

微生物尿酸氧化酶的筛选、酶学性质及重组表达

咸静女, 郭鑫, 李波, 彭海波, 汪小龙, 张建业, 陈刚

中国海洋大学, 山东 青岛 266007

咸静女, 郭鑫, 李波, 等. 微生物尿酸氧化酶的筛选、酶学性质及重组表达. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1147-1155.

Xian JN, Guo X, Li B, et al. Screening, characterization and expression of microbial urate oxidase. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1147-1155.

摘要: 尿酸氧化酶 (Urate oxidase, Uox) 是一种催化尿酸氧化为尿囊素的酶, 常用于尿酸的检测以及痛风和高尿酸血症治疗。文中从土壤中筛选出一株 Uox 高产菌株 OUC-1, 经 16S rRNA 部分基因序列分析, 与苛求芽孢杆菌 *Bacillus fastidiosus* 序列相似度达 99%。*B. fastidiosus* OUC-1 的 Uox 经纯化后, 分析表明该酶反应最适 pH 和温度分别为 10.0 和 40 °C; Uox 以尿酸为底物反应动力学参数 K_m 值为 (0.15 ± 0.04) mmol/L ($n=5$)。Mg²⁺ 能够提高该酶活性, 而 Zn²⁺ 和 SDS 能强烈抑制该酶的酶活。参考 GenBank 中苛求芽孢杆菌基因组中的 *uox* 基因序列, 成功扩增出 *uox* 基因, 通过 SWISS-MODEL 对 Uox 空间结构进行预测, 推测该酶是同源四聚体, 单亚基分子量为 35.38 kDa。文中将 *uox* 基因克隆并在大肠杆菌中表达, 为后续的 Uox 的性能改造提供条件和技术支持。

关键词: 尿酸氧化酶, 苛求芽孢杆菌 OUC-1, 酶学性质, 重组尿酸氧化酶

Screening, characterization and expression of microbial urate oxidase

Jingnü Xian, Xin Guo, Bo Li, Haibo Peng, Xiaolong Wang, Jianye Zhang, and Gang Chen

Ocean University of China, Qingdao 266007, Shandong, China

Abstract: Urate oxidase (Uox), an enzyme catalyzing oxidation of uric acid to allantoin, is widely used as diagnostic reagents and for treatments of uarthritis and hyperuricemia diseases. In our study, a higher Uox producer, bacterial strain OUC-1, was isolated from soil samples. The 16S rRNA gene sequence of strain OUC-1 showed 99% identity to the homologous fragments of *Bacillus fastidiosus*. After purification, Uox showed the optimal pH and temperature was 10.0 and 40 °C. The K_m value of Uox was (0.15 ± 0.04) mmol/L ($n=5$) with uric acid as the substrate. Uox activity was enhanced by Mg²⁺, and seriously inhibited by Zn²⁺ and SDS. Then the *uox* gene of *B. fastidiosus* OUC-1 was amplified and sequenced. The 3D structures of Uox, predicted with SWISS-MODEL, showed a homotetramer structure with a subunit molecular weight of 35.38 kDa. Finally, the gene coding for the *B. fastidiosus* Uox was successfully cloned and heterologously expressed in *E. coli*, which provides theoretical basis and technical support for improvement of Uox in the future.

Received: December 27, 2017; **Accepted:** February 26, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 41476090).

Corresponding author: Gang Chen. E-mail: chengang@ouc.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 41476090) 资助。

网络出版时间: 2018-03-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180326.0926.002.html>

Keywords: urate oxidase, *Bacillus fastidiosus* OUC-1, enzymatic properties, recombinant urate oxidase

尿酸氧化酶 (Urate oxidase, Uox, EC1.7.3.3) 是生物体内嘌呤代谢的关键酶, 催化尿酸氧化形成尿囊素。研究发现许多物种中有 Uox 存在, 然而在高等哺乳动物尤其是猿和人类体内却缺乏具有生物活性的 Uox^[1], 尿酸在人体内的累积可导致痛风症^[2-4]。近年来随着饮食结构和生活方式的改变, 摄入嘌呤成分的增多, 调查发现成年人痛风发病率呈逐渐上升的趋势^[5], 同时流行病学和临床研究证实了血液中尿酸升高与心血管疾病的发生有重要的关联^[6-7]。

随着研究的深入, 在尿酸的检测、痛风和高尿酸症治疗方面, Uox 的应用潜力也逐渐被发现^[8-9]。利用 Uox 检测尿酸的方法具有简单、快速、特异性强的优点而成为常用的临床检测方法^[10]。此外 Uox 在疾病治疗方面可通过直接注射 Uox 快速降低血液中的尿酸含量, 用于痛风症的长期治疗^[11]。研究发现自然界中存在大量的微生物来源的 Uox 资源^[12-14], 这些野生菌产生的 Uox 虽然在体外具有一定降解尿酸活性, 但由于结构和稳定性上的缺陷, 限制了其在检测和临床的应用。因此利用工程菌株异源表达 *uox* 基因, 并通过分子杂交和理性设计等手段改造 Uox 是获得具有临床价值药物的重要途径。

