

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 化學科

第二名

050202

微生物源尿酸氧化酶催化尿酸降解與高尿酸檢
測

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 許庭瑄 高二 黃琛予	指導老師： 許名智
-------------------------	--------------

關鍵詞：尿酸氧化酶、尿酸降解、蛋白質工程

摘要

尿酸氧化酶參與嘌呤代謝機制，然人類尿酸氧化酶基因已退化，易使過量尿酸沉積於關節造成痛風，因此微生物源尿酸氧化酶具極高研發價值。

本研究針對微生物源酵素進行基因體探勘，篩選出抗輻射奇異球菌 (*Deinococcus radiodurans*)及耐熱雙球桿菌(*Thermobispora bispora*)源尿酸氧化酶基因，取得尿酸氧化酶重組蛋白質進行酵素活性測定、熱穩定分析、蛋白質結構解析、酵素對金屬離子耐受性分析與尿酸檢測應用。抗輻射奇異球菌源酵素於 30°C催化速率較過去報導之酵素佳，而耐熱雙球桿菌源酵素於 70°C催化效率與熱穩定性仍佳。解析耐熱雙球桿菌源酵素結構發現羧基端具特異性構型，推測與熱穩定性有關。本研究的兩種尿酸氧化酶，可分別作為降解尿酸的速效及緩解型藥物，並開發成快速檢測尿酸的簡易方法。

壹、研究動機

一、研究背景介紹

(一) 尿酸(Uric Acid, UA)

尿酸是人體嘌呤代謝的產物，而嘌呤的來源主要是飲食和核苷降解。尿酸在人體中大多以游離酸及尿酸鹽的形式存在，而兩者皆不易溶於水，當人體血液中的尿酸超過 70 mg/L 即可能引發高尿酸血症。長期的高尿酸血症容易使尿酸鹽沉積在人體關節甚至臟器而造成損傷，當沉積在關節的尿酸鹽大量累積後，極易造成典型的痛風性關節炎。

近年來，隨著人們飲食與生活習慣改變，痛風患者數量於過去二十年間迅速增長。目前的治療方法主要分為兩種，一是透過飲食控制，減少食用嘌呤含量高的食物(如動物內臟、紅肉、海產、豆類等)，避免飲酒過量，以免酒精影響腎臟代謝尿酸的功能；二是藉由藥物治療，目前市面上藥物主要有非類固醇消炎止痛藥(NSAIDs)、類固醇(corticosteroids)、秋水仙素(colchicines)、抑制尿酸合成-黃嘌呤氧化酶抑制劑(Xanthine oxidase inhibitors)、促進尿酸排泄藥物(uricosuric agents)、重組尿酸氧化酵素(recombinant urate oxidase)，而「重組尿酸氧化酵素」即為我們的研究對象。

在尿酸濃度檢測方面，目前在醫院的檢測方式是空腹抽血檢驗尿酸濃度，市面上則販售尿酸檢測儀，以利高尿酸患者在家中日常監測。而我們計畫利用酵素降解尿酸時所生成的過氧化氫進行呈色反應，盼能以比色法之顏色深淺變化，開發更為簡便的檢測方式。

(二) 尿酸氧化酶(urate oxidase, EC 1.7.3.3)

人體高尿酸血症與其尿酸氧化酶基因於演化過程中突變失活有關。因此，重組尿酸氧化酶成為臨床研究對象，被積極開發應用於藥物及臨床檢測等用途上。尿酸氧化酶是一種分解尿酸的酵素，能催化嘌呤代謝途徑中的尿酸氧化為 5-HIU，5-HIU 會再進一步分解為尿囊素和過氧化氫(圖 1)，尿囊素和過氧化氫在水中有極高的溶解度，因此透過尿酸氧化酶的催化反應，能有效降低尿酸的濃度。由生物資料庫(NCBI)分析得知，尿酸氧化酶基因廣泛存在於微生物基因組中，過去許多研究也針對各種微生物源尿酸重組氧化酶進行酵素特性分析，如枯草桿菌源(*Bacillus subtilis*)尿酸氧化酶、球形節桿菌(*Arthrobacter globiformis*)源尿酸氧化酶等重組酵素，成為近年來科學家積極研究的方向，盼透過蛋白質工程與定向演化分析的改造，提升酵素之活性與穩定性，提升未來生醫檢測與臨床藥物開發之價值。

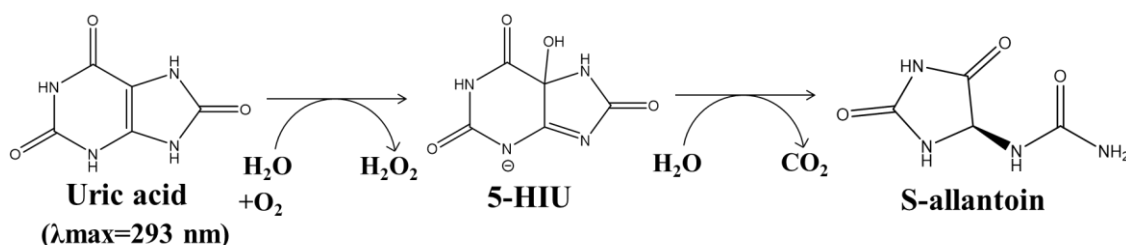


圖 1. 尿酸降解化學反應式

二、研究動機

尿酸氧化酶是一種能分解尿酸的酵素，負責催化嘌呤代謝途徑中的尿酸氧化生成尿囊素，易水溶而排出體外，因此，重組氧化酶的開發具備臨床檢測與治療的潛能，而目前重組氧化酶於生化工程的研究也逐漸受到重視，如已上市之藥物 *Krystexxa*® (pegloticase)。

然而，重組氧化酶的生產、純化與改良仍具發展空間，我們透過基因體探勘，篩選出具研究潛能之微生物源尿酸氧化酶基因，盼未來利用蛋白質工程改造，得到具良好熱穩定性、高催化效率及高受質專一性的重組尿酸氧化酶蛋白。於臨床檢測上，盼能運用於檢測試劑上，迅速且靈敏地測得尿酸濃度，於臨床藥物應用上，盼能將其注入人體，以有效降解血液中的尿酸。

貳、研究目的

- 一、利用生物資料庫(NCBI)之生資分析工具，進行微生物源同源基因之核酸與蛋白質序列比對與分析。
- 二、以大腸桿菌異源表現微生物源重組酵素，利用金屬螯合層析法得到高產量、高純度之重

組蛋白質。

- 三、分析各酵素之最佳反應環境(溫度及酸鹼值)，利用酵素動力學實驗計算其催化效率並比較活性差異。
- 四、為深入探討酵素催化之分子機制，作為蛋白質工程之起點，以 X 光晶體繞射技術解析蛋白質結構。
- 五、重組尿酸氧化酶於臨床尿酸檢測之開發與應用，利用氧化還原比色法與光譜檢測技術進行高尿酸檢測。

參、研究設備及器材

一、研究設備

- (一) DNA 膠體螢光影像分析
- (二) 聚丙烯醯胺膠體電泳
- (三) 快速蛋白液相色譜
- (四) 分光光譜儀
- (五) 水浴槽
- (六) 離心機
- (七) 移液器(Pipetman p10, p20, p100, p1000)
- (八) 試管振盪器
- (九) 微生物培養箱
- (十) 低溫冷凍櫃

二、器材：微量滴定盤

肆、研究過程或方法

一、生物資料庫探勘

二、基因選殖

- (一) 從微生物染色體中取得尿酸氧化酶的基因片段作為模板
- (二) 設計引子
 1. 選擇前置引子(forward primer)和反置引子(reverse primer)所用的限制酶
 2. 於 NCBI 網站上找到該微生物基因組 DNA(Genomic DNA)與胺基酸序列
 3. 設計前置引子和反置引子(任意 2 或 3 個核苷酸+限制酶核苷酸+微生物基因組 DNA 之 18~21 個核苷酸)
 4. 交由生技公司合成引子

(三) 利用聚合連鎖反應將此段基因序列放大

1.取 2 個微量離心管，依下表所列體積(單位： μL)加入

	對照組(#1)	實驗組(#2)
Template DNA	0	1
Forward primer (NdeI)	0.2	1
Reverse primer (XhoI)	0.8	1
2.5 mM dNTP	2	4
5x buffer	0.1	10
Polymerase	0.6	0.5
$\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$	6.3	32.5

2.以分度吸量管輕輕混合後，短暫離心後，放入 PCR 機器中

- (1) 置於 95°C 下變性 10 秒
 - (2) 在 60°C 降溫 2 分鐘
 - (3) 使其在 72°C 下擴大 10 分鐘
- (1)~(3)共循環 30 次

(四) 將放大後的產物接合到載體 pET-28a 中，形成質體 pET28URI

(五) 透過 DNA 定序檢查選殖所得的基因序列

(六) 將質體轉殖入 *E. coli* 中

三、蛋白質異源表現測試

(一) 將 *E. coli* 輸入 5mL LB 培養基(含 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗生素—卡那黴素)，並以轉速 180 rpm 離心過夜

(二) 從養菌管中取出 1mL 菌液至 250 mL 燒瓶中，加入 100 mL LB 培養基，並在相同條件下培養，直到 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$

(三) 將燒瓶中的菌液分裝為 9 個養菌管，3 管不加 IPTG (異丙基- β -D-硫代半乳糖苷)作為控制組，另 3 管加入 0.1 mM IPTG，最後 3 管加入 1 mM IPTG，各在 16°C (培養 2 天)、 25°C (培養 16 小時)、 37°C (培養 5 小時)的培養箱中培養

(四) 取出 2 mL 的樣品於微量離心管中，離心後分為上層上清液及底部沉澱之菌塊

(五) 以 $20 \mu\text{L}$ Tris-HCl 緩衝溶液溶解菌塊

(六) 將微量離心管放入沸水中煮 5 分鐘後跑膠

(七) 用考馬斯藍(Coomassie Blue)將蛋白質膠染色，搖晃 5 分鐘後，退染至其顏色變為透明

四、蛋白質大量表現與純化

(一) 蛋白質表現

- 1.挑取培養基上單一菌落，培養在 1L LB 培養基中，在 25°C、轉速 130 rpm 下搖晃過夜
- 2.取出上述菌液 10 mL，加入 1 L LB 培養基中在 25°C、轉速 6500 rpm 下培養至 OD₆₀₀=0.6~0.8 後，加入 IPTG 成為 0.1 mM 濃度，在 25°C、轉速 130 rpm 下搖晃過夜
- 3.將菌液倒入離心管中離心 20 分鐘(13000 rpm)
- 4.倒去上清液，可將菌塊連同離心管置-20°C冰箱貯存
- 5.取出含菌塊之離心管置碎冰上，加入 15 mL lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0) 溶解菌塊
- 6.以超聲波震盪 30 分鐘，裝入離心管中
- 7.離心管於 4°C 下離心 20 分鐘(13000 rpm)
- 8.取出上清液並過濾

(二) 親和層析法

- 1.親和層析膠體 1 mL 已經裝填在 Ni-NTA 管柱內
- 2.以 500 mM imidazole、0 mM imidazole 各洗 Ni-NTA 管柱 2 次
- 3.將上述之上清液 20 mL 加入管柱中，並以離心管收集(flow through)
- 4.管柱內依序加入 1 次 0 mM、2 次 50 mM、2 次 100 mM、2 次 300 mM、2 次 500 mM imidazole，每次各加入 10 mL，並以離心管收集過濾液體
- 5.每個離心管取出 3 μL 跑膠(12 % SDS-PAGE)
- 6.蛋白質膠經染色及退染後，收集含有蛋白質的離心管溶液，加入透析袋中，透析 3 次(其中一次過夜透析)

(三) 二次純化 (Rebinding)

- 1.取出透析袋內的蛋白質溶液，加入少量凝血酶(thrombin)在 10°C 下過夜震盪(13000 rpm)
- 2.將 Ni-NTA 管柱以 500 mM imidazole 沖洗 2 次，再以 0 mM imidazole 沖洗 2 次
- 3.將透析袋中的溶液倒入管柱，以離心管收集過濾後液體(flow through)
- 4.管柱內依序加入 0 mM、50 mM、80 mM、100 mM、300 mM、500 mM imidazole 各 10 mL，以離心管收集過濾液體
- 5.各管過濾液體取出 20 μL 跑膠(12 % SDS-PAGE)
- 6.蛋白質膠經染色及退染後，收集含有蛋白質的離心管溶液再透析 3 次(其中一次過夜)

夜透析)

(四) 粒徑篩析層析法 (Size Exclusion Chromatography, SEC)

[原理]

使用具有特定立體網狀孔隙大小的膠體顆粒，或高分子聚合凝膠作為固定相，適用於較大分子量(約 2 kDa 以上)試樣的層析。蛋白質分子流過填充凝膠的管柱時，大分子無法進入凝膠篩孔，而只流經凝膠及管柱間的孔隙，因此總體運行路徑較短，從層析柱入口到出口所需時間較短；較小的分子因為進入凝膠內的篩孔，總體運行路徑較長，故在管柱內的停留時間較長；基於此原理可以區分大小不同的分子，亦可與已知大小的分子作比較而確定未知樣品的分子量。

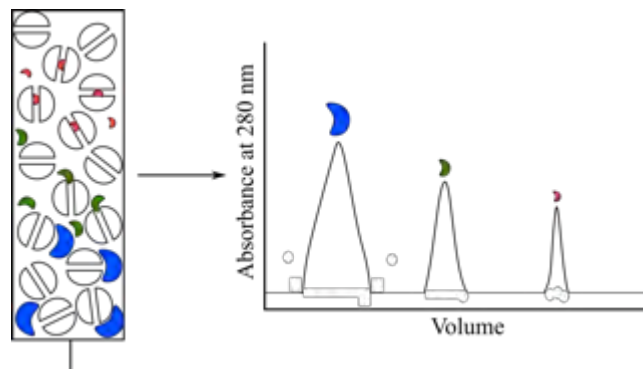


圖 2. 蛋白質分子篩選層析示意圖

(<http://www.labome.cn/method/Protein-Purification.html>)

[步驟]

1. 將完成初步純化之蛋白質於 4°C 下以 13000rpm 離心 20 分鐘，吸取上清液
2. 以適當大小針頭注入機器管線中(使用 Super S200 HR 16/60 管柱，緩衝溶液含 20mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM NaCl、0.5mM dithiothreitol (DTT))
3. 觀察分子篩選樣品曲線

(五) 蛋白質濃縮

1. 取出離心管內蛋白質溶液，裝入濃縮離心管
2. 於濃縮離心管中加入 Tris-HCl 緩衝溶液，在轉速 4000 g 下離心 10 分鐘
3. 將濃縮離心管中的溶液分次加入濃縮離心管上層，在轉速 4000 g 下離心

五、蛋白質濃度測定

(一) 牛血清蛋白(BSA)

1. 將 10 mg/mL 牛血清蛋白和蛋白質原液分別序列稀釋
2. 將 1x, 2x, 4x, 8x 之牛血清蛋白和 1x, 2x, 4x, 8x 之蛋白質依序加入蛋白質膠，跑膠後 (12 % SDS-PAGE)比較條帶寬度，可粗估蛋白質濃度

(二) 分光光譜儀

- 1.將兩個分光液槽(cuvette)加入 Tris-HCl 緩衝溶液放入分光光譜儀(UV₂₈₀)中，作為吸光背景值
- 2.取出一個分光液槽，改加入蛋白質，再以分光光譜儀測量吸光值
- 3.透過比爾定律換算出蛋白質濃度

六、酵素活性分析

(一) 尿酸標準曲線

- 1.配製 2000 μM 尿酸，再序列稀釋
- 2.利用分光光譜儀(UV₂₉₃)，測定不同濃度下尿酸的吸光值
- 3.繪製尿酸濃度的標準曲線

(二) 酵素反應時間測試

- 1.在 96 格之 ELISA 微盤中加入尿酸、酸鹼緩衝溶液及酵素，混合均勻，計時 1~5 分鐘
- 2.到達反應時間(1~5 分鐘)後以 elisa reader 測量吸光值(UV₂₉₃)
- 3.經由繪圖，找到酵素反應線性範圍內的時間(2 分鐘)

(三) 酸鹼值對酵素活性之影響

- 1.用 0.1 M 檸檬酸和 0.2 M 磷酸氫鈉配製 pH 3.0~8.0 的緩衝溶液
- 2.用 0.2 M 甘胺酸和 0.2 M 氫氧化鈉配製 pH 9.0, 10.0 的緩衝溶液
- 3.取 8 個微量離心管，加入尿酸、pH 3.0~10.0 緩衝溶液及酵素反應
- 4.到達反應時間(2 分鐘)後，加入 1 % KOH 終止反應
- 5.用分光光譜儀(UV₂₉₃)測量尿酸吸光值
- 6.繪圖比較不同酸鹼值下尿酸氧化酶的相對活性

(四) 溫度對酵素活性之影響

- 1.取 8 個微量離心管，加入酸鹼緩衝溶液、尿酸及酵素，放入 10°C~80°C 中反應
- 2.到達反應時間(2 分鐘)後，加入 1 % KOH 終止反應
- 3.用分光光譜儀(UV₂₉₃)測量尿酸吸光值
- 4.繪圖比較不同酸鹼值下尿酸氧化酶的相對活性

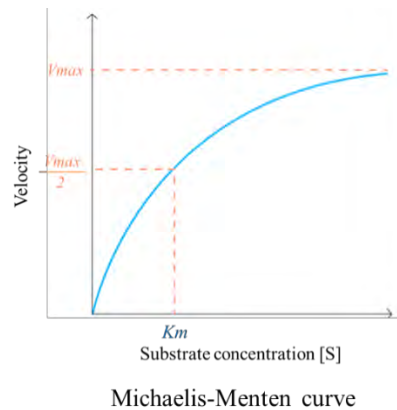
(五) 酵素動力學：米氏動力學(Michaelis-Menten equation)

[原理]

利用下列參數，比較不同酵素間催化反應的能力

- K_m ：酵素與受質間親和力的指標， K_m 值越大代表親和力越小

- V_{max} ：在足夠的受質濃度下，一定量的酵素能催化的最高反應速率
- K_{cat} ($=V_{max}/\text{酵素濃度}$)：單位時間內每莫耳酵素所能催化的受質數



取雙倒數

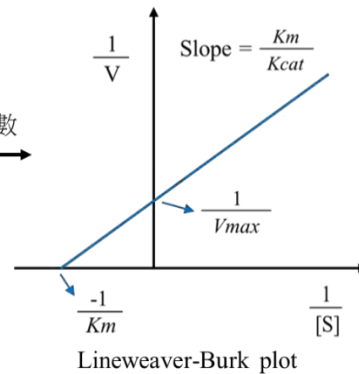


圖 3. 反應速率對受質濃度作圖

圖 4. Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形

[步驟]

1. 在 5 個微量離心管中，配置尿酸溶液(序列稀釋 5 次)，加入六(三)實驗所得酵素相對活性最高之酸鹼緩衝溶液
2. 加入尿酸氧化酶反應，計時，到達反應時間後(2 分鐘)加入 1 % KOH 終止反應
3. 利用分光光譜儀(UV₂₉₃)測量吸光值，利用標準曲線將吸光值換算為尿酸濃度
4. 用反應速率對尿酸濃度作圖，可得到 V_{max}
5. 將尿酸濃度及反應速率取雙倒數再作圖，可得到 K_m 、 K_{cat} 及 K_m/K_{cat}

(六) 酵素金屬離子、有機溶劑、界面活性劑耐受性測試

1. 配製 0.1 M 氯化鎳、氯化鈣、硫酸亞鐵、氯化鉀、硫酸鎂、氯化錳、氯化鈷、乙二胺四乙酸(EDTA)溶液，20 % 丙酮、異丙醇、甲醇、乙醇、二甲基亞砜(DMSO)、聚乙二醇(PEG4000)、 β -ME 溶液，1 % Triton X-100、Tween-20 溶液，1 mM DTT 溶液及 0.02 mM 過氧化氫溶液於離心管中
2. 在上述不同環境下，取數個微量離心管，加入 2 mM 尿酸、緩衝溶液及上述配置之不同溶液
3. 將 0.1 μ M 尿酸氧化酶加入微量離心管中進行反應，計時，到達反應時間後(2 分鐘)加入 1 % KOH 終止反應
4. 利用分光光譜儀(UV₂₉₃)測量吸光值
5. 繪圖比較不同干擾因子對酵素活性的影響

七、酵素熱穩定性測試

[原理]

