技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001001

用简并引物快速克隆苛求芽孢杆菌尿酸酶的编码序列

赵运胜[1]，卜友泉[2]，廖　飞[3]

（1. 秦皇岛市第一医院检验科，秦皇岛　066000；2. 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室，重庆　400016；3. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：从头克隆苛求芽孢杆菌尿酸酶基因的编码序列。**方法**：据 Edman 降解所得 N 端氨基酸序列（AERTMFYGKGDV）用 BLASTp 搜索 N 端相似性>70%细菌尿酸酶；多序列联配比对发现靠近 N 端和 C 端的 2 个保守肽段。据 N 端已知序列和 2 个保守肽段设计简并引物进行 PCR 扩增；将所得片段连接到 T 载体，转化后筛选阳性克隆测序。**结果**：据密码子偏好性调整简并引物，获得该尿酸酶从第六位氨基酸到终止密码子之间的编码序列；此尿酸酶共含 322 个氨基酸残基，原核尿酸酶靠近 N 端的保守序列 ATDSMKNFI 从该尿酸酶第 70 位氨基酸残基左右开始，另一保守序列 GKVYTEPR 从该尿酸酶第 290 位氨基酸残基开始但变为 GAVFTEPR。**结论**：用简并引物 PCR 快速克隆获得了苛求芽孢杆菌尿酸酶的编码序列。

【关键词】苛求芽孢杆菌尿酸酶；简并引物 PCR；基因测序

【中图分类号】Q523　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-08-31

Rapidly cloning gene sequence of the uricase from *Bacillus fastidious* by degenerated primer

Zhao Yunsheng[1], *Bu Youquan*[2], *Liao Fei*[3]

(*1. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Qinhuangdao; 2. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the whole encoding sequence of the uricase from *Bacillus fastidious*. ***Methods***: According to the N-terminus amino sequence AERTMFYGKGDV from Edman degradation, bacterial uricases bearing similar N-terminus were sought in NCBI database by BLASTp; through multiple sequence alignment, two short conserved peptide fragments were found, one close to the N-terminus while the other close to the C-terminus. Using the known N-terminus and two conserved peptides, degenerated primers were designed for cloning the encoding sequence of the uricase by PCR; the resulting fragments were inserted into T vector for sequencing. ***Results***: After the adjustment of degeneration of the primers according to the code preference, the encoding sequence of the uricase was obtained from the sixth amino acid residue to the termination code. The translated enzyme contained 322 amino. The conserved peptide fragment ATDSMKNFI started from 70th amino acid residue while the other conserved peptide fragment GKVYTEPR started from 290th amino acid residue with the mutated sequence of GAVFTEPR. ***Conclusion***: The encoding sequence of the uricase is cloned rapidly by degenerated primer PCR.

【Key words】*Bacillus fastidious* uricase; degenerated primer PCR; gene cloning

血清尿酸测定是临床检验的常规项目；尿酸酶法是测定血清尿酸的基本方法[1]。现有尿酸酶法中，偶联过氧化物酶的间接终点平衡法最常用，但受血清中还原物质、过氧化物及黄嘌呤等显著干扰，所需显色剂毒害性较大[2-5]。本实验室建立了分析 293 nm 吸收变化测定血清尿酸的动力学尿酸酶法[1,6-8]，与其他尿酸酶法相比，相同分析效率下其成本最低、线性范围最宽、对常见干扰物质的抗性最强，但需米氏常数接近 0.20 mmol/L 且对黄嘌呤有抗性的尿酸酶，其比活性需尽量高。已报道有价值尿酸酶都有专利保护，且现有商品尿酸酶都不符合此专利方法对米氏常数的要求。因此，迫切需获得满足要求尿酸酶的基因进行重组表达。

作者介绍：赵运胜，Email:zhaoyunshengsh@163.com，研究方向：临床检验诊断。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1540.008.html（2016-06-23）