本研究通过从环境微生物中筛选高产 Uox 菌株, 发酵后纯化 Uox, 并对最适温度、pH 等酶学性质进行探究。通过合理设计引物扩增该菌的 *uox* 基因, 进行克隆和在大肠杆菌中异源表达, 为后续 *uox* 基因突变表达库的构建及筛选高稳定性和高底物亲和力的 Uox 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

本研究采用的菌株大肠杆菌 *Escherichia coli*

DH5 α 、BL21 和质粒 pET28a 等为本实验室保存。

1.1.2 培养基及试剂

尿酸降解微生物富集培养基 (g/L): 硫酸镁 0.5, 氯化钠 0.1, 磷酸氢二钾 0.5, 磷酸二氢钾 0.5, 尿酸 2, pH 7.0; 固体分离培养基添加 2% 的琼脂。

产尿酸氧化酶发酵培养基(L): 蛋白胨 10 g, 蔗糖 20 g, 氯化钠 0.5 g, 硫酸镁 1 g, 磷酸二氢钾 1 g, 硫酸亚铁 10 mg, 尿酸 1.5 g, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 产尿酸氧化酶菌株的筛选

称取 5 g 不同环境来源的土壤样品, 加入到富集培养基于 30 °C、120 r/min 振荡富集培养 3-5 d。梯度稀释后涂布在含有尿酸的筛选培养基上培养, 挑取含有透明圈的菌落, 经分离纯化后, 接种在发酵培养基中培养 3-5 d, 检测发酵液中 Uox 的活性, 筛选出高产 Uox 的菌株进行进一步测试。

1.2.2 菌株生长和尿酸氧化酶活性检测

产酶发酵过程中定时取样检测菌体生长和发酵液 Uox 酶活。菌体生长通过检测 OD_{600} 的值确定。Uox 活性根据文献^[15-16], 将每分钟转换 1 μmol 尿酸的量定义为单位酶活。检测反应液尿酸溶液在 293 nm 紫外光下吸光值单位时间的减少量来确定。具体公式如下:

$$\frac{(\text{空白}A_{293} - \text{测试}A_{293})/\text{时长} \times \text{体积} \times \text{倍数}}{12.6 \times \text{酶测试液总体积}}$$

1.2.3 产酶菌株 16S rRNA 基因测序及鉴定

提取产酶菌株的基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增^[17-18]。扩增产物经纯化测序后, 序列通过 PubMed 数据库中的 Blast 工具与 GenBank 中核酸序列进行比对分析, 确定与已知菌种的相似关系。DNA 测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.4 产酶菌株 Uox 的纯化

产酶菌株发酵结束后, 离心分别获取菌体和

发酵液。菌体经超声破碎离心收集上清液,即粗酶液。将胞内外粗酶液经 50 mL 透析管 (10 kDa) 初步脱盐浓缩后,通过 AKTA 蛋白纯化系统依次经 DEAE-52 阴离子交换层析^[19]和丙烯基葡聚糖 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析^[20]对 Uox 酶进行进一步纯化。

1.2.5 Uox 酶学性质分析

将纯化好的 Uox 酶液加入合适的反应体系中,分析温度 (25 °C、28 °C、30 °C、32 °C、35 °C、37 °C、40 °C、42 °C、45 °C、48 °C、50 °C、52 °C、55 °C、58 °C、60 °C)、pH (7–12)、常见离子 (Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Ca^{2+}) 及酶抑制剂 (EDTA、咪唑、SDS) 对 Uox 酶活的影响,每组实验分别设置 3 个平行组。

在酶热稳定性研究中,反应液分别经不同温度处理 10、20、30 min 后检测酶活变化;检测金属离子对 Uox 影响实验中,离子的浓度设置为 0–6 mmol/L,除 Ca^{2+} 使用 CaCl_2 外,其他金属离子都使用其硫酸盐化合物;检测酶抑制剂 EDTA、咪唑、SDS 对 Uox 活性的影响,抑制剂的浓度分别设置为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 mmol/L。

1.2.6 苛求芽孢杆菌 *Bacillus fastidiosus* OUC-1 的 Uox 米氏常数 (K_m) 测定

在 25 °C 条件下,0.2 mmol/L 硼酸钠反应体系 (pH 9.0) 中,测试不同浓度的尿酸 (0.1–0.5 mmol/L) 底物,在 293 nm 处 1 min 内光吸收的减少量。根据 Lineweaver Burk 法^[21]作图计算该尿酸酶的 K_m 。

1.3 苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1 来源的 *uox* 基因的克隆、表达

uox 基因扩增:根据 GenBank 中已知 *uox* 的保守序列设计扩增 *B. fastidiosus* OUC-1 菌的 *uox* 基因全序列的引物^[22–23],为便于克隆测序,分别在正向和反向引物序列的 5'端引入酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点,具体引物序列如下。正向引物 UoxF: 5'-CGGG ATCCATGTTTTATGGTAAAGGCG-3'; 反