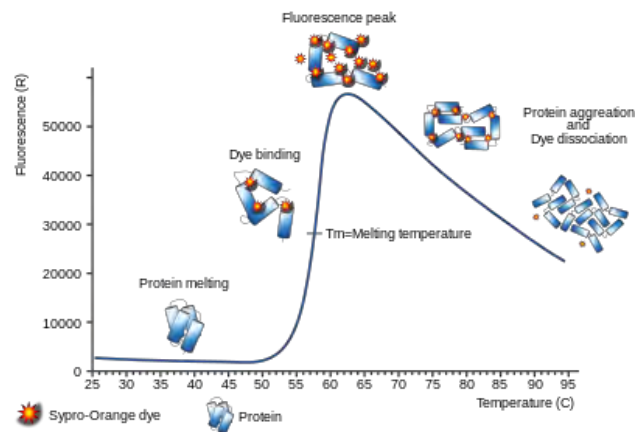


圖 5. Principle of the thermal shift assay

(https://de.wikipedia.org/wiki/Thermal_Shift_Assay)

[步驟]

- (一) 配製 2.5, 5, 10 mg/mL 的尿酸氧化酶
- (二) 配製 Tris-HCl 緩衝溶液：Sypro-orange(蛋白質螢光染色劑) = 1000 : 1 的混合液
- (三) 取 4 個微量離心管，分別加入 2 μ L 的 2.5, 5, 10 mg/mL 的酵素、水(控制組)，再加入 23 μ L 的 Sypro-orange 混合液
- (四) 放在黑暗處 10 分鐘後，放入機器中，設定反應溫度 20°C~95°C

八、酵素熱耐受性測試

- (一) 取 12 個微量離心管，加入 0.1 μ M 酵素，並放置 6 管在 30°C 水浴槽中、6 管在 70°C 水浴槽中
- (二) 在微量離心管中，配置 200 μ M 尿酸溶液，並加入酸鹼緩衝溶液
- (三) 每過 1 小時，從 2 個水浴槽中各取出一管酵素加入上述尿酸溶液的離心管中
- (四) 將離心管放置於該溫度下的水浴槽內，反應 10 分鐘後加入終止劑 1% KOH
- (五) 以 elisa reader 於波長 293nm 下測其吸光值
- (六) 繪圖分析

九、蛋白質結構解析

- (一) 製作蛋白質晶體與重金屬衍生物
- (二) 繞射數據的收集
- (三) 數據計算
- (四) 解決相位問題
- (五) 獲得電子密度圖

(六) 大分子模型建立

十、高尿酸檢測

(一) 碘化鉀比色法

[原理]

利用碘化鉀與尿酸降解過程中產生的 H_2O_2 進行氧化還原反應(圖 6)，以肉眼觀察溶液轉為黃色，透過顏色深淺初步判斷尿酸濃度高低。

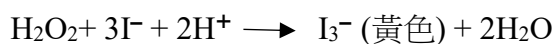


圖 6. 氧化還原比色法—碘化鉀與過氧化氫於酸性環境下氧化還原之化學反應式

[步驟]

1. 溶液檢測

- (1)在微量離心管中，將酵素加入不同濃度的尿酸溶液中，反應 2 分鐘
- (2)2 分鐘後加入終止劑 KOH
- (3)加入 20 % KI、10 % H_2SO_4 ，混勻後溶液轉為黃色
- (4)加入 0.1 % 澱粉溶液，顏色轉為藍紫色

2. 試片檢測

- (1)裁減適當大小的硝酸纖維素膜(Nitrocellulose membrane)做為固相試片
- (2)將酵素滴在試片上靜置風乾
- (3)將尿酸滴在試片上反應 2 分鐘
- (4)2 分鐘後加入終止劑、KI+ H_2SO_4 混合溶液
- (5)靜置觀察顏色變化

(二) 光譜檢測法

[原理]

利用對硝基苯硼酸與尿酸降解過程中產生的 H_2O_2 反應，生成黃色的硝基苯酚鹽 (圖 7)，其在波長 405 nm 下有一吸光峰值，利用酵素免疫分析測讀儀(elisa reader)測溶液在 405 nm 的吸光，即可推算出過氧化氫的濃度及酵素反應速率，進而得知尿酸濃度。

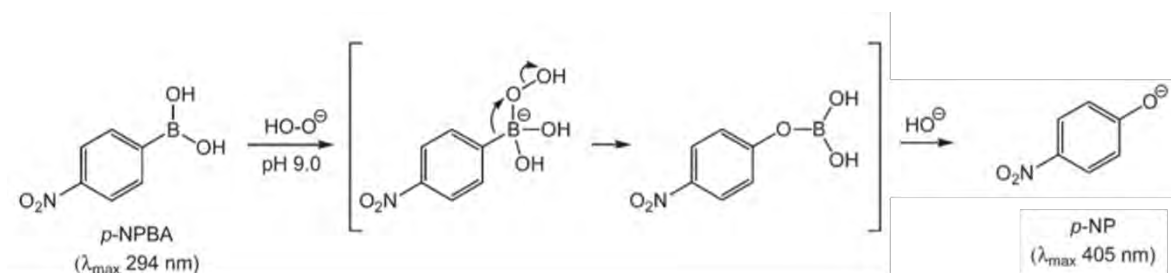


圖 7. 對硝基苯硼酸與過氧化氫鹼性條件下之化學反應式 (Lu, Lin, Chang, Wu, & Lo, 2019)

[步驟]

- (一) 在波長 405 nm 下測不同濃度之對硝基苯酚(PNP)的吸光值，以繪製標準檢量線
- (二) 在微量離心管中，將酵素加入不同濃度的尿酸溶液中，反應 2 分鐘
- (三) 2 分鐘後加入終止劑 KOH
- (四) 在波長 405 nm 下分別測其吸光值，對照標準檢量線，以回推其 PNP 濃度，計算出酵素反應速率
- (五) 繪製反應速率對尿酸濃度圖形

伍、研究結果

一、基因體探勘

從生物資料庫(NCBI)和已發表文獻中，針對各微生物源尿酸氧化酶基因來比對分析，挑選出嗜極生物抗輻射奇異球菌源尿酸氧化酶(*Deinococcus radiodurans* uricase, NCBI Accession number WP_010887803.1)、耐熱雙球桿菌源尿酸氧化酶(*Thermobispora bispora* uricase, NCBI Accession number WP_013132827.1) (圖 8)。

Species	Strain	GenBank Accession number
<i>Acidobacterium</i> sp.	MPS AC1X8	NZ_ADVX01000009.1
<i>Actinosynnema mirum</i>	DSM 43827	NC_013093.1
<i>Arthrobacter aureosens</i>	TC1	NC_008711.1
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	AG	NC_011886.1
<i>Bacillus clausii</i>	KSM-K16	NC_006582.1
<i>Bacillus halodurans</i>	C-125	NC_002570.2
<i>Bacillus selenitireducens</i>	MLS10	NC_014219.1
<i>Bacillus subtilis</i>	str. 168	NZ_ABQK01000005.1
<i>Bacillus tusciae</i>	DSM 2912	CP002017.1
<i>Brachyobacterium faecium</i>	DSM 4810	NC_013172.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	J2315	NC_011000.1
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	K96243	NC_006350.1
<i>Citromyces aculeiphilus</i>	DSM 44928	NC_013131.1
<i>Cellulomonas flavigena</i>	DSM 20109	CP001964.1
<i>Chitinophaga pinensis</i>	DSM 2588	NC_013132.1
<i>Comamonas testasteroni</i>	CNB-2	NC_013446.1
<i>Deinococcus radiodurans</i>	R1	NC_001263.1
<i>Dickeya dadantii</i>	3937	NC_014500.1
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP1430	NC_013961.1
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM 12163	FN392235.1
<i>Frankia alni</i>	ACN14a	NC_008278.1
<i>Geoskermatophilus obscurus</i>	DSM 43160	NC_013757.1
<i>Kinococcus radiotolerans</i>	SRS30216	NC_009664.2
<i>Kocuria rhizophila</i>	DC2201	AP009152.1
<i>Klebsiella bacter racemifer</i>	DSM 44963	ADVG01000003.1
<i>Methylobacterium nodulans</i>	ORS 2060	NC_011894.1
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	JCM 2831	NC_010505.1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MC2 155	NC_008596.1
<i>Nakamurella multipartite</i>	DSM 44233	NC_013235.1
<i>Nocardia farcinica</i>	IFM 10152	NC_006361.1
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	DSM 43111	CP002040.1
<i>Paenibacillus</i> sp.	JDR-2	NC_012914.1
<i>Plantococcus vagans</i>	C9-1	NC_014562.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	NC_002516.2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBW25	NC_012660.1
<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP134	NC_007347.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	bv. viciae 3841	NC_008380.1
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	PR4	NC_012490.1
<i>Rhodococcus opacus</i>	B4	AP011115.1
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	DSM 9941	NC_008148.1
<i>Saccharomyces erythraea</i>	NKRI 2338	AM420293.1
<i>Solibacter usitatus</i>	Eilm6076	CP000473.1
<i>Sorangium cellulosum</i>	So ce 36	NC_010162.1
<i>Stactobrevibacter massachusettsensis</i>	DSM 44728	CP001776.1
<i>Starkeya novella</i>	DSM 44728	CP002026.1
<i>Streptomyces avermitilis</i>	DSM 506	BA000030.3
<i>Streptomyces hingchengensis</i>	MA-4680	CP002047.1
<i>Streptomyces griseus</i>	NBRC 13350	AP009493.1
<i>Streptomyces scabiei</i>	87.22	FN554889.1
<i>Streptoparamecium rissatum</i>	DSM 43071	NC_013595.1
<i>Thermobispora bispora</i>	DSM 43833	CP001874.1
<i>Tracoptera radiotolerans</i>	DSM 17093	CP002049.1

圖 8. 文獻記載含尿酸氧化酶基因序列的細菌種類

(Dabbagha, Moradpoura, Ghasemiana, & Ghasemia, 2012)

將挑選出之酵素與目前已發表之微生物源尿酸氧化酶進行蛋白質一級序列比對，分別為球形節桿菌源尿酸氧化酶(*Arthrobacter globiformis* uricase, NCBI Accession number D0VWQ1)、菇草桿菌源尿酸氧化酶(*Bacillus subtilis* uricase, NCBI Accession number WP_003242600.1)、酸桿菌源尿酸氧化酶(*Granulicella tundricola* uricase, NCBI Accession number WP_013581210.1)、白色庫氏菌源尿酸氧化酶(*Kyrpidia tusciae* uricase, NCBI Accession number WP_013075995.1)，能夠得知其蛋白質序列相似度 (表 1)。

表 1. 尿酸氧化酶之蛋白質序列相似度比對

	Consensus	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Thermobispora bispora</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Granulicella tundricola</i>
Consensus	100	42.8	55.9	25.7	23.8	29.4
<i>Deinococcus radiodurans</i>		100	42.9	22.5	38.1	26.2
<i>Thermobispora bispora</i>			100	26.2	41.9	26.9
<i>Arthrobacter globiformis</i>				100	43.7	27.9
<i>Bacillus subtilis</i>					100	55.7
<i>Granulicella tundricola</i>						100
<i>Kyrpidia tusciae</i>						

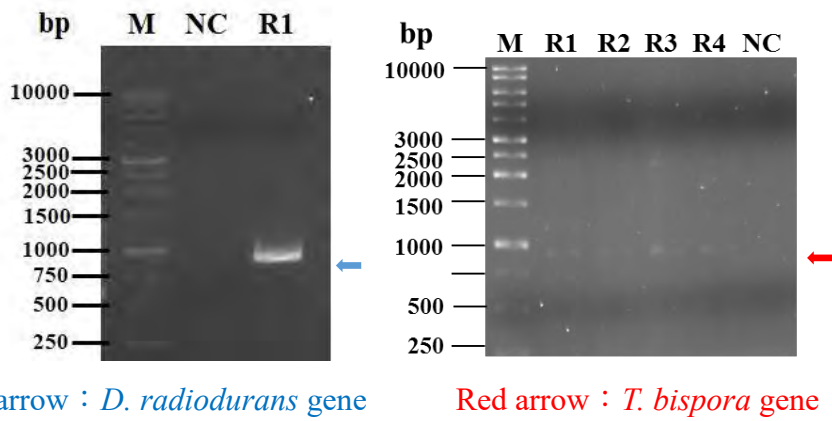
取得抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)及耐熱雙球桿菌(*Thermobispora bispora*)之全長基因片段後，設計引子以擷取出兩種菌源製造尿酸氧化酶的基因片段(表 2)。

表 2. 引子之序列

微生物源 尿酸氧化酶	使用的限制酶		引子之全長序列 (5'~3')
抗輻射奇異球菌 源尿酸氧化酶	Forward	NdeI	CGG CATAGC ATGATGACGGGAACCCAG
	Reverse	XhoI	GTGGAGCGCGCCGAGTG CTCGAG ATT
耐熱雙球桿菌源 尿酸氧化酶	Forward	NdeI	AAT CATATG GCCATCGTCCTCGGACGC
	Reverse	EcoRI	ACGCCCGGCTTCTGCTG GAATTC AAT

二、基因選殖

透過聚合連鎖反應取得以抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)及耐熱雙球桿菌(*Thermobispora bispora*) 全長 DNA 為模版的尿酸氧化酶基因片段，長度分別為 897 bp 及 906 bp (圖 9)，接著接合載體 pET-28a/His-tag (圖 10)，再將其轉殖入 *E.coli* BL21(DE3)中表現。



Blue arrow : *D. radiodurans* gene

Red arrow : *T. bispora* gene

圖 9. *D. radiodurans* uricase gene (897 bp) 及 *T. bispora* uricase gene (906 bp) DNA 電泳圖

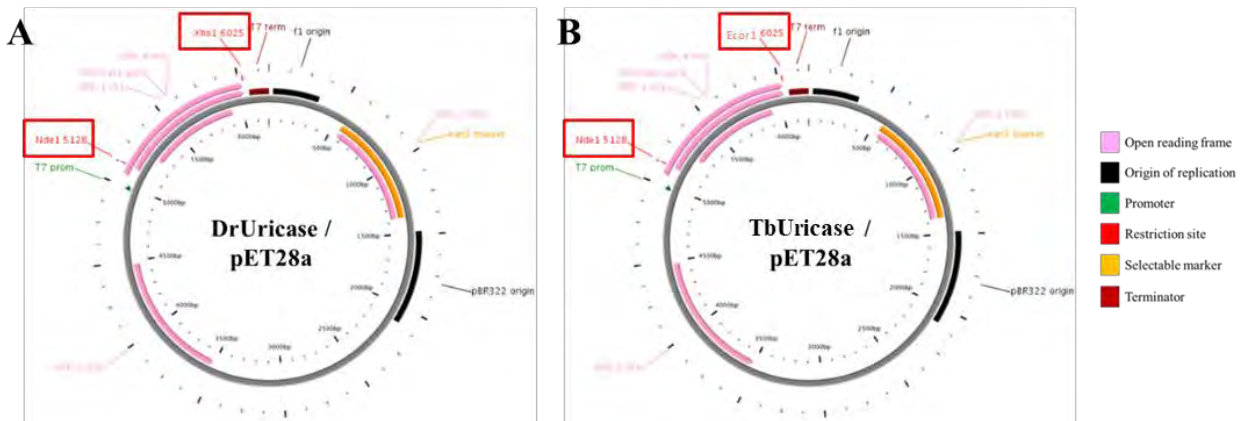


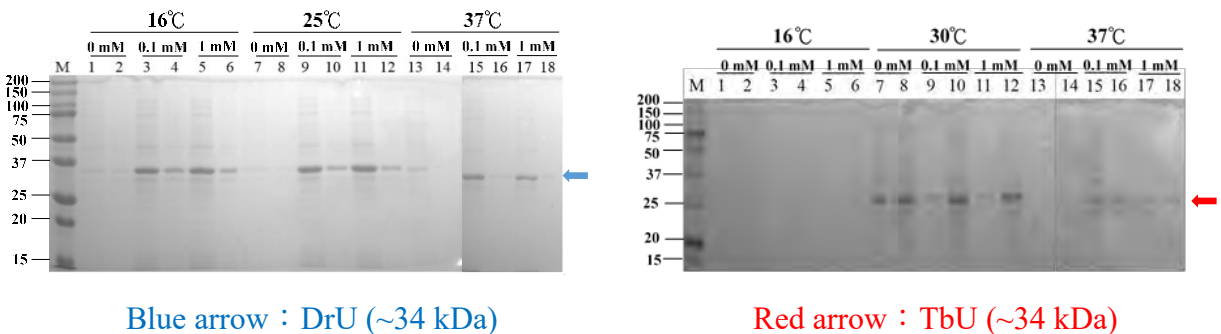
圖 10. (A) 以分子選殖技術建構 DrUricase/pET-28a 之質體 DNA

(B) 以分子選殖技術建構 TbUricase/pET-28a 之質體 DNA

三、蛋白質異源表現測試

在進行反應溫度 16°C、25°C/30°C 及 37°C 及誘導物 IPTG 0.1 mM 及 1 mM 的誘導表現測試後，決定以 25°C、0.1 mM IPTG 為誘導條件。

(註：*D. radiodurans* uricase 以下簡稱 DrU，*T. bispora* uricase 以下簡稱 TbU)



Blue arrow : DrU (~34 kDa)

Red arrow : TbU (~34 kDa)

圖 11. DrU & TbU 重組蛋白質誘導條件測試圖 (12 % SDS-PAGE)

四、蛋白質純化

(一) 親和層析法

利用 Ni-NTA/His-tag 純化尿酸氧化酶，12% SDS-PAGE 跑膠後，顯示~34 kDa 的粗

條帶，和其分子量大小一致。

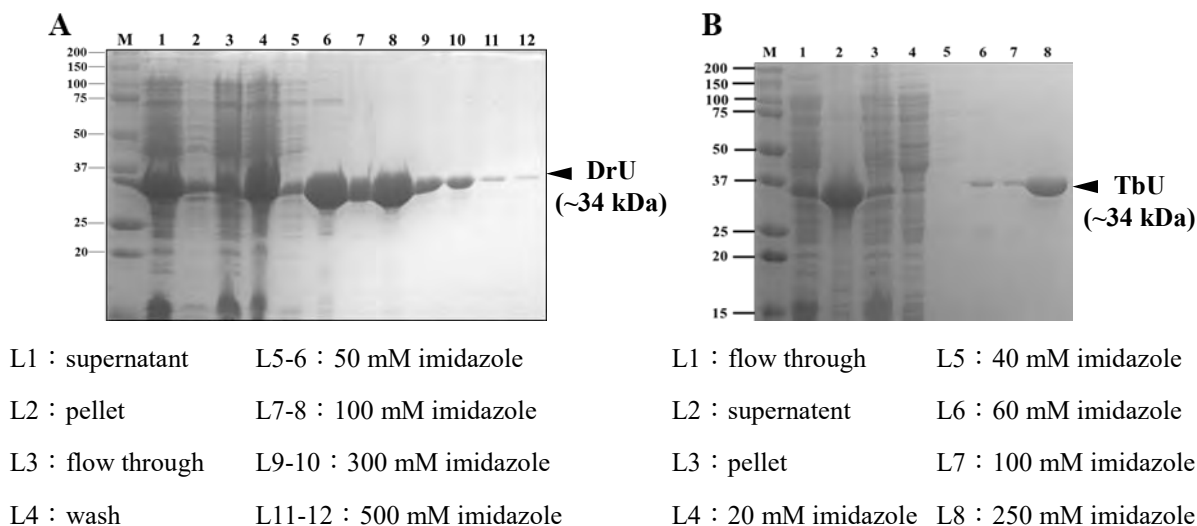


圖 12. (A) DrU 重組蛋白質純化結果圖 (12 % SDS-PAGE)

(B) TbU 重組蛋白質純化結果圖 (12 % SDS-PAGE)

(二) 粒徑篩析層析法(Size Exclusion Chromatography, SEC)

利用 Superdex S200 HR 16/60 柱(GE Healthcare)，在含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl 和 0.5 mM 二硫蘇糖醇(Dithiothreitol)的緩衝溶液中，通過凝膠過濾層析法，進一步純化蛋白質(圖 13)。