Bacillus fastidious ATCC 29604 有胞外和胞内尿酸酶，都适合此专利方法测定血清尿酸含量，且胞内酶 N 端 12 个氨基酸残基已通过 Edman 降解测序获得[9-10]。但此胞内尿酸酶的编码基因未知，只有从头克隆其编码序列才能实现重组表达。克隆未知蛋白编码基因可筛选 cDNA 文库，但其效率低且成本高。相近物种中决定酶对底物选择性和催化效力的氨基酸残基通常是保守的。如该尿酸酶氨基酸序列与其它尿酸酶之间有保守序列，则可设计针对保守序列的简并引物，通过 PCR 快速克隆此尿酸酶的部分编码区，再通过末端扩增快速高效克隆全长编码序列。据 Edman 降解所得该尿酸酶 N 端 12 个氨基酸残基序列，用 BLASTp 搜索数据库，多序列联配比对分析 N 端序列相似性>70%的细菌尿酸酶，发现有 2 个保守肽段，即靠近 N 端的 ATDSMKNFI 和靠近 C 端的 GKVYTEPR。本文报道以这 2 个保守肽段及已知 N 端序列设计简并引物 PCR 克隆此酶编码序列的简要过程。

1 材料与方法

1.1 细菌培养和基因组 DNA 提取

苛求芽孢杆菌在培养基中 30 ℃（180 r/min）振荡培养过夜，收集菌体，用改进 CTAB 法提取基因组 DNA[11]。

1.2 简并引物 PCR 进行苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶的基因克隆

1.2.1 简并引物设计 针对 N 端已知序列设计正向简并引物，代号为 DPF1~DPF4；针对靠近 C 端的保守序列GKVYTEPR 设计反向简并引物，代号为 DPR1~DPR2；针对靠近 N 端的保守序列 ATDSMKNFI 设计反向简并引物，代号为 DPR3~DPR4。具体序列见表 1。

表 1 简并引物 DPF1~DPF4 和 DPR1~DPR4 的碱基序列及相应的氨基酸序列

Tab.1 The base sequences and corresponding amino acid sequences of degenerated primers that were designated as DPF1–DPF4 and DPR1–DPR4

引物	相应的氨基酸序列
DPF1：5'-ACNATGTTYTAYGGNAARGG-3'	TMFYGKG
DPF2：5'-ATGTTYTAYGGNAARGGNGA-3'	MFYGKGD
DPF3：5'-ACNATGTTTTATGGNAA-3'	TMFYGK
DPF4：5'-ATGTTTTATGGNAARGG-3'	MFYGKG
DPR1：5'-GGYTCNGTRTANACYTTNCC-3'	GKVYTEP
DPR2：5'-GGTTCKGTRTAKACYTT-3'	KVYTEP
DPR3：5'-ATRAARTTYTTCAT-3'	MKNFI
DPR4：5'-ATRAARTTYTTCATNGWRTC-3'	DSMKNFI

注：Y=C 或 T；R=G 或 A；K=G 或 T；N= A 或 T 或 C 或 G；W=A 或 T

1.2.2 简并引物合成 DPF1~DPF4 和 DPR1~DPR2 由 Takara 合成；DPR3~DPR4 由上海生工合成。

1.2.3 简并引物 PCR 及目的片段纯化 分别将其中的任意一条正向引物和反向引物配对组合后进行 PCR 扩增，将得到的 DNA 片段用天为时代离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化。

1.2.4 目的片段和载体连接 用 T4 DNA Ligase 将纯化后的 PCR 产物和 pUCm-T 载体 16 度连接过夜。

1.2.5 转化 将含目的片段载体转化入感受态细胞进行培养，涂布在用 7 μL 20% IPTG 和 40 μL 2% X-gal 涂布的氨苄平板上（90 mm 平板），37 ℃培养过夜进行蓝白斑筛选。

1.2.6 克隆鉴定

1.2.6.1 重组质粒大小的快速鉴定 将转化后在 X-gal/IPTG 平板上培养呈白色的菌落和蓝斑对照菌落进行纯培养，挑取少量菌体用 Cracking 缓冲液裂解后电泳，初步鉴定重组质粒。