向引物 UoxR: 5'-CCCAAGCTTTCATAGTGCA ACATACTCCG-3'。PCR 扩增参考文献[24–25]进行。

uox 表达载体 pET28a/*uox* 的构建:*uox* 基因 PCR 扩增产物和质粒 pET28a 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后回收纯化,经 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,构建成重组质粒 pET28a/*uox*,重组质粒序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

大肠杆菌重组表达 Uox 蛋白的分离纯化:含有 Uox 重组子表达的工程大肠杆菌经发酵、IPTG 诱导表达后 48 h 收获菌体,7 500 r/min 离心 20 min 后收集菌体,菌体经超声波破菌后离心,上清和重悬的沉淀分别经 12% SDS-PAGE 分析来确定其为胞内可溶或包涵体表达,重组蛋白通过 AKTA 蛋白纯化系统,经亲和层析柱纯化^[26]后检测酶活。

2 结果与分析

2.1 产尿酸氧化酶菌株的筛选和鉴定

经过富集筛选从环境样品中纯化出 9 株具有产透明圈的菌株,经 PCR 扩增 16S rRNA 部分序列并测序进行序列比对后,根据 GenBank 中菌落序列的相似性比对结果 (序列相似度>98%),初步鉴定 *uo*-331、*uo*-332、*uo*-333、*uo*-334、*uo*-335、*uo*-338 为芽孢杆菌属,*uo*-336、*uo*-411 为假单胞菌属,*uo*-412 为微杆菌属。根据透明圈的大小和发酵液酶活的初步测试,*uo*-338 菌株的酶活最高,其 16S rRNA 序列与苛求芽孢杆菌基因序列 (NR_113989) 相似性>99%。菌株经进一步的生理生化分析后确认为苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1,以下实验将针对该菌 Uox 酶进行研究。

2.2 *B. fastidiosus* OUC-1 的生长和产酶曲线测定

实验结果 (图 1) 显示,*B. fastidiosus* OUC-1 经发酵培养 36 h 时生长量达到最高,随后菌株的

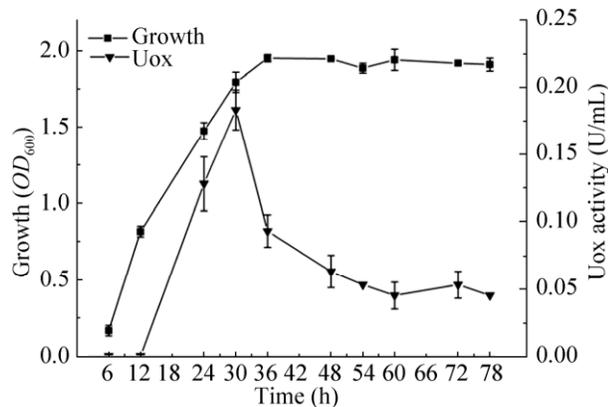


图1 *B. fastidiosus* OUC-1 的生长和酶活测定
Fig. 1 Growth and enzyme production curve of *B. fastidiosus* OUC-1.

表1 纯化过程的酶活和比酶活

Table 1 Enzyme activity and specific enzyme activity

Purifying process	Endoenzyme		Exoenzyme	
	Enzyme activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)	Enzyme activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)
Crude enzyme	0.28	4.60	0.11	0.85
Ultrafiltration	0.34	11.70	0.18	1.73
DEAE	0.42	16.80	0.26	5.73
Gel filtration	0.84	23.33	0.38	11.35

OD_{600} 值趋于稳定。发酵液酶活在培养 12 h 前未检测到 Uox 活性, 24 h 酶活达 0.128 U/mL, 到 30 h 时酶活性最高, 达到 0.183 U/mL, 随后酶活性逐渐下降。

2.3 *B. fastidiosus* OUC-1 产 Uox 的纯化

实验中发酵液及菌体内都检测出 Uox 酶活性, 发酵后细胞粗酶液经超滤浓缩和进一步的离子交换、凝胶层析纯化后, 胞内外 Uox 酶活都有不同程度的提高 (表 1), 胞内 Uox 的比酶活提升了 5 倍, 胞外 Uox 的比酶活则提升了 13 倍。SDS-PAGE 结果 (图 2) 也表明 Uox 经纯化后纯度明显提高, 且主要分布在 35–40 kDa 之间。

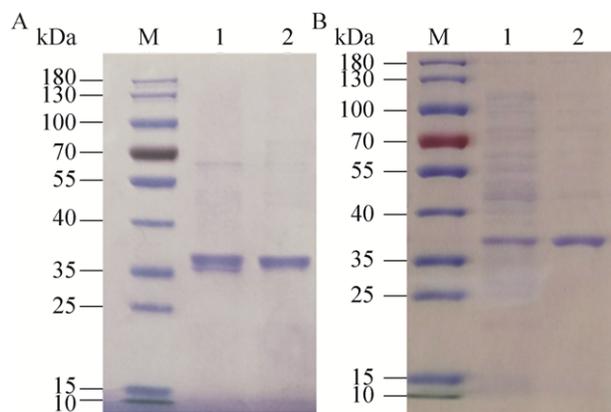


图2 OUC-1 胞外 (A)、胞内 (B) 纯化 Uox 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of exoenzyme and endoenzyme purification. (A) Lane 1: unpurified exoenzyme; Lane 2: purified exoenzyme. (B) Lane 1: unpurified endoenzyme; Lane 2: purified endoenzyme.

