

重组尿酸酶发酵培养及制备的工艺条件

赵明¹, 何中杰¹, 王瑞¹, 姚明东¹, 师慧², 王振伟², 孟尧^{*1}

(1. 成都医学院 检验医学院, 成都 610500; 2. 四川大学 生命科学学院/生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 利用含 PET-Urate Oxidase 表达质粒的重组 *E.coli* JM109 (DE3) 菌株进行大规模发酵培养, 拟建立一种高效、低成本的生产重组尿酸酶的技术工艺路线。取冻存的工程菌接种于含质量分数 1% 琼脂的种子培养基中进行培养, 从划线平板上挑取单菌落接种于摇瓶中继续培养, 最后以体积分数 5% 接种量接种于发酵培养基中, 绘制生长曲线; 以乳糖作为诱导剂与传统 IPTG 诱导方法进行发酵培养比较; 菌体经高压均质机破碎、质量分数 40%~60% 硫酸铵分级沉淀, 以及 Q-Sepharose F.F. 层析进行分离纯化。结果显示, 乳糖作为诱导剂在 300 L 的发酵罐中进行培养可获得菌体湿质量 2 700 g, 目的蛋白质表达量占菌体可溶性蛋白质的 30% 左右, 略高于 IPTG 诱导的效果; 经分离纯化后该酶的纯化倍数可达原来的 4.5 倍, 活性回收率为 40%; 纯化的重组尿酸酶经 SDS-PAGE 和 HPLC 分析, 显示单一蛋白质色带和单一洗脱峰。成果为该酶的医学实际应用奠定了理论实验基础。

关键词: 重组尿酸酶; 乳糖; 诱导表达; 发酵; 纯化

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)03—0311—05

Study on Fermentation and Preparation of Recombinant Uricase

ZHAO Ming¹, HE Zhongjie¹, WANG Rui¹, YAO Mingdong¹, SHI Hui², WANG Zhenwei², MENG Yao^{*1}

(1. School of Medical Laboratory Science, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. School of Life Science/Key Laboratory of China Ministry Education for Bio-resources and Eco-environment, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: This manuscript was applied with recombinant plasmid PET-urate oxidase gene expressed from *E.coli* JM109 (DE3) to study the conditions of fermentation and purification of recombinant urate oxidase. The freezing stored engineering bacteria were inoculated to seed culture medium which contained 1% agar for slant cultivation. We used lactose as inducer and fermentation was conducted in 300 L fermenter. Finally, 2 700 g wet samples (1 200 U/g) were prepared and the aimed protein expression was about 30% proportions to soluble bacteria. After crushed by high-pressure quality machine, the ammonium sulphate precipitation from 40% to 60% saturation and Q-Sepharose FF ion-exchange chromatography, the purity of the obtained r-Urate Oxidase was up to 97% and 40% of final yield, as well as 30 U/mg of the specific activity. Additionally, the

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 四川省大学生创新创业训练计划项目(201313705020); 成都医学院创新性实验项目(CS201228); 成都医学院实验室开放项目(Kf201407)。

* 通信作者: 孟尧(1981—), 男, 甘肃兰州人, 理学博士, 副教授, 主要从事蛋白质结构与工程研究。E-mail: myaopapers@gmail.com

interference enzyme of catalase was also under standard conditions. The purified enzyme can be stored one year at 4 °C under sterile procedure and the activity can retain about 85%. The lyophilized powder can also be stored for one year and the activity have not been released. All results of this study could lay the theoretical foundation in medical application.

Keywords: recombinant uricase, lactose, inducible expression, fermentation, purification

尿酸酶(Urate Oxidase, Uricase; EC1.7.3.3)是生物体内嘌呤代谢途径中的一种酶,可将尿酸氧化分解为尿囊素、二氧化碳和过氧化氢^[1]。人体中缺乏尿酸酶,嘌呤代谢终产物尿酸及其盐类在血液中溶解度很低,当人体中尿酸水平高于正常水平时,就会引发高尿酸血症,继而诱发痛风等一系列疾病^[2-3];临床上尿酸酶可以作为治疗高尿酸血症的药物,也可用于配制诊断试剂盒检测样本中尿酸的浓度,因此尿酸酶是一种重要的医药用酶,有较高的市场价值^[4-6]。国内虽然也有相关尿酸酶基因克隆高效表达的报道^[7],但商品化程度远不如国外,还需要大量进口以满足临床需求。因此,开展重组尿酸酶大规模生产工艺研究就显得很有必要。