1.2.6.2 重组质粒的酶切鉴定 质粒抽提操作过程按照上海生工公司柱离心式质粒小量抽提试剂盒操作说明书进行，选取 *Pst* I 进行单酶切鉴定。

1.2.6.3 目的片段测序 根据鉴定结果，选取阳性克隆菌株，提交质粒到感染性疾病分子生物学省部共建重点实验室用 ABI 3100 基因测序仪测序。

1.2.7 序列分析 用 DNAMAN 5.2 软件对测序结果进行分析，确认基因克隆的正确性，并将其翻译序列用 BLASTp 在 NCBI 数据库中搜索进行序列比对，看其是否和其他尿酸酶的相似性最高。

1.3 调整简并引物后重新扩增并克隆部分胞内尿酸酶序列

据已测序列，按照最长翻译产物原则确定密码子；据此统计苛求芽孢杆菌密码子偏好性，优化简并引物后再重新合成正向引物（代号 DPF5~DPF6）和反向引物（代号 DPR5~DPR6）（Takara 合成）。见表 2。

表 2 简并引物 DPF5~DPF6 和 DPR5~DPR6 的碱基序列及相应的氨基酸序列

Tab.2 The base sequences and corresponding amino acid sequences of degenerated primers that were designated as DPF5–DPF6 and DPR5–DPR6

引物	相应的氨基酸序列
DPF5：5'-ATGTTTTATGCWAAAGGWGATGT-3'	MFYGKGDV
DPF6：5'-ATGTTTTATGGWAAAGGWGACGT-3'	MFYGKGDV
DPR5：5'-GGTTCYGTATAWACTTTTCC-3'	GKVYTEP
DPR6：5'-GGTTCYGTATAWACTTTACC-3'	GKVYTEP

分别将任意一条正向引物和反向引物配对组合后进行 PCR 扩增，产物测序。

1.4 尿酸酶长基因片段的精确扩增

据 N 端已知序列，以及此尿酸酶靠近 C 端的保守序列 GAVFTEPR 和其终止密码子后 60 碱基附近的序列，用 prime 5.0 设计 3 条精确引物（上海生工合成）。见表 3。

表 3 引物 DPF7 和 DPR7~DPR8 的碱基序列及相应氨基酸序列

Tab.3 The base sequences and corresponding amino acid sequences of primers that were designated as DPF7, DPR7 and DPR8

引物	相应的氨基酸序列
DPF7: 5'-TATGGTAAAGGCGATGTA-3'	YGKGDV
DPR7: 5'-CGTGGCTCAGTGAATACA-3'	AVFTEPR
DPR8: 5'-TAGTCAACGCCATAGTCG-3'	STMALT

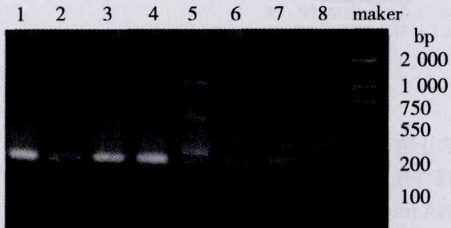
分别以 DPF7 和 DPR7，DPF7 和 DPR8 为引物进行 PCR 扩增，并将所得 PCR 产物进行测序鉴定。

2 结 果

2.1 利用简并引物初步扩增获得胞内尿酸酶 N 端片段的部分编码序列

DPF1 和 DPR1 进行 PCR 扩增时未获得产物。DPF3 和 DPR2 扩增出 850、750、500、100 bp 左右的多个DNA 片段，测序发现均为仅由 N 端氨基酸序列对应简并引物扩增的产物。按照最长翻译产物原则，分别将这些序列编码的肽段用 BLASTp 搜索数据库，发现和它们序列最相似的蛋白都不是尿酸酶。这些序列已提交 GenBank（登录号：DQ464200、464201、464202）。用这些 DNA 片段统计出所用苛求芽孢杆菌对密码子的偏好性（表 4），用于优化简并引物设计。

DPF1、DPF3、DPF4 分别和 DPR3 进行 PCR 扩增出 210 bp 左右片段（图 1），翻译后有用 Edman 降解测定所获得的 N-端 FYGKGDV 片段和靠近 N-端保守序列 ATDSMKNF；搜索 NCBI 数据库发现和其他原核尿酸酶 N-端序列很相似（图 2）。