2.4 苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1 来源 Uox 的酶学性质

2.4.1 Uox 的最适反应温度及热稳定性研究

实验结果显示 (图 3), 40 °C 为该酶的最适反应温度。温度从 25 °C 升高到 40 °C 时, *B. fastidiosus* OUC-1 的 Uox 活性随温度的升高处于较平稳的状态, 在 40 °C 热处理 10 min 后达到最高。当温度从 48 °C 增高到 55 °C 以上时, 酶活从高点快速下降到 8% 左右, 并随着处理时间的延长, 其酶的热稳定性也呈下降趋势, 尤其是在 50 °C 和 52 °C 热处理 30 min 后酶活衰减较快。温度继续升高到 60 °C, 酶活一直保持在较低的水平, 此时延长热处理时间并不能使酶活快速降低。

2.4.2 pH 对 Uox 酶活性的影响

以 pH 9.0 为参照, 实验结果显示 (图 4),

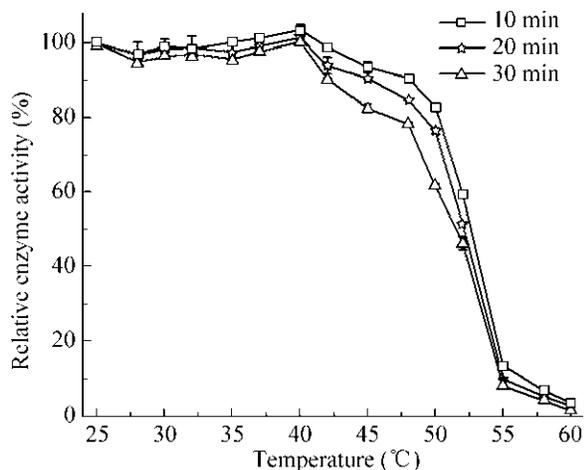


图3 温度对 Uox 酶活的影响
Fig. 3 Effect of temperature on Uox.

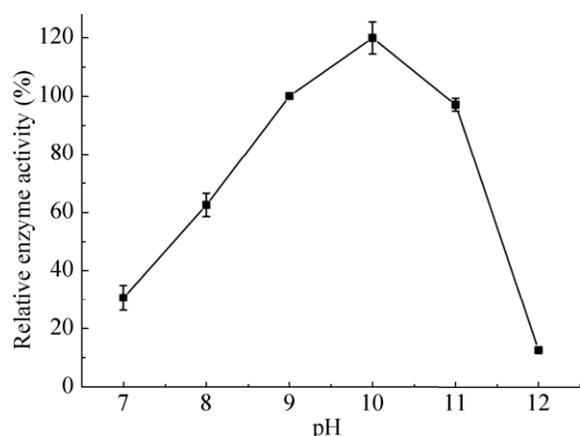


图4 pH 对 Uox 酶活的影响
Fig. 4 Effect of pH on Uox.

反应体系的 pH 从 7.0 升高到 10.0 过程中, Uox 的相对酶活从 30% 升高到 120%, 之后随 pH 从 10.0 升高到 12.0, 酶活呈快速下降趋势, 该 Uox 酶的最适 pH 应在 10.0 左右。

2.4.3 不同金属离子对 Uox 活性的影响

实验结果 (图 5) 显示出 Zn^{2+} 对 Uox 酶活性有明显的抑制作用, 在较低浓度 (0.5 mmol/L) 时 Uox 相对酶活为 11.15%; 而 Mg^{2+} 随着浓度的增加能显著提高 Uox 酶的活性, 当浓度达到 6 mmol/L 时, 相对酶活高达 163.27%。 K^+ 和 Ca^{2+} 在测试浓度范围

内对酶活无明显影响。而 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 随着浓度升高, 其对 Uox 的抑制作用明显, 金属 Mn^{2+} 离子在测试浓度范围可能对 Uox 活性略有抑制。

2.4.4 抑制剂对 Uox 活性的影响

图 6 结果表明 Uox 酶活随着 SDS 浓度升高而迅速降低, 尤其当 SDS 浓度高于 3 mmol/L 时, Uox 几乎没有活性。咪唑在 0.5–8 mmol/L 浓度范围内对 Uox 无明显影响。EDTA 作为常见的金属螯合剂, 在 0.5 mmol/L 时相对酶活高达 134%, 对 Uox 具有明显促进作用, 但随着浓度的持续升高 (>4 mmol/L), 其促进作用减弱到对照的酶活水平。