基因工程技术是解决诊断试剂盒工具酶原酶来源的有效技术方法之一,它不但能大大降低生产成本,而且也容易消除目的酶中的干扰酶。作者所在课题组曾报道了各种因素对摇瓶中重组酵母尿酸酶工程菌影响的研究成果^[8]。在已有工作的基础上,作者主要考察了在300 L的发酵罐中工程菌的发酵培养及其酶的大规模制备工艺路线的建立。

1 材料与方法

1.1 主要材料

表达重组尿酸酶基因工程菌,由作者所在研究室构建;硫酸卡那霉素(Kanamycin Sulfate),购自Merck公司;丙烯酰胺(acrylamide, Acr), N,N'-甲叉双丙烯酰胺(methylene bisacrylamide, Bis), SDS,购自Bio-Rad公司;低相对分子质量标准蛋白质(low molecular weight calibration kit, LMW calibration kit)和Q-Spharose F.F., 购自Pharmacia公司;蛋白胨(Tryptone)和酵母粉(Yeast Extract), 购自英国OXOID公司;尿酸,购自Sigma公司;其它试剂均为国产A.R级。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(LB) 硫酸卡那霉素

(Kanamycin Sulfate) 50 µg/mL, 蛋白胨(Tryptone) 10 g/L, 酵母浸膏(Yeast Extract) 5 g/L, NaCl 10 g/L。

1.2.2 发酵培养基 蛋白胨(Tryptone) 10 g/L, 酵母浸膏(Yeast Extract) 5 g/L, NaCl 10 g/L, 甘油(Glycerol) 4 g/L, K₂HPO₄ 12 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 乳糖(Lactose) 400 g/L。

1.3 主要仪器

工作体积300 L发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司制造;高速冷冻离心机(Eppendorf 5804R、Beckman Avanti J-20XP),分别由德国艾本德(中国)生命科学公司和美国贝克曼库尔特(中国)有限公司提供;紫外可见分光光度计(Unico™ UC-2102 PC),尤尼柯(上海)仪器有限公司提供;VCX-750型超声波细胞粉碎机,Sonics公司制造;Power PAC300型电泳系统,76S/02324型凝胶成像分析仪,Bio-Rad公司提供;GQ75B高速管式离心机,上海浦东天本离心机机械有限公司制造;GYB300-10S高压均质机,上海东华高压均质机厂制造;721型分光光度计,上海第三分析仪器厂制造;冷却罐,温州市商泰轻工机械有限公司制造;Mini Pellicon及Pellicon超滤系统,Millipore公司提供。

1.4 种子培养基选择

取冻存的工程菌,接种于含1 g/dL琼脂的种子培养基中,37 °C条件下培养10~12 h,活化2~3次。挑取生长饱满的单菌落于摇瓶中继续培养,37 °C, 200 r/min培养10~12 h,期间取少许菌液采用SDS-PAGE分析其目的蛋白质的表达量。取上述菌液按体积分数5%接种量在同样条件下培养10~12 h, OD₆₀₀为5.0时,即为发酵罐培养用工程菌种子液。

1.5 重组尿酸酶(r-UO)发酵表达

将工程菌种子液以体积分数2%的接种量转入到含270 L培养液的300 L的发酵罐中,200 r/min搅拌培养,通气量调节至使溶解氧大于30%饱和度,37 °C条件下间隔2小时定时取样。分析检测生

物量(OD_{600})、菌体湿质量、pH。待菌株生长到对数生长期时加入诱导剂培养。

1.6 诱导培养

在菌体进入对数生长末期,加入乳糖溶液于发酵罐中,终质量浓度为 5 g/L,开始诱导培养。间隔 2 h 定时取样,检测分析 OD_{600} 、菌体湿质量、pH 及酶活性。若酶活性不再增长或下降即停止发酵。将发酵液泵入贮存罐,冷却降温至 10 °C 时,泵入连续离心筒离心。收集的菌体称质量,于 -20 °C 保存备用。

1.7 蛋白质含量和酶活力测定方法

蛋白质含量测定参照 Bradford 法^[9]进行,以 BSA 为标准蛋白质对照;酶活定义及测定方法按参考文献^[10]进行。

1.8 生物量分析

生物量的测定采用细菌光电比浊计数法,用分光光度计测其 OD_{600} 值表示菌体浓度。

1.9 无细胞粗酶液的制备

按 1 kg 菌体与 20 倍 50 mmol/L pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体,于冷却罐预冷至 2~4 °C,泵入高压均质机(压力 50 MPa),循环重复 2 次至破碎完全,然后泵入高速管式离心机,16 000 g 连续离心,收集上清液。上清液放在预冷的冷冻罐中,在电动搅拌下加入硫酸铵,至饱和度达 40%,静置 1~2 h,泵入高速管式离心机,16 000 g 连续离心,弃沉淀后保留上清液。在上清液中追加硫酸铵达 60% 饱和度,再次泵入高速管式离心机,16 000 g 连续离心后收集沉淀。将沉淀溶解于 5 L 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,进行简单离心后用 Pellicon 超滤系统超滤除盐。