1. DPF1+DPR3；2. DPF2+DPR3；3. DPF3+DPR3；4. DPF4+DPR3；5. DPF1+DPR4；6. DPF2+DPR4；7. DPF3+DPR4；8. DPF4+DPR4

图 1 PCR 扩增出的 213 bp 片段的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Agarose electrophoresis analysis of the 213 bp fragment that amplified by PCR

```
                                                                  Score    E
Sequences producing signidicant alignments:                       (Bits)  Value

gi|10173373|dbj|BAB04478.1|  uricase [Bacillus halodurans C-12…   112   2e-24
gi|15870111|prf||2205297A  uricase >gi|762856|dbj|BAA08723.1| uric…  101   4e-21
gi|21431959|sp|Q45697|URIC_BACSB Uricase (Urate oxidase) >gi|…    101   4e-21
gi|50513249|pdb|1J2G|D Chain D, Crystal Structure Of Urate Ox…   101   4e-21
gi|56911740|dbj|BAD66267.1|  uricase [Bacillus clausii KSM-K16…   99.4  2e-20
gi|2635742|emb|CAB15235.1|  uricase [Bacillus subtilis subsp…     98.6  3e-20
gi|67930361|ref|ZP_00523534.1|  Urate oxidase [Solibacter usi…    52.8  2e-06
gi|39574179|emb|CAE79356.1|  methyl accepting chemotaxis prote…   35.0  0.36
gi|68560692|ref|ZP_00600003.1|  Urate oxidase [Rubrobacter xyl…   33.9  0.81
gi|62424848|ref|ZP_00379989.1| COG3648: Uricase (urate oxidase)…  32.3  2.4
gi|66967325|ref|ZP_00414865.1|  Urate oxidase [Arthrobacter sp…   32.0  3.1
gi|76875804|emb|CAI87025.1|  conserved protein of unknown func…   31.6  4.0
gi|71041760|pdb|1VAY|H  Chain H, Crystal Structure Of Uricase…    31.2  5.2
gi|71368886|ref|ZP_00659366.1|  Urate oxidase [Nocardioides sp…   30.8  6.8

Alignments

>gi|10173373|dbj|BAB04478.1|  uricase [Bacillus halodurans C-125]
gi|15613322|ref|NP_241625.1|  uricase [Bacillus halodurans C-125]
Length=329
Score = 112 bite (279), Expect = 2e-24
Identities = 51/74 (68%), Positives = 66/74 (89%), Gaps = 0/74 (0%)

Query  2   E RTM FYGKGDVYVFRTY ANPLKGLKQ IPESNFTE K MN T I F GMNAK VALKGEQ FLTSFTEG 61
           + RTM +YGKGDV+V+RT  A+PL + G+K  IPES+F +  +  N  I  GM+  KVALKG+  FL+SFT+G
Sbjct  14  K RTMYYGKGDVFVYRTN ASPL EGI KA IPES SFSG R K NV I L GMDL KVALKGDAFLSSFTDG 73

Query  62  DNSLVVATDSMKNF 75
           DNSLV+ATDSMKNF
Sbjct  74  DNSLVI ATDSMKNF 87
```

图 2 简并引物 PCR 扩增所得 213 bp 片段测序翻译后氨基酸序列进行 BLASTp 分析（ATDSMKNF 为保守序列）

Fig.2 BLAST analysis of translated amino acid from encoding DNA sequence obtained by PCR with degenerated primers (ATDSMKNF was the conserved peptide fragment)

2.2 用优化后的简并引物扩增获得胞内尿酸酶的大部分编码序列

用优化后的简并引物 DPF5 和 DPR5 扩增出多个 DNA 片断，多数不能编码超过 30 个氨基酸的肽段，不是结构基因片段。但其中有 1 个 1 000 bp 左右片段选好读码框翻译后得到从 N 端第 60 个氨基酸附近到终止密码子（TGA）之后的序列，用 BLASTp 分析发现此肽段和其它细菌尿酸酶的 C 端氨基酸序列相似性最高。所得氨基酸序列中含第 70 个左右氨基酸残基的 N 端保守序列（ATDSMKNFI）和靠近 290 氨基酸残基的 C 端保守序列，但是此 C 端保守序列中有 2 个氨基酸残基都发生改变（图3）。