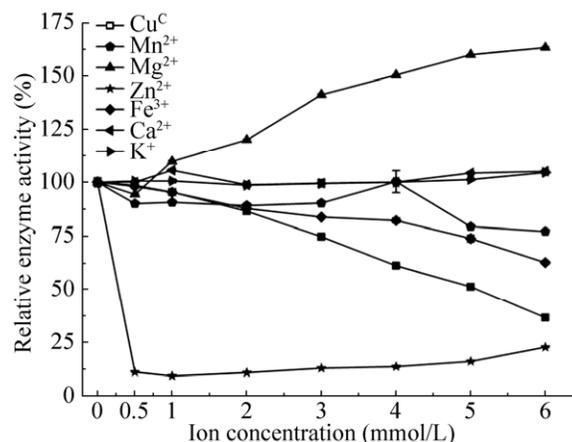


图5 不同离子对 Uox 酶活的影响
Fig. 5 Effect of ions on Uox.

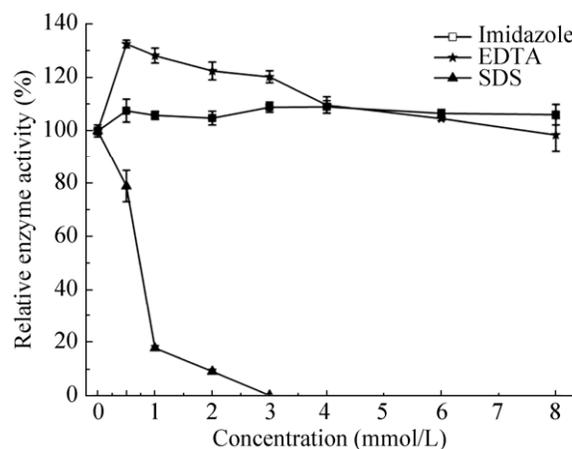


图6 常见酶抑制剂对 Uox 酶活的影响
Fig. 6 Effect of inhibitors on Uox.

2.5 Uox 的米氏常数 (K_m) 和 V_{max} 测定

根据 Lineweaver Burk 作图法求得苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1 尿酸氧化酶的 K_m 为 (0.15 ± 0.04) mmol/L ($n=5$) (图 7), V_{max} 为 0.021 mol/(L·min)。米氏方程为: $1/V=7.01/S+46.57$ 。

2.6 *uox* 基因的克隆和重组表达

2.6.1 *uox* 基因的扩增及表达载体的构建

以苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1 的基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增出大小约为 900 bp 的 DNA 片段, 测序后序列经 NCBI 网站的 ORF Finder 转换为蛋白质序列, 利用 SWISS-MODEL 建模推测该酶为同源四亚基, 单亚基的分子量为 35.38 kDa, 等电点 pI 为 5.1。*B. fastidiosus* OUC-1 的 *uox* 基因序列通过 NCBI 网站的 blastn 和 blastp 分析工具与 GenBank 中的已知 *uox* 基因和 Uox 酶蛋白质进行比对, 发现与已报道^[27] 的 *B. fastidiosus* ATCC 29604 的 *uox* 基因和 Uox 序列高度相似, 同源性分别达到 96% 和 97.5%, 但单亚基的氨基酸序列上存在 7 个氨基酸的差别: D103S、K118Q、K207Q、A215P、T230S、N234T、E236D。

通过进化树分析 (图 8) 可看出 *B. fastidiosus* OUC-1 的 Uox 与其他种类 Uox 的同源性相对较低。利用 UniProt 网站数据库中蛋白比对推测该菌的 Uox 活性位点为 65 位苏氨酸 (T) 和 66 位的天冬氨酸 (D)、175 位的苯丙氨酸 (F) 以及 192 位的精氨酸 (R)。

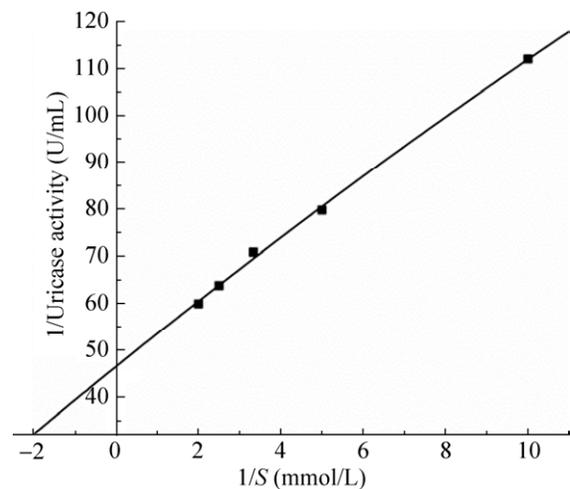


图 7 双倒数作图法测定 K_m

Fig. 7 The K_m and V_{max} values of Uox produced by *B. fastidiosus* OUC-1.

