

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080003
參展科別	生物化學
作品名稱	以蛋白質工程開發新穎酵素於高尿酸檢測 及降解藥物
得獎獎項	大會獎：二等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 許名智、徐駿森

作者姓名 許庭瑄

關鍵詞 尿酸氧化酶、尿酸降解、蛋白質工程

作者簡介



我是北一女中數理資優班的許庭瑄。高一時開始在台大的實驗室，進行基因體及蛋白質實驗的研究，過程中體會到研究的快樂與辛苦，對生物化學的實驗技巧也有更深入的了解。

感謝臺大農化系徐駿森教授，讓我有進入實驗室學習的機會。感謝實驗室的邱奕志學長，陪我進行實驗並一起討論報告。感謝北一女中化學科許名智老師，在專研路上給我的扶持與協助。

摘要

尿酸氧化酶參與嘌呤代謝，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，近年來微生物源尿酸氧化酶之酵素工程改良，逐漸被應用於尿酸檢測與降解藥物，因此具極高研發價值。

本研究針對微生物源尿酸氧化酶進行基因體探勘，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，以蛋白質異源表現與金屬螯合層析法純化取得重組尿酸氧化酶，進行酵素動力學、熱穩定分析、結構解析、金屬離子耐受性分析與尿酸檢測應用。在最佳反應條件下，抗輻射奇異球菌源酵素於 30 °C 之 K_m 與 K_{cat} 為 679.03 μM , 30.33 s^{-1} ；耐熱雙球桿菌源酵素於 70 °C 之 K_m 與 K_{cat} 為 191.31 μM , 12.85 s^{-1} 。此外，我們已解析耐熱雙球桿菌源尿酸氧化酶結構，發現其羧基端之特異性構型可能與熱穩定性有關。本研究以此兩種尿酸氧化酶為酵素工程改良標的，盼未來能研發作為快速篩檢與臨床治療之生物替代藥物。

Abstract

Urate oxidase (EC 1.7.3.3), which is also known as uricase, catalyzes the oxidation of uric acid to soluble allantoin in the purine degradation. Although it exists in most organisms, humans and some primates are lack of uricases during the evolutionary process. As a consequence of this enzyme deficiency, humans have high serum uric acid levels. In some people, uric acid levels rise above the solubility limit resulting in crystallization in joints, acute inflammation in response to these crystals causes severe pain; a condition known as gout.

Microbial-derived uricase has been widely used in recent years for the detection of hyperuricemia and uric acid concentration in blood and urine. It is also seen as a new drug to lower uric acid. However, more improvements in the activity and thermo stability of urate oxidase can be done. Therefore, in this project, we study urate oxidase from *Deinococcus radiodurans* and *Thermobispora bispora*. We successfully obtained the target gene. Purification of recombinant uricase, enzyme kinetics, thermal tolerance assay, thermal shift assay, protein structure analysis, enzyme resistance to metal ion and uric acid detection applications were done. Under the optimal reaction conditions, the K_m and K_{cat} of *Deinococcus radiodurans* uricase were 679.03 μM , 30.33 s^{-1} , respectively, while *Thermobispora bispora* uricase were 191.31 μM , 12.85 s^{-1} . We hope to improve the thermal stability and activity of enzymes through protein engineering. In the future, we hope that it can be used as a bio-alternative drug for rapid screening and clinical treatment.

壹、前言

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。

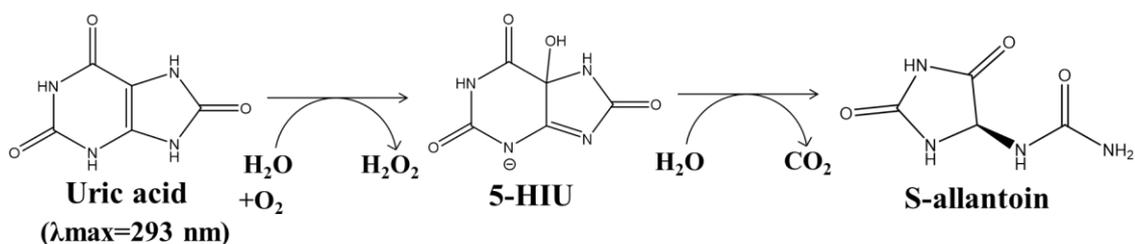


圖 1. 尿酸降解化學反應式

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。

三、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。

貳、研究方法或過程

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
d ₂ H ₂ 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 μ 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 $OD_{600}=0.6\sim 0.8$ 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 μ L 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 μ L 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。

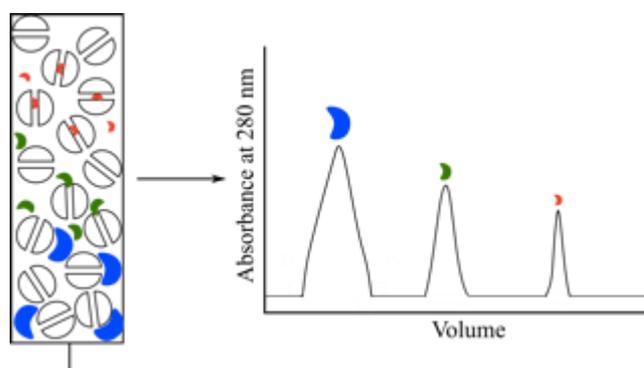


圖 2. 蛋白質分子篩選層析示意圖

(<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 μ M 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

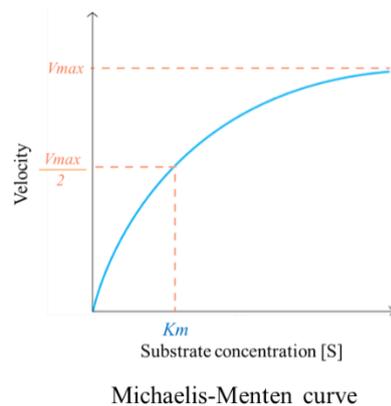
4.繪圖比較不同酸鹼值下尿酸氧化酶的相對活性

(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

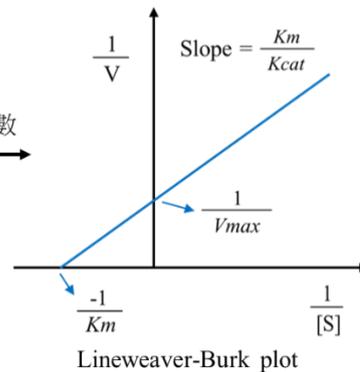


圖 3. 反應速率對受質濃度作圖

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]

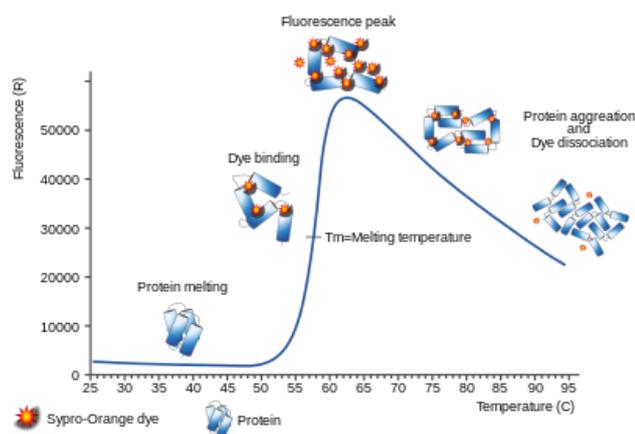


圖 5. Principle of the thermal shift assay

(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) 簡易比色法

[原理]

利用辣根過氧化酶(HRP)催化 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)與尿酸降解產生的 H_2O_2 於酸性環境下反應呈色(圖 6)，透過顏色深淺初步判斷尿酸濃度高低。

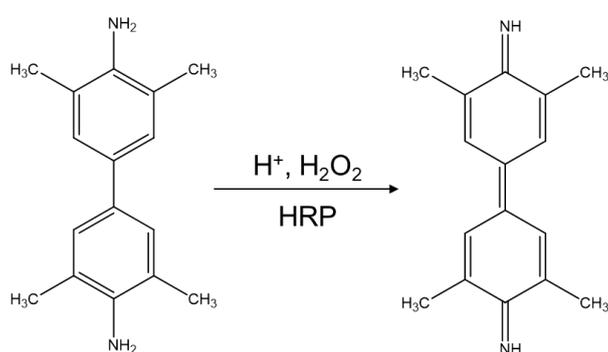


圖 6. 簡易比色法—TMB 與過氧化氫於酸性環境下氧化還原之化學反應式

[步驟]