1.10 Q-Sepharose Fast Flow 层析

粗酶液经 0.45~0.6 μ m 滤膜过滤脱盐后上经 20 mmol/L pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液充分平衡的 Q-Sepharose F.F 层析柱(5 cm×30 cm)。上样毕,用相同缓冲液洗涤至 280 nm 吸收值达记录纸基线,然后以 0~0.2 mol/L NaCl 缓冲液梯度洗脱,通过酶活性检测方法及紫外检测 280 nm 吸收峰情况,用部分收集器收集活性峰部分,之后适当超滤浓缩、记录体积、留样测定酶活和蛋白质含量,并进行质量分数 12% SDS-PAGE 分析。

1.11 SDS-PAGE

按参考文献^[11]所述方法进行。浓缩胶质量分数 4.0%,分离胶质量分数 12%。样品在浓缩胶中的

电压为 120 V,分离胶中电压 160 V。胶条用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 结果与分析

2.1 工程菌发酵罐菌体生长曲线

如图 1 所示,工程菌在发酵罐中培养 1.5 h 后进入对数生长期,5 h 后进入对数生长末期,加诱导剂乳糖之后的 1 h 菌体生长出现停滞,6.5 h 后菌体又开始生长,约 11 h 后进入稳定期,13.5 h 后生物量与酶活性出现微降。从该曲线可知,5 h 为菌体生长的对数中后期,即诱导的最佳时机。乳糖诱导生长 6 h 后,生物量和酶活性趋于稳定,8 h 后生物量与酶活性出现微降,故诱导时间约 7 h 为最佳。

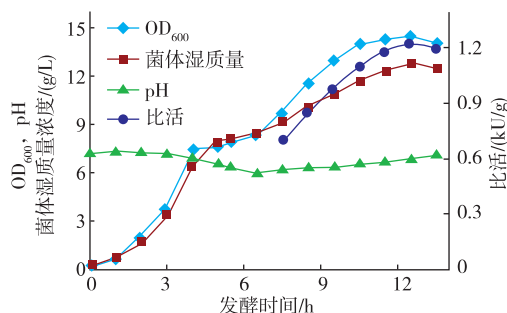


图 1 重组尿酸酶的发酵罐生长曲线

Fig. 1 Growth curve of recombinant Urate Oxidase in fermenter

2.2 重组尿酸酶的分离纯化

菌细胞悬液经高压均质机破碎后,离心获得上清液。首先采用质量分数 40%~60% 硫酸铵分级沉淀,初级分离;然后用 Q-Sepharose F.F 层析柱进一步纯化(见图 2)。

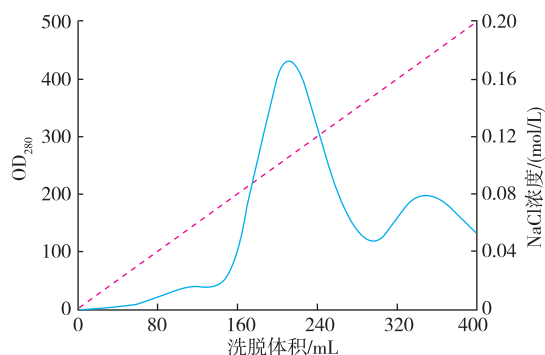


图 2 重组尿酸酶 Q-Sepharose F.F 层析图谱

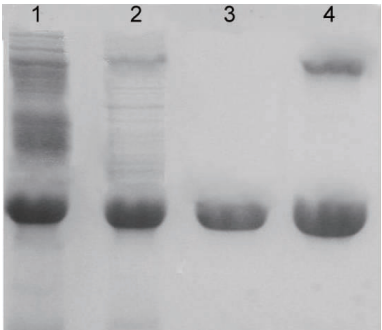
Fig. 2 Q-Sepharose FF chromatography of recombinant uricase

不同纯化阶段样品液的 SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示。酶活性和电泳结果显示,两个洗脱峰均为目的蛋白质峰,其中第 1 个洗脱峰目的蛋白质纯度高,第 2 个峰含有一些杂蛋白质。整个纯化结果见表 1, 最终获得该酶的纯化倍数达 4.56 倍,活性回收率为 40%。