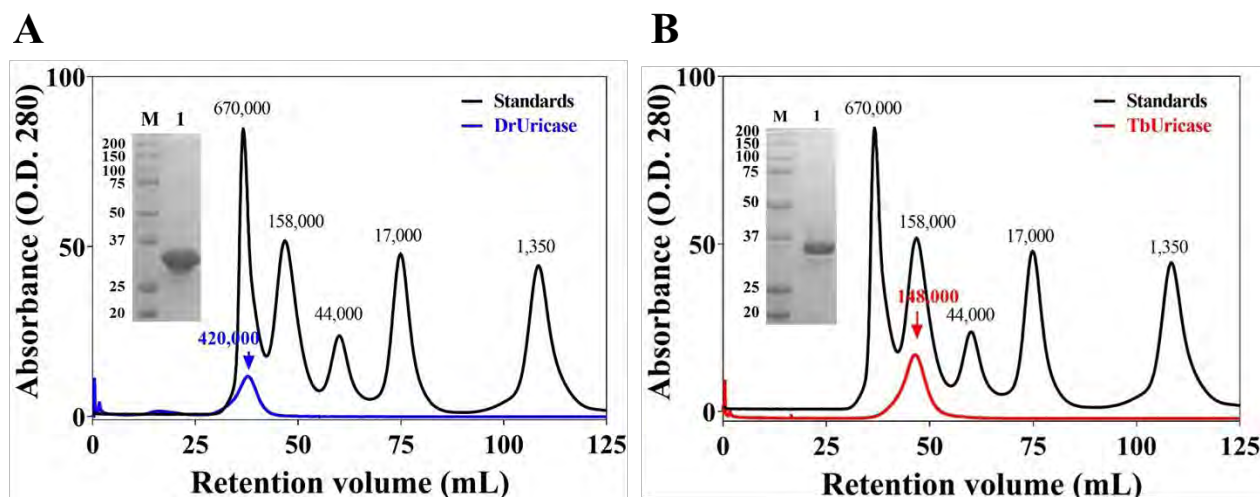


圖 13. (A)粒徑篩析層析法與 DrU 二次純化(12 %SDS-PAGE)結果圖

(B)粒徑篩析層析法與 TbU 二次純化(12 %SDS-PAGE)結果圖

五、蛋白質濃度測定

以牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin)為標準，透過布拉德福蛋白質定量法(Bradford assay)，目測電泳膠上條帶的寬度，粗估蛋白質濃度(圖 14)；同時也利用分光光譜儀(UV₂₈₀)測定蛋白質的吸光值，透過比爾定律換算出精確的蛋白質濃度，DrU 及 TbU 的濃度分別為 21.63 mg/mL 及 32.73 mg/mL。

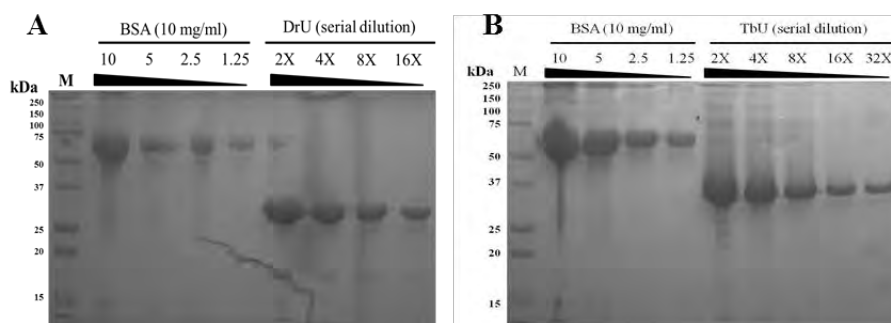


圖 14. (A) DrU 重組蛋白質之 BSA 定量膠圖 (12% SDS-PAGE)
(B) TbU 重組蛋白質之 BSA 定量膠圖 (12% SDS-PAGE)

六、酵素活性分析

(一) 尿酸標準曲線

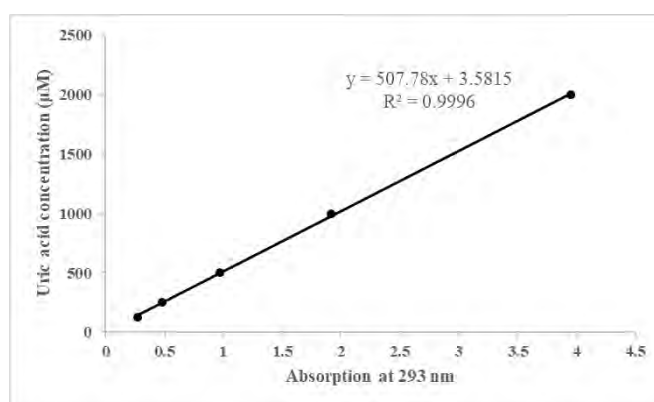


圖 15. 2000 μ M, 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M 的尿酸對吸光值作圖

(二) 溫度對酵素活性之影響

為了測定溫度對酵素催化效率的影響，於 10~90°C 進行反應，比較其相對活性，DrU 在 30°C 下活性最高，TbU 在 70°C 下活性最高。

(三) 酸鹼值對酵素活性之影響

為了測定酸鹼值對酵素活性之影響，於 pH 3.0~10.0 進行酵素反應 (Phosphate-Citrate 緩衝溶液 pH 3.0-7.0；Glycine-NaOH 緩衝溶液 pH 8.0-10.0)，並比較其相對活性，DrU 在 pH 10.0 下活性最高，TbU 在 pH 9.0 下活性最高。

(四) 酵素熱穩定性

透過熱移分析(Thermal shift assay)，我們測量出 DrU 的熔點為 54°C。而由於 TbU 之微生物源為耐熱菌，推測酵素在高溫下亦不會變性，因此計畫加入尿素(Urea)破壞蛋白質結構間的氫鍵，再換算回其實際熔點。

(五) 酵素熱耐受性

為了測定長時間高溫對酵素活性之影響，將酵素分別置於 30°C、70°C 下 1~6 小時，再與尿酸溶液於該溫度下反應，比較其與在最佳反應溫度下之相對活性。DrU 在高

溫下已變性，故無催化能力，在 30°C 下能維持 6 小時活性；TbU 在 70°C 下放置 6 小時仍有 50 % 的活性，在 30°C 同樣能維持 6 小時活性。

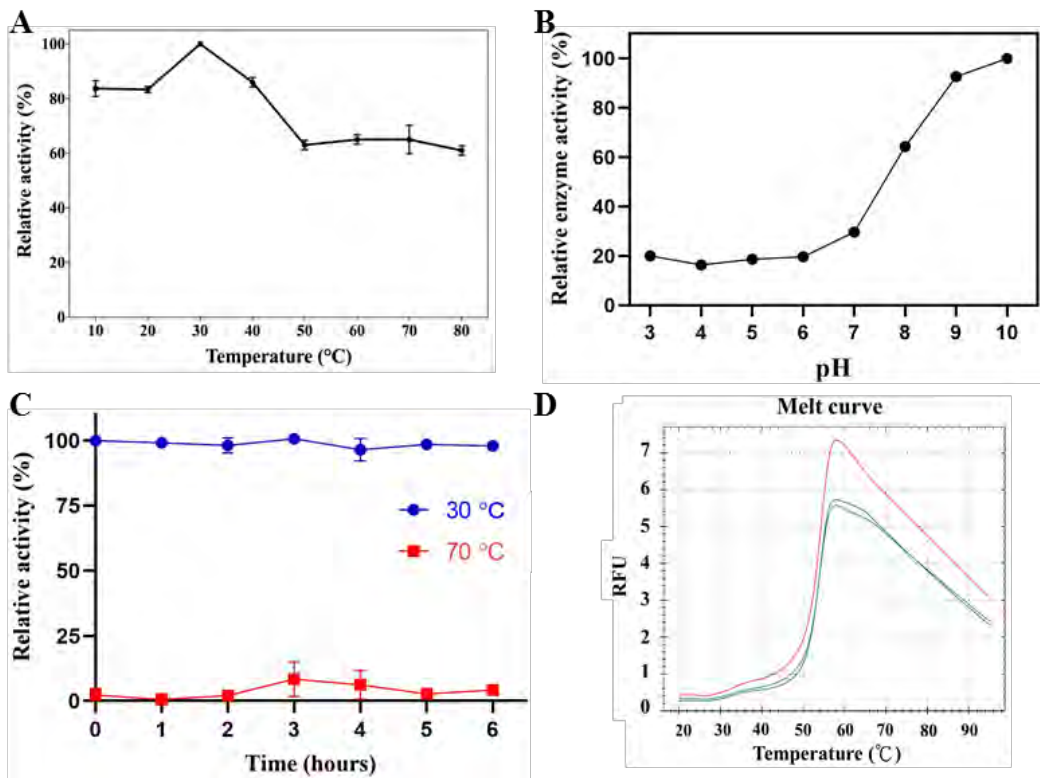


圖 16. Characterization of *D. radiodurans* uricase (A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應 pH 值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性 (紅：10 mg/mL, 藍：7.5 mg/mL, 綠：5 mg/mL)

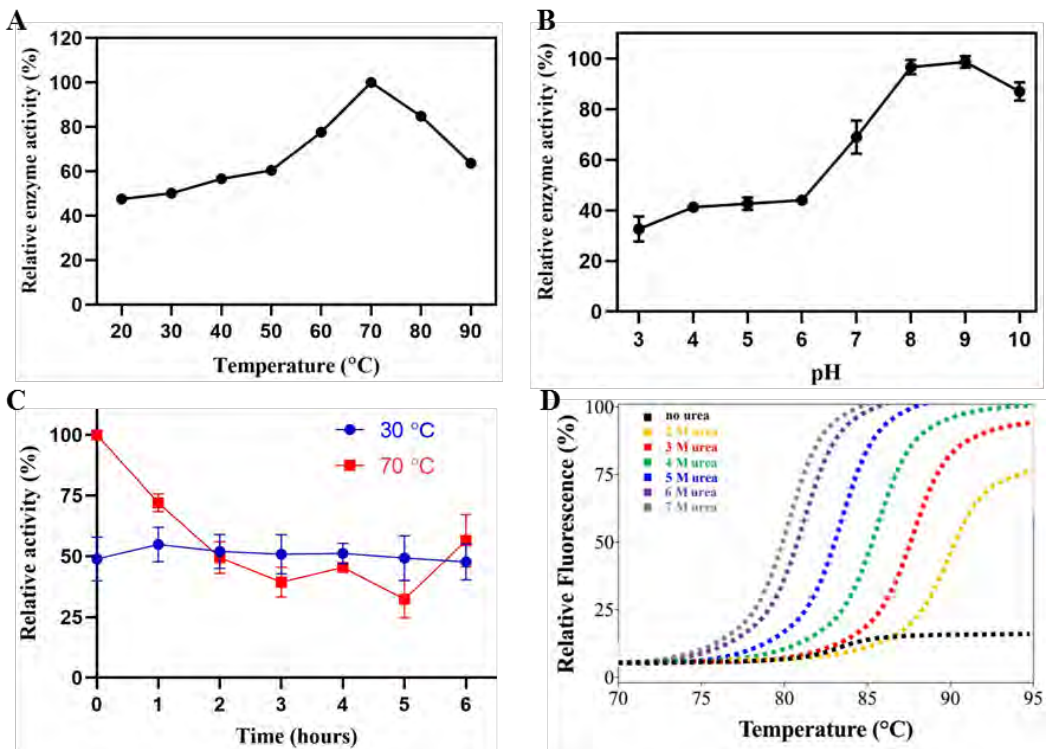


圖 17. Characterization of *T. bispora* uricase (A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應 pH 值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性實驗設計概念圖

(六) 酵素動力學 (Enzyme Kinetics)

為了探討酵素的催化能力，分別將 DrU 及 TbU 以最佳溫度及酸鹼值條件下進行酵素動力學分析，DrU 之反應條件為 2 分鐘，pH 10.0, 30°C, [DrU] = 0.5 μM (圖 18)，TbU 之反應條件為 2 分鐘，pH 9.0, 70°C, [TbU] = 0.1 μM (圖 19)。而為了解 TbU 在室溫下的催化能力，進行 30°C 之酵素動力學，反應條件為 2 分鐘，pH 9.0, 30°C, [TbU] = 10 μM (圖 19)。

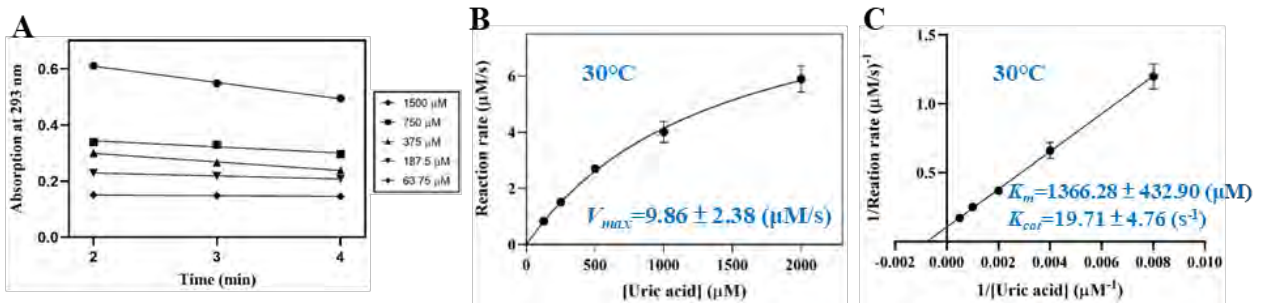


圖 18. DrU enzyme kinetics (A) 酵素反應時間(Time dependent kinetics) (B) Michaelis-Menten 作圖 (C) Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形

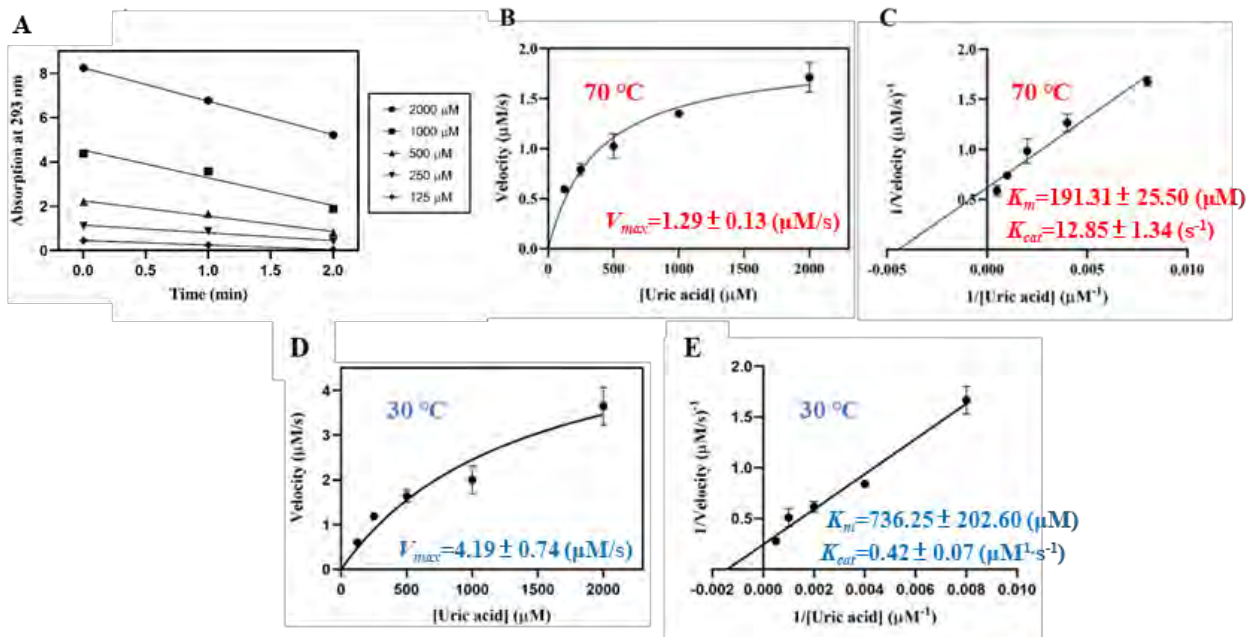


圖 19. TbU enzyme kinetics (A) 酵素反應時間(Time dependent kinetics) (B,C) Michaelis-Menten 動力學與 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖 (70°C) (D,E) Michaelis-Menten 動力學與 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖(30°C)

(七) 不同金屬離子、有機溶劑和界面活性劑對酵素活性之影響

為了探討不同干擾因子對酵素反應之影響，於酵素反應中分別加入不同金屬離子、有機溶劑及界面活性劑，比較相對活性(圖 20, 表 3)。由圖 20，DrU 與 TbU 酵素之生化特性相似，皆不需二價金屬離子作為輔酶，但兩者在含有機溶劑(以 β-ME 最為

明顯) 的環境下，酵素活性下降。

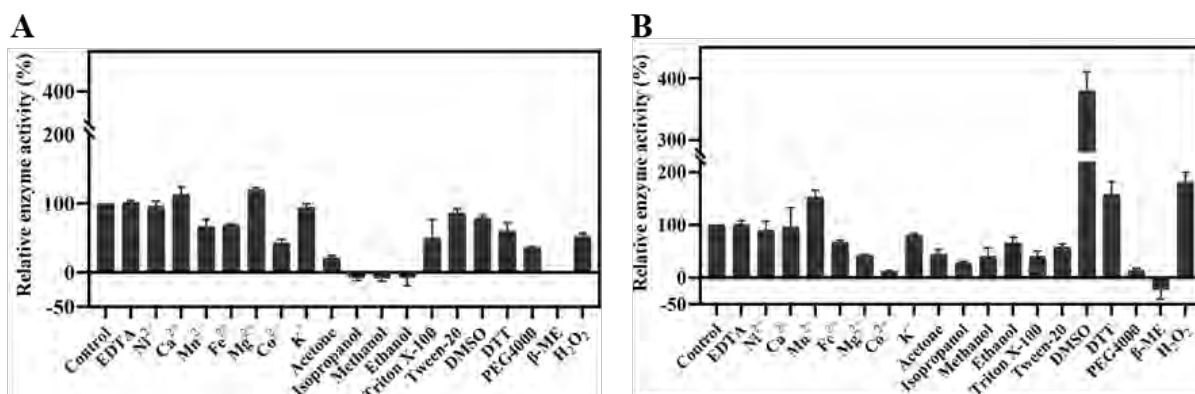


圖 20. (A)DrU 之耐受性實驗結果圖 (B)TbU 之耐受性實驗結果圖

表 3. DrU, TbU 之耐受性相對活性比較表

Effectors	Concentration	DrU relative activity (%)	TbU relative activity (%)	Effectors	Concentration	DrU relative activity (%)	TbU relative activity (%)
Control	-	100.0	100.0	Isopropanol	20 %	-7.5 ± 4.6	27.6 ± 3.2
EDTA	0.1 μM	101.1 ± 3.0	100.5 ± 7.5	Methanol	20 %	-8.2 ± 4.6	40.5 ± 11.4
Ni ²⁺	0.1 μM	95.8 ± 7.7	89.8 ± 16.7	Ethanol	20 %	-11.5 ± 5.2	65.3 ± 1.4
Ca ²⁺	0.1 μM	112.8 ± 11.9	95.4 ± 37.3	Triton X-100	1 %	49.3 ± 27.6	40.3 ± 10.2
Mn ²⁺	0.1 μM	66.7 ± 10.9	152.7 ± 13.0	Tween-20	1 %	86.3 ± 6.3	58.0 ± 5.7
Fe ²⁺	0.1 μM	68.2 ± 4.1	66.9 ± 3.7	DMSO	20 %	78.0 ± 4.8	380.0 ± 30.5
Mg ²⁺	0.1 μM	119.8 ± 3.3	42.5 ± 1.8	DTT	1 mM	30.1 ± 11.6	157.5 ± 24.6
Co ²⁺	0.1 μM	41.9 ± 6.0	12.5 ± 1.6	PEG4000	20 %	36.0 ± 0.9	13.8 ± 3.9
K ⁺	0.1 μM	94.1 ± 5.4	80.3 ± 3.3	β-ME	20 %	-7.0 ± 25.0	-42.1 ± 29.1
Acetone	20 %	20.8 ± 3.8	43.8 ± 8.7	H ₂ O ₂	0.02 mM	52.2 ± 4.8	180.5 ± 19.2

七、蛋白質結構解析

(一) 蛋白質結晶學

於蛋白質純化與濃縮過程，取得高純度和濃度之重組蛋白質後，透過 PCT 測試選擇適當養晶濃度，最終以 6 mg/mL 之濃度進行高通量蛋白質結晶篩選 (圖 21)。