2.3 尿酸酶全长编码片段的扩增

用 DPF7 和 DPR7、DPF7 和 DPR8 分别扩增出 850 bp 和 1 000 bp 左右的 DNA 片段（图 4）。分析测序结果发现 1 000 bp 左右的 DNA 片段完全包括 850 bp 片段部分并含有终止密码，几个不同克隆载体的正反向测序结果比对拼接出尿酸酶

表 4 苛求芽孢杆菌的密码子偏好性

Tab.4 Code preference of *Bacillus fastidious*

氨基酸	密码子	次数	氨基酸	密码子	次数	氨基酸	密码子	次数	氨基酸	密码子	次数
Phe	TTT	29	Lys	AAA	31	Pro	CCA	13	Glu	GAA	37
Phe	TTC	13	Lys	AAG	18	Pro	CCG	8	Glu	GAG	16
Tyr	TAT	26	Asp	GAT	26	Pro	CCT	4	Arg	CGG	6
Tyr	TAC	5	Asp	GAC	10	Pro	CCC	1	Arg	CGT	5
Gly	GGT	14	Val	GTA	17	Ala	GCG	18	Arg	CGC	13
Gly	GGC	6	Val	GTT	20	Ala	GCA	18	Arg	AGA	12
Gly	GGA	20	Val	GTC	8	Ala	GCT	13	Arg	AGG	6
Gly	GGG	6	Val	GTG	10	Ala	GCC	5	Arg	CGA	2

Query=
Length=278

Sequences producing signidicant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi|2635742|emb|CAB15235.1| uricase [Bacillus subtilis subsp…	291	7e-78
gi|1587011|prf||2205297A uricase >gi|762856|dbj|BAA08723.1| uric…	286	4e-76
gi|21431959|sp|Q45697|URIC_BACSB Uricase (Urate oxidase) >gi…	286	4e-76
gi|50513249|pdb|1J2G|D Chain D, Crystal Structure Of Urate Ox…	286	4e-76
gi|56911740|dbj|BAD66267.1| uricase [Bacillus clausii KSM-K16…	277	1e-73
gi|10173373|dbj|BAB04478.1| uricase [Bacillus halodurans C-12…	265	7e-70
gi|67930361|ref|ZP_00523534.1| Urate oxidase [Solibacter usi…	169	4e-41
gi|71368886|ref|ZP_00659366.1| Urate oxidase [Nocardioides sp…	101	2e-20
gi|67988681|gb|EAM76458.1| Urate oxidase [Kineococcus radioto…	100	2e-20
gi|86740615|ref|YP_481015.1| Urate oxidase [Frankia sp. CcI3]…	89.4	7e-17
gi|54018724|dbj|BAD60094.1| putative uricase [Nocardia farcin…	86.3	6e-16
gi|66967325|ref|ZP_00414865.1| Urate oxidase [Arthrobacter sp…	84.7	2e-15
gi|71041760|pdb|1VAY|H Chain H, Crystal Structure Of Uricase…	84.7	2e-15
gi|68234777|ref|ZP_00573838.1| Urate oxidase [Frankia sp. EAN…	79.7	5e-14
gi|62424848|ref|ZP_00379989.1| COG3648: Uricase (urate oxidase)…	79.0	9e-14
gi|29828560|ref|NP_823194.1| uricase [Streptomyces avermitili…	78.2	2e-13
gi|68560692|ref|ZP_00600003.1| Urate oxidase [Rubrobacter xyl…	77.0	3e-13
gi|32141291|ref|NP_733692.1| uricase [Streptomyces coelicolor…	71.6	1e-11
gi|66799191|ref|ZP_00397926.1| Urate oxidase [Deinococcus geo…	55.5	1e-06
gi|6458899|gb|AAF10733.1| uricase [Deinococcus radiodurans R1…	53.5	4e-06
gi|50261589|gb|AAT72357.1| restriction endonuclease [Streptococc…	36.6	0.50
gi|50903578|gb|AAT87293.1| Type II restriction-modification s…	36.6	0.50

Alignments

>gi|2635742|emb|CAB15235.1| uricase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]
gi|16080298|ref|NP_391125.1| uricase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]
gi|7475974|pir||G70016 uricase homolog yunL-Bacillus subtilis
Length=494
Score=291 bits(746), Expect=7e-78
Identities=143/261(54%), Positives=188/261(72%), Gaps=0/261(0%)

```
Query  1    TE GDNSLVVATDSMKNFIQRH AASYEG A TL EGFLQ YVCEA FLAKYSHLDA V RLEAKEYAF  60
            T+ GDN+LVVATDSMKNFIQRH  ASYEG  T  EGFL  YV    FL   YSH+D  +  L   ++   F
Sbjct  229  TDGDNTLVVATDSMKNFIQRH L ASYEG T TT EGFL H YVAHRFLDTYSHMDT I T L TGEDI PF  288

Query  61   DD IQVGT DKGV V TSD LVFRKSRNE YA T A T VEVARTA SGT EVVEQ A SG IA D IQL I KVSGSS 120
            +  +      +K  +  TS  LVFR+ SRNE  +  +  ++    R+  +    + EQ  S  I  D+QL+KVSG +S
Sbjct  289  EAMPA YEEK E L S TSR LVFRR SRNE RSR S V LKAERSG NTI T I T EQ Y SE IMDLQLVKVSGNS 348

Query  121  FY GYI I DEYTTLA EA TDRPLY I F LNIGW A YEN QDDAKGDN PANYVAAEQVRD IAASVFHT 180
             F  G+I  DEYTTL  E   +RPL +++ LNI  W   YEN  +D+     + PA  YVAAEQVRD+A++VFH
Sbjct  349  FV GFI R DEYTTLP EDGNRPLFVYLNI S W QYEN TND SY AS DPAR YVAAEQVRDLASTVFHE 408

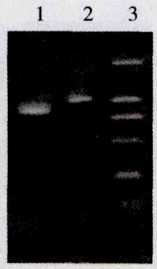
Query  181  LDNKSIQHLIYHIG LTIL D RFPQLTEVNFG T NN RTWDTVVEGTDG F KGAVTFIPRPP FGF  240
            L+   SIQ +LIYHIG   IL  RFPQLT +V+F  +  N  TWDTVVE   G  KG  V+TEPRPP +GF
Sbjct  409  LETP SIQ NLIYHIGCRIL A RFPQLTDVSFQ S QN HTWDTVVEE I PG S KGK VYTEPRPPYGF  468

Query  241  LG FSVH QMILQEKKHQ LLGVC 261
               F+V  +     +++ K  +   C
Sbjct  469  QHFTVT REDAEKEKQK AAEKC 489
```

图 3　DPF5 和 DPR5 进行 PCR 所得 1 000 bp 片段测序翻译后终止密码子之前氨基酸序列 BLASTp 分析（ATDSMKNFI 和 GAVFTEPR 为保守序列）

Fig.3　BLASTp analysis of amino acid sequence from 1 000 bp DNA fragment obtained by PCR with DPF5 and DPR5 (ATDSMKNFI and GAVFTEPR were the conserved peptide fragments)

从第 6 位开始的编码序列；后续用 5'-RACE 补齐 N 端编码基因，得到从对应第 3 位 R 开始的编码序列，并提交GenBank 数据库（登录号：FJ393559）。



1. 850 bp 左右片段；
2. 1 000 bp 左右片段；
3. marker 同图 2

图 4　琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增出的 850 bp 和 1 000 bp 片段

Fig.4　Agarose electrophoresis analysis of the 850 bp and 1 000 bp fragments amplified by PCR

将所得该尿酸酶的氨基酸序列 N 端用 Edman 降解测定序列补齐后，用 BLASTp 搜索数据库，发现该序列和已报道的多个原核尿酸酶序列相似度很高，如与 *Bacillus sp.* TB-90 尿酸酶序列相似性最高（57%相同+73%相似+1 Gap），同 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 尿酸酶序列相似性排第 2（56%相同+72%相似+0 Gap），与 Bacillus clausii KSM-K16 尿酸酶序列相似性排第 3（53%相同+70%相似+0 Gap），与 *Bacillus halodurans* C-125 尿酸酶的序列相似性排第四（56%相同+74%相似+2 Gaps）。据所得氨基酸序列，与相似性较高的几种细菌尿酸酶序列比对发现此尿酸酶含有 N 端保守序列 ATDSMKNFI，而其他细菌尿酸酶的 C 端保守序列 GKVYTEPR 在该菌突变为 GAVFTEPR（图 5）。



图 5　多序列联配比对苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶与相似性最高的细菌尿酸酶的氨基酸序列

Fig.5　Multiple sequence alignment analysis of the intracellular from *Bacillus fastidious* with six bacterial uricases of higher similarity

3　讨　论

用基因组文库筛选出预期尿酸酶基因效率低且成本高[12]。原核生物 mRNA 无多聚腺苷酸尾，难以用逆转录建立 cDNA 文库进行筛选。原核蛋白编码基因无内含子，通常酶蛋白中底物结合和参与催化的氨基酸残基高度保守。用尿酸酶保守肽段设计对应简并引物，用基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增其编码基因序列，再用 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增有望快速简便获得所需尿酸酶的基因序列。

用 N 端氨基酸序列先搜索数据库发现相似序列的原核尿酸酶，并从中发掘出靠近其 N 端和 C 端的两个保守序列。通过对 *Bacillus sp.* TB-90 尿酸酶蛋白的晶体结构分析，发现两个保守肽段位于活性中心结合竞争性抑制剂和底物区域[12-13]。初步设计简并引物 PCR 扩增，据所用菌株密码子偏好性优化简并引物设计降低简并度，优化条件扩增获得了所需尿酸酶的第 6 位开始的编码序列。最后用 5'-RACE 获得了从第 3 位残基开始的编码序列，即 GenBank 记录 FJ393559；数据库搜寻和序列比对支持此基因片段编码尿酸酶；用已知 N 端的氨基酸序

列补齐，再重组表达确认为所需克隆的细菌尿酸酶，且有优越的热稳定性[14-19]。这些结果表明用简并引物 PCR 快速成功获得了苛求芽孢杆菌尿酸酶的编码序列。

通过简并引物 PCR 获得该尿酸酶编码序列的关键在于简并引物的设计。简并引物导致有效引物浓度低，PCR 产物非特异性增高，难以获得目的基因。在最初的扩增结果中未发现目的基因序列，但用所得序列数据推算苛求芽孢杆菌编码的基因密码子偏好性，正好用于优化简并引物设计以降低其简并性。简并引物优化后重新 PCR 直接获得了 C 端全部氨基酸残基的编码序列。但是只有对尽可能多的 PCR 产物克隆测序和分析，才能从中发掘出有用的编码信息。另外，PCR 条件对结果也有影响，如退火和延伸温度以及循环次数等，都需要逐步优化。通过简并引物 PCR 快速获得此尿酸酶编码序列是进行后续研究的关键；基于此编码序列，实现重组表达、晶体结构测定、序列-活性关系研究和分子改造，为进一步研制性能更优的诊断和药用尿酸酶奠定基础。综上所述，优化简并引物的设计和 PCR 的过程，以基因组 DNA 为模板简并引物 PCR 是快速克隆无内含子编码基因的高效手段。

参 考 文 献

[1] Zhao YS, Yang XY, Lu W, et al. Uricase based methods for determination of uric acid in serum[J]. Microchim Acta, 2009, 164(1-2): 1-6.

[2] Sanders GT, Pasman AJ, Hoek FJ. Determination of uric acid with uricase and peroxidase[J]. Clin Chim Acta, 1980, 101(2-3): 299-303.

[3] Hande KR, Perini F, Putterