

## 技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000939

## 尿酸酶基因工程菌的构建与分泌表达

唐丽霞, 刘 杰, 刘先俊, 蒋 雪

(重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**将产朊假丝酵母菌尿酸酶编码基因克隆至已改造的表达载体 pET-28a 中,使尿酸酶在大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)中以分泌的形式持续表达,并具有生物学活性。**方法:**①利用重组 PCR 技术删除 pET-28a 中 Lac O 和 Lac I 序列构建表达载体;②金黄色葡萄球菌蛋白 A(Staphylococcal Protein A, SPA)信号肽编码基因与尿酸酶基因 N 端融合成目的基因;③将目的基因克隆至表达载体中,再转化至 *E.coli* DH5α 中,使之表达;④利用 SDS-PAGE 鉴定并测定表达产物生物学活性。**结果:**尿酸酶在 *E.coli* 中以分泌的形式持续表达,并具有生物学活性。**结论:**利用肠道内正常菌群 *E.coli* 构建可分泌、持续表达蛋白的载体 pET-28a-sUOX,可将表达的尿酸酶作用于高尿酸血症模型上,为应用于动物实验通过肠道降低尿酸水平提供依据。

**【关键词】**尿酸酶;大肠埃希菌;分泌;持续表达

**【中图分类号】**Q782

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2015-11-28

## Construction and secretory expression of gene engineering bacteria of uric acid enzyme

Tang Lixia, Liu Jie, Liu Xianjun, Jiang Xue

(Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To clone uricase encoding gene in *Candida utilis* into the modified expression vector of pET-28a, and to make the uricase gene in *Escherichia coli* (*E.coli*) continuously express in secreted form with biological activity. **Methods:** To construct expression vector pET-28a, RT-PCR method was used to delete the Lac O and Lac I sequence of pET-28a. The target gene was fused by the the N-terminal of uricase encoding gene and the signal peptide of protein A in *Staphylococcus aureus*. The fusion gene was cloned into the expression vector pET-28a, then transformed into *E.coli* DH5α and expressed. The biological activity of expression product was identified and measured by SDS-PAGE gel electrophoresis. **Results:** The uricase gene in *E.coli* was continuously expressed with biological activity in secreted form. **Conclusion:** As the normal flora in the gut, *E.coli* can be used to construct the expression vector pET-28a-sUOX, which has secrete protein effect. Expression of uricase can be applied to the hyperuricemia model, which provide a basis for reducing uricase level through intestine.

**【Key words】**uricase; *Escherichia coli*; secretion; continuously express

尿酸是嘌呤分解代谢产物,部分动物将尿酸通过尿酸酶(Uricase, EC1.7.3.3)的作用转化为水溶性更好的尿囊素排出体外,由于人类在进化过程中尿酸酶基因发生突变,影响尿酸酶的折叠和活性中心的形成<sup>[1]</sup>,进一步影响了尿酸的排出。当人体内尿酸生成超过肾脏排泄能力时血清尿酸会显著升高,引

起高尿酸血症而危害人体健康。已经证实,体内尿酸增多主要由于尿酸排泄减少所致<sup>[2]</sup>。尿酸约 2/3 经过肾脏排泄,肾小管尿酸排泄机制通常采用“四组分”模型学说<sup>[3]</sup>来解释,例如,苯溴马隆通过作用于肾小管转运子尿酸盐转运蛋白 1 促进其对尿酸的分泌,达到降尿酸作用<sup>[4]</sup>,但尿酸水溶性有限,增加肾脏尿酸排泄通常易引起肾脏尿酸结石,加重对肾功能损害。尿酸在肠道的排泄约占 1/3,可以在尿酸酶的作用下随粪便排出,但对其在肠道的转运、代谢和机制研究较少。本实验通过构建以分泌的形式持续表达(便于在肠道内表达目的基因)尿酸酶的

作者介绍:唐丽霞, Email: 937204392@qq.com,

研究方向:生物化学与分子生物学。

通信作者:蒋 雪, Email: jiangxue868@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81001017)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160513.0958.024.html>

(2016-05-13)

载体,将分泌表达的尿酸酶作用于高尿酸血症模型上,为通过肠道降低尿酸水平提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒 产朊假丝酵母菌 CGMCC2.120 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,其余菌种由本校微生物实验室提供。

1.1.2 实验试剂 限制性内切酶、 $T_4$  DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶和 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;UNIQ-10 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒、细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、引物合成购自上海生工;硫酸卡那霉素购自 Sigma 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的获取及 pET-28a 载体的改造 以金黄色葡萄球菌 ATCC6538 为模板 PCR 扩增 SPA 信号肽编码基因。引物序列如下表:上游引物 SF 引入 *Nco* I 酶切位点;下游引物 SR 引入 *Nde* I 酶切位点,反应条件为 94 ℃,5 min;94 ℃ 1 min 67 ℃ 30 s 72 ℃ 1 min 共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。再以产朊假丝酵母菌为模板,PCR 扩增尿酸酶编码基因,引物序列如表 1。上游引物 NF 引入 *Nde* I 酶切位点;下游引物 NR 引入 *Xho* I 酶切位点,反应条件为 94 ℃,5 min;然后 94 ℃ 1 min,46 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后纯化回收。将纯化回收后的 SPA 信号肽编码基因和尿酸酶编码基因用 *Nde* I 酶切,胶回收,连接,称为 sUOX 目的基因。利用 PCR 技术以 pET-28a 为模板,用高保真 *Taq* DNA 聚合酶扩增,以删除 Lac I 和 Lac O 序列,使之不需要 IPTG 等诱导剂的作用下表达目的基因。引物分别为 Lac I 下游序列 V1F、Lac O 上游序列 V1R;Lac O 下游序列 V2F、Lac I 上游序列 V2R。引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物序列  
Tab.1 The list of primer sequences

| 引物  | 序列(5'~3')                                                     | 大小<br>(bp) |
|-----|---------------------------------------------------------------|------------|
| SF  | CATGCCATGGCATGACTTTACAAATAC                                   | 143        |
| SR  | GGAATTCCATATGGCATTTGCAGCAGGTGTTA                              |            |
| NF  | GGAATTCCATATGTCAACAACGCTCTCATC                                | 912        |
| NR  | CCGCTCGAGCTT ACA ACT TGG TCT TCT CCT                          |            |
| V1F | CTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCCGGGATCTC<br>GACGCTCTCCCTT           | 327        |
| V1R | AGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGCCTATAGTC<br>AGTCGTATTAATTTTCGCGGGAT |            |
| V2F | CCTCTAGAAATAATTTTGTCTTAACCTTAAGAAGG<br>AGATATACC              | 3 855      |
| V2R | GCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCAC                                |            |

PCR 反应条件为:V1:94 ℃,5 min; 然后 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。V2:94 ℃,5 min; 然后 94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min 共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,纯化回收。利用 overlap PCR 技术<sup>[6]</sup>将 V1、V2 两端序列重组,引物分别为 V2F、V1R,PCR 反应条件为:94 ℃,5 min;然后 94 ℃ 1 min, 65 ℃ 30 s,72 ℃ 4.5 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。片段重组,50 ℃,反应 20 min,1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 重组表达载体 pET-28a-sUOX 的鉴定 纯化后的目的基因与 pET-28a 载体分别用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切,进行连接反应,连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态中,涂布含 50  $\mu$ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 琼脂平板,挑选阳性克隆并提取质粒,然后进行酶切鉴定和序列测定。重组质粒命名为 pET-28a-sUOX。

1.2.3 尿酸酶的分泌表达 挑选鉴定的阳性重组子接种于 LB 培养基(含 50  $\mu$ g/mL 硫酸卡那霉素)中,37 ℃150 r/min 振荡培养。以 1:20 比例接种于含 LB 培养基的培养瓶中,37 ℃ 继续培养,以胞内尿酸酶为对照,在 6、9、12、15、18 h 取样做 SDS-PAGE 分析,以确定最佳表达时间。

将培养液 6 000 r/min 离心 20 min,收集上清后加硫酸铵饱和溶液并慢慢搅拌<sup>[6]</sup>,至有沉淀析出,沉淀用咪唑(pH 8.0)缓冲液溶解,透析 24 h 后过相同缓冲液平衡的镍层析柱,用两倍树脂体积的含 20 mmol/L Tris-HCl 的 500 mmol/L 咪唑(pH 8.0)缓冲液洗脱,至洗脱液吸光度在 280 nm 基线处。将洗脱液合并,饱和硫酸铵沉淀,透析过夜后用 12% 的 SDS-PAGE 分离鉴定。随后测定尿酸酶活性,酶活力单位定义为:在 37 ℃下,每分钟催化 1  $\mu$ mol 尿酸氧化所需的酶量为 1 个酶活力单位<sup>[7]</sup>。同时用 Bradford 检测法测定蛋白质含量。

## 2 结果

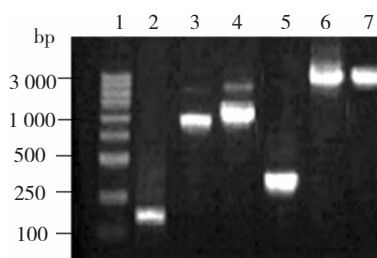
### 2.1 目的基因及 pET-28a 载体改造结果

分别从金黄色葡萄球菌和产朊假丝酵母菌中 PCR 扩增 SPA 信号肽编码基因和尿酸酶编码基因,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见,分别呈现 912 bp 和 143 bp 的目的条带,经连接两段目的基因呈现 1 045 bp 条带,测序结果与预期核苷酸序列一致,表明核苷酸序列完全正确;以 pET-28a 载体为模板,PCR 技术删除 Lac I 和 Lac O 序列,呈现 327 bp 和 3 855 bp 目的条带,经 overlap PCR 技术重组两段目的基因呈现 4 182 bp 条带(见图 1),测序结果与预期核苷酸序列一致,表明核苷酸序列完全正确。

### 2.2 重组表达载体 pET-28a-sUOX 的构建及鉴定

经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见,重组表达载体 pET-28a-sUOX 用 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切后,呈现约 1 000 bp 的条带(见图 2),证明 sUOX 基因成功克隆到表达载体 pET-28a-

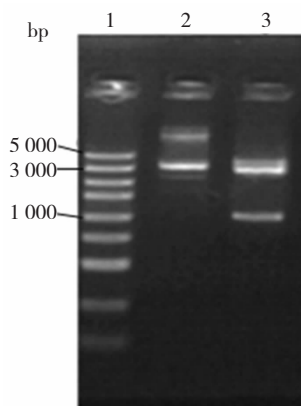
sUOX 上。经测序分析,核苷酸序列完全正确。



1:DNA 标志物(DL5000);2:SPA 信号肽;3:尿酸酶;4:sUOX 目的基因;5~6:pET-28a 载体改造(删除 Lac I 和 Lac O);7:pET-28a 载体改造后电泳结果

图 1 PCR 产物与载体 pET-28a-sUOX 改造结果

Fig.1 Results of PCR produces and reform vector in pET-28a-sUOX



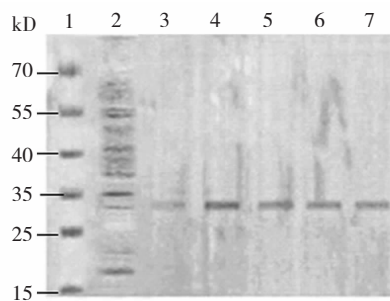
1:DNA 标志物(DL5000);2:pET-28a-sUOX 提取;3:双酶切

图 2 提取 pET-28a-sUOX 质粒及双酶切电泳结果

Fig.2 Results of plasmid extraction and double digestion in pET-28a-sUOX

### 2.3 目的蛋白在 *E.coli* 中的分泌表达及条件优化

pET-28a-sUOX 转化至 DH5 $\alpha$  后不同培养时间取上清液做 SDS-PAGE 分析(以胞内尿酸酶为对照)。如图 3 结果表明,在 34 kD 处有明显条带,与预期目的蛋白分子量一致,在 9 h 可得到最大表达量。测得酶活性为 2.99 U/mg。



1:蛋白标志物(70 kD);2:对照组;3~7:pET-28a-sUOX 蛋白表达量(6、9、12、15、18 h)

图 3 尿酸酶不同时间分泌表达

Fig.3 Secreted expression of uricase at different time points

## 3 讨论

随着人们生活水平的提高、饮食结构的改变,近年来原发性高尿酸血症的发生率呈明显升高趋势,高尿酸血症除可引起痛风、肾功能不全外,也与肥胖症<sup>[7]</sup>、高脂血症、高血压病<sup>[8]</sup>、糖尿病、动脉粥样硬化<sup>[9]</sup>等疾病呈显著正相关。为了将体内尿酸转化为水溶性更好的尿囊素随粪便排出体外,本研究成功构建了 pET-28a-sUOX 尿酸酶工程菌,该表达载体不需要 IPTG 等诱导便将尿酸酶分泌到肠道中,具有 2 个优势。第一是 IPTG 具有潜在毒性,持续表达可避免有毒物质的吸收,便于在肠道表达尿酸酶。由于肠黏膜有半透膜特性,不仅可阻止肠道尿酸吸收入血,也可加速血尿酸向肠道的扩散<sup>[10]</sup>,进而达到降低血尿酸的双重效果。第二是 SPA 信号肽引导尿酸酶到达并通过内质网修饰加工,SPA 信号肽被切割下来,尿酸酶被分泌到胞外,可避免强启动子造成的包涵体使降尿酸作用下降,从而增强尿酸酶在肠道的表达。通过肠道途径增加尿酸排出,它与传统的、通过增加肾脏尿酸排出不同,可以避免通过肾脏排泄尿酸结石而加重对肾功能的损害<sup>[11]</sup>;通过肠道菌群表达的尿酸酶,由于其不能进入血液中,即使长期应用也不会导致机体产生抗体而影响疗效。和胞内表达相比<sup>[12]</sup>,分泌表达的量较低,在时间条件优化后,结果仍不能令人满意,故需继续探索条件增加酶分泌表达量,如优化培养基成分及含量、最适温度、pH 值、硫酸铵分级沉淀等。同时,可在 SPA 信号肽 N-区和/或疏水片段连接 1 个亲水增强序列作为分泌增强子,提高尿酸酶的分泌效率。由于双歧杆菌是既不产生内、外毒素,也不产生致病物质和有害气体的益生菌,并且可调节胃肠障碍、维护肠道正常菌群的平衡,因此,本课题组下一步将以双歧杆菌为宿主菌进行分泌表达。同时,将分泌表达的尿酸酶作用于高尿酸血症模型<sup>[13]</sup>上,为探索高尿酸血症通过肠道降低尿酸水平这一治疗手段提供新依据。

## 参 考 文 献

- [1] Kratzer JT, Lanasa MA, Murphy MN, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(10): 3763-3768.