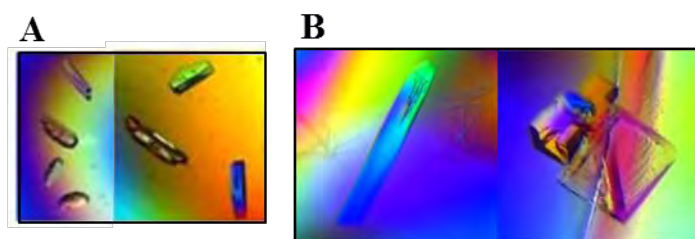


圖 21. (A)*D. radiodurans* uricase 於可見光顯微鏡下之蛋白質晶體 (B) *T. bispora* uricase 於可見光顯微鏡下之蛋白質晶體

- *D. radiodurans* uricase 的養晶條件為 50 % Tacsimate (pH 7.0)，於七天後形成長柱狀及方塊狀晶體，經由 X-ray 繞射後產生蛋白質繞射圖型，待收集完整數據解析其蛋白質結構。
- *T. bispora* uricase 的養晶條件為 0.2 M Li₂SO₄、0.1 M Bis-Tris (pH 6.5)及 25 % PEG 3350，於

七天後形成長柱狀及方形塊狀晶體，經由 X-ray 繞射後產生蛋白質繞射圖型，已收集完整數據解析其蛋白質結構。

(二) 胺基酸一級序列分析

將蛋白質分子模擬構型於 DALI 分析，在資料庫中搜尋與其相似之蛋白質結構，基於蛋白質結構信息進行胺基酸一級序列比對 (圖 22)。

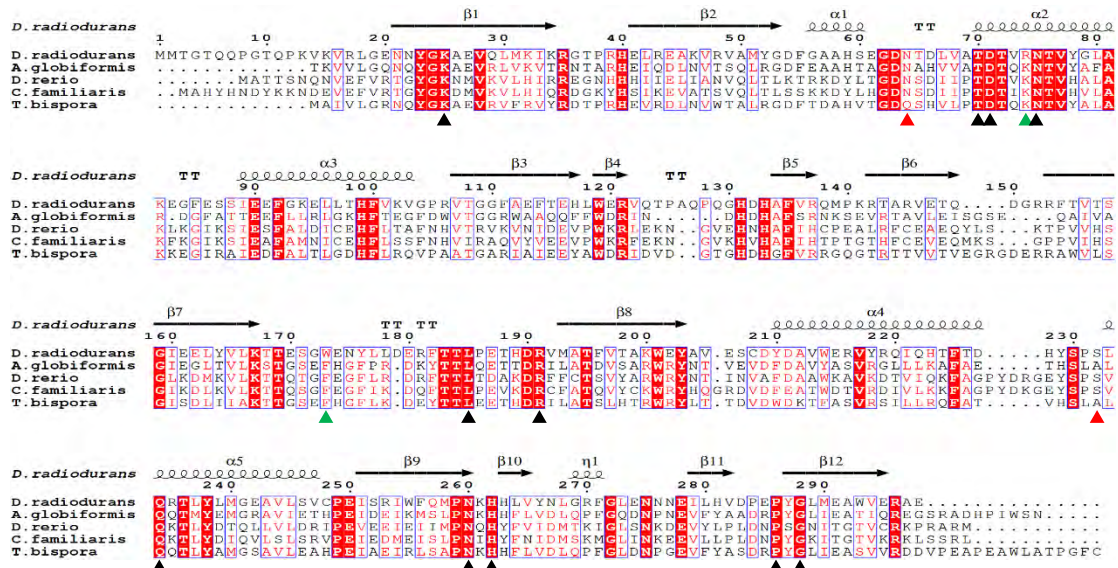


圖 22. *D. radiodurans* uricase, *T. bispora* uricase 及與其相似之蛋白質一級序列比對圖

- 箭頭指示為靠近酵素活化區之胺基酸，可能為參與酵素催化之重要位點，黑箭頭為高度保守之胺基酸位點，綠色和紅色箭頭分別為 *D. radiodurans* 與 *T. bispora* 獨特之胺基酸位點。

(三) 蛋白質結構解析

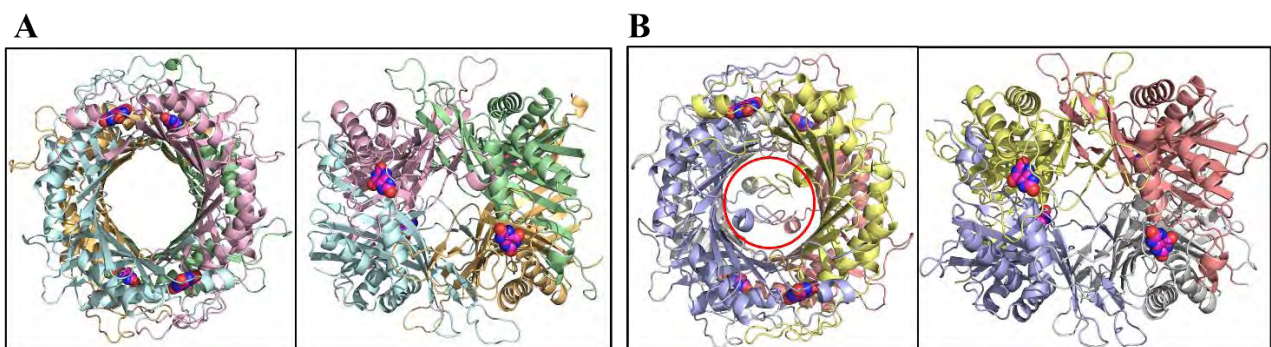


圖 23. (A) *D. radiodurans* uricase 分子模擬結構之頂視圖與側視圖，以對稱四聚體呈現

(B) 已解析 *T. bispora* uricase 蛋白質結構之頂視圖與側視圖，以對稱四聚體呈現

- *D. radiodurans* uricase 之蛋白質單體結構由 5 個主要的 α -helix 與 12 個 β -sheet 所組成，比較 DrU 與 TbU 之總體結構差異，後者於 C 端具有特異性的 α -helix 構型 (圖 B 紅圈處)，過去曾被報導與提升酵素之熱穩定性相關。

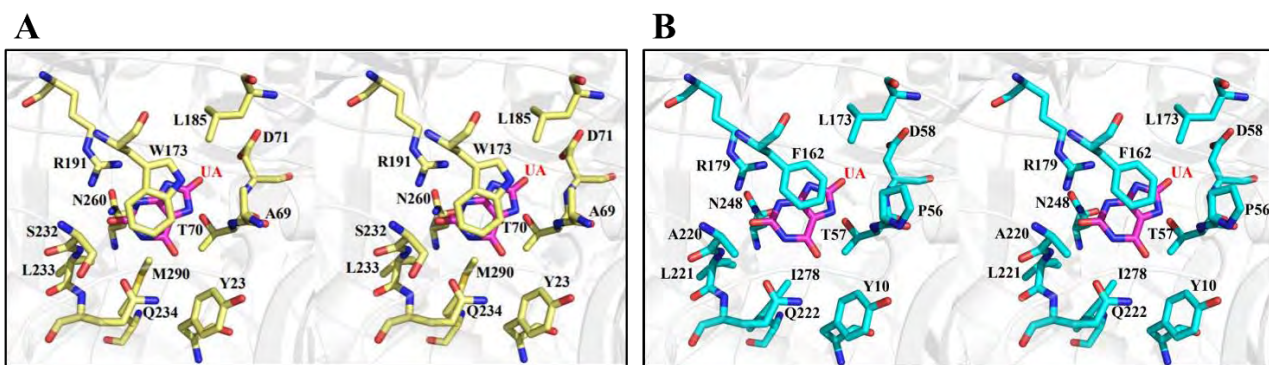


圖 24. (A) *D. radiodurans* uricase 酵素受質結合區之立體模擬視圖 (B) 已解析之 *T. bispora* uricase 結構於酵素受質結合區之立體視圖

➤ 分析可能參與尿酸(UA, 紅字)結合與催化之重要胺基酸(黑字)，淺黃色柱狀圖呈現各胺基酸之立體化學構型，受質尿酸則以桃紅色柱狀圖呈現。

八、高尿酸檢測

(一) 氧化還原比色法

目前在溶液態中測試，尿酸初始濃度分別為 1000 μM , 200 μM , 40 μM , 8 μM , 1.6 μM (5 倍稀釋)，[DrU]=1 μM ，反應 2 分鐘後加入碘化鉀及硫酸混和溶液，呈色結果由深黃到淺黃 (圖 25-A)；在檢測溶液中加入澱粉改良，使澱粉與碘反應，使顏色變化更明顯，尿酸初始濃度分別為 2100 μM , 420 μM , 84 μM , 16.8 μM , 3.36 μM (5 倍稀釋)，[DrU]=1 μM ，反應 2 分鐘後加入碘化鉀、硫酸及澱粉混合溶液，呈色結果由深紫到淺紫(圖 25-B)。此方法具有顏色變化明顯、可以肉眼觀察之優點。

註：人體血液中尿酸的標準濃度為 420 μM

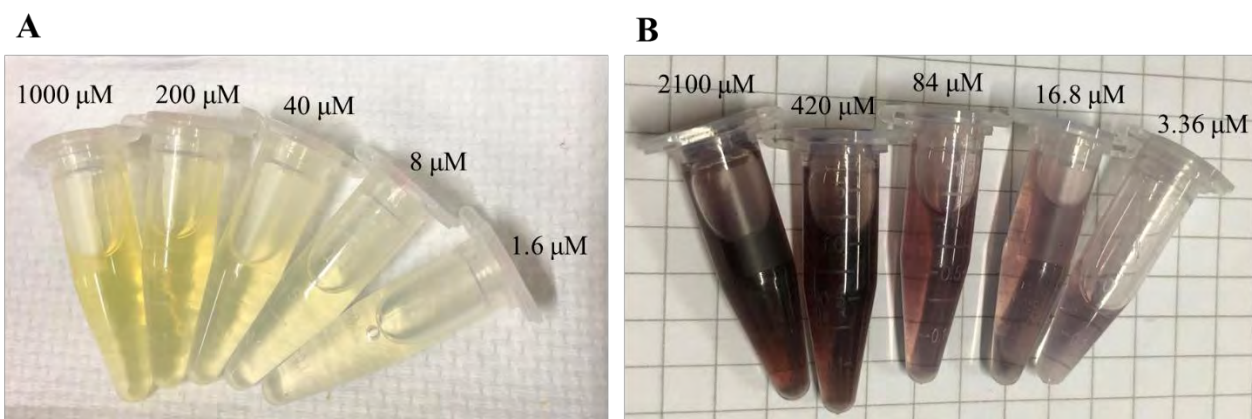


圖 25. (A) 加入碘化鉀之呈色圖 (B) 加入碘化鉀及澱粉之呈色圖

(二) 光譜檢測法

尿酸初始濃度為 50 mM, 10 mM, 2000 μM , 400 μM , 80 μM ，[DrU]=10 μM 。在反應終止 20 分鐘後，以 elisa reader 測吸光值，可換算出精確的尿酸濃度，此種方法精確性較高，可用於尿酸定量(圖 26)。

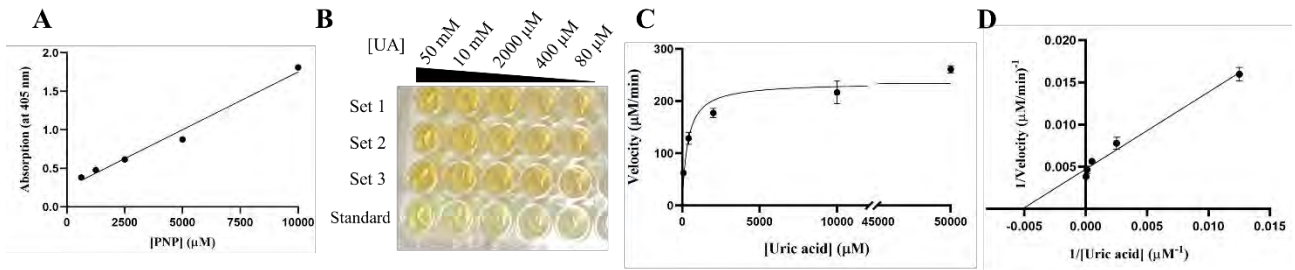


圖 26. (A)對硝基苯酚(PNP)標準檢量線 (B)尿酸在加入 p-NPBA 後在 ELISA 微盤上的呈色結果圖 (C)反應速率對尿酸濃度作圖 (D) Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形

陸、討論

一、基因體探勘

將篩選出之抗輻射菌源尿酸氧化酶與耐熱雙球菌源尿酸氧化酶，進行蛋白質一級序列比對分析，與目前文獻記載催化活性最佳之枯草桿菌源尿酸氧化酶相比，抗輻射菌源尿酸氧化酶與其相似度為 22.5%，而耐熱雙球菌源尿酸氧化酶為 26.2%，可知其序列相似度低，且基於嗜極生物之生物特性，引起我們的研究興趣，因此我們選擇抗輻射奇異球菌源尿酸氧化酶及耐熱雙球菌源尿酸氧化酶進行研究。

二、基因選殖

透過聚合連鎖反應取得大量尿酸氧化酶基因片段後，將基因片段接合入載體中，再轉殖入勝任細胞 *E. coli* BL21(DE3)中，透過抗生素篩選出基因轉殖成功之菌落，養菌並生產出大量蛋白質。

三、蛋白質異源表現測試

在 16°C、25°C、37°C 及不同濃度之誘導劑 IPTG 的條件下養菌，透過 12% SDS-PAGE 跑膠得知細菌生產蛋白質的產量高低，並以產量及純度高的條件：25°C, 0.1 mM IPTG 作為大量表現的條件。

四、蛋白質純化

(一) 親和管柱層析

將細菌在異源表現測試下的條件：25°C, 0.1 mM IPTG 大量培養，生產出之大量蛋白質，利用 Ni-NTA 管柱純化。由於在 pET-28a 載體上含有 His-tag，因此可利用 Ni²⁺ 結合含 His-tag 的蛋白質來過濾掉雜蛋白。在純化完後，12% SDS-PAGE 跑膠結果可見明顯的單一粗條帶。

(二) 粒徑篩析層析法

在 Tris-HCl pH 8.0 緩衝溶液下，推測 DrU 在溶液中可能以 12 聚體存在，未來可在進一步用分析級超高速離心機 (Analytical Ultracentrifuge, AUC) 分析確認。而 TbU 則

在溶液中以四聚體存在，相似於過去報導之同源酵素，也符合已解析蛋白質結構之對稱性模型，未來仍可進一步透過 AUC 分析確認。

五、蛋白質濃度測定

(一) 布拉德福蛋白質定量法(Bradford assay)

將牛血清蛋白(BSA)及蛋白質(DrU 或 TbU)分別序列稀釋，一同以 12 % SDS-PAGE 跑膠，圖 14(A)可見條帶的寬度：2.5 mg/mL 牛血清蛋白約與稀釋 8 倍之 DrU 同寬，因此可推算 DrU 之濃度約為 20 mg/mL。圖 14(B)可見條帶的寬度：1.25 mg/mL BSA 約介於稀釋 4 倍及 8 倍之 TbU 間，因此推測 TbU 之濃度介於 20~40 mg/mL。

(二) 分光光譜儀(UV₂₈₀)

利用蛋白質在波長 280 nm 下有一吸光高峰測其吸光值：DrU 為 1.603，TbU 為 2.246，

經由比爾定律換算：濃度(mg/mL) = $\frac{\text{吸光值}}{\text{消光係數}} \times \text{稀釋倍率} \times 1000 \times \text{分子量}$

$$[\text{DrU}] = \frac{1.603}{50880} \times 20 \times 1000 \times 34.33 = 21.63 \text{ mg/mL}$$

$$[\text{TbU}] = \frac{2.246}{46410} \times 20 \times 1000 \times 33.81 = 32.73 \text{ mg/mL}$$

六、酵素活性分析

(一) 酸鹼值對酵素活性之影響

BsU、DrU 及 TbU 的最佳 pH 分別為 10.0, 10.0, 9.0，可知尿酸氧化酶偏好鹼性環境下反應。

表 4. 不同酸鹼值下，不同微生物源尿酸氧化酶之相對活性比較

pH	8.0	9.0	10.0
<i>B. subtilis</i>	62 %	80 %	100 %
<i>D. radiodurans</i>	56 %	93 %	100 %
<i>T. bispora</i>	90 %	100 %	97 %

(二) 溫度對酵素活性之影響

將文獻中 wild type *Bacillus subtilis* uricase (BsU)、DrU 及 TbU 進行比較，三者的最佳反應溫度分別是 40°C、30°C、70°C。

(三) 酵素動力學

表 5 比較市面上治療高尿酸之藥物 *Krystexxa*®、文獻中不同種微生物源，及本實驗之 DrU、TbU 酵素動力學各項參數。

表 5. 不同微生物源尿酸氧化酶酵素動力學之參數比較

	K_{cat} (s^{-1})	K_m (μM UA)	K_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	酸鹼值	溫度($^{\circ}C$)
<i>Krystexxa</i> ®	3.20	116.3	0.028	7.4	30
<i>Arthrobacter globiformis</i>	6.08	109.7	0.055	7.4	30
<i>Deinococcus geothermalis</i>	3.24	55.73	0.058	7.4	30
<i>Terriglobus saanensis</i>	3.09	76.18	0.041	7.4	30
<i>Bacillus subtilis</i>	7.07	27.14	0.260	8.5	30
<i>Deinococcus radiodurans</i>	19.71	1366.28	0.015	10.0	30
<i>Thermobispora bispora</i>	12.85	191.31	0.067	9.0	70
<i>Thermobispora bispora</i>	4.19	736.25	0.006	9.0	30

(四) 酵素熱穩定性

BsU 在 66 $^{\circ}C$ 酵素開始變性，DrU 在 54 $^{\circ}C$ 開始變性，而 TbU 源自耐熱菌，推測其熱穩定性良好，因此計畫之後加入尿素以進行熱穩定性測試。

(五) 酵素熱耐受性

DrU 在高溫下已變性，故無催化能力，在 30 $^{\circ}C$ 下能維持 6 小時活性，且由酵素動力學實驗，我們發現 DrU 在 30 $^{\circ}C$ 催化效率較 TbU 高，故具作為速效型藥物的潛力；TbU 在 70 $^{\circ}C$ 下放置 6 小時仍有 50 % 的活性，在 30 $^{\circ}C$ 同樣能維持 6 小時活性，TbU 在高溫下催化效率高，且活性可維持至少 6 小時，因此可作為長效型之緩解藥物。

(六) 不同金屬離子、有機溶劑和界面活性劑對酵素活性之影響

比較兩種酵素在不同金屬離子環境下的活性差異，可見金屬離子對尿酸氧化酶普遍影響幅度小，僅 Co^{2+} 會使尿酸氧化酶活性降低；在含有機溶劑的環境下，酵素的活性則普遍較差，並以 β -ME 最為明顯；界面活性劑對酵素活性影響幅度較小，僅 Triton X-100 會使酵素活性下降。

推測這些溶劑影響蛋白質活性的因素：有機溶劑如甲醇、乙醇、丙酮等可以提供自己的羥基或羰基上的氫或氧去形成氫鍵，從而破壞了蛋白質中原有的氫鍵，使蛋白質變性，另一方面，甲醇、乙醇、丙酮等有機溶劑使介電常數降低，增加了相反電

荷的吸引力，且因這些有機溶劑是強親水試劑，會破壞蛋白質膠體分子表面的水化層而使蛋白質分子易聚集沉澱； β -ME 可以打斷蛋白質中的二硫鍵，破壞其四級或三級結構。Triton X-100 則能與受質結合，抑制其與酵素的作用，而使酵素活性降低，此外，它也能累積過氧化物，破壞蛋白質。

七、蛋白質結構解析

尿酸氧化酶多以四聚體形式存在，而 *T. bispora uricase* 於 C 端具有特異性的 α -helix 構型，這段多出來的結構，過去曾被報導與酵素熱穩定性及活性相關，未來可更進一步朝此方面進行點突變等實驗，探討其對熱穩定性及活性的貢獻。

由圖 27，尿酸氧化酶活化區的保守胺基酸位點包括穩定尿酸主體結構的 Gln, Arg (DrU : Gln 234, Arg 191 / TbU : Gln 222, Arg 179)，Gln 和尿酸之 N1 間會形成氫鍵，而 Arg 則和尿酸之 N3 間會形成氫鍵；Asn, Thr 和水分子間形成氫鍵 (DrU : Asn 260, Thr 70 / TbU : Asn 248, Thr 57)。而 DrU 結構中尿酸下方有 Trp 173，TbU 則是 pHe 162，關閉下方空腔。Trp 的雙環結構和 pHe 的單環結構可能是受質尿酸在與酵素結合時的立體空間障礙，雙環產生的立體空間障礙可能較大，而使 DrU 與受質間的親和性遜於 TbU。

