 20mmol/L PBS (pH7.0) 复溶; 用 20mmol/L PBS pH7.0 的缓冲液平衡 SephadexG25

(XK16/70) 脱盐柱两个柱体积, 将复溶后的上清上样至平衡好的脱盐柱, 收集脱盐峰。将收集到的脱盐峰上样至用 20mmol/L PBS pH7.0 平衡好的阴离子交换柱 (Q Sepharose FF), 收集穿出, 流速 3ml/min; 将收集到的样品用 0.2mol/L NaH₂PO₄ 调 pH 值至 6.5, 上样至阳离子交换柱 (SP Sepharose FF), 上样结束后用 20mmol/L PBS, pH6.5, 0.5mol/L NaCl 线性洗脱 10 个柱体积, 分部收集, 电泳检测。

1.2.7 酶学活性的测定 根据参考文献报道的活性分析方法^[4], 体外酶活性分析采用分光光度法。在 pH8.4 0.1mol/L 硼酸缓冲液中溶解 0.3 μ mol 尿酸, 加入 1 μ mol 尿酸氧化酶纯品, 在 25℃ 下反应 5min, 测定尿酸在 293nm 下吸光值。酶活性定义: 在 pH8.4, 25℃ 时, 每分钟催化 1 μ mol 尿酸所需的酶量为 1 个酶单位。

2 实验结果

2.1 基因合成及质粒构建

上海生工提供 pUC57/uox 质粒以限制性内切酶 *NdeI-SalI* 双酶切, 回收 0.9kb uox 片段, 与以同样酶切的载体 pET43.1a 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得转化子, 提质粒进行双酶切验证 (图 1), 分别为 *NdeI-SalI*, *XbaI-SalI*, *SalI-ScalI* 和 *HindIII-XbaI*, 酶切验证结果如图 1。

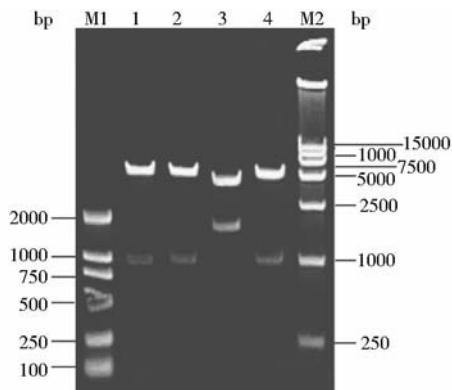


图 1 重组质粒 pET43.1a/uox 酶切验证分析

Fig. 1 Enzymatic analysis of recombinant plasmid pET43.1a/uox recombinant

M1: DL2000 marker; 1: Recombinant pET43.1a/uox digested with *NdeI* and *SalI*; 2: Recombinant pET43.1a/uox digested with *XbaI* and *SalI*; 3: Recombinant pET43.1a/uox digested with *SalI* and *ScalI*; 4: Recombinant pET43.1a/uox digested with *HindIII* and *XbaI*; 5: λ /HindIII marker

验证正确的质粒进行测序, 测序结果与 NCBI 尿酸氧化酶基因 (序列号 X61766) 进行比对。结果表明: 重

组黄曲霉尿酸氧化酶基因与文献报道的序列一致,序列正确,并且阅读框正确。

2.2 蛋白表达

表达载体 pET43. 1a/uox 转化 JM109 感受态细胞,挑取转化子以 IPTG 诱导表达,以 8000r/min,离心 5min 收集菌体,菌体经煮沸裂解,离心取上清以 12% SDS-PAGE 检测蛋白表达,结果显示目的蛋白在 JM109 中有表达,重组蛋白分子量约为 34kDa,与国外报道的分子量一致,经凝胶成像分析仪扫描,蛋白表达量占全菌总蛋白的 50% 以上(图 2)。

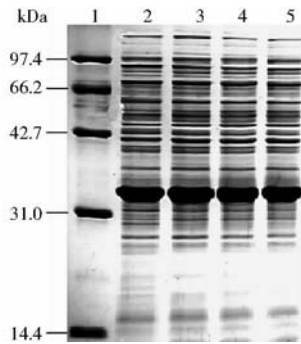


图 2 重组尿酸氧化酶蛋白表达 SDS-PAGE (12%) 电泳分析

Fig.2 Analysis of uricase produced by JM109/pET43. 1a/uox

1:Protein marker;2~5:JM109/pET43. 1a/uox induced by 1mmol/L IPTG

2.3 表达形式的鉴定

重组菌株 JM109/pET43. 1a/uox 以 1mmol/LIPTG 进行诱导表达,以 8000r/min,5min 离心收集菌体,称取 1g 湿菌用 20ml 破碎缓冲液悬浮,冰浴,超声破碎 (2s/2s, 500W,15min),离心,分别收集上清和沉淀,通过 12% SDS-PAGE 检测,结果证明蛋白以可溶形式表达(图 3)。

2.4 表达产物的纯化

以摇瓶发酵菌体,收集 10g 湿菌,以破碎缓冲液悬浮,经过超声破碎 (2s/2s, 500W, 15min),离心,上清经硫酸铵分级沉淀,进行粗分离;盐析后,收集脱盐峰过阴离子柱,尿酸氧化酶穿出,而杂质保留;穿出原液过阳离子柱,目的蛋白结合,洗脱得到纯品,最终 10g 湿菌可得到 320mg 纯品。SDS-PAGE 结果表明,纯度达到 95%(图 4)。

2.5 酶学活性的测定

在 pH8.4,25℃ 条件下测定尿酸氧化酶纯品的比活性,约为 48EAU/mg,与文献报道的酶活性一致。

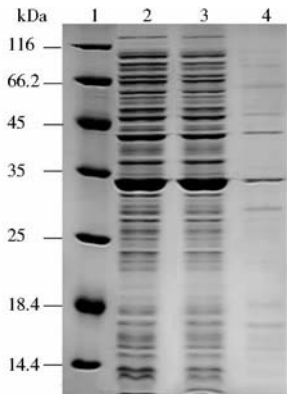


图 3 重组尿酸氧化酶蛋白表达形式 SDS-PAGE(12%) 电泳分析

Fig. 3 Analysis of uricase expression form produced by JM109/pET43. 1a/uox

1:Marker;2:Control;3:Supernatant;4:Precipitation

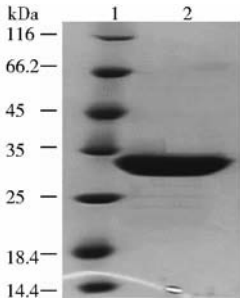


图 4 重组尿酸氧化酶蛋白纯化 SDS-PAGE (12%) 电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purification from uricase produced by JM109/pET43. 1a/uox

1:Protein marker;2:Purified uox

3 讨论

本实验克隆的黄曲霉尿酸氧化酶基因经过测序证明,该序列与国外上市酿酒酵母表达的尿酸氧化酶 DNA 序列一致,并且目的蛋白为胞内可溶性表达,经过两步纯化获得纯品,通过体外酶活性分析发现纯品具有分解尿酸的能力。

尿酸氧化酶是一种具有重要医药价值的酶。提取的天然尿酸氧化酶已上市,缺点是不但培养周期长、产率低,而且容易受病原体污染。基因工程技术为大量制备尿酸氧化酶开辟了道路。国外上市的重组尿酸氧化酶(商品名:拉布立酶)采用酿酒酵母表达体系,表达量为 13%,培养周期长,成本高^[3]。

大肠杆菌作为表达体系,具有表达稳定、操作安

全、遗传背景简单、产量高、下游工艺简单和易于工业化生产等优点,被广泛用于外源蛋白的表达^[4]。Hongoh 等^[5]将尿酸氧化酶基因在大肠杆菌中融合表达,90%的目标蛋白以包涵体的形式存在,表达量仅为20%;国内朱献军等^[6]在大肠杆菌中表达了假丝酵母的尿酸氧化酶基因,产物以可溶形式表达,占可溶性蛋白的30%。

本研究在大肠杆菌中高效表达重组黄曲霉尿酸氧化酶,目的蛋白占菌体总蛋白的50%,高于文献报道的水平^[7],并且目的蛋白以可溶形式存在;下游纯化工艺简单,经三步纯化后获得纯品纯度达95%,酶比活力可达48EAU/mg,和文献报道的水平一致。本研究产品比天然提取和酵母表达的尿酸氧化酶培养周期短、产率高,而且相对于其它文献报道,蛋白表达量高,纯化工艺简单,收率高,并具有较高的酶活性,适合大规模生产,可以满足临床需要。

参考文献

[1] 开雷、岳珂、马晓航. 尿酸氧化酶的研究及其应用. 科技通报, 2008,24(2): 183-187.
Kai L, Yue K, Ma X H. Bulletin of Science and Technology, 2008, 24(2): 183-187.

[2] 陈志禹、何秀萍、张博润. 微生物来源的尿酸氧化酶的研究进展及应用前景. 微生物学通报, 2007, 3(6): 1205-1208.
Chen Z Y, He X P, Zhang B R. Microbiology, 2007, 3(6): 1205-1208.

[3] Leplatois P, Le Douarin B. High-level production of a peroxisomal enzyme: *Aspergillus flavus* uricase accumulates intracellularly and is active in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1992, 122: 139-145.

[4] Richard Legoux, Bruno Delpech. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(12): 8565-8570.

[5] Hongoh Yuichi, Tetsuhiko Sasaki, Hajime Ishikawa. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding a uricase the yeast-like symbiont of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30: 173-182.

[6] 朱献军、刘建国、黎高翔. 尿酸氧化酶基因的克隆、表达及其产物的应用. 生物工程学报, 2001, 17(1): 68-72.
Zhu X J, Liu J G, Li G X, et al Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(1): 68-72.

[7] 吴伟立、李彦英、苗林, 等. 尿酸氧化酶的表达纯化及活性形式鉴定. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(2): 124-131.
Wu W L, Li Y Y, Miao L, et al. Bull Acad Mil Med Sci, 2005, 29(2): 124-131.

Expression, Purification and Activity Identification of Urate Oxidase in *Escherichia coli*

ZHU Lei WANG Qing-min WU Guo-dong XUE Tong-tong SUN Li-xia WANG Jing-yi

(Research and Development Institute of Qilu Pharmaceutical Limited Company, Jinan 250100, China)

Abstract Urate oxidase (uox, C 1.7.3.3) was responsible for the oxidation of uric acid to allantoin. The urate oxidase gene from *Aspergillus flavus* was cloned into expression vector of pET43. 1a. The sequence was confirmed by DNA sequencing and double endonuclease digestion, and transformed to competent cell named JM109. Recombinant strain was induced to express urate oxidase protein, and the target protein was almost the soluble protein after sonication; the uox pure was purified from supernatant after anion and cation column two-step column purification; the activity of pure uox was determined by spectrophotometry. The results showed that: urate oxidase was high level expressed in *E. coli*, and the ratio of uox to bacterial proteins could reach 50%; expression product was purified by two steps of chromatography and purification method is simple to obtain high purity protein; the protein had the activity of breaking down uric acid *in vitro*.

Key words Urate oxidase *E. coli* Efficient expression Purification