1. 溶液檢測

- (1) 配置呈色劑所需藥品：100 μL TMB(in DMSO)、1 mL 0.01 M 醋酸鈉溶液(pH 4.0)、1 μL HRP
- (2) 在微量離心管中，配置 0, 200, 400, 600, 800, 1000 μM 尿酸溶液、pH 10.0 緩衝溶液、5 μM DrU
- (3) 在總體積 500 μL 下反應 20 min
- (4) 取出 100 μL 呈色劑，加入 6 μL 反應溶液，搖晃後即可見藍色

2. 試片檢測

- (1) 裁剪適當大小的濾紙作為固相試片
- (2) 配置呈色劑所需藥品：100 μL TMB(in DMSO)、1 mL 0.01 M 醋酸鈉溶液(pH=4.0)、1 μL HRP
- (3) 在微量離心管中，配置 200, 400, 600, 800, 1000 μM 尿酸溶液、pH=10.0 緩衝溶液、5 μM DrU，取出 10 μL 反應溶液，點在濾紙上
- (4) 取 10 μL 呈色劑點在濾紙上，靜置一段時間後即可見藍色

(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。

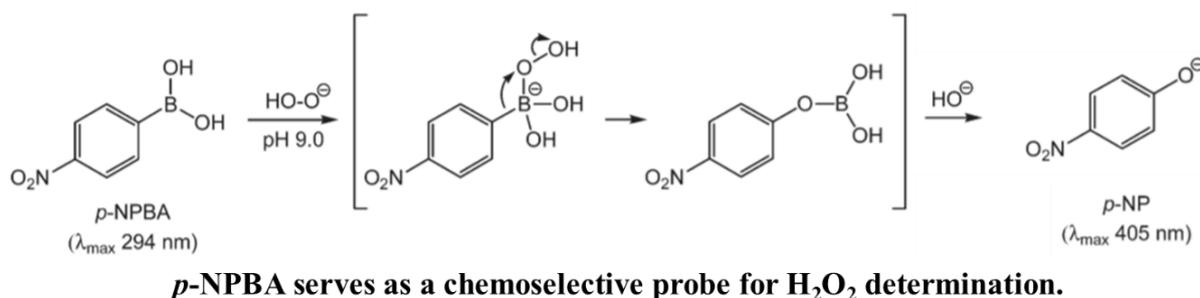


圖 7. 對硝基苯硼酸與過氧化氫鹼性條件下之化學反應式 (Lu, Lin, Chang, Wu, & Lo, 2018)

[步驟]

1. 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
2. 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
3. 2 分鐘後加入終止劑 KOH
4. 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
5. 繪製反應速率對尿酸濃度圖形

參、研究結果與討論

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.	MPSACTX8	NZ_ADVX01000009.1	<i>Methylobacterium nodulans</i>	ORS 2060	NC_011894.1
<i>Actinosynnema mirum</i>	DSM 43827	NC_013093.1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	JCM 2831	NC_010505.1
<i>Arthrobacter aurescens</i>	TC1	NC_008711.1	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MC2 155	NC_008596.1
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	A6	NC_011886.1	<i>Nakamurella multipartite</i>	DSM 44233	NC_013235.1
<i>Bacillus clausii</i>	KSM-K16	NC_006582.1	<i>Nocardiopsis farcinica</i>	IFM 10152	NC_006361.1
<i>Bacillus halodurans</i>	C-125	NC_002570.2	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	DSM 43111	CP002040.1
<i>Bacillus selenitireducens</i>	MLS10	NC_014219.1	<i>Paniceibacillus</i> sp.	JDR-2	NC_012914.1
<i>Bacillus subtilis</i>	str. 168	NZ_ABQK01000005.1	<i>Pantoea vagans</i>	C9-1	NC_014562.1
<i>Bacillus tusciae</i>	DSM 2912	CP002017.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	NC_002516.2
<i>Brachy bacterium faecium</i>	DSM 4810	NC_013172.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBW25	NC_012660.1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	J2315	NC_011000.1	<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP134	NC_007347.1
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	K96243	NC_006350.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	bv. viciae 3841	NC_008380.1
<i>Catenulospira acidiphila</i>	DSM 44928	NC_013131.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	PR4	NC_012490.1
<i>Cellulomonas flavigena</i>	DSM 20109	CP001964.1	<i>Rhodococcus opacus</i>	B4	AP011115.1
<i>Citriophaga pinensis</i>	DSM 2588	NC_013132.1	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	DSM 9941	NC_008148.1
<i>Comamonas testosteroni</i>	CNB-2	NC_013446.1	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	NRR1.2338	AM420293.1
<i>Deinococcus radiodurans</i>	R1	NC_001263.1	<i>Solibacter usitatus</i>	Eliin6076	CP000473.1
<i>Dickeya dadantii</i>	3937	NC_014300.1	<i>Sorangium cellulosum</i>	So ce 56	NC_010162.1
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP1430	NC_013961.1	<i>Staeckelbrandia nassauensis</i>	DSM 44728	CP001778.1
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	DSM 12163	FN392235.1	<i>Starkeya novella</i>	DSM 44728	CP002026.1
<i>Frankia alni</i>	ALCN14a	NC_008278.1	<i>Streptomyces avermitilis</i>	DSM 506	BA000030.3
<i>Geodermatophilus obscures</i>	DSM 43160	NC_013757.1	<i>Streptomyces bingchengensis</i>	MA-4680	CP002047.1
<i>Kinococcus radiotolerans</i>	SRS30216	NC_009664.2	<i>Streptomyces griseus</i>	NBRCC 13350	AP009493.1
<i>Kocuria rhizophila</i>	DC2201	AP009152.1	<i>Streptomyces scabiei</i>	87.22	FN554889.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 44963	ADVG01000003.1	<i>Streptomyces scabiei</i>	87.22	FN554889.1
			<i>Thermobispora bispora</i>	DSM 43021	NC_013595.1
			<i>Thermobispora bispora</i>	DSM 43833	CP001874.1
			<i>Trispora radiovictrix</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)。

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，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。

表 1. 尿酸氧化酶之蛋白質序列相似度比對

	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Granulicella tundricola</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	<i>Thermobispora bispora</i>
<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	28.7	41.7	42.7	30.2	54.6
<i>Bacillus subtilis</i>		100	25.5	28.5	52.1	28.6
<i>Deinococcus radiodurans</i>			100	37.5	26.6	41.5
<i>Granulicella tundricola</i>				100	28.8	41.5
<i>Kyrpidia tusciae</i>					100	29.7
<i>Thermobispora bispora</i>						100

取得抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)及耐熱雙球菌(*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	使用的限制酶切位		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	GTGGAGCGCGCCGAGTGAC CTCGAG ATT
耐熱雙球桿菌源 尿酸氧化酶	Forward	NdeI	AAT CATATG GCCATCGTCCTCGGACGC
	Reverse	EcoRI	ACGCCCGGCTTCTGCTGAG 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。

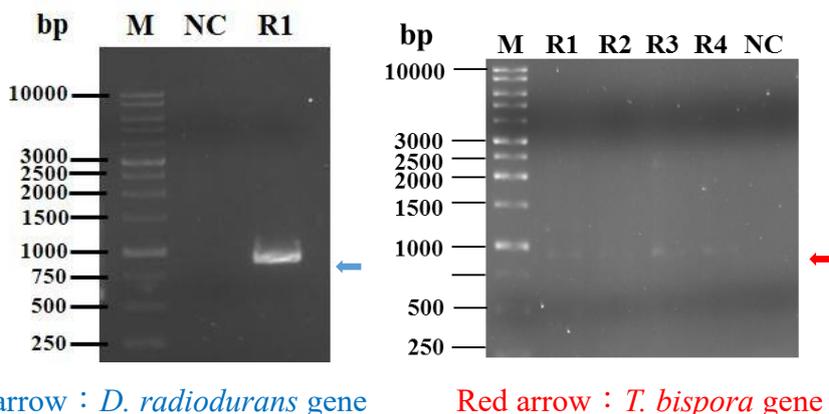


圖 9. *D. radiodurans* uricase gene (897 bp) 及 *T. bispora* uricase gene (906 bp) DNA 電泳圖