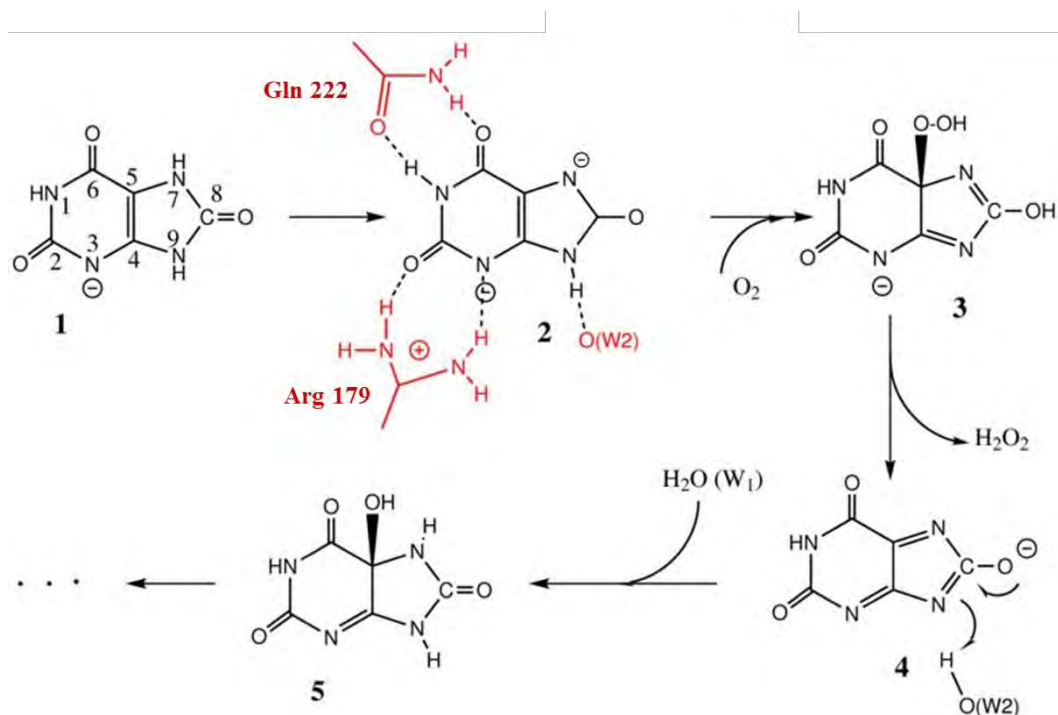


圖 27. TbU 催化尿酸降解的推測催化機制圖

(Colloc'h, Gabison, Monard, Altarsha, Chiadmi, Marassio, Sopkova-de Oliveira Santos, El Hajji, Castro, Abraini & Prangé, 2008)

八、高尿酸檢測

表 6. 碘化鉀比色法與光譜檢測法之優缺點比較

檢測方法	優點	缺點
碘化鉀	<ul style="list-style-type: none">• 顏色變化較明顯，可以肉眼辨識• 可即時呈色• 適用初步檢測	<ul style="list-style-type: none">• 無法精確定量尿酸濃度
對硝基苯硼酸	<ul style="list-style-type: none">• 以機器偵測吸光值，可知過氧化氫之精確生成量，作為酵素反應定量	<ul style="list-style-type: none">• 顏色變化較不明顯，肉眼難分辨差異• 呈色所需時間較長 (20 分鐘)

柒、結論

一、結論

目前關於尿酸氧化酶研究尚未成熟，酵素效能仍待提升，因此我們從源頭方面進行改善，透過基因體探勘，篩選出抗輻射奇異球菌源(*D. radiodurans* uricase, DrU)及耐熱雙球桿菌源(*T. bispora* uricase, TbU)尿酸氧化酶。純化出蛋白質後，測試酵素的活性及其反應最佳條件，得知 DrU 之最佳反應溫度及 pH 值為 30°C, pH 10.0；TbU 之最佳反應溫度及 pH 值為 70°C, pH 9.0。

在此條件下進行酵素動力學。抗輻射奇異球菌源每 1 μM ，每秒可降解 12.95 μM 的尿酸，耐熱雙球桿菌源每 1 μM ，每秒約可降解 16.2 μM 的尿酸。若將本實驗的重組酵素作為降尿酸藥物，不考慮其他干擾因子，體內尿酸達建議用藥範圍(9 mg/dL)的 65 kg 成年男子，注入 13 mg 酵素，欲使尿酸降回正常值(7 mg/dL)，預估 TbU 需約 1 小時，而 DrU 僅需 1.5 分鐘。

抗輻射奇異球菌源蛋白質約在 54°C 開始分解變性；耐熱雙球桿菌源酵素的熱穩定性良好，不易變性。在離子耐受性測試中，兩種微生物源尿酸氧化酶在含 Co^{2+} 、SDS、 β -ME 的環境下活性皆降低。

利用 DrU 設計出 2 種檢測尿酸濃度的方式，其中碘化鉀比色法具有顏色變化較明顯、可即時呈色、簡易方便等優點，適合初步檢測；而對硝基苯硼酸則是精確性較高，適用於進階檢測與定量。

未來我們希望利用蛋白質工程進行酵素工程的改善，以期能得到活性、催化效率和受質專一性都更佳的酵素，並開發更為靈敏的尿酸檢測方法，以期能應用於尿酸檢測，更進一步作為藥物被注入人體中，以分解尿酸，治療因尿酸堆積而導致的種種疾病，如痛風和高尿酸血症等。

二、未來實驗規劃

- (一) DrU, TbU 之生化特性分析與結構功能相關性的深入探討
- (二) TbU 酵素熱穩定性測試：測量 TbU 加入尿素後的蛋白質變性溫度
- (三) 高靈敏度尿酸檢測之開發

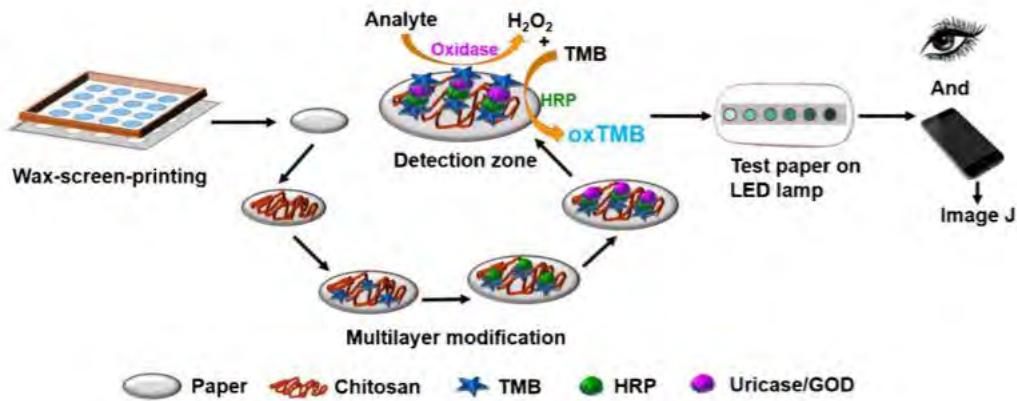


圖 28. 高靈敏度尿酸檢測方法流程圖

(Wang X, Li F, Cai Z, Liu K, Li J, Zhang B & He J, 2018)

- (四) 針對 DrU 及 TbU 之重要胺基酸進行點突變(site-directed mutagenesis)，改善酵素與受質的親和性及催化效率 (圖 29)。

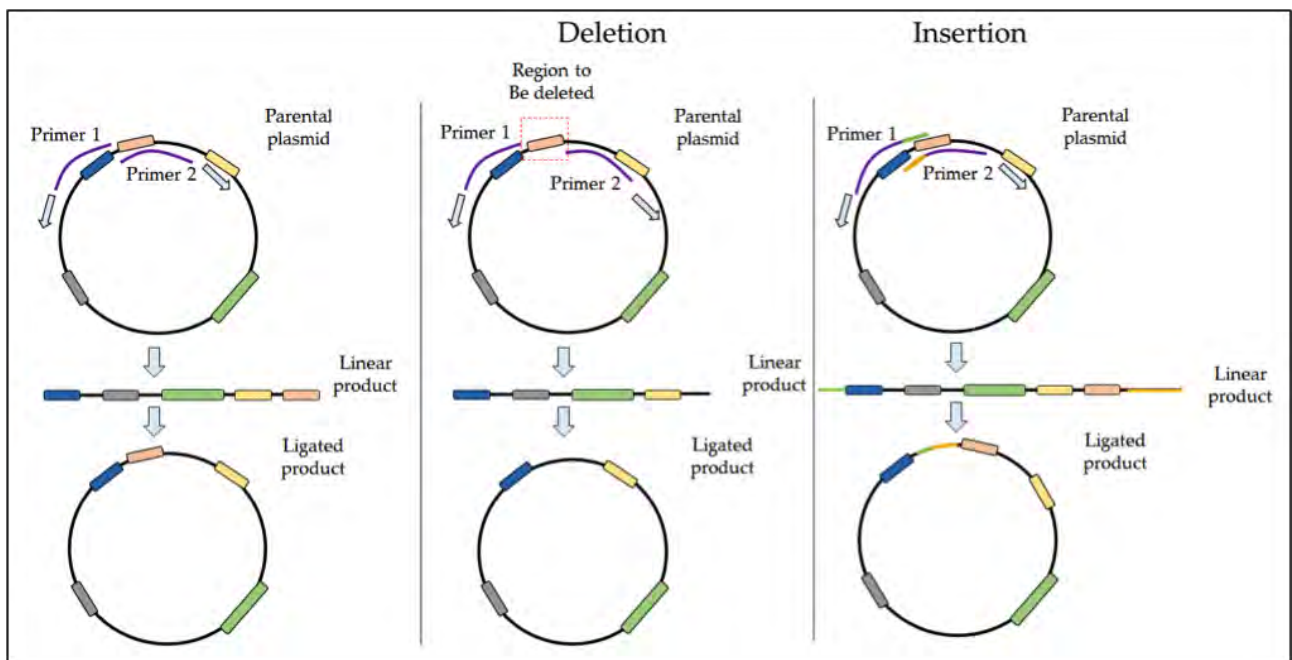


圖 29. 點突變實驗流程圖

(<https://bitesizebio.com/25570/site-directed-mutagenesis-tips-and-tricks/>)

- (五) DrU, TbU 之定向演化分析

利用 error-prone PCR 隨機突變後篩選出性能較佳的突變株，並以此重複步驟以得到性能最佳的突變酵素 (圖 30)。

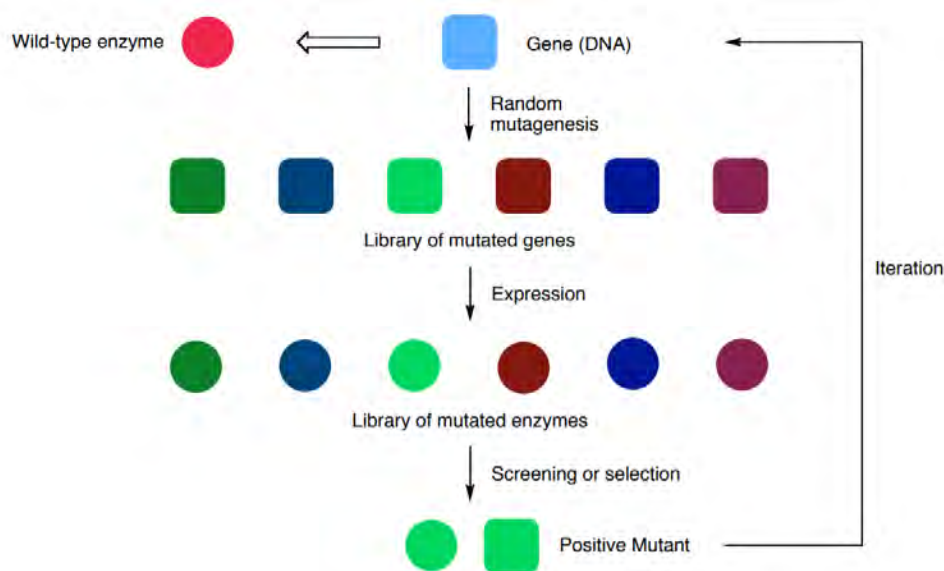


圖 30. 定向演化示意圖

(Rendler S, 2008)

捌、參考資料及其他

- 一、Hafez RM, Abdel-Rahman TM, Naguib RM. (2017). Uric acid in plants and microorganisms: Biological applications and genetics - A review. *Journal of Advanced Research* 8(5), 475–486.
- 二、Li W, Xu S, Zhang B, Zhu Y, Hua Y, Kong X, Sun L, Hong J. (2017). Directed evolution to improve the catalytic efficiency of urate oxidase from *Bacillus subtilis*. *PLoS One*. 12(5), e0177877.
- 三、Bove M, Cicero AF, Veronesi M, Borghi C. (2017). An evidence-based review on urate-lowering treatments: implications for optimal treatment of chronic hyperuricemia. *Vasc Health Risk Manag*, 23–28.
- 四、Nyborg AC, Ward C, Zacco A, Chacko B, Grinberg L, Geoghegan JC, Bean R, Wendeler M, Bartnik F, O'Connor E, Gruia F, Iyer V, Feng H, Roy V, Berge M, Miner JN, Wilson DM, Zhou D, Nicholson S, Wilker C, Wu CY, Wilson S, Jermutus L, Wu H, Owen DA, Osbourn J, Coats S, Baca M. (2016). A Therapeutic Uricase with Reduced Immunogenicity Risk and Improved Development Properties. *PLoS One*. 11(12), e0167935.
- 五、Pfrimer P, de Moraes LM, Galdino AS, Salles LP, Reis VC, De Marco JL, Prates MV, Bloch C Jr, Torres FA. (2010). Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *J Biomed Biotechnol*, 674908.
- 六、Dabbagha F, Moradpoura Z, Ghasemiana A, Ghasemia Y. (2012). Phylogeny of urate oxidase producing bacteria: on the basis of gene sequences of 16S rRNA and uricase protein. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Spring*, 8(2), 99-102.
- 七、Colloc'h N, Gabison L, Monard G, Altarsha M, Chiadmi M, Marassio G, Sopkova-de Oliveira

- Santos J, El Hajji M, Castro B, Abraini JH, Prangé T. (2008). Oxygen Pressurized X-Ray Crystallography: Probing the Dioxygen Binding Site in Cofactorless Urate Oxidase and Implications for Its Catalytic Mechanism. *Biophysical Journal, Column 95*, 2415-2422.
- 八、 Gabison L, Prangé T, Colloc'h N, El Hajji M, Castro B, Chiadmi M. (2008). Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide: Mechanistic implications. *BMC Structural Biology*, 8:32.
- 九、 Lu CP, Lin CT, Chang CM, Wu SH, Lo LC. (2016). Nitrophenylboronic Acids as Highly Chemoselective Probes To Detect Hydrogen Peroxide in Foods and Agricultural Products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 59(21), 11403-11406.
- 十、 Wang X, Li F, Cai Z, Liu K, Li J, Zhang B, He J. (2018). Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 2647–2655.

【評語】 050202

本研究針對微生物源酵素進行基因體探勘，篩選出抗輻射奇異球菌 (*Deinococcus radiodurans*)及耐熱雙球桿菌(*Thermobispora bispora*)來源尿酸氧化酶基因，製備重組尿酸氧化酶基因，進行酵素活性測定、熱穩定分析、X-ray 結構解析、對金屬離子耐受性與酵素活性測定、尿酸檢測應用等，研究工作完整清晰。

壹、研究動機

尿酸氧化酶是一種能直接降解尿酸的酵素，負責將嘌呤代謝途徑的產物尿酸氧化為可溶性尿囊素，然人類基因體中之尿酸氧化酶基因已隨演化過程退化，一旦體內尿酸代謝過程出現酵素異常，導致血液中尿酸濃度過高，即為高尿酸血症，長期高尿酸易使尿酸鹽沉積於關節造成痛風性關節炎。為有效治療高尿酸所引發之疾病，盼引入外源性尿酸氧化酶，來快速降低體內的尿酸濃度。我們以微生物源尿酸氧化酶為研究標的，探討其酵素結構與生化功能的關係，盼設計出良好熱穩定性、催化效率高及受質專一性的重組酵素，以作為未來生醫檢測與藥物研發的新選擇。

貳、研究目的

- 一、利用生物資料庫(NCBI)之生資分析工具，進行微生物源同源基因之核酸與蛋白質序列比對與分析。
- 二、以大腸桿菌異源表現微生物源重組酵素，結合金屬螯合層析法與分子篩選層析法進行酵素純化與生產。
- 三、分析酵素之熱穩定性、生化特性與酵素活性，利用酵素動力學計算其催化反應參數並比較其活性差異。
- 四、探討酵素催化與受質結合之分子機制，以X光晶體繞射技術解析蛋白質結構，作為蛋白質工程之起點。
- 五、重組尿酸氧化酶於臨床尿酸檢測之開發與應用，利用簡易比色法與光譜檢測法進行高尿酸檢測。