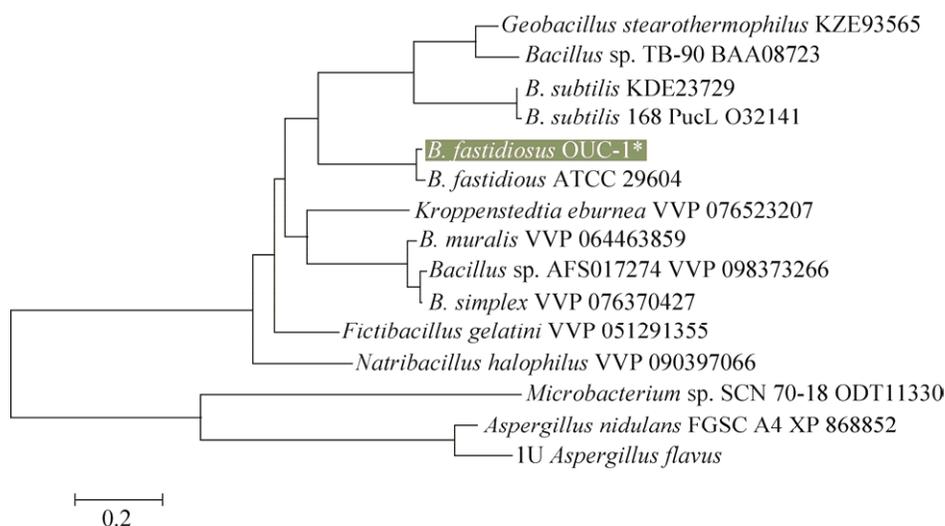


图 8 基于氨基酸序列的邻接法 (N-J) 构建的 Uox 系统发育关系进化树

Fig. 8 Neighbor-joining tree constructed from amino acid sequences of the microbial Uox showing the phylogenetic relationships. Bootstrap values above 50 are indicated at the main nodes. Bootstrap values are given above branches.

2.6.2 苛求芽孢杆菌 *B. fastidiosus* OUC-1 的 *uox* 基因克隆及大肠杆菌异源表达

B. fastidiosus 的 *uox* 基因在大肠杆菌重组表达的实验中, 转化后涂布在含有尿酸的固体培养基上, 与对照组相比, 含有尿酸氧化酶菌落的周围已变透明, 说明该重组子能分解 Uox, 进一步对重组子测序分析证明 Uox 已在大肠杆菌中异源表达成功。重组子发酵液菌体超声波破碎后所得上清液经 Ni 柱亲和层析纯化获得重组表达的 Uox。酶活测试显示, 经 IPTG 诱导和未加诱导皆有 Uox 产生 (图 9), 但未加 IPTG 的对照组全菌裂解液上清酶活为 0.07 U/mL, 而加入 IPTG 诱导的实验组酶活达 2.32 U/mL, 酶活提升 30 多倍。

3 讨论

Uox 作为医学检测试剂和治疗用酶具有广阔的市场前景。微生物是尿酸氧化酶的一个重要来源, 具有易于培养和代谢类型多样的特点。目前国内已有许多微生物尿酸酶研究报道^[28-33], 本研究

从土壤等环境样品中筛选得到了多株产 Uox 的菌株, 有假单胞菌、微杆菌、芽孢杆菌等菌株。其中苛求芽孢杆菌 OUC-1 产酶较高。*B. fastidiosus* OUC-1 具有同时产生分泌性和细胞内 Uox 酶的特点, 但野生菌的生长和产酶依赖尿酸诱导, 并且可同化的底物少, 这提高了 Uox 的生产成本, 尚需遗传改良得以提高产率。野生菌株的遗传背景相对复杂, 提高酶活和改进酶学性质存在一定难度。将基因克隆到表达载体, 一方面可利用工程菌直接生产 Uox, 也利于分子进化和理性设计等分子改造快速改善酶的性能。本实验表达的重组后 Uox 发酵产酶量达到了野生菌株的 30 倍, 同时省去了添加价格昂贵的尿酸。

本研究筛选的 *B. fastidiosus* OUC-1 产 Uox 由同源四聚体构成, 与 1978 年 Bongaerts 报道的由 2 个 36 kDa 和 2 个 39 kDa 的亚基组成的 *B. fastidiosus* SMG83 Uox 异四聚体不同, 后者只存在菌体胞内, 两者在最适温度上也存在差异^[10,28]。在氨基酸序列和空间结构上与 *B. fastidiosus* ATCC 29604 同源性非常高, 仅有 7 个氨基酸差异, 可能是同一种酶。其中有 3 个氨基酸 T230S、N234T、E236D 位于 α 螺旋 (225-238) 中, 另外几个氨基酸的电性和疏水性等性质都存在变化, 这些变化可能通过静电网络和空间结构的改变对酶活性产生一定的影响。