表 1 重组尿酸酶纯化过程总结

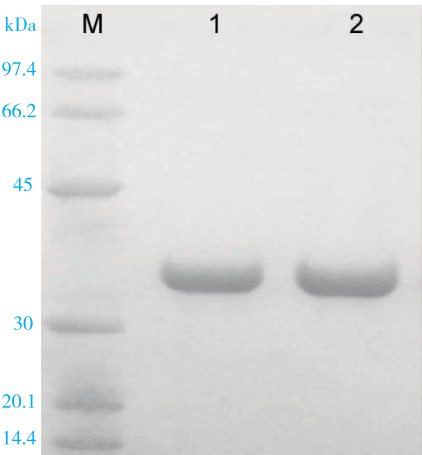
Table 1 Purification procedure of recombinant uricase

项目	总体积/mL	总蛋白质质量/mg	总活性/kU	比活/(U/mg)	纯化倍数	收率/%
破碎液	3 480	39 672	226.1	5.7	1	100
硫酸铵沉淀	700	20 351	203.5	10	1.75	90
Q 柱层析	140	3 478	90.4	26	4.56	40



泳道 1: 粗提取物; 泳道 2: 脱盐后的样品; 泳道 3: 在 0.08 mol/L NaCl 条件下经阳离子交换后的样品; 泳道 4: 在 0.15 mol/L NaCl 条件下经阳离子交换后的样品

图 3 重组尿酸酶不同纯化阶段的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 3 SDS -PAGE analysis of recombinant uricase purified from various steps

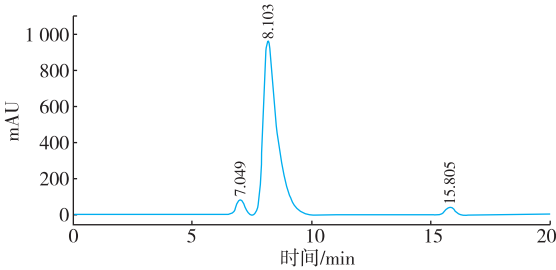


M: 低相对分子质量标准蛋白质; 泳道 1: 还原 SDS-PAGE; 泳道 2: 非还原 SDS-PAGE

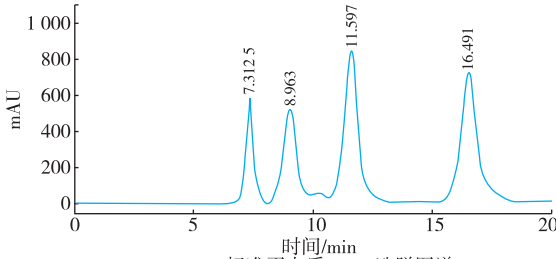
图 4 重组尿酸酶纯品还原/非还原 SDS-PAGE
Fig. 4 Reduced/Non-reduced SDS-PAGE of purified r-uricase

2.3 重组尿酸酶的鉴定

纯化的重组尿酸酶经 SDS-PAGE (见图 4) 检测, 结果显示单一蛋白质色带; 经 HPLC (见图 5) 检测, 结果显示单一洗脱峰。经 SDS-PAGE 分析计算, 该酶的表观分子量为 34 kDa, 经 HPLC (见图 5 和图 6) 分析, 计算求得该酶分子量为 130 kDa, 属四聚体。



(a) 重组尿酸酶HPLC洗脱图谱



(b) 标准蛋白质HPLC洗脱图谱

图 5 重组尿酸酶及标准蛋白质的 HPLC 洗脱图谱
Fig. 5 Elution chromatogram of r-uricase and standard proteins on HPLC

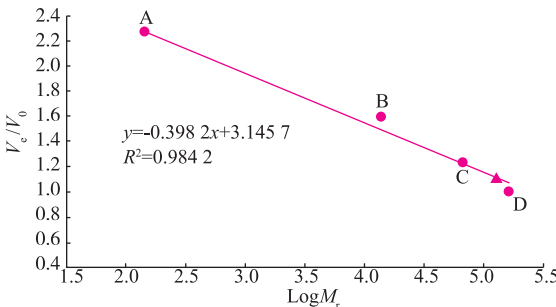


图 6 HPLC 中标准蛋白质 V_e/V_0 和相对分子质量关系的标准曲线
Fig. 6 Standard curve of standard proteins on HPLC with relationship between V_e/V_0 and molecular weight