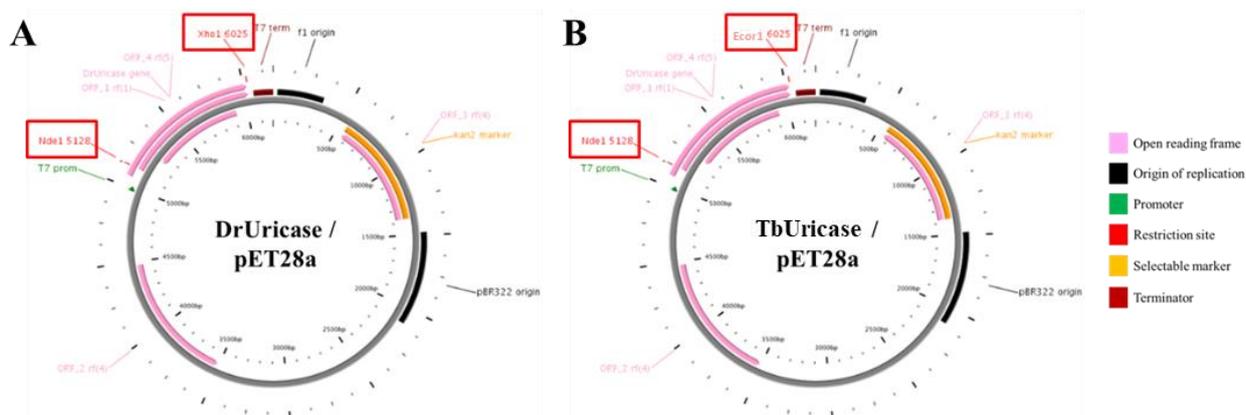


圖 10. (A) 以分子選殖技術建構 DrUricase/pET-28a 之質體 DNA

(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)

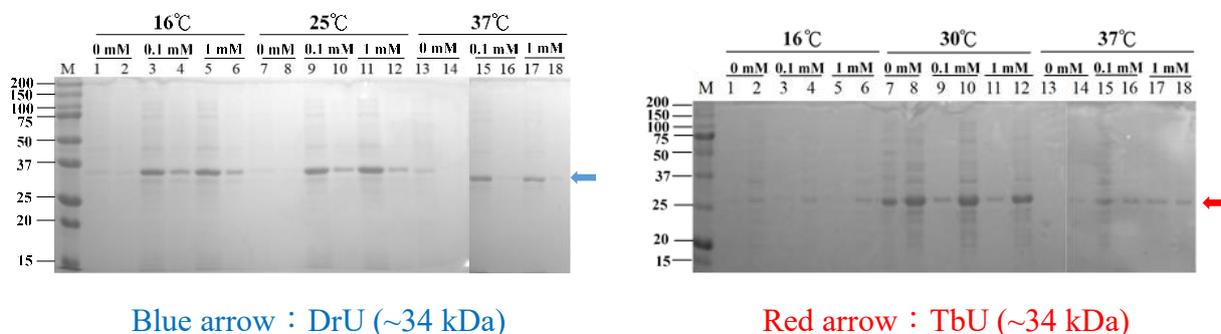


圖 11. DrU & TbU 重組蛋白質誘導條件測試圖 (12 % SDS-PAGE)

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。

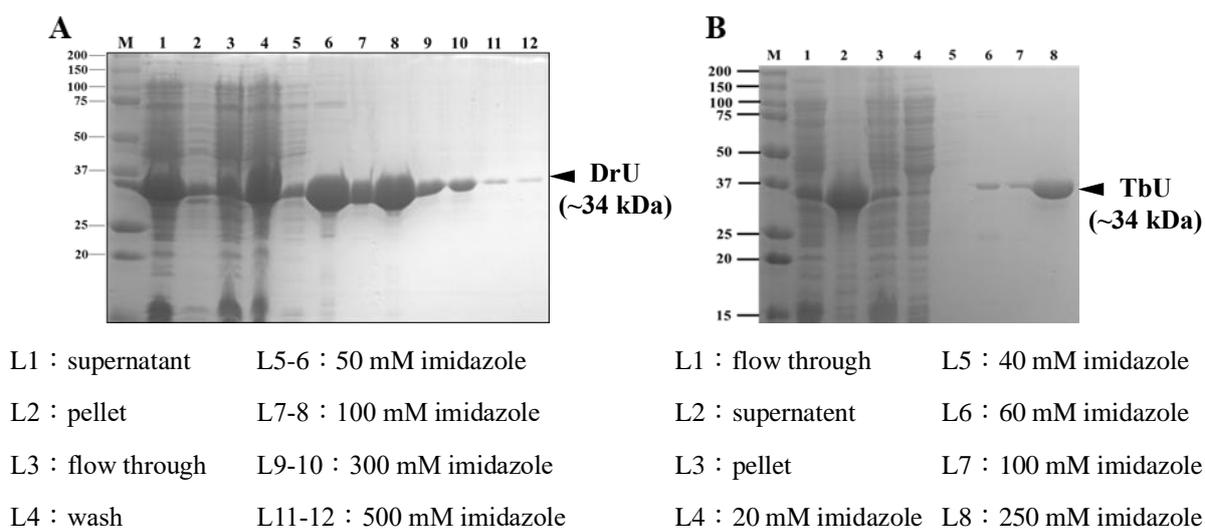


圖 12. (A) DrU 重組蛋白質純化結果圖 (12 % SDS-PAGE)

(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)。

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。

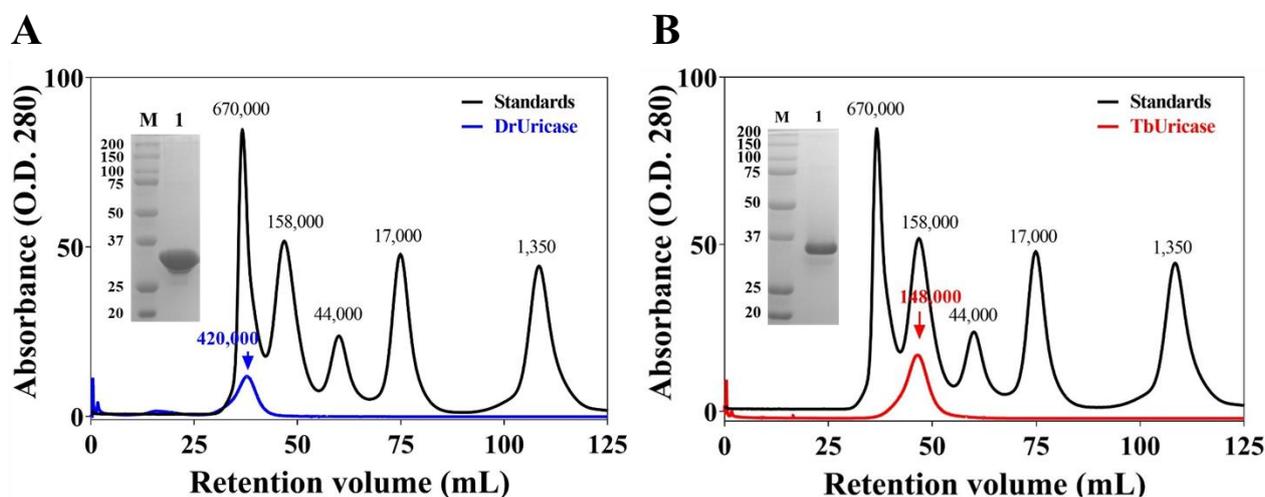


圖 13. (A)粒徑篩析層析法與 DrU 二次純化(12 %SDS-PAGE)結果圖

(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

(一) 布拉德福蛋白質定量法(Bradford assay)

將牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin)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) = $\frac{\text{吸光值}}{\text{消光係數}} \times \text{稀釋倍率} \times 1000 \times \text{分子量}$

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

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

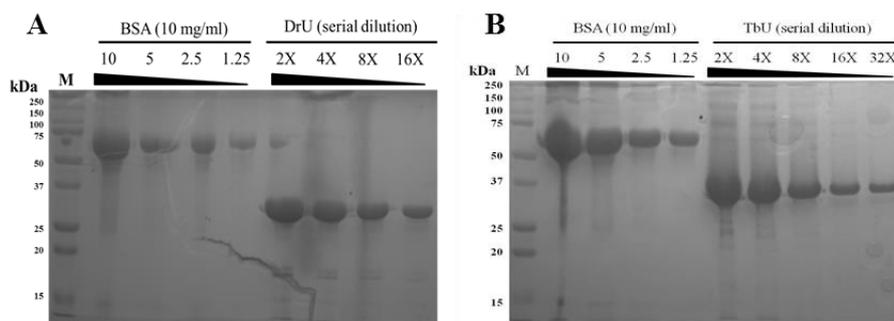


圖 14. (A) DrU 重組蛋白質之 BSA 定量膠圖 (12% SDS-PAGE)
(B) TbU 重組蛋白質之 BSA 定量膠圖 (12% SDS-PAGE)

六、酵素活性分析

(一) 尿酸標準曲線

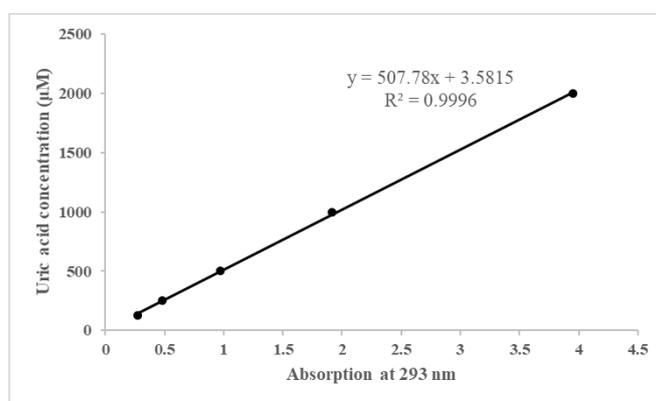


圖 15. 2000 μM , 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM 的尿酸對吸光值作圖

(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。

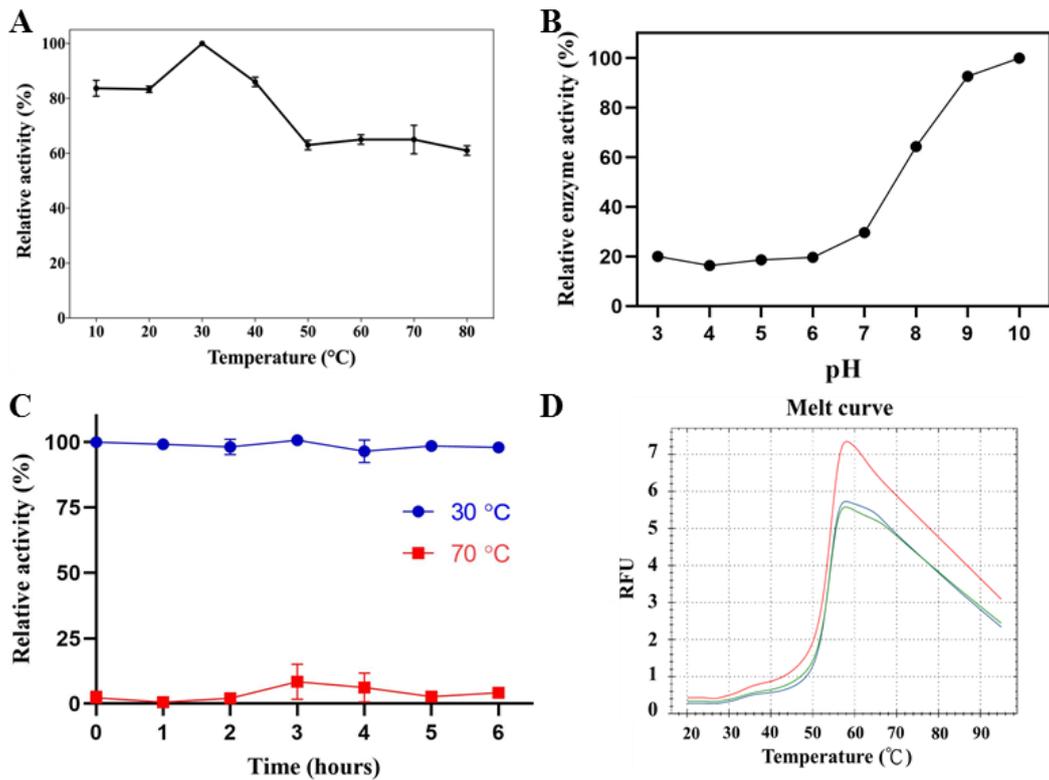


圖 16. Characterization of *D. radiodurans* uricase (A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應 pH 值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性 (紅：10 mg/mL, 藍：7.5 mg/mL, 綠：5 mg/mL)

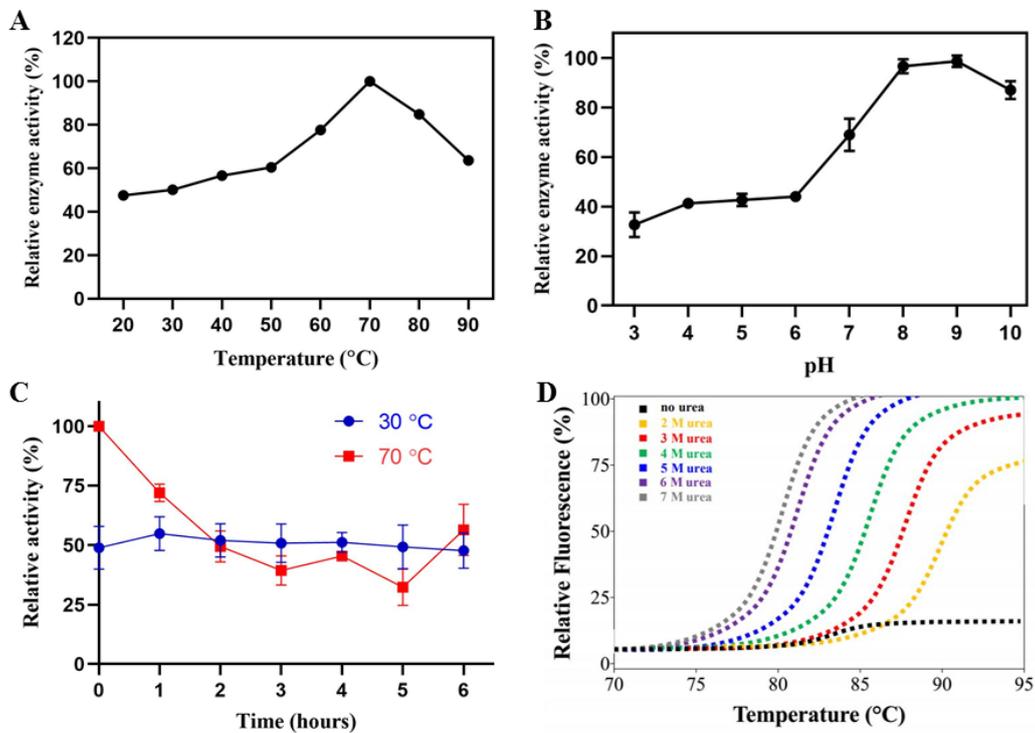


圖 17. Characterization of *T. bispora* uricase (A) 最佳反應溫度 (B) 最佳反應 pH 值 (C) 熱耐受性 (D) 熱穩定性實驗設計概念圖

(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)。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。