B. fastidiosus OUC-1 来源 Uox 的 K_m 为 0.15 mmol/L, 明显低于 *B. fastidiosus* ATCC 29604 (0.22 mmol/L)^[27], 也低于 Bongaerts 等早期报道的 *B. fastidiosus* SMG83 产生的尿酸酶 (0.18 mmol/L)^[28], 另外相对于 Kai 等^[34]报道的一种微杆菌属尿酸酶 (0.31 mmol/L), 以及李想等^[35]报道的芽孢杆菌胞内尿酸酶 (0.29 mmol/L), *B. fastidiosus* OUC-1 尿酸酶的 K_m 值较低, 说明其与底物亲和性更强。

研究报道不同金属离子对不同微生物来源的 Uox

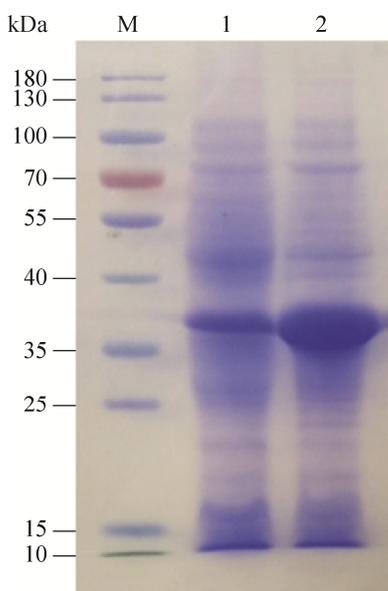


图 9 Uox 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of recombinant Uox expression. lane 1: uninduced Uox; lane 2: induced Uox with IPTG.

活性的作用不同^[36]。本研究设置了 0.5–6.0 mmol/L 的不同离子浓度梯度,发现 Mg^{2+} 对 Uox 有明显的促进作用,并且随着浓度的提高促进作用更明显,这在其他文献中很少报道。而 Zn^{2+} 对 Uox 活性有明显的抑制作用,与报道的 Zn^{2+} 对球形节杆菌 *Arthrobacter globiformis*^[36]、*B. fastidiosus* SMG83^[28]和微杆菌 *Microbacterium* sp. ZZJ4-1^[37]的尿酸酶抑制作用相似。之前研究发现 Cu^{2+} 对不同微生物尿酸酶也存在不同的作用,本研究随 Cu^{2+} 浓度升高,其抑制作用逐渐增强,但仍与 Cu^{2+} 表现出对 *A. globiformis* FERM BP-360、*Bacillus* sp. TB-90 和 *C. utilis* 来源^[37]的 Uox 的强抑制作用有区别。

虽然 *B. fastidiosus* OUC-1 来源的 Uox 与 *B. fastidiosus* ATCC 29604 的 Uox 相似性非常高,但两者在底物的亲和力、离子对酶的影响方面还是有很大差异,并且这些酶有些性质的差异与氨基酸的变化之间可能存在关联,尚需进一步研究。

当前应用于检测和临床治疗的 Uox 普遍存在热稳定差和免疫原性问题,在储藏、运输和应用过程中容易失活。目前对热稳定性好的 Uox 研究较少。因此以重组表达的苛求芽孢杆菌 *uox* 基因为基础,采用易错 PCR 或与其他尿酸氧化酶进行分子进化等技术,构建 Uox 基因突变库筛选和设计具有高耐热和 pH 稳定性 Uox 是今后研究的方向。

REFERENCES

- [1] Christen P, Peacock WC, Christen AE, et al. Urate oxidase in primate phylogenesis. *Eur J Biochem*, 1970, 12(1): 3–5.
- [2] Oda M, Satta Y, Takenaka O, et al. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(5): 640–653.
- [3] Wyngaarden JB. Overproduction of uric acid as the cause of hyperuricemia in primary gout. *J Clin Invest*, 1957, 36(10): 1508–1515.
- [4] Wu XW, Lee CC, Muzny DM, et al. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(23): 9412–9416.
- [5] Rai SK, Aviña-Zubieta JA, McCormick N, et al. The rising prevalence and incidence of gout in British Columbia, Canada: Population-based trends from 2000 to 2012. *Semin Arthritis Rheu*, 2016, 46(4): 451–456.
- [6] Conen D, Wietlisbach V, Bovet P, et al. Prevalence of hyperuricemia and relation of serum uric acid with cardiovascular risk factors in a developing country. *Bmc Public Health*, 2004, 4(1): 9.
- [7] Wu AH, Gladden JD, Ahmed M, et al. Relation of serum uric acid to cardiovascular disease. *Int J Cardiol*, 2016, 213: 4–7.
- [8] Bieber JD, Terkeltaub RA. Gout: On the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(8): 2400–2414.
- [9] Filiopoulos V, Hadjiyannakos D, Vlassopoulos D. New insights into uric acid effects on the progression and prognosis of chronic kidney disease. *Renal Fail*, 2012, 34(4): 510–520.
- [10] Chen ZY, He XP, Zhang BR, et al. Research progress on the microbial urate oxidase. *Microbiol China*, 2007, 34(6): 1205–1208 (in Chinese). 陈志禹, 何秀萍, 张博润, 等. 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, 34(6): 1205–1208.
- [11] Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, et al. Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris*. *Springerplus*, 2014, 3(1): 395.
- [12] Mcleod MP, Warren RL, Hsiao WWL, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(42): 15582–15587.
- [13] Deng Y, Zhu YG, Wang PX, et al. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol*, 2011, 193(8): 2070–2071.
- [14] Abdel-Fattah YR, Saeed HM, Gohar YM, et al. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Process Biochem*, 2005, 40(5): 1707–1714.
- [15] Liao F, Zhao YS, Zhao LN, et al. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 7(6): 497–502.
- [16] Cui BY, Li YH. Modified microdetermination of serum uric acid and its normal reference value. *J Med College PLA*, 1981, 7(2): 178–181 (in Chinese).

- 崔宝印, 李亚虹. 改良血清尿酸微量测定法及正常参考值. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1981, 7(2): 178-181.
- [17] Enticknap JJ, Nonogaki H, Place AR, et al. Microbial diversity associated with odor modification for production of fertilizers from chicken litter. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(6): 4105-4114.
- [18] Raji AI, Moller C, Litthauer D, et al. Bacterial diversity of biofilm samples from deep mines in South Africa. *Biokemistri*, 2008, 20(2): 53-62.
- [19] Cummins P, Dowling O, O'Connor BF. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase//Walls D, Loughran S, eds. *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2011: 215-228.
- [20] Li XQ, Bai XH, Liu CF. Study on the purification of moringa oleifera coagulant through gel filtration chromatography. *Tropical Agr Sci Technol*, 2008, 31(2): 35-37 (in Chinese).
黎小清, 白旭华, 刘昌芬. 凝胶过滤层析纯化辣木絮凝剂研究. *热带农业科技*, 2008, 31(2): 35-37.
- [21] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constant. *J Am Chem Soc*, 1934, 56(3): 658-666.
- [22] Abd-Elsalam KA. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol*, 2003, 2(5): 91-95.
- [23] Robertson JM, Walshweller J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions//Lincoln PJ, Thomson J, eds. *Forensic DNA Profiling Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 1998: 121.
- [24] Zhang XY, Zhu YN, Gao Y. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5. *Bioinformatiocs*, 2004, 2(4): 15-18.
- [25] Apte A, Daniel S. PCR primer design. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, 2009(3): pdb ip65.
- [26] Yoo D, Provchy J, Park C, et al. Automated high-throughput protein purification using an ÄKTA purifier and a CETAC autosampler. *J Chromatogr A*, 2014, 1344: 23-30.
- [27] Zhao YS, Zhao LN, Yang GQ, et al. Characterization of an extracellular uricase from bacillus fastidiosus and its application in direct kinetic assay of serum uric acid. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2007, 36(2): 239-242 (in Chinese).
- [28] Bongaerts GPA, Uitzetter J, Brouns R, et al. Uricase of *Bacillus fastidiosus* properties and regulation of synthesis. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Enzymol*, 1978, 527(2): 348-358.
- [29] Yu QL. Preparation and Identification of Bacillus uric Acid enzyme. *J Clinical Lab Sci*, 1994(3): 125-126 (in Chinese).
于青琳. 芽胞杆菌尿酸酶的制备及鉴定. *临床检验杂志*, 1994(3): 125-126.
- [30] 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.
- [31] Koyama Y, Ichikawa T, Nakano E. 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.
- [32] Zhou XL, Ma XH, Sun GQ, et al. Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production conditions. *Process Biochem*, 2005, 40(12): 3749-3753.
- [33] Chen ZY, Wang ZY, He XP, et al. Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(4): 545-554.
- [34] Kai L, Ma XH, Zhou XL, et al. Purification and characterization of a thermostable uricase from *Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(3): 401-406.
- [35] Li X, Feng J, Zhang C, et al. Effects of reaction conditions on interactions of some purine derivatives with the intracellular uricase from *Bacillus fastidiosus*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, 17(1): 91-94 (in Chinese)
李想, 冯娟, 张纯, 等. 反应条件对苛求芽胞杆菌胞内尿酸酶与嘌呤衍生物作用的影响. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(1): 91-94.
- [36] Suzuki K, Sakasegawa S, Misaki H, et al. Molecular cloning and expression of uricase gene from *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(3): 153-158.
- [37] Zhang PC. Cloning expression and characterization of urate oxidase gene from *Microbacterium* sp. ZZJ4-1 strain in *Escherichia coli*. Hangzhou: Zhejiang University [D], 2012 (in Chinese).
张鹏程. 微杆菌 *Microbacterium* sp. ZZJ4-1 尿酸氧化酶基因的克隆表达及重组酶性质的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

(本文责编 郝丽芳)