參、研究原理

圖1：尿酸降解化學反應式

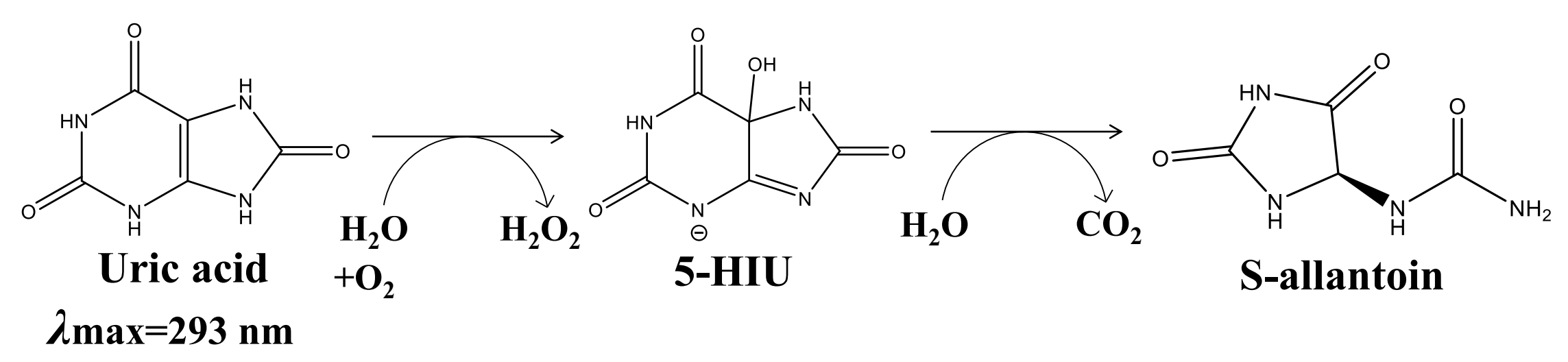


圖4：蛋白質結晶過程及原理圖

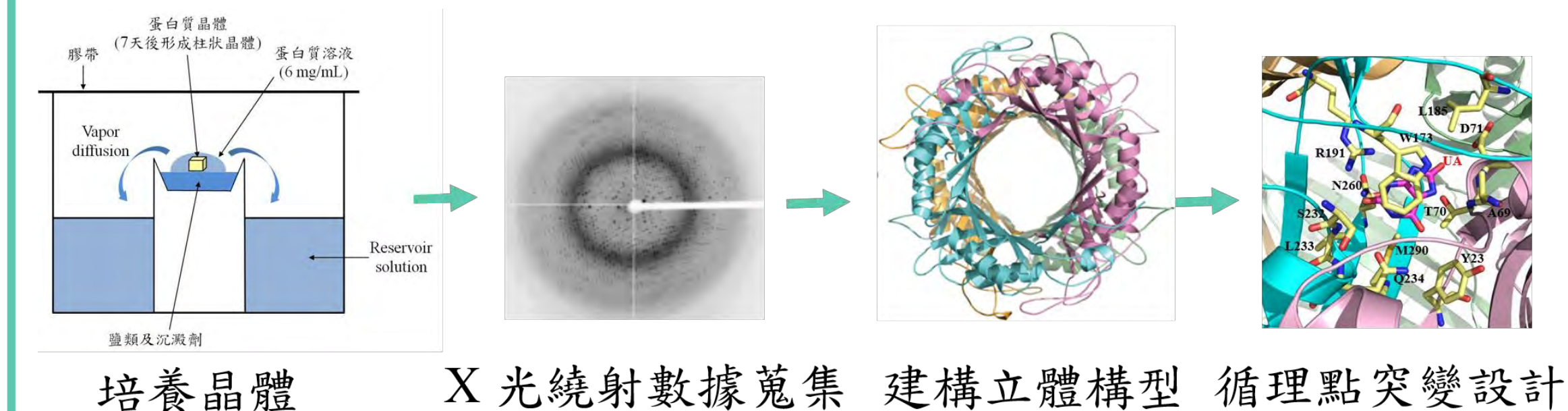


圖2：蛋白質純化—金屬螯合層析法與分子篩選層析法

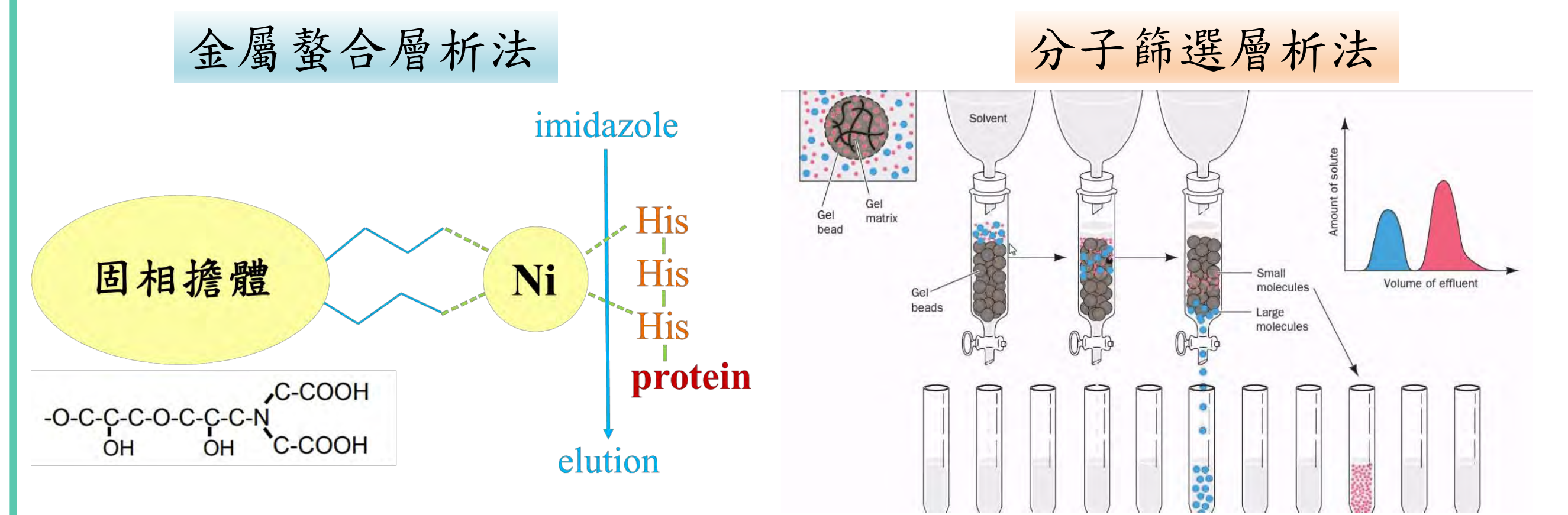


圖5：簡易比色法

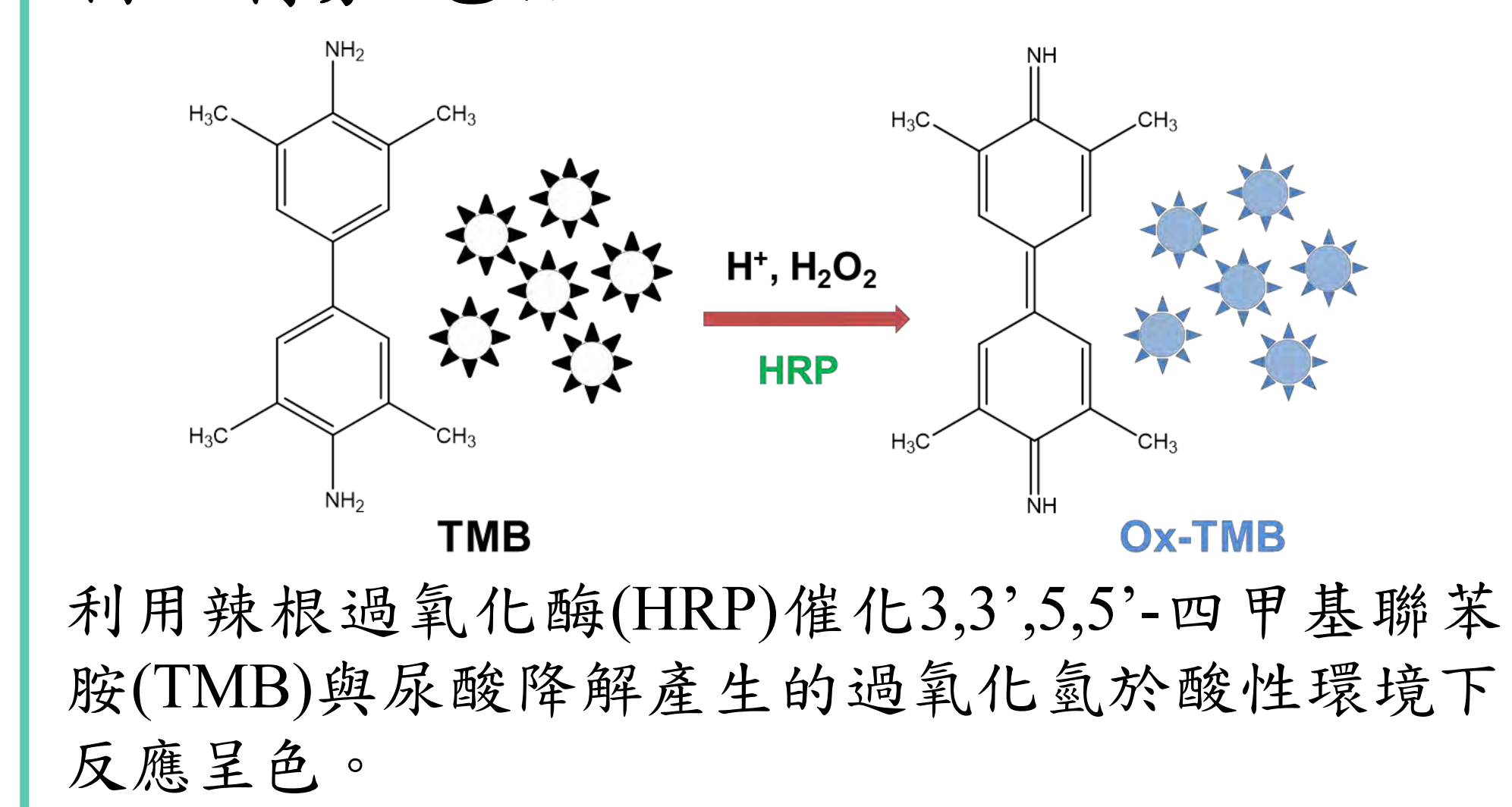
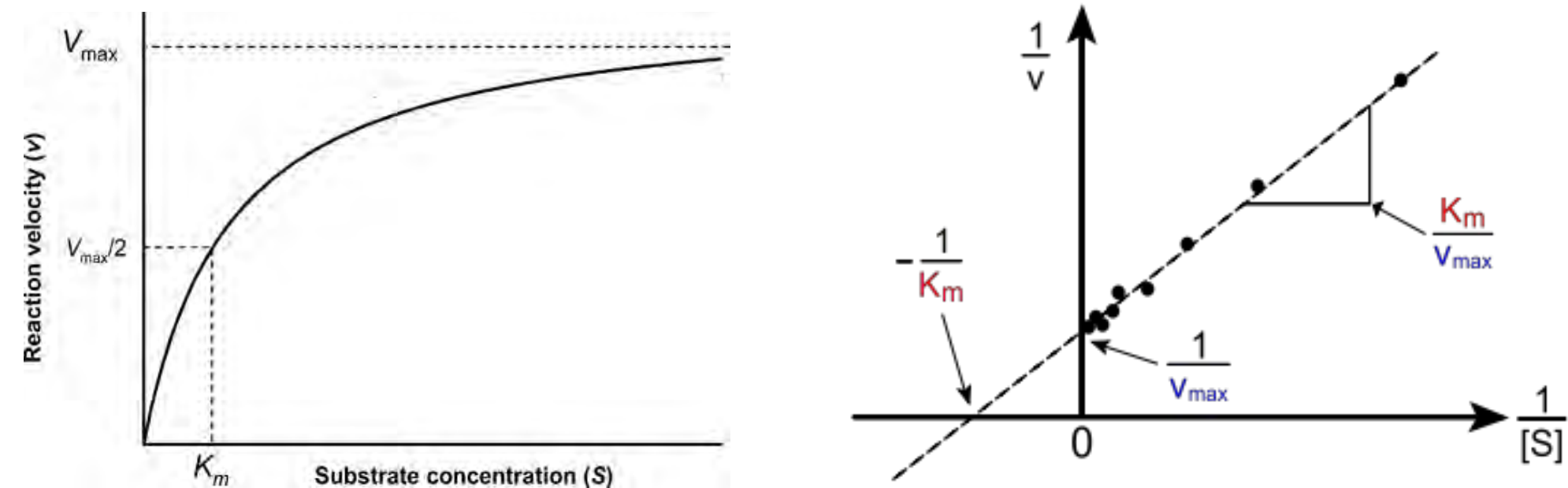
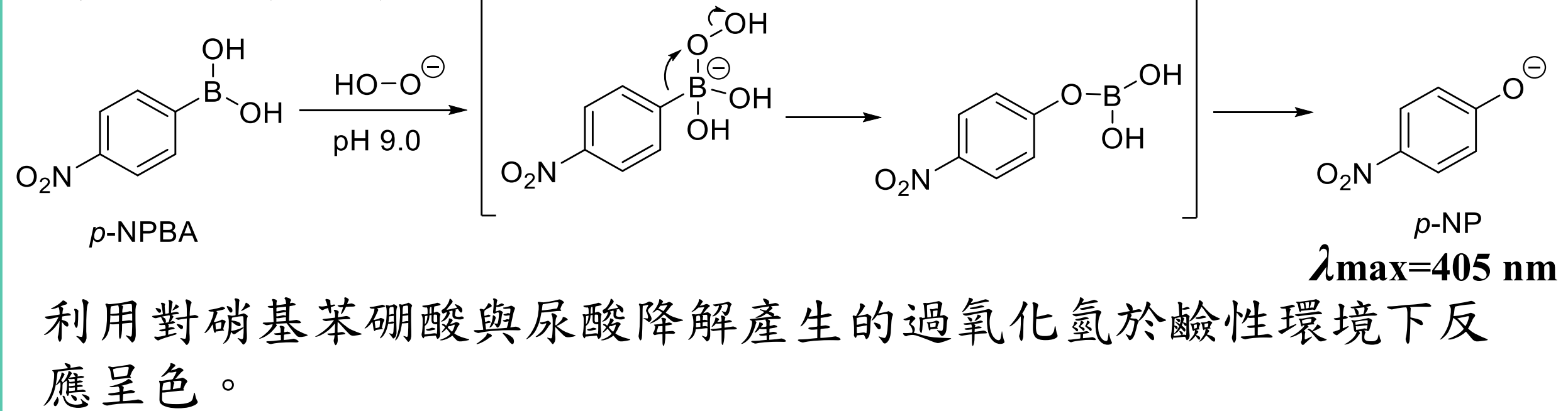


圖3：酵素活性分析—酵素動力學



- V_{max} ：酵素催化反應最大速率
- k_m ：酵素與受質親和性指標
- k_{cat} ：酵素催化速率

圖6：光譜檢測法



肆、研究方法及過程

生物資料庫探
勘/基因重組

蛋白質表現
與純化

酵素活性與
生化分析

蛋白質結構
解析

應用：
高尿酸檢測

伍、研究結果及討論

一、生物資料庫基因體探勘與蛋白質表現載體之建構

	Consensus	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Thermobispora bispora</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Granulicella tundricola</i>
Consensus	100	42.8	55.9	25.7	23.8	29.4
<i>Deinococcus radiodurans</i>	100	42.9	22.5	38.1	26.2	26.2
<i>Thermobispora bispora</i>	100	26.2	100	43.7	55.7	27.9
<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	26.2	26.2	100	27.9	27.9
<i>Bacillus subtilis</i>	100	26.2	26.2	26.2	100	27.9
<i>Granulicella tundricola</i>	100	26.2	26.2	26.2	26.2	100
<i>Kyripidia tusciae</i>	100	26.2	26.2	26.2	26.2	26.2

圖7：生物資料庫中微生物源尿酸氧化酶之蛋白質序列相似度比對

- 由圖7，將篩選出之2種尿酸氧化酶，進行蛋白質一級序列比對分析，與目前文獻記載催化活性最佳之枯草桿菌原尿酸氧化酶相比，抗輻射菌源尿酸氧化酶與其相似度為22.5%，而耐熱雙球菌源尿酸氧化酶為26.2%，可知其序列相似度低，且基於嗜極生物之生物特性，引起我們的研究興趣。
- 由圖8，透過聚合連鎖反應，取得大量尿酸氧化酶基因片段後，接合入載體pET-28a，再轉殖入勝任細胞*E. coli* BL21(DE3)中，透過抗生素篩選出基因轉殖成功之菌落，養菌並生產出大量蛋白質。

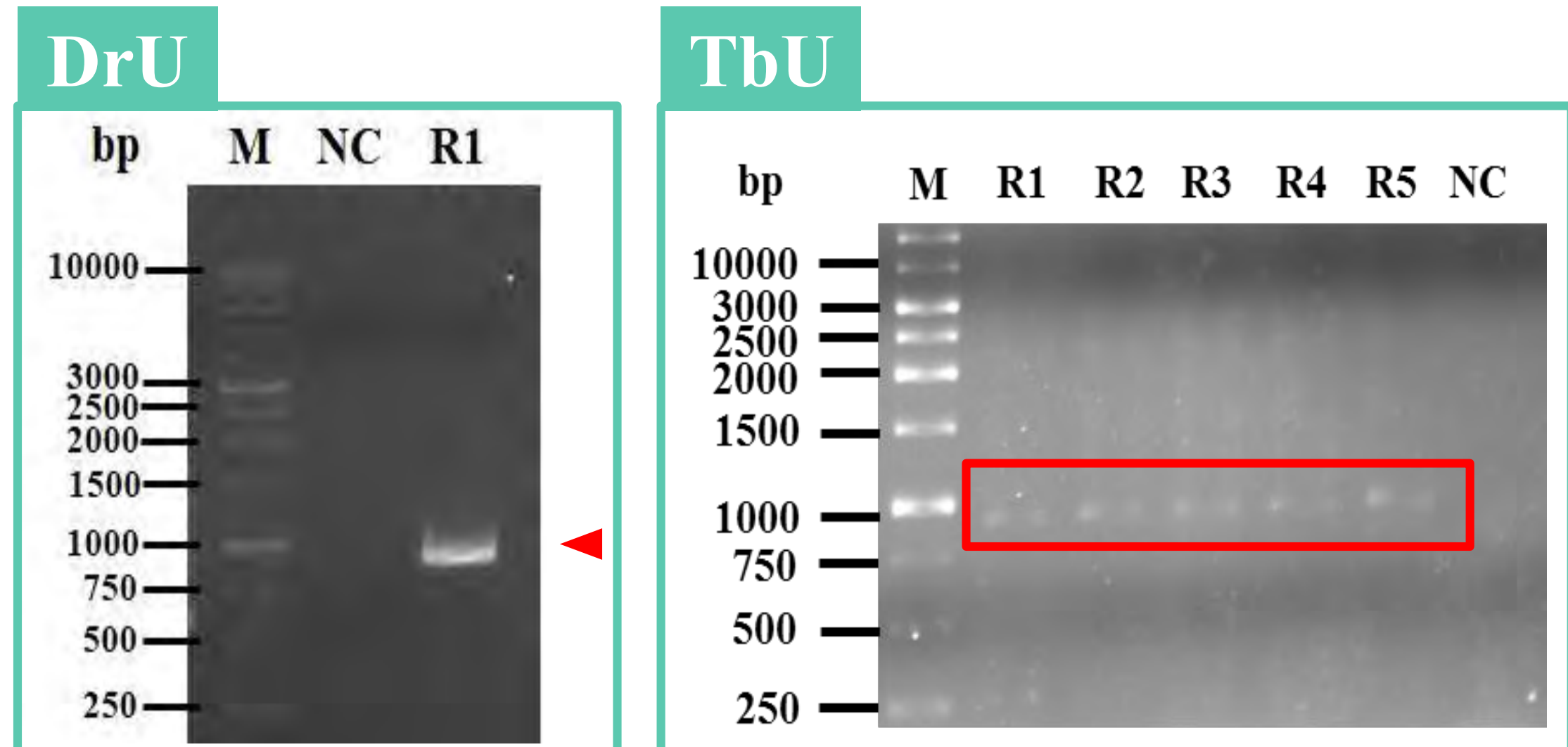


圖8：*D. radiodurans* uricase gene (897 bp) 及 *T. bispora* uricase gene (906 bp) DNA 電泳圖

二、蛋白質表現與純化

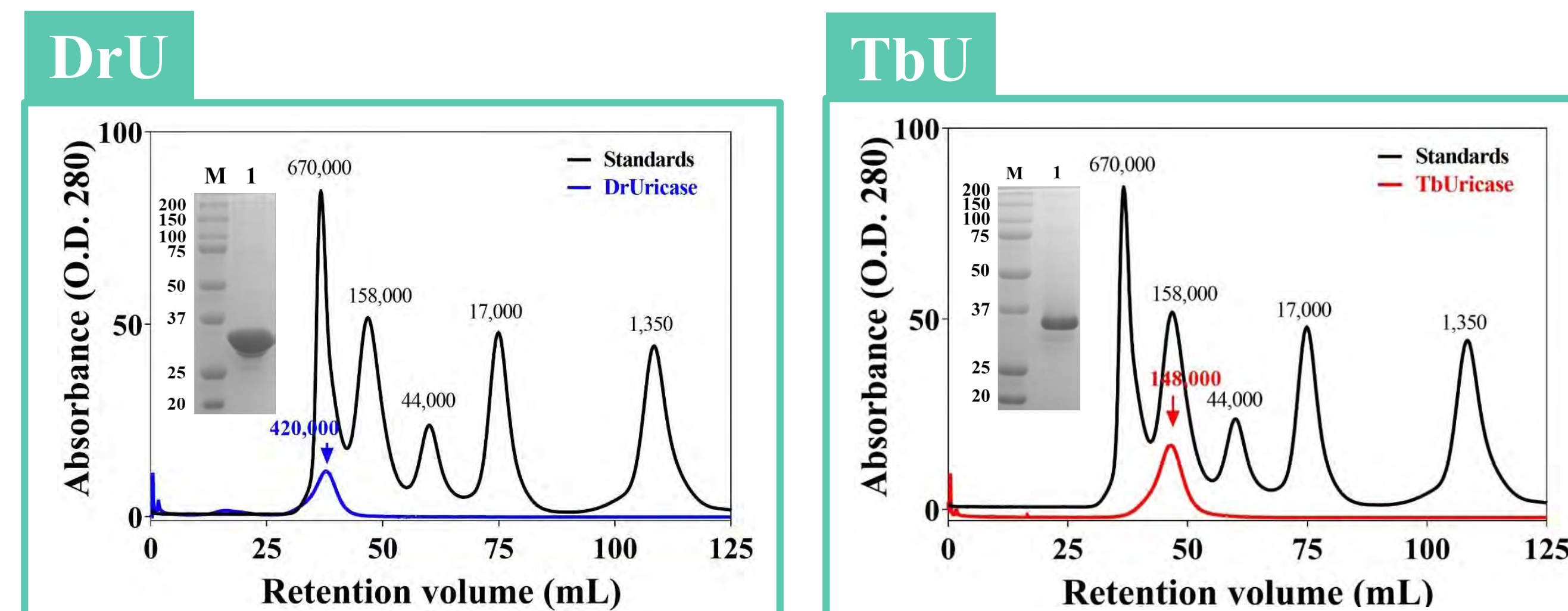


圖9：Recombinant DrU 及 TbU (~34 kDa) 純化跑膠圖(12%SDS-PAGE)