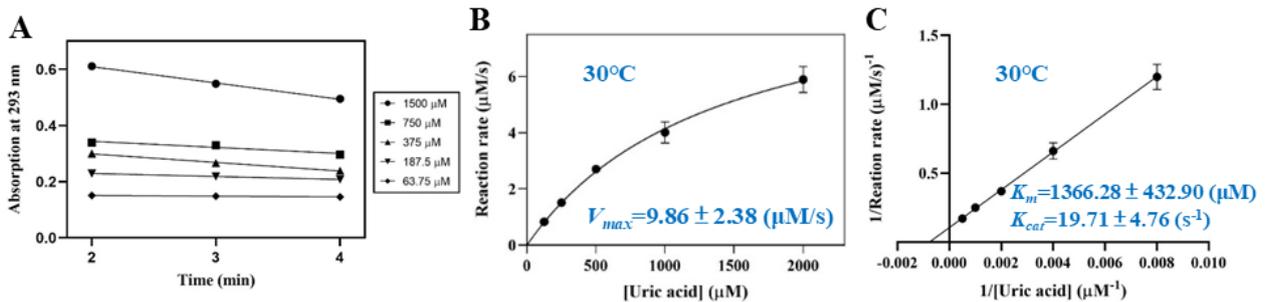


圖 18. DrU enzyme kinetics (A) 酵素反應時間 (Time dependent kinetics) (B) Michaelis-Menten 作圖 (C) Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形

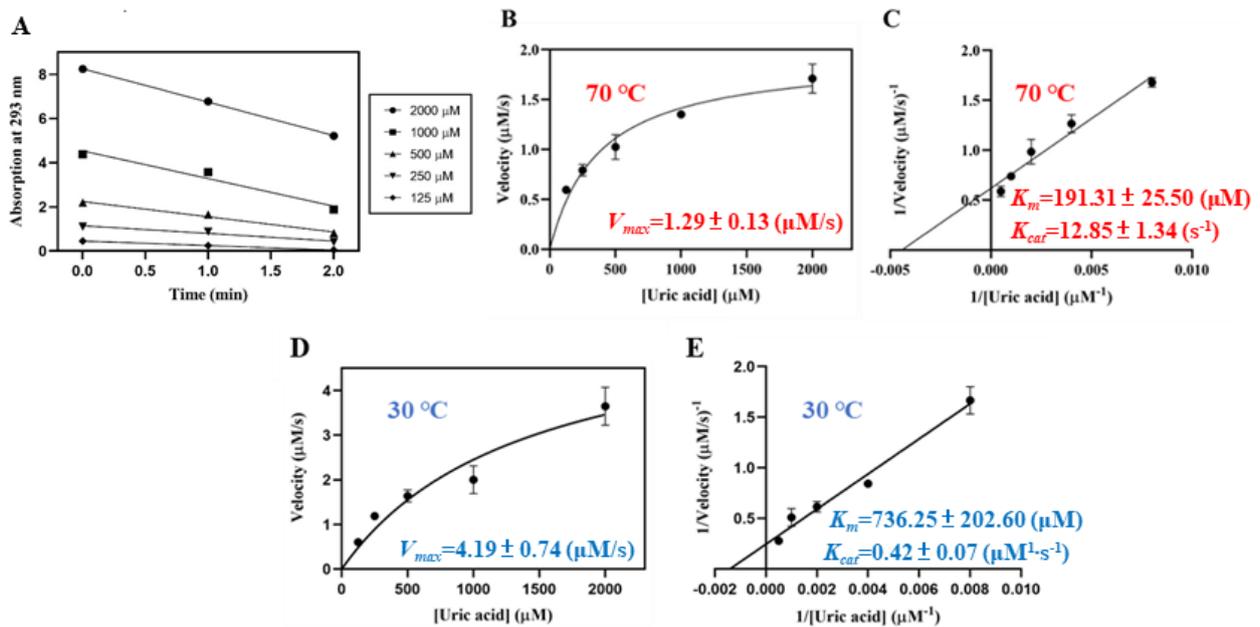


圖 19. TbU enzyme kinetics (A) 酵素反應時間 (Time dependent kinetics) (B,C) Michaelis-Menten 動力學與 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖 (70°C) (D,E) Michaelis-Menten 動力學與 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖 (30°C)

表 3. 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 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	pH 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>	30.33	679.03	0.043	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

- 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。

(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)。

- 比較兩種酵素於不同金屬離子環境下的活性差異，無論一價或二價金屬離子皆無法提升酵素活性，證實兩酵素皆無須金屬離子作為輔因子參與酵素催化反應(Cofactor-free oxidase-catalyzed reactions)，與過去報導之尿酸氧化酶特性相符。在含有機溶劑的環境下，酵素的活性則普遍較差；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。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。

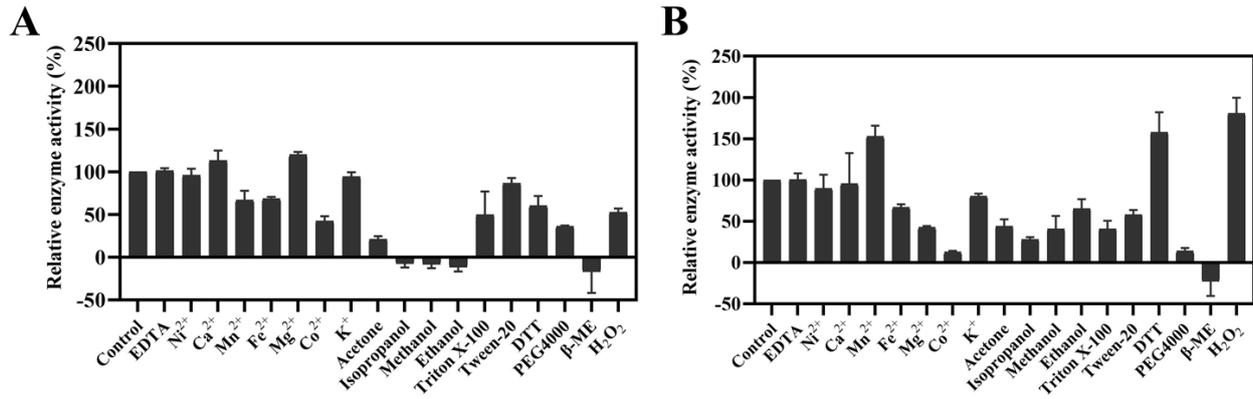


圖 20. (A)DrU 之耐受性實驗結果圖 (B)TbU 之耐受性實驗結果圖

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	DTT	1 mM	30.1 ± 11.6	157.5 ± 24.6
Mg ²⁺	0.1 μM	119.8 ± 3.3	42.5 ± 1.8	PEG4000	20 %	36.0 ± 0.9	13.8 ± 3.9
Co ²⁺	0.1 μM	41.9 ± 6.0	12.5 ± 1.6	β-ME	20 %	-7.0 ± 25.0	-42.1 ± 29.1
K ⁺	0.1 μM	94.1 ± 5.4	80.3 ± 3.3	H ₂ O ₂	0.02 mM	52.2 ± 4.8	180.5 ± 19.2
Acetone	20 %	20.8 ± 3.8	43.8 ± 8.7				

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)。

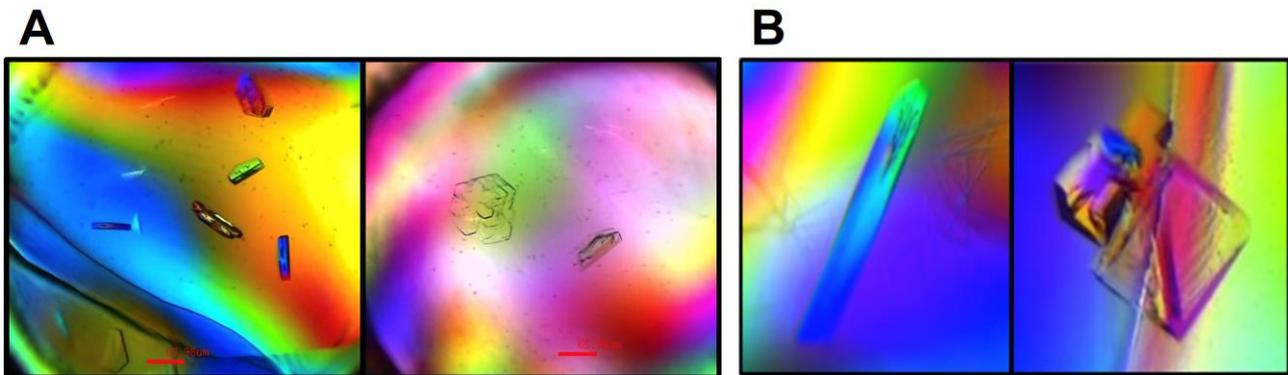


圖 21. (A)*D. radiodurans* uricase 於可見光顯微鏡下之蛋白質晶體 (B) *T. bispora* uricase 於可見光顯微鏡下之蛋白質晶體

➤ *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形塊狀晶體，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)。

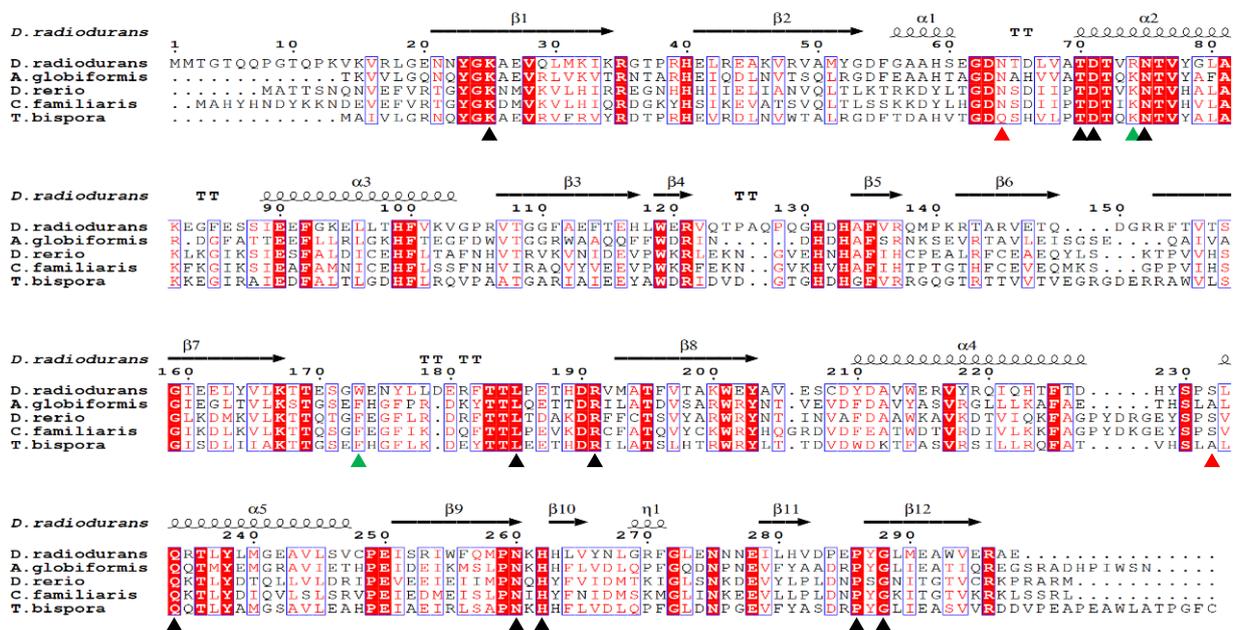


圖 22. *D. radiodurans* uricase, *T. bispora* uricase 及與其相似之蛋白質一級序列比對圖

➤ 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

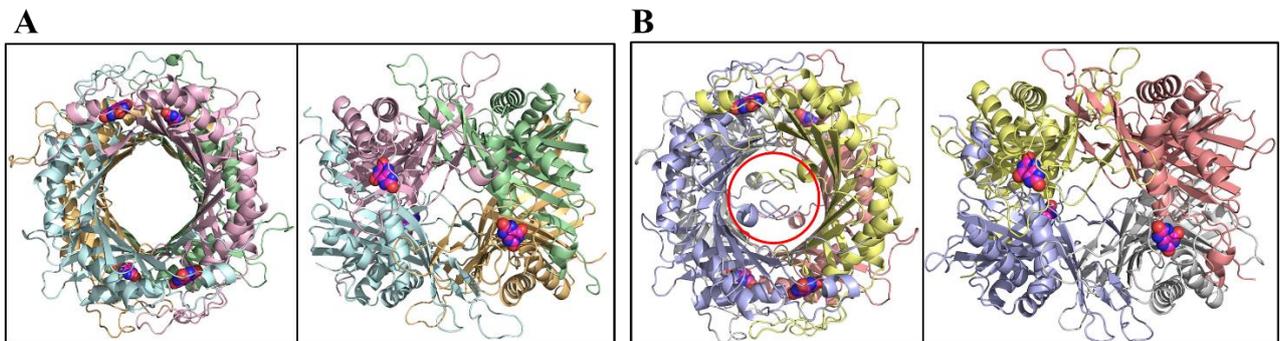


圖 23. (A) *D. radiodurans* uricase 分子模擬結構之頂視圖與側視圖，以對稱四聚體呈現 (B) 已解析 *T. bispora* uricase 蛋白質結構之頂視圖與側視圖，以對稱四聚體呈現

- *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。

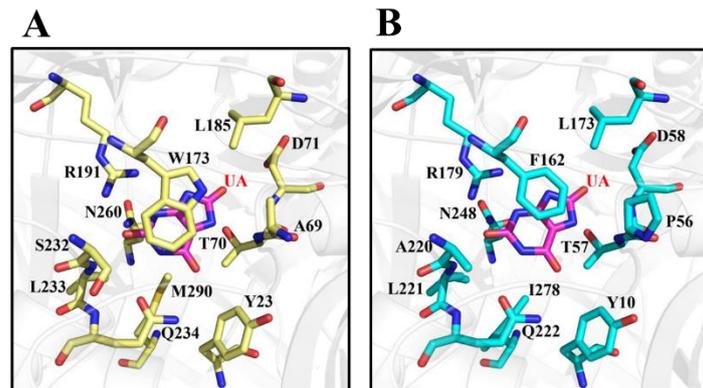


圖 24. (A) *D. radiodurans* uricase 酵素受質結合區之立體模擬視圖 (B) 已解析之 *T. bispora* uricase 結構於酵素受質結合區之立體視圖

- 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。
- 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。

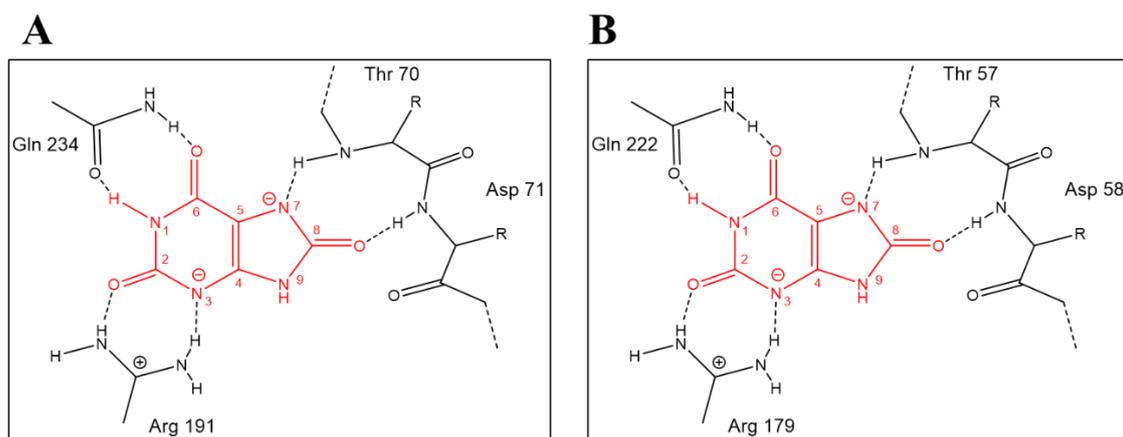


圖 25. (A) DrU 與尿酸結合之位點圖 (B) TbU 與尿酸結合之位點圖

由圖 25，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麩胺醯胺 (Glutamine)和精胺酸(Arginine) (DrU : Gln 234, Arg 191 / TbU : Gln 222, Arg 179)，麩胺醯胺和尿酸之 N1 間會形成氫鍵，而精胺酸則和尿酸之 N3 間會形成氫鍵；蘇胺酸(Threonine)和 N7 間形成氫鍵 (DrU : Thr 70 / TbU : Thr 57)；天冬胺酸(Aspartate)和氧間形成氫鍵 (DrU : Asp 71 / TbU : Asp 58)。而 DrU 結構中尿酸下方有 Tryptophan 173，TbU 則是 Phenylalanine

162，關閉下方空腔(未標示在圖內)。其中苯丙胺酸之六員環可與尿酸之六員環緊密相接，且色胺酸(Tryptophan)的雙環結構比起苯丙胺酸(Phenylalanine)的單環結構在與尿酸結合時的立體空間障礙可能較大，因此導致 DrU 與受質間的親和性遜於 TbU。

八、高尿酸檢測

(一) 簡易比色法

1. 溶液檢測

尿酸初始濃度分別為 0, 200, 400, 600, 800, 1000 μM ， $[\text{DrU}]=5 \mu\text{M}$ ，反應 20 分鐘後加入呈色溶液，呈色結果由淺藍到深藍 (圖 26)。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

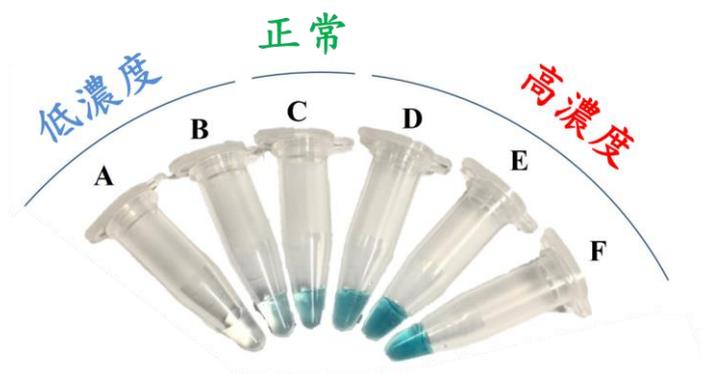


圖 26. 不同濃度尿酸加入呈色劑之呈色圖。尿酸濃度(A) 0 μM (B) 200 μM (C) 400 μM (D) 600 μM (E) 800 μM (F) 1000 μM 。

2. 試片檢測

尿酸初始濃度分別為 200, 400, 600, 800, 1000 μM ， $[\text{DrU}]=5 \mu\text{M}$ ，將反應溶液點在濾紙上，再加入呈色劑，呈色結果由淺藍到深藍(圖 27)。



圖 27. 尿酸試片之呈色結果圖。尿酸濃度(A) 200 μM (B) 400 μM (C) 600 μM (D) 800 μM (E) 1000 μM 。

(二) 光譜檢測法

尿酸初始濃度為 50 mM, 10 mM, 2000 μM , 400 μM , 80 μM ， $[\text{DrU}]=10 \mu\text{M}$ 。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 28)。

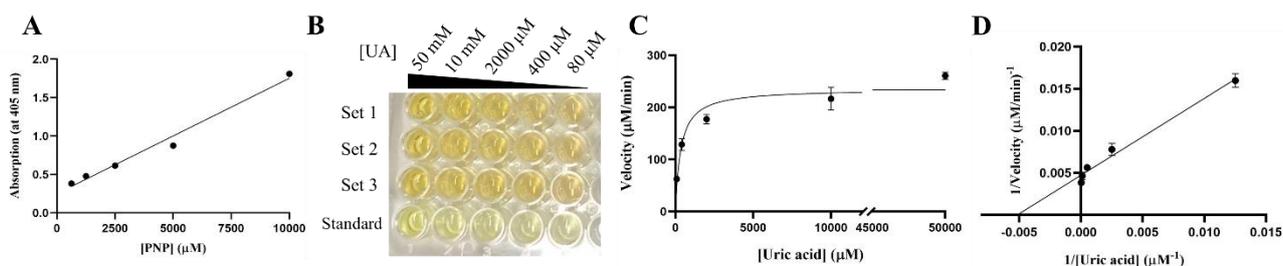


圖 28. (A)對硝基苯酚(PNP)標準檢量線 (B)尿酸在加入 p-NPBA 後在 ELISA 微盤上的呈色結果圖 (C)反應速率對尿酸濃度作圖 (D) Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形

表 4. 簡易比色法與光譜檢測法之優缺點比較

檢測方法	優點	缺點
簡易比色法	<ul style="list-style-type: none"> 顏色變化明顯 肉眼觀察比色即可知尿酸濃度是否超標，可用於初步快速篩檢 	<ul style="list-style-type: none"> 無法得知精確之尿酸濃度 檢測之尿酸濃度有上限值，高尿酸時顏色呈黃色至透明
光譜檢測法	<ul style="list-style-type: none"> 利用檢量線精確測得尿酸濃度 適用尿酸濃度範圍較廣 	<ul style="list-style-type: none"> 須利用光譜儀，無法肉眼判讀 需專人操作

肆、結論與應用

本研究以生物化學分析與解析蛋白質晶體結構深入探討抗輻射奇異球菌源及耐熱雙球桿菌源尿酸氧化酶之酵素特性，並以此重組酵素結合化學呈色法與光譜法，應用於尿酸快速篩檢。

首先透過基因體探勘方式，以各微生物源尿酸氧化酶基因之生物、生化特性與序列相似度為篩選標準，以抗輻射奇異球菌源及耐熱雙球桿菌源尿酸氧化酶基因作為研究目標。接著我們透過菌體 genomic DNA 抽取、引子設計、PCR 技術與限制酶酵素接合反應，建構出兩蛋白質表現載體。從蛋白質誘導測試與金屬螯合層析法純化出蛋白質，可分別得到 [DrU]=21.63 mg/mL 與 [TbU]=32.73 mg/mL，且兩者純度皆達 90%。由酵素活性分析結果，我們得知 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。以最佳反應條件進行酵素動力學，得知 DrU 之 $K_m=679.03 \mu\text{M UA}$, $K_{cat}=30.33 \text{ s}^{-1}$, $K_{cat}/K_m=0.043 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，而 TbU 之 $K_m=12.85 \mu\text{M UA}$, $K_{cat}=12.85 \text{ s}^{-1}$, $K_{cat}/K_m=0.067 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。

從熱耐受性分析(Thermal tolerance assay)結果，我們發現 DrU 於 30 °C 下放置 6 小時後活性幾乎維持 100 %，70 °C 下則幾乎沒有活性，而 TbU 於 30°C 下放置 6 小時後活性幾乎維持 100 %，70 °C 下則活性下降至約 50 %。從熱穩定分析(Thermal shift assay)結果，

得知抗輻射奇異球菌源尿酸氧化酶之變性溫度(T_m)為 54°C；而耐熱雙球桿菌源酵素由於熱穩定性佳，未來將利用不同濃度 Urea 以進行其熱穩定性分析。此外，酵素於金屬離子、EDTA 與洗滌劑耐受性分析結果，兩種微生物源尿酸氧化酶在含 Co^{2+} 、醇類(甲醇、乙醇及異丙醇)、 β -ME 的環境下活性皆降低，其中 DrU 在含醇類及 β -ME 的環境幾乎無活性，TbU 則在含 Co^{2+} 、 β -ME 的環境下幾乎無活性，且無論一價或二價金屬離子皆無法提升酵素活性，證實兩酵素皆無須金屬離子作為輔因子參與酵素催化反應 (Cofactor-free oxidase-catalyzed reactions)，與過去報導之尿酸氧化酶特性相符。

於尿酸檢測應用上，我們利用重組酵素結合化學呈色法與光譜法，設計出二種簡易尿酸檢測方法，首先是簡易比色法，其呈色原理是利用尿酸受酵素降解後所產生之過氧化氫氧化 TMB，使溶液呈藍色，隨尿酸濃度增加，藍色越深，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檢測；第二為光譜檢測法，透過尿酸受酵素降解後所產生之過氧化氫氧化對硝基苯硼酸，產生對硝基苯酚，利用酵素免疫分析測讀儀(elisa reader)偵測對硝基苯酚在波長 405 nm 下的吸光值，經標準曲線換算後，可得尿酸濃度，此種方法的精確性較高，適用於醫療機構的進階檢測。

二、未來實驗規劃

本研究將以提高酵素活性、酵素催化效率和酵素受質專一性為目標，進行蛋白質工程改良，以提升其應用價值，未來研究方向如下：

- (一) 深入探討 DrU 與 TbU 蛋白質晶體結構與酵素催化功能之相關性。
- (二) 蛋白質次單位間雙硫鍵之設計(Intra-subunit disulfide bonds design)：利用尿酸氧化酶之聚合特性，蛋白質次單體間之相互作用氨基酸突變為半胱氨酸(Cysteine)，促使突變酶形成雙硫鍵，增加酵素之熱穩定性。
- (三) 以尿酸氧化酶之蛋白質結構為基礎，進行循理點突變設計(Structure-based mutagenesis)，藉由分析酵素活化區周圍可能貢獻於催化功能的重要氨基酸，設計胺基酸突變位點，以提高受質專一性與酵素穩定性 (圖 29)。

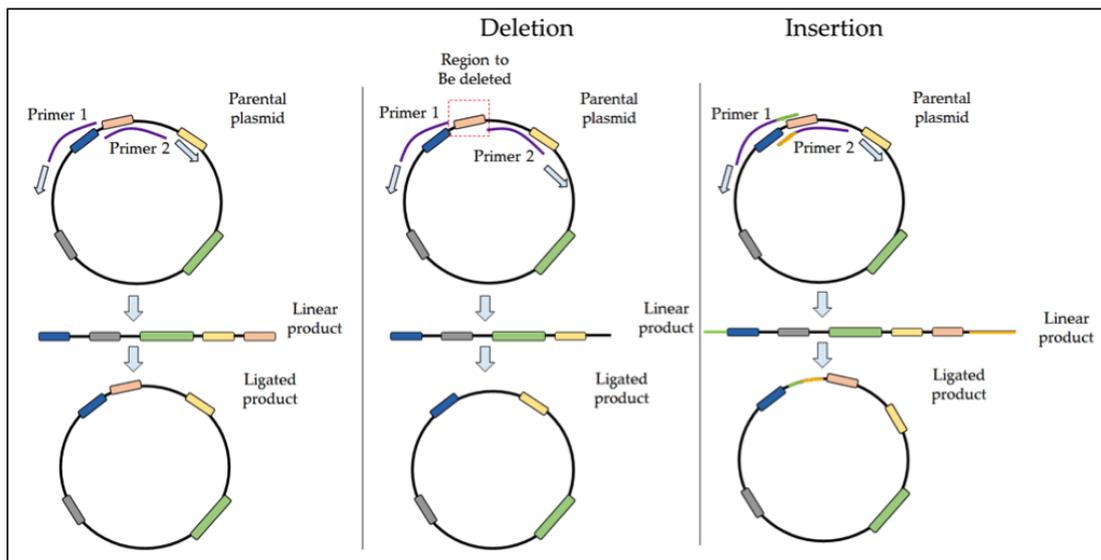


圖 29. 點突變實驗流程圖

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

(四) DrU, TbU 之定向演化分析

利用 error-prone PCR 進行隨機點突變，建立快速篩選平台，以高通量篩選方法鑑定出活性提升之突變酶，並結合循理點突變方法設計出活性最佳之尿酸氧化酶 (圖 30)。

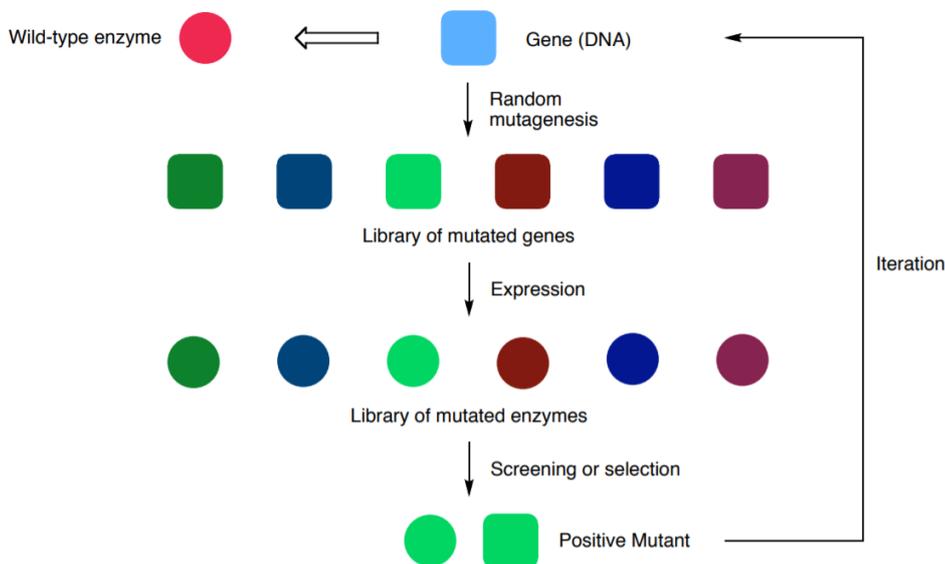


圖 30. 定向演化示意圖 (Rendler S, 2008)

(五) 高靈敏度尿酸檢測之開發：基於目前檢測試片呈色之初步成果，未來將以此呈色原理為基礎，增加樣品呈色之靈敏度，以提升尿酸快速篩檢之正確性。此外，此快速檢測試片亦可結合手機相機功能 (圖 31)，進行呈色強度定量分析，輔助人眼判斷快篩結果。

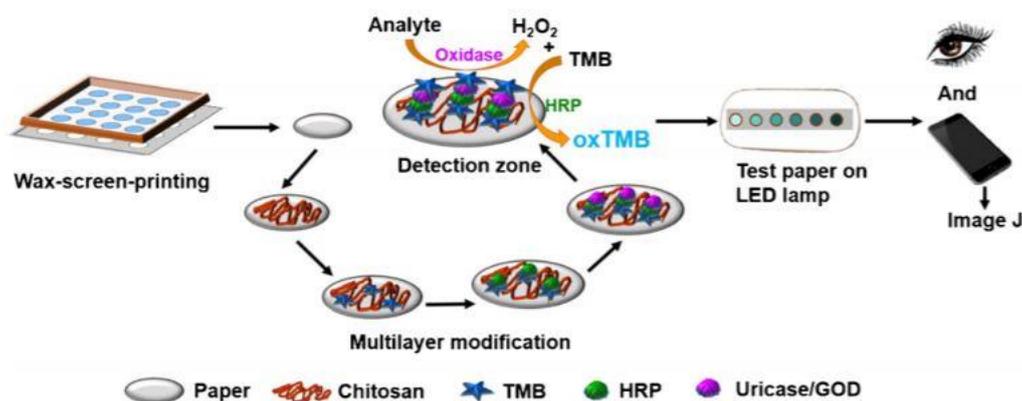


圖 31. 高靈敏度尿酸檢測方法流程圖

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

伍、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】 080003

此作品選殖級表現兩種尿酸氧化酶為酵素工程改良標的，並進行酵素動力學、熱穩定分析、結構分析、金屬離子耐受性等分析與尿酸檢測。研究動機與目的清楚明確，實驗內容豐富並有預期的初步結果，是很好的科展作品。然而題目與研究內容並不相符。

書面報告內容及研究建議如下：

1. 注意排版，圖表擠在一起且未說明詳細，讀者不易理解。
2. 每一張圖需有清楚的圖說，簡介做法及所得到的初步結論，勿以單一個標題即結束。
3. 所有實驗是否皆為本研究獨立完成，或是有前人研究累積成果需說明清楚並引用文獻註明來源。
4. 每組實驗若有三次重複，應做統計分析及畫出標準偏差，確認差異是否具有統計意義？或是單純的實驗誤差？
5. 圖表資料太多太雜，應仔細整理，每一實驗都應簡述其目的及原理，如何進行該實驗，以及得到結果為何？其結果代表什麼意義都需一步一步詳細說明。