

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.011

诊断用苛求芽孢杆菌尿酸酶的剂型与储存方法

陈远翔¹, 姜海蓉¹, 彭方毅¹, 廖娟², 杨晓兰², 廖飞²

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

【摘要】目的: 考察重组苛求芽孢杆菌尿酸酶作为诊断试剂的剂型和储存方法。方法: 将此重组尿酸酶制成干粉和液体剂型于-18℃和 4℃储存, 定期测定酶活性; 在干粉制剂时加入保护剂于-18℃储存, 在液体制剂时加入防腐剂于 4℃储存, 间隔适当时间监测酶活性。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离此尿酸酶四聚体和二聚体, 染色检测蛋白和酶活性。结果: 此尿酸酶干粉和液体制剂在 4℃储存 28 d 后对应的剩余酶活性分别为 12% 和 100%, 在-18℃冻存 28 d 后对应的剩余酶活性分别为 24% 和 92%。在干粉制剂时加海藻糖、蔗糖或甘露醇作为保护剂于-18℃储存 56 d 后, 剩余酶活性对应分别为 100%、76% 和 43%。加叠氮钠或苯甲酸的液体剂型, 在 4℃储存 56 d 后对应的剩余酶活性分别为 99% 和 82%。在-18℃储存至无活性的冻干粉制剂经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 发现此尿酸酶主要以无活性二聚体存在而活性四聚体很少。结论: 此尿酸酶作为诊断试剂, 可加入叠氮钠制成液体剂型在 4℃储存。

【关键词】苛求芽孢杆菌尿酸酶; 制剂与储存方法; 酶活性; 储存稳定性

【中国图书分类法分类号】Q55

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-06-16

作者介绍: 陈远翔(1979-), 女, 硕士,

研究方向: 诊断生物技术和诊断试剂。

通信作者: 廖飞, 男, 教授, Email: liaofeish@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30672009); 重庆市科

委重点资助项目(编号: CSTC2011BA5039); 教育部科学

技术研究重点资助项目(编号: 210178)。

参 考 文 献

- [1] 王志远, 王成章, 王福祥, 等. 四氢异喹啉衍生物的合成及其抑制血小板聚集作用[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(5): 261-263.
- Wang Z Y, Wang C Z, Wang F X, et al. Synthesis and platelet aggregation inhibitory activity of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline derivatives[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2005, 36(5): 261-263.
- [2] 黄文龙, 宋学勤, 彭司勋, 等. 取代四氢异喹啉衍生物的合成及其生物活性[J]. 药学报, 1999, 25(11): 815-823.
- Huang W L, Song X Q, Peng S X, et al. The synthesis and biological activity of substituted tetrahydroisoquinoline compounds[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1999, 25(11): 815-823.
- [3] 谢宇, 胡金钢, 洪小伟, 等. 异喹啉酮类衍生物的合成研究[J]. 有机化学, 2010, 30(6): 894-897.
- Xie Y, Hu J G, Hong X W, et al. A Novel synthesis of isoquinolone derivatives[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2010, 30(6): 894-897.
- [4] 余瑜. 一种氮杂甾体化合物、制备及其用途[P]. 中国发明专利: CN1124251A. 1996-06-12.
- Yu Y. One kind of aza-steroid compound preparation and use[P]. China invention patents, CN1124251A, 1996-06-12.
- [5] Roszkowski P, Maurin J K, Zarnocki C. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ)[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2006, 17(9): 1415-1419.
- [6] Shekhter O V, Sergovskaya N L, Tsizin Y S. Reaction of 1-aminomethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline with diethyl fumarate[J]. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1985, 21(6): 665-667.
- [7] 陈洁忠, 郑小红, 段雯, 等. 1-氯甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉盐酸盐的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(3): 178-179.
- Chen J Z, Zheng X H, Duan W, et al. Preparation of 1-chloromethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals 2009, 40(3): 178-179.
- [8] 李桂珠, 刘秀杰, 王保杰, 等. 1-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉的简易合成[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(6): 337-338.
- Li G Z, Liu X J, Wang B J, et al. Synthesis of 12-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2007, 24(6): 337-338.
- [9] Beaumont D, Waigh R D, Sunbhanich M, et al. Synthesis of 1-(aminomethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and their actions at adrenoceptors in vivo and in vitro[J]. J Med Chem, 1983, 26(4): 507-515.
- [10] Nelson J, Leonard, Gerhard W, Leubner. Reactions of nitroparaffins with isoquinolinium compounds[J]. J Am Chem Soc, 1949, 71(10): 3405-3408.

(责任编辑: 张学颖)

Formulation and storage of bacillus fastidious uricase as diagnosis enzymes

CHEN Yuanxiang¹, JIANG Hairong¹, PENG Fangyi¹, LIAO Juan², YANG Xiaolan², LIAO Fei²

(1. College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology;

2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

[Abstract] *Objective:* To explore the formulation and storage methods for bacillus fastidious uricase as a diagnosis enzyme. *Methods:* Lyophilized powders of this uricase containing protective additives, and solutions of this uricase containing preservatives, were stored at -18°C or 4°C . Enzyme activity was monitored at proper intervals. Homotetramers and homodimers of this uricase were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and were stained separately for both proteins and enzyme activities. *Results:* The lyophilized powders and solution preparations of this uricase yielded the corresponding residual enzyme activities of 12% and 100%, respectively, after storage at 4°C for 28 days, and the residual enzyme activities of 24% and 92%, respectively, after storage at -18°C for 28 days. The use of trehalose, sucrose and mannitol as the protective additives in lyophilized powders gave the residual enzyme activities of 100%, 76% and 43%, respectively, after storage for 56 days at -18°C . The use of NaN_3 and benzoic acid as the preservative in the solutions gave the residual enzyme activities of 99% and 82%, respectively, after storage for 56 days at 4°C . By PAGE analyses of lyophilized powders of low activity, less active homotetramers but more inactive homodimers were observed. *Conclusion:* This uricase as a diagnosis reagent can be prepared in solutions containing NaN_3 for storage at 4°C .

[Key words] bacillus fastidious uricase; formulation and storage; enzyme activity; storage stability

尿酸酶(Uricase)以分子氧为电子受体催化尿酸氧化,最终生成尿囊素、过氧化氢和二氧化碳^[1]。动植物和细菌中均有尿酸酶;但人类尿酸酶基因发生无义突变,嘌呤分解代谢终产物为尿酸,并经肾脏排泄。尿酸生成过多或肾脏排泄障碍都会造成血清尿酸升高,即造成高尿酸血症,这是痛风的主要诱因之一^[2]。血清尿酸水平是诊断痛风及肾功的重要指标之一。基于尿酸酶高专一性测定血清尿酸称尿酸酶法,其简单、快速、灵敏度高、易于自动化,广泛用于临床检验。因此,尿酸酶是重要的诊断工具酶^[3]。

目前临床测定血清尿酸主要用尿酸酶氧化尿酸生成 H_2O_2 , 过氧化物酶使 H_2O_2 氧化无色还原型色素成为显色产物,再测定吸收确定反应体系尿酸。高尿酸血症常伴随高黄嘌呤^[4],黄嘌呤是多数尿酸酶的强效抑制剂^[5],目前市售尿酸试剂盒所用真核尿酸酶对黄嘌呤抑制都较敏感。因此,尿酸酶法测定血清尿酸需对黄嘌呤有抗性的工具尿酸酶。

本实验已克隆了苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶基因并获得其发明专利授权(专利号 ZL200910103741.1, Genbank 登录号 FJ393559);此酶用于尿酸测定时可对 1.50 mmol/L 黄嘌呤有抗性^[6,7]。诊断用尿酸酶制剂后需有足够长储存期。本文考察此尿酸酶作为诊断工具酶可能的剂型和储存方法。

1 方法

1.1 苛求芽孢杆菌尿酸酶制备

按此前方法原核重组表达苛求芽孢杆菌尿酸酶^[7,8]。将编码此尿酸酶基因的 pET28a 表达载体转化感受态 *E.coli* BL21 细胞(DE3),用卡那霉素抗性筛选;被转化细胞在 37°C 培养,加入诱导剂 IPTG(终浓度 0.8 mmol/L) 18°C 培养 18 h;离心收

集菌体,超声裂解并离心去沉淀;DEAE 纤维素柱层析用 0.10 mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液平衡;可溶性尿酸酶上此离子交换柱,先用 100 ml 含 0.10 mol/L NaCl 的 0.10 mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液洗脱,再用含 0.10~0.40 mol/L NaCl 的 Tris-HCl(pH8.0)缓冲液线性梯度洗脱,将 6.0 U/mg 以上洗脱液合并,PEG-6000 浓缩后备用。

1.2 尿酸酶活性测定

用欣茂 UV7504 紫外分光光度计测定 293 nm 吸收,缓冲液 pH9.2 的硼砂缓冲液。每分钟氧化 1.0 μmol 尿酸的酶量为 1 个单位^[7]。如未说明,尿酸浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$;每个样品重复测定 2 次。尿酸消光系数为 11.5 L/(mmol·cm)。

1.3 不同制剂方式对尿酸酶稳定性的影响

将尿酸酶制成干粉和液体剂型于 -18°C 或 4°C 储存(德国 CHRIST 101021 冷冻干燥机, -54°C , 5 h)。样品用 50 mmol/L pH9.2 的硼砂缓冲液稀释后滤菌再分装;拟冻干样品中加入 5%海藻糖、5%蔗糖和 3%甘露醇为保护剂,滤菌冻干后 -18°C 储存,用 0.45% NaCl 复溶至冻干干燥前的体积再测定酶活性;液体剂型用 50 mmol/L pH9.2 的硼砂缓冲液稀释,加入 0.01%叠氮钠或 0.03%的苯甲酸滤菌后 4°C 或 -18°C 储存,直接取样或复融后测定尿酸酶活性。每种条件下无菌制样后分装,各个时间点至少有 3 份相同样品供测试。

1.4 电泳分析冻干储存尿酸酶的高级结构

用电泳纯牛血清白蛋白和卵清白蛋白为参考,将冻干粉 -18°C 储存过程中比活性逐步下降为 3.2、1.5、0.3 U/mg 的样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE);电泳上样量相同;电泳后将凝胶从中间切开成 2 份,分别进行蛋白质染色和酶活性染色^[9]。酶活性染色时将非变性 PAGE 电泳凝胶用含 10%甘油的硼砂缓冲液中漂洗 10 min,移入含 200 U 辣根过氧化酶的 10 ml 硼砂缓冲液(pH9.2, 培养皿)中,加入尿酸

(终浓度为 0.4 mmol/L)和四甲基联苯胺, 25℃摇床避光振摇; 持续观察, 出现棕色沉淀时照相记录。

1.5 统计分析

数据为均数±标准差, 用 MS Excel 2003 进行 *t*-test 分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(图中相对起点差异显著时用 * 标示)。

2 结果与讨论

2.1 干粉和液体制剂方式储存的稳定性

诊断试剂常用干粉或液体制剂于 4℃或-18℃储存, 故将此尿酸酶制成干粉和液体制剂 4℃和-18℃储存, 观察其活性变化(图 1、2, 所有数据测定 $CV < 5\%$, $n=3$)。

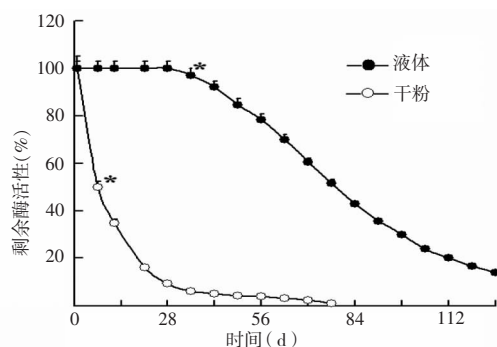


图 1 干粉和液体制剂 4℃储存尿酸酶的稳定性

Fig.1 Stability of uricase in powder and liquid at 4℃

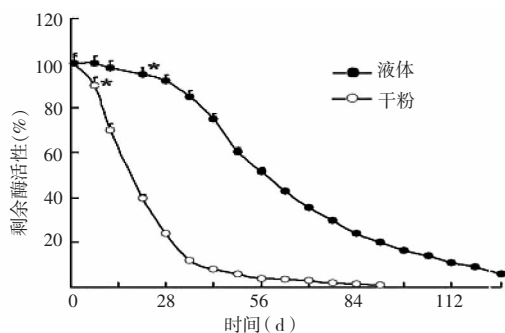


图 2 干粉和液体制剂 -18℃冻存期间尿酸酶的稳定性

Fig.2 Stability of uricase in powder and liquid at -18℃

在 4℃时, 干粉剂型中尿酸酶储存 7 d 后活性已显著下降到 50% ($P < 0.05$), 液体制剂中尿酸酶活性储存 21 d 后才出现明显下降 ($P < 0.05$), 且即使到第 35 天其剩余活性高于 85%, 而此时干粉剂型中尿酸酶活性仅余 12%; 进一步储存 126 d 后, 液体制剂中尿酸酶活性余 14% 而干粉剂型尿酸酶已无活性(图 1); 可见 4℃储存时液体制剂优于干粉剂型。在-18℃时, 干粉剂型中尿酸酶储存 7 d 后已有显著下降 ($P < 0.05$), 但其下降幅度低于在 4℃储存时的下降幅度 ($P < 0.05$); 液体制剂中尿酸酶储存 28 d 后剩余酶活性仍有 92%, 而干粉剂型中尿酸酶活性剩余仅有 24%(图 2); 可见此尿酸酶液体制剂冻存更稳定。而且, 此尿酸酶的液体制剂 4℃储存 56 d 后剩余活性显著高于在-18℃储存 ($P < 0.05$), 故此尿酸酶以液体

剂型在 4℃储存显著优于在-18℃冻存。

多数蛋白冻干剂型储存稳定性更好; 此尿酸酶的这种储存稳定性同大多数其它蛋白质不同。蛋白质冻干过程中的冻结、干燥和储存阶段有各种各样的应力, 通常包括低温应力、冻结应力(包括枝状冰晶形成、离子强度增加、pH 值改变、相分离等)、干燥应力(移去蛋白质表面单层水分子)等, 常会降低蛋白质储存稳定性^[10-15]。这些因素也可能是此尿酸酶冻干剂型储存稳定性低于溶液剂型储存的原因之一。

Anchordoquy 等^[16,17]发现在常见蛋白质冷冻干燥过程中加入海藻糖或蔗糖等可提高其冻干剂型储存稳定性。将此尿酸酶分别加海藻糖、蔗糖和甘露醇冻干在-18℃储存 7 d 后剩余酶活性分别为 100%、100%、87% ($P < 0.05$), 56 d 后剩余酶活性分别为 100%、76% 和 43%(图 3, $CV < 5\%$, $n=3$), 与未加保护剂冻干储存相比剩余酶活都显著提高 ($P < 0.05$); 但加 5% 海藻糖冻干储存 126 d 后剩余活性仍接近为零。可见, 常用冻存保护剂提高此尿酸酶冻存稳定性的效果有限, 此尿酸酶只适宜用液体制剂在 4℃保存。

长期储存过程中蛋白质降解是蛋白质活性下降的主要原因。叠氮钠和苯甲酸是蛋白质储存时最常用的防腐剂。此尿酸酶液体制剂不加防腐剂、加 0.01% 叠氮钠或 0.03% 的苯甲酸后 4℃储存, 35 d 后剩余酶活性分别为 92% ($P < 0.05$)、100%、93% ($P < 0.05$), 56 d 后剩余酶活性分别为 78%、99%、82%(图 4, $CV < 5\%$, $n=3$), 继续储存 126 d 后剩余酶活性分别为 15%、42% 和 21%。可见此尿酸酶液体制剂加防腐剂可储存 4 月, 且叠氮钠作为防腐剂优于苯甲酸 ($P < 0.05$)。

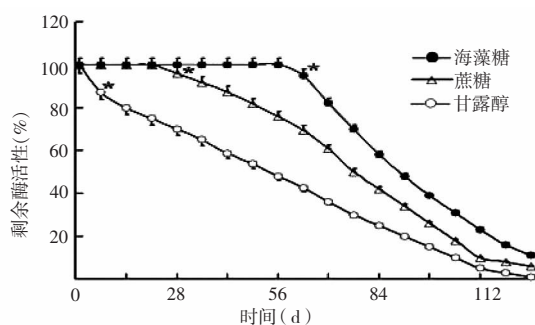


图 3 加入保护剂对干粉制剂 -18℃冻存稳定性的影响

Fig.3 Effects of additives on stability of uricase in powder at -18℃

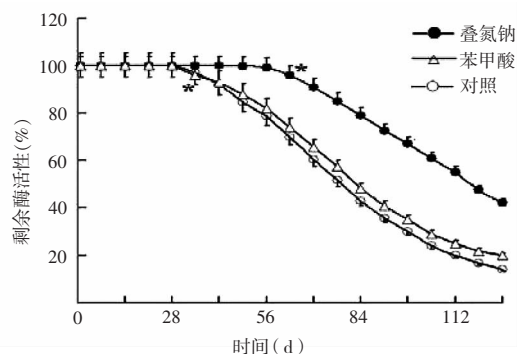


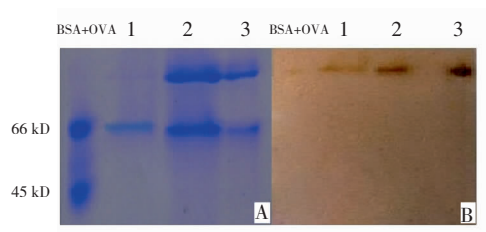
图 4 防腐剂对尿酸酶溶液 4℃储存稳定性的影响

Fig.4 Effects of preservatives on stability of uricase in solutions at 4℃

2.2 冻干样品储存失活后高级结构初步分析

冻干制剂时加入保护剂低温储存提高了酶的稳定性,但随储存时间延长酶活性仍显著下降。此尿酸酶在低离子强度时易解聚成二聚体而失去活性^[9]。为了明确冻干剂型储存过程中是否也出现此尿酸酶同四聚体的解聚而造成活性下降,将冻干尿酸酶制剂储存到很低活性后作非变性 PAGE 电泳分辨其二聚体和四聚体,并进行酶活性染色分析。

此尿酸酶等电点接近 5.0,与动物血清清蛋白接近;其亚基分子量约 36 kD,同四聚体分子量约 150 kD^[8,9]。非变性 PAGE 分析发现尿酸酶冻干剂型储存过程中,高活性样本主要由分子量约为 150 kD 四聚体和少量分子量接近 66 kD 二聚体组成;随干粉剂型储存时间延长,中等活性样品主要由二聚体组成,低活性样品则几乎没有四聚体(图 5A)。酶活性染色证实干粉剂型随储存时间延长酶活性逐渐下降,并且活性四聚体减少而且二聚体不能显示酶活性,这不同于透析解聚所生成的二聚体(图 5B)。因此,此尿酸酶在冻干制剂储存过程中活性下降可能也源于四聚体解聚生成无活性二聚体。这种冻干粉储存造成同四聚体解聚的现象很少见,其物理机制还不清楚。需详细解析冻干储存失活物理机制才有望通过冻干储存延长该尿酸酶的保存期;这对进一步将此尿酸酶开发成治疗高尿酸血症相关疾病的药物也有重要意义。



A和B的非变性 PAGE 条件和样品完全相同

1. 0.3 U/mg; 2. 1.5 U/mg; 3. 3.2 U/mg

图 5 干粉剂型尿酸酶冻存过程中结构(A)和酶活性(B)变化分析

Fig.5 Changes of structures and activities of uricase in powder at -18°C

综上,此苛求芽孢杆菌尿酸酶冻干剂型储存时四聚体会解聚成二聚体而失活,将其作为诊断工具酶时可加叠氮钠制备成液体剂型在 4°C 储存;同时,这些数据也为此尿酸酶开发成药用酶的制剂和储存提供了参考。

参 考 文 献

- [1] Ramazzina I, Folli C, Secchi A, et al. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(3):144-148.
- [2] Kutzin M K, Firestein B L. Altered uric acid levels and disease states[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(1):1-7.
- [3] Zhao Y S, Yang X Y, Lu W, et al. Uricase based method for determination of uric acid in serum[J]. Microchim Acta, 2009, 164(1):1-6.
- [4] Hande K R, Perini F, Putterman G, et al. Hyperxanthinemia interferes with serum uric acid determinations by the uricase method[J]. Clin Chem, 1979, 25(8): 1492-1494.
- [5] Liao F, Zhu X Y, Wang Y M, et al. The comparison on the estimation of kinetic parameters by fitting enzyme reaction curve to the integrated rate equation of different predictor variables[J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, 62(1): 13-24.
- [6] Liao F, Zhao Y S, Zhao L N, et al. The evaluation of a direct kinetic method for serum uric acid assay by predicting the background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(6): 497-502.
- [7] Zhao Y S, Zhao L N, Yang G Q, et al. Characterization of an intracellular uricase from *Bacillus fastidiosus* ATCC 26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic method[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2006, 45(2):75-80.
- [8] Zhang C, Yang X L, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from *Bacillus fastidiosus*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6):1298-1301.
- [9] Zhao Y S, Yang X L, Li X Y, et al. Reversible inactivation of an intracellular uricase from *Bacillus fastidiosus* via dissociation of homotrimer into homodimers in solutions of low ionic strength. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(9):2141-2144.
- [10] Imamura K, Iwai M, Ogawa T, et al. Evaluation of hydration states of protein in freeze-dried amorphous sugar matrix[J]. J Pharm Sci, 2001, 90(12):1955-1963.
- [11] Nakasako M. Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004, 359(1448): 1191-1204.
- [12] Allison S D, Randolph T W, Manning M C, et al. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 358(1):171-181.
- [13] Gabellieri E, Strambini G B. Perturbation of protein tertiary structure in frozen solutions revealed by 1-anilino-8-naphthalene sulfonate fluorescence[J]. Biophys J, 2003, 85(5):3214-3220.
- [14] Eriksson J H, Hinrichs W L, de Jong G J, et al. Investigations into the stabilization of drugs by sugar glasses: III. the influence of various high-pH buffers[J]. Pharm Res, 2003, 20(9):1437-1443.
- [15] Heller M C, Carpenter J F, Randolph T W. Application of a thermodynamic model to the prediction of phase separations in freeze-concentrated formulations for protein lyophilization[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 363(2):191-201.
- [16] Anchordoquy T J, Izutsu K I, Randolph T W. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying[J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 390(1): 35-41.
- [17] Strambini G B, Gonnelli M. Protein stability in ice[J]. Biophys J, 2007, 92(6):2131-2138.

(责任编辑:张学颖)