- 蛋白質異源表現條件：以25°C、0.1 mM IPTG作為誘導條件，進行大量蛋白質表現與純化。
- 使用Ni-NTA親和層析法純化蛋白質(圖9)。在Tris-HCl pH 8.0緩衝溶液下，推測DrU在溶液中可能以12聚體存在，未來可在進一步用分析級超高速離心機(Ancyltical Ultracentrifuge, AUC)分析確認。而TbU則在溶液中以四聚體存在，相似於過去報導之同源酵素，也符合已解析蛋白質結構之對稱性模型，未來仍可進一步透過AUC分析確認。

三、酵素活性分析

• 酵素反應條件(溫度、pH值)、熱耐受性與熱穩定性測試

DrU

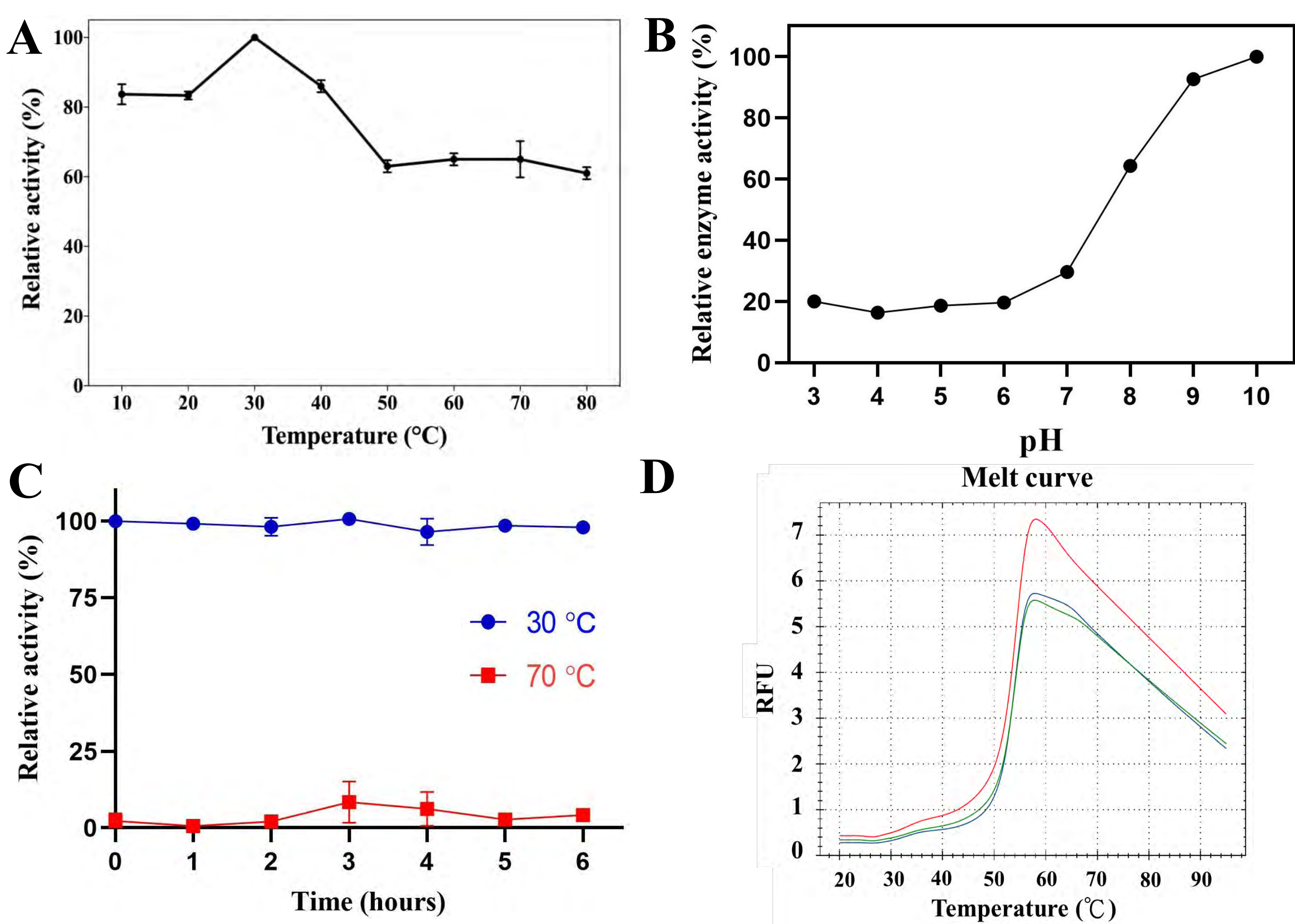


圖10：(A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應pH值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性 (紅：10 mg/mL, 藍：7.5 mg/mL, 綠：5 mg/mL DrU)

➢ 由圖10, DrU重組酵素最佳反應條件為pH 10.0, 30°C。蛋白質熔化溫度(melt temperature): 紅54.5°C, 藍54°C, 綠54°C。DrU在30°C下靜置6小時仍有活性, 70°C下幾乎無活性。

TbU

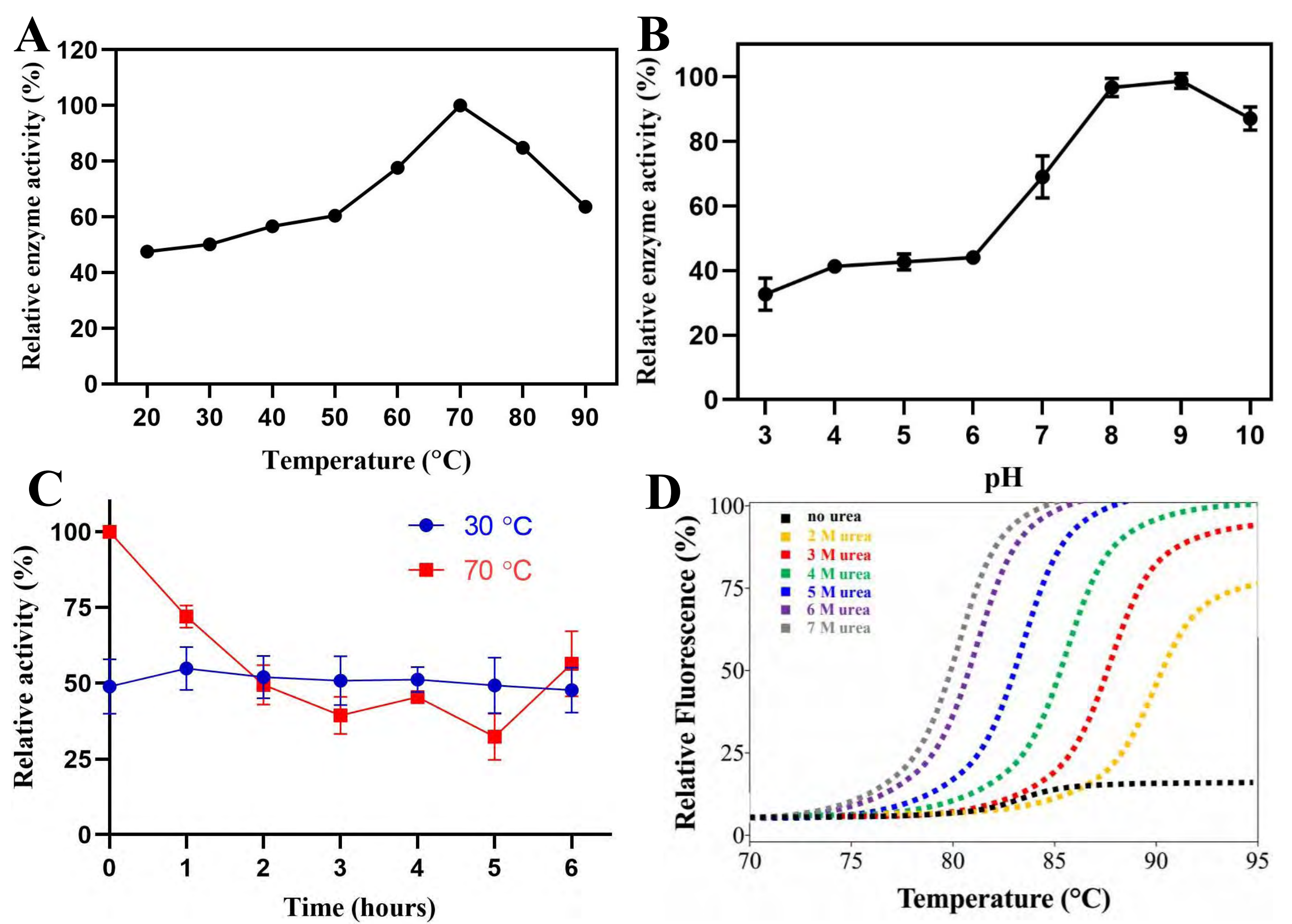


圖11：(A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應pH值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性 實驗設計概念圖 (以不同濃度Urea變性蛋白質並測定熔點(Tm), 再利用軟體計算TbU於自然狀態下之實際融化溫度)

➢ 由圖11, TbU重組酵素最佳反應條件為pH 9.0, 70°C。其熱穩定性較DrU佳, 靜置6小時後, 30°C活性不變, 70°C仍有50%活性。

• 酵素動力學

DrU

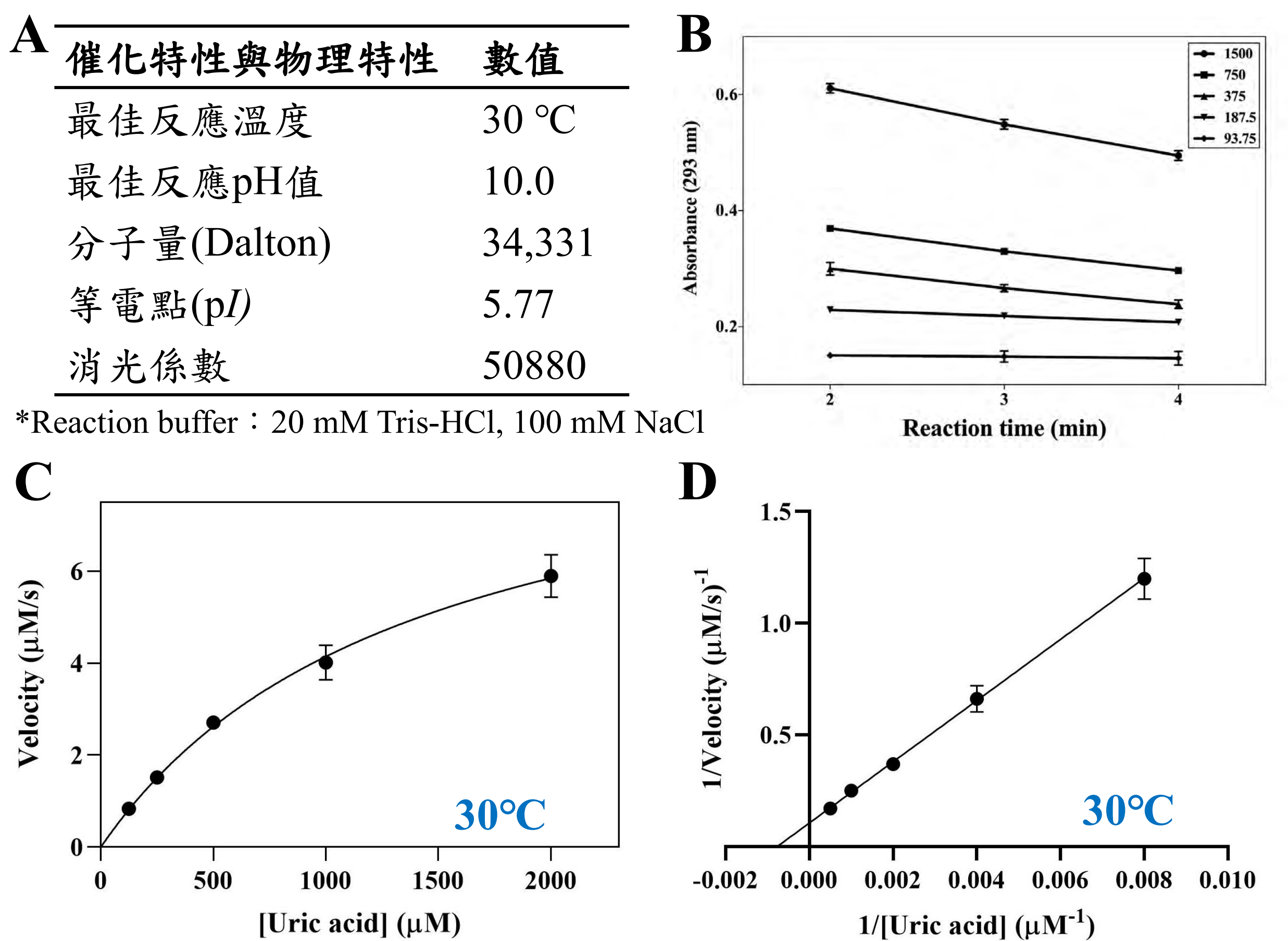


圖12：DrU酵素動力學實驗(A) 酵素基本催化與物理特性 (B) 酵素催化反應時間 (Time dependent kinetics) (C) Michaelis-Menten動力學作圖 (D) Lineweaver-Burk雙倒數之圖形 (30°C)

TbU

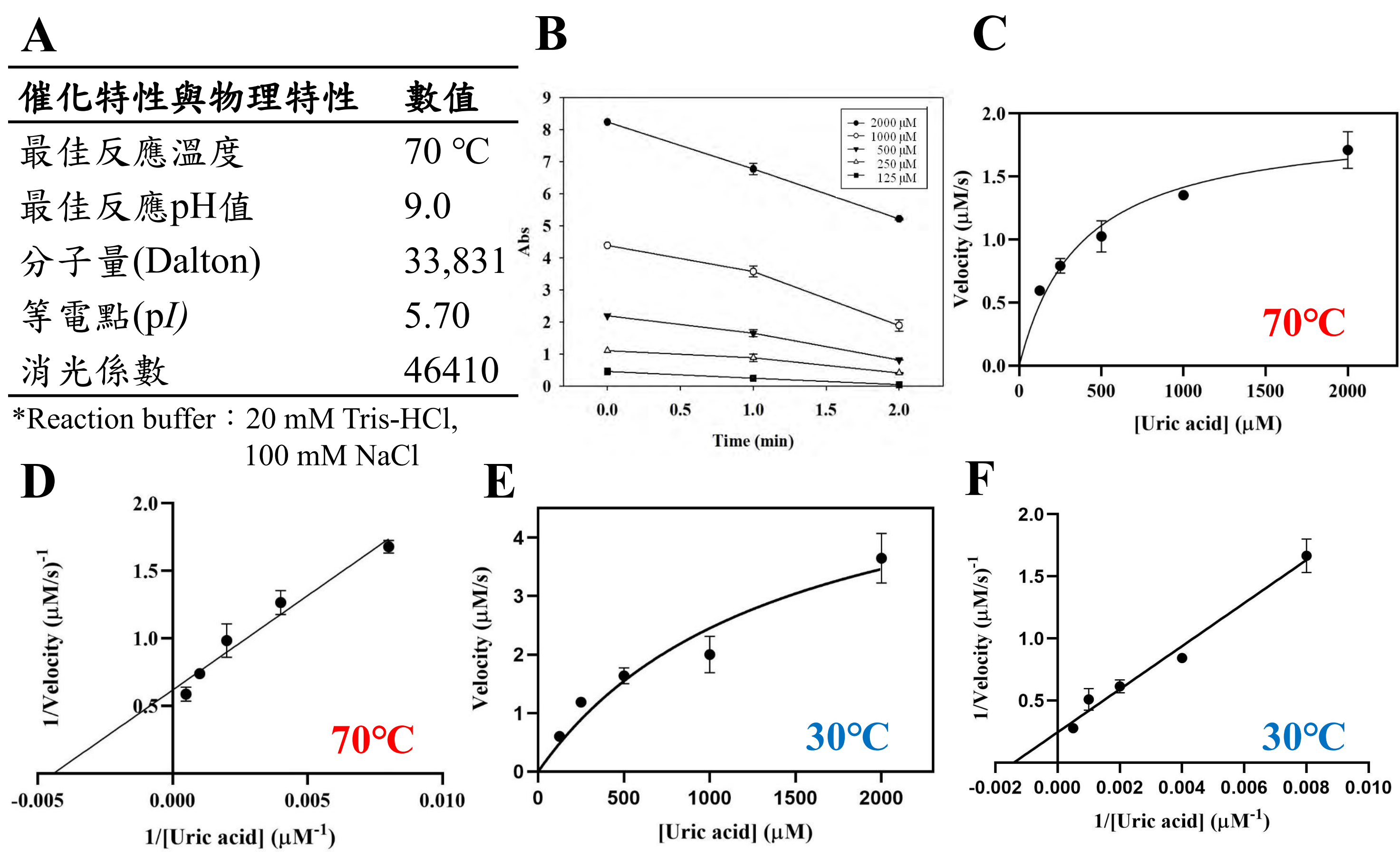


圖13：TbU酵素動力學實驗(A) 酵素基本催化與物理特性 (B) 酵素催化反應時間 (Time-dependent kinetics) (C, D) Michaelis-Menten動力學與Lineweaver-Burk雙倒數作圖(70°C) (E, F) 於30°C反應之動力學作圖

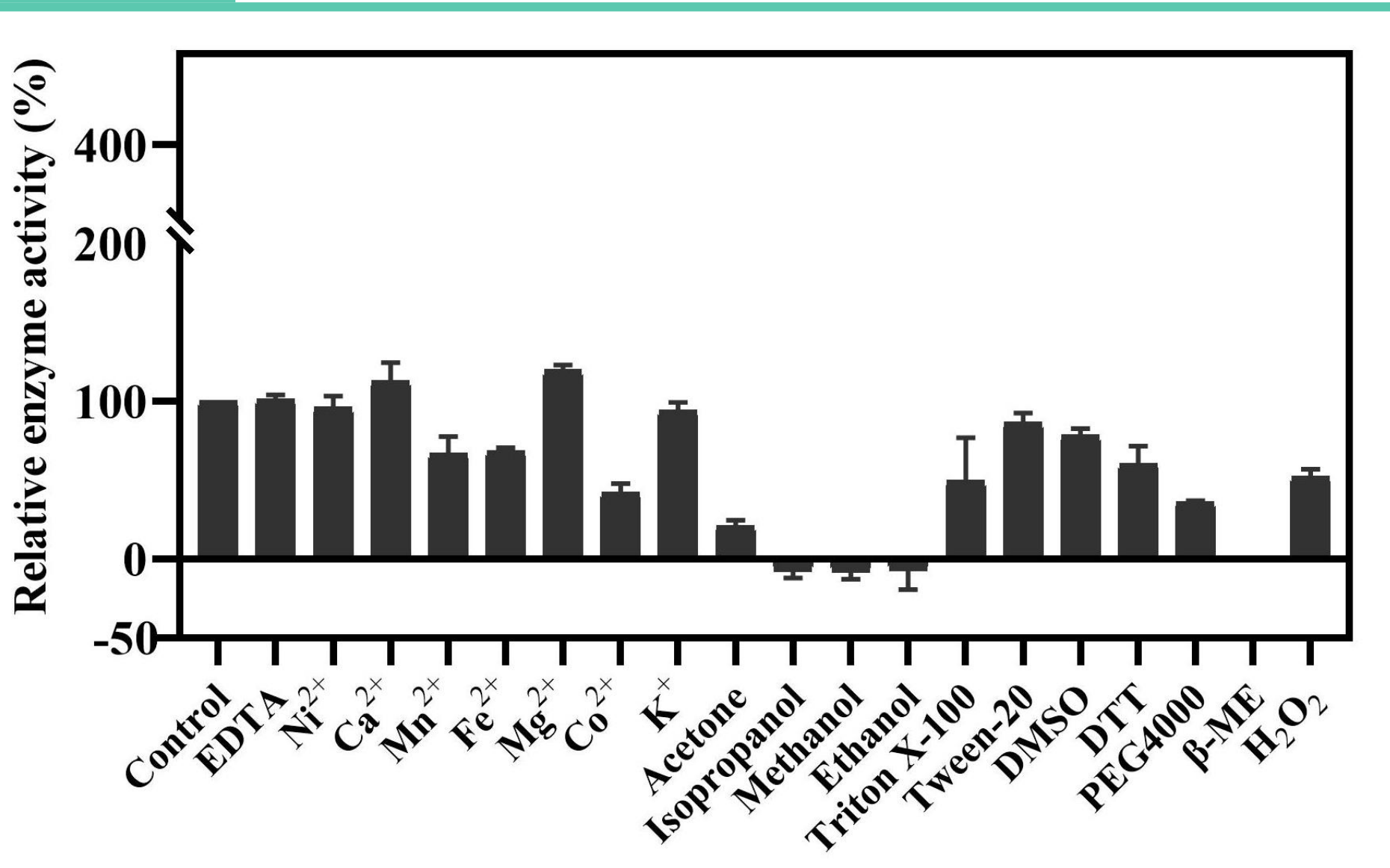
表1：DrU及TbU酵素動力學參數比較

Protein	Buffer pH	Enzyme Concentration	Temperature (°C)	V_{max} (µM/s)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_m (µM)	k_{cat}/k_m (µM ⁻¹ ·s ⁻¹)
DrU	10.0	0.5 µM	30	9.86 ± 2.38	19.71 ± 4.76	1366.28 ± 432.90	0.0147 ± 0.0013
TbU	9.0	1 µM	70	1.29 ± 0.13	12.85 ± 1.34	191.31 ± 25.50	0.0673 ± 0.0032
TbU	9.0	10 µM	30	4.19 ± 0.74	0.42 ± 0.07	736.25 ± 202.60	0.0006 ± 0.0001

➢ 由表1, TbU於高溫下(70°C)反應下, 其受質親和力(k_m)與催化效率(k_{cat}/k_m)最佳, 而在30°C反應下則以DrU較佳。

• 金屬離子、有機溶劑及界面活性劑對酵素反應之影響

DrU



TbU

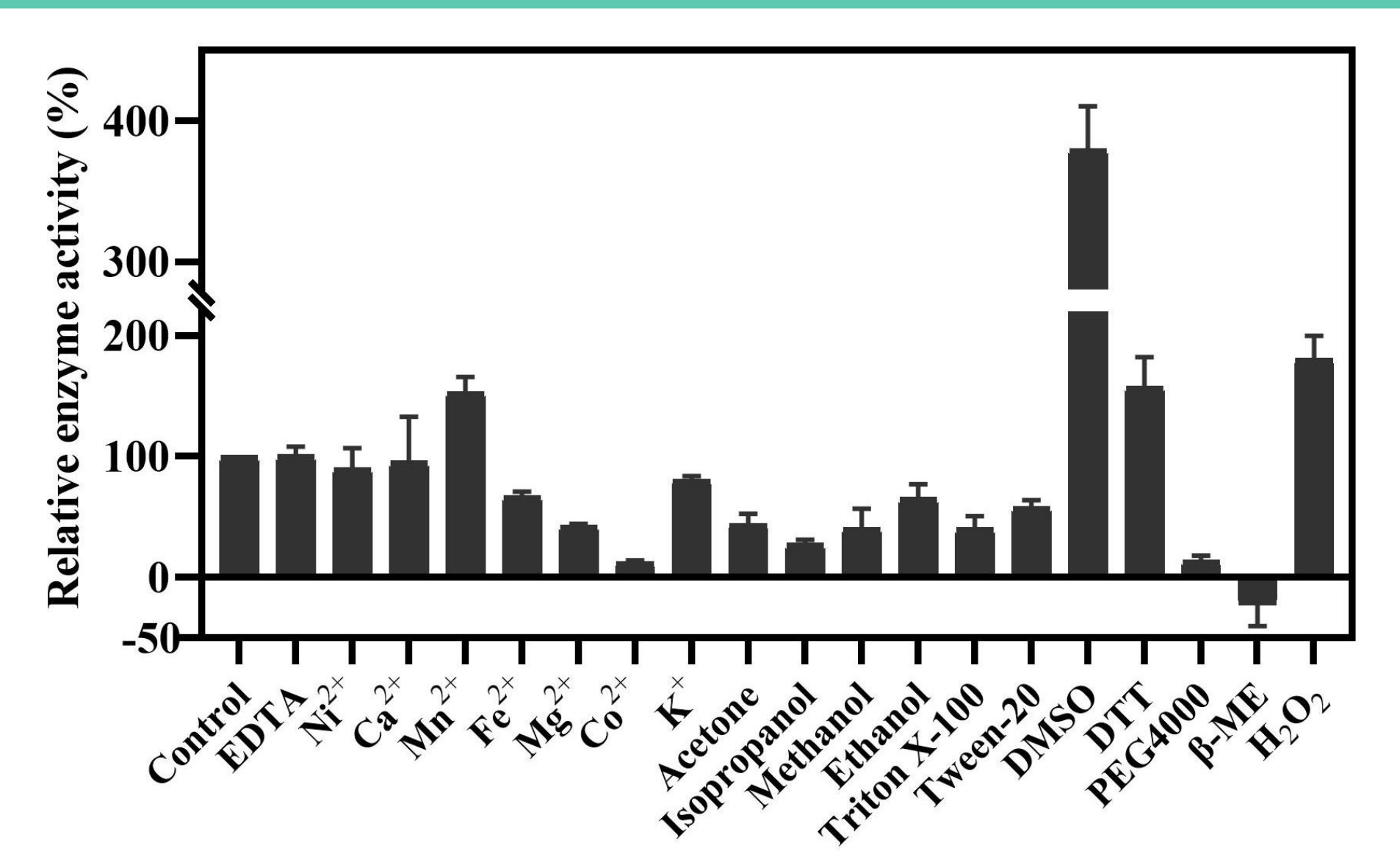


圖14：DrU(左圖)、TbU(右圖)在金屬離子、有機溶劑及界面活性劑環境中之相對活性比較圖。

➢ 由圖14, DrU與TbU酵素之生化特性相似, 皆不需二價金屬離子作為輔酶, 但兩者在含Fe²⁺、Co²⁺、β-ME的環境下, 其酵素活性明顯下降。

Effectors	Concentration	DrU relative activity (%)	TbU relative activity (%)
Control	-	100.0	100.0
EDTA	0.1 µM	101.1 ± 3.0	100.5 ± 7.5
Ni ²⁺	0.1 µM	95.8 ± 7.7	89.8 ± 16.7
Ca ²⁺	0.1 µM	112.8 ± 11.9	95.4 ± 37.3
Mn ²⁺	0.1 µM	66.7 ± 10.9	152.7 ± 13.0
Fe ²⁺	0.1 µM	68.2 ± 4.1	66.9 ± 3.7
Mg ²⁺	0.1 µM	119.8 ± 3.3	42.5 ± 1.8
Co ²⁺	0.1 µM	41.9 ± 6.0	12.5 ± 1.6
K ⁺	0.1 µM	94.1 ± 5.4	80.3 ± 3.3
Acetone	20 %	20.8 ± 3.8	43.8 ± 8.7
Isopropanol	20 %	-7.5 ± 4.6	27.6 ± 3.2
Methanol	20 %	-8.2 ± 4.6	40.5 ± 11.4
Ethanol	20 %	-11.5 ± 5.2	65.3 ± 1.4
Triton X-100	1 %	49.3 ± 27.6	40.3 ± 10.2
Tween-20	1 %	86.3 ± 6.3	58.0 ± 5.7
DMSO	20 %	78.0 ± 4.8	380.0 ± 30.5
DTT	1 mM	30.1 ± 11.6	157.5 ± 24.6
PEG4000	20 %	36.0 ± 0.9	13.8 ± 3.9
β-ME	20 %	-7.0 ± 25.0	-42.1 ± 29.1
H ₂ O ₂	0.02 mM	52.2 ± 4.8	180.5 ± 19.2

四、蛋白質結構分析

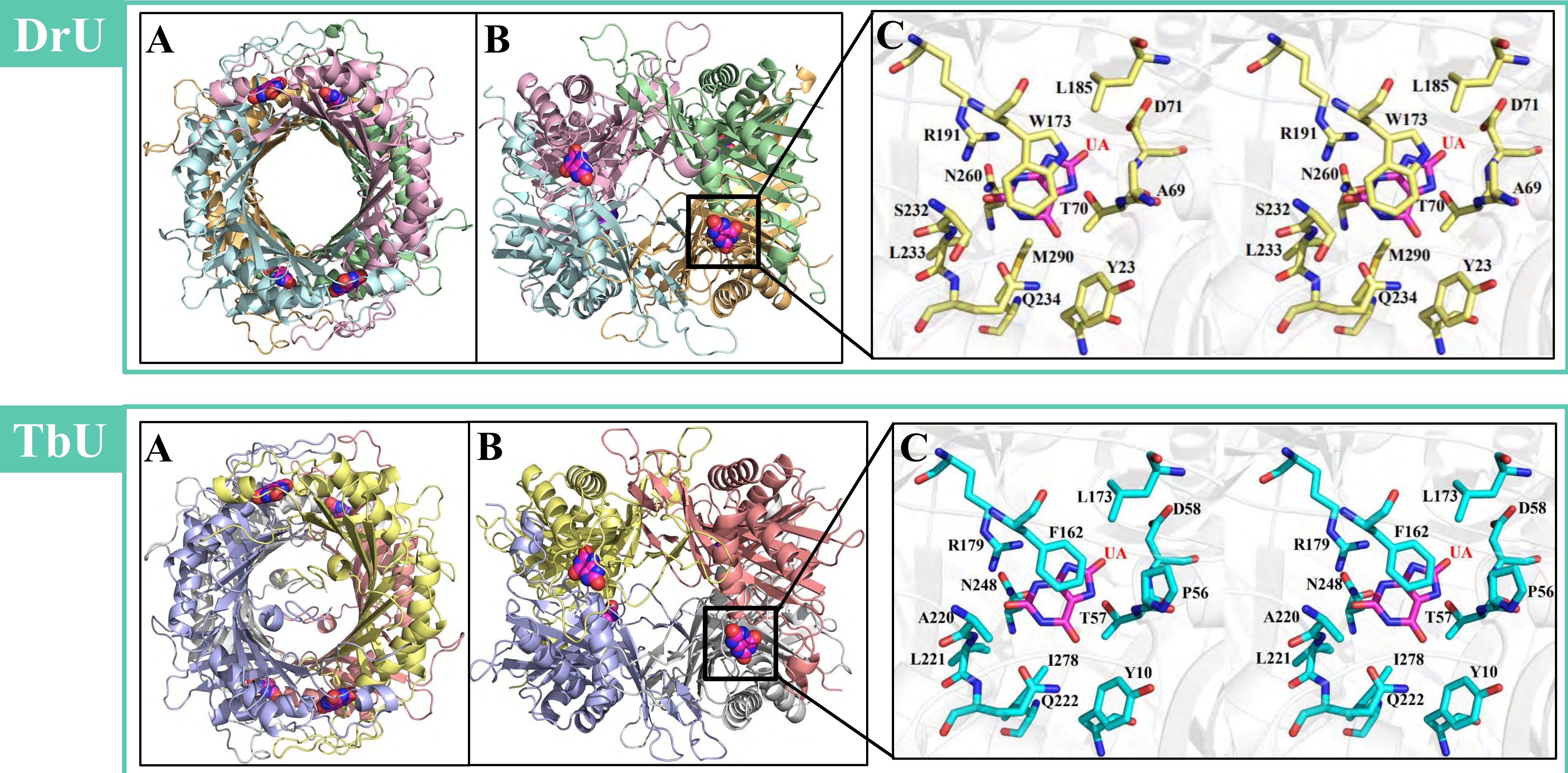


圖15：(A)(B) 兩種角度的蛋白質四聚體構型(C) 蛋白質與受質尿酸結合情形分析圖

- 由DALI分析之胺基酸一級序列比對，*D. radiodurans* uricase之蛋白質單體結構由5個主要的 α -helix與12個 β -sheet所組成，比較DrU與TbU之總體結構差異，後者於C端具有特異性的 α -helix構型。
- 由圖15，比較DrU與TbU分子模擬構型的最大差異，在於DrU中央為一雙環結構，而TbU中央為單環，由此推測DrU與受質間親和性較低和DrU結構上的立體空間障礙有關。

五、高尿酸檢測

• 簡易比色法：TMB + HRP

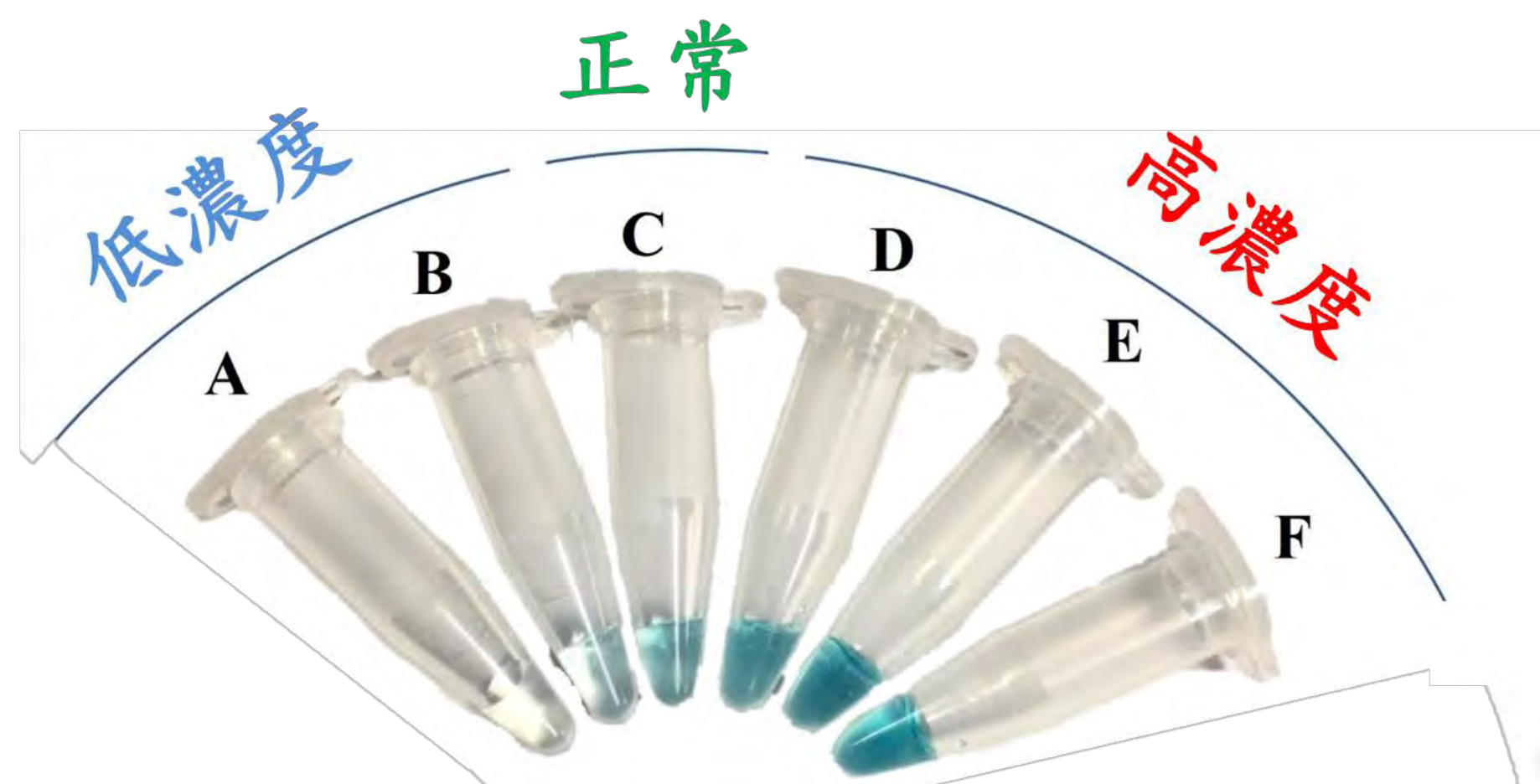


圖16：各種濃度尿酸加入自製的DrU降解後產生 H_2O_2 ，再與TMB, HRP反應的呈色圖。尿酸濃度(A) 0 μ M (B) 200 μ M (C) 400 μ M (D) 600 μ M (E) 800 μ M (F) 1000 μ M

• 光譜檢測法：對硝基苯硼酸 (p-NPBA)

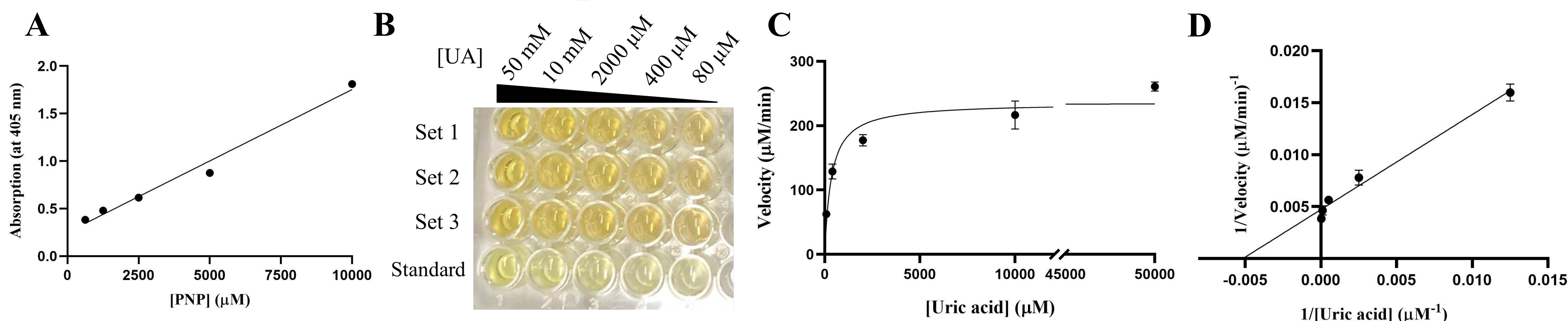


圖17：(A) 對硝基苯酚 (PNP) 之標準檢量線 (B) 由左至右依序為50 mM, 10 mM, 2000 μ M, 400 μ M, 80 μ M UA加入 p-NPBA後在 elisa plate 上的呈色結果 (C) 降解反應速率對尿酸濃度作圖 (D) Lineweaver-Burk雙倒數之圖形

- 如圖16，DrU加入由低至高的不同尿酸濃度反應20分鐘後，加入TMB+HRP中呈色，氧化後的TMB顏色由淺藍到深藍。
- 如圖17，DrU加入尿酸溶液反應後，加入p-NPBA呈色，以對硝基苯酚(PNP)為標準品測405 nm下吸光值，由圖17(A)的PNP檢量線得知降解速率，再由圖17(D)的酵素動力學檢量線得知尿酸濃度。

陸、結論

- 本實驗篩選出抗輻射奇異球菌源(DrU)、耐熱雙球桿菌源(TbU)尿酸氧化酶，取得目標基因序列並成功純化出蛋白質，濃度分別為21.63 mg/mL及32.73 mg/mL。
- 在酵素活性分析上，抗輻射奇異球菌源的最佳反應條件為pH 10.0, 30°C，在室溫下催化效率佳；而耐熱雙球桿菌源最佳反應條件為pH 9.0, 70°C，酵素在高溫下催化效率較佳，且與受質間親和性較好($k_m=191.3$)。
- 若將本實驗的重組酵素作為降尿酸藥物，不考慮其他干擾因子，體內尿酸達建議用藥範圍(9 mg/dL)的65 kg成年男子，注入13 mg酵素，欲使尿酸降回正常值(7 mg/dL)，預估TbU約需1 hrs，而DrU僅需1.5 min。
- 由酵素結構分析得知兩種尿酸氧化酶皆以四聚體形式存在。其中DrU在受質結合區為雙環構造，而TbU則為單環，立體空間障礙小，為TbU與受質親和性優於DrU的原因之一。
- 我們利用DrU設計出2種檢測尿酸濃度的方法，其中簡易比色法具有顏色變化較明顯、簡易方便等優點，適合高尿酸患者自行初步快速檢測；而光譜檢測法則是精確性較高，適用於醫療機構的進階檢測。

柒、未來展望

- 針對DrU及TbU與受質結合之重要胺基酸進行點突變，並透過定向演化隨機點突變篩選出性能更佳的酵素突變種。
- 針對尿酸簡易檢測，加入奈米金改良簡易比色法並製成呈色試片，以肉眼觀測檢測尿酸是否超標，同時也能偵測其螢光訊號，盼能提升檢測之靈敏度。

捌、參考文獻及其他

- Li W, Xu S, Zhang B, Zhu Y, Hua Y, Kong X, Sun L, Hong J. 2017; PLoS One. 12(5): e0177877.
- Bove M., Cicero A.F., Veronesi M., Borghi C. 2017. Vasc Health Risk Manag, 23–28.