3 讨论

尿酸酶广泛存在于动物、植物、真菌、酵母和细菌中,能以分子氧作为受体催化尿酸氧化生成尿囊素、CO₂和H₂O₂。如果人体内由于膳食等原因产生过量的尿酸或排泄受阻,就会导致体内嘌呤代谢紊乱,引起血液中尿酸沉积形成高尿酸血症。另一方面,对于某些敏感个体,食用富含嘌呤的食物如动物肝脏、鱼类、果酒等亦会引起痛风等疾病。因此,在临床上尿酸酶就可以作为治疗痛风、高尿酸血症等的药物。尿酸酶作为以上疾病诊断的关键工具酶,具有可靠性好、反应灵敏、特异性高、干扰因素少等优点,已成为检测血液尿酸的最佳方法。但目前,国内由于酶制剂质量等原因主要依赖于进口。

4 结语

利用 PET-Urate Oxidase 表达转化 *E.coli* JM109(DE3)构建的尿酸酶基因工程菌进行发酵培养,根据发酵罐生长曲线对其分离纯化条件优化,确定发酵 5 h 为菌体生长对数中后期即诱导最佳时机;同时确定诱导约 7 h 最佳。目前重组尿酸酶都由 IPTG 作为诱导剂,价格高和潜在毒性限制了其应用。乳糖作为廉价二糖,可使携带 pET 表达质粒的 *E.coli* JM109(DE3)的 lac 启动子表达 T7 mRNA 聚合酶,利用该酶诱导表达目的蛋白质,成功实现了重组尿酸酶大规模发酵培养。经过 Q-Sepharose F.F 层析柱分离纯化和鉴定,确定其目的洗脱蛋白质即为重组尿酸酶,计算证实该酶为四聚体。

参考文献:

- [1] Ronco C, Bellomo R, Inguaggiato P, et al. Rasburicase therapy in acute hyperuricemic renal dysfunction [J]. **Contributions to Nephrology**, 2004, 144: 158-165.
- [2] Hummel M, Buchheidt D, Reiter S, et al. Successful treatment of hyperuricemia with low doses of recombinant urate oxidase in four patients with hematologic malignancy and tumor lysis syndrome[J]. **Leukemia**, 2003, 17(12): 2542-2544.
- [3] Fraisse L, Bonnet M C, Agut C, et al. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters[J]. **Analytical Biochemistry**, 2002, 309(2): 173-179.
- [4] Pui C H. Urate oxidase in the prophylaxis or treatment of hyperuricemia: the United States experience [J]. **Seminars in Hematology**, 2001, 38(4 Suppl): 13-21.
- [5] Bomalaski J S, Holtsberg F W, Ensor C M, et al. Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies[J]. **The Journal of Rheumatology**, 2002, 29(9): 1942-1949.
- [6] Vogt B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout [J]. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, 2005, 20(2): 431-433.
- [7] 刘广桢, 陈建华, 汪敏. 尿酸酶产生菌的筛选、基因克隆及表达[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 464-467.
LIU Guangzhen, CHEN Jianhua, WANG Min. Screening of uricase producing strains, cloning and expression of uricase gene[J]. **Journal of China Pharmaceutical University**, 2005, 36(5): 464-467. (in Chinese)
- [8] 邓永康, 吴民沛, 刘盛邦, 等. 乳糖诱导重组尿酸酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(7): 74-79.
DENG Yongkang, WU Minlu, LIU Shengbang, et al. Expression of recombinant uricase in *E. coli* JM109 (DE3) induced by lactose[J]. **China Biotechnology**, 2009, 29(7): 74-79. (in Chinese)
- [9] Restiawaty E, Honda K, Okano K, et al. Construction of membrane-anchoring fusion protein of *Thermococcus kodakaraensis* glycerol kinase and its application to repetitive batchwise reactions [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2012, 113(4): 521-525.
- [10] Biochemical Dept, Toyobo Co Ltd. Toyobo enzymes[M]. Pittsburgh: Academic Press, 1996: 112-115.
- [11] Janke R, Genzel Y, Freunda S, et al. Expression, purification and characterization of a His6-tagged glycerokinase from *Pichia farinosa* for enzymatic cycling assays in mammalian cells[J]. **Journal of Biotechnology**, 2010, 150: 396-403.
- [12] Truong L, Hevener K E, Rice A J, et al. High-level expression, purification, and characterization of *Staphylococcus aureus* dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion[J/OL]. **Protein Expression and Purification**, 2012[2012-11-18]. doi: 10.1016/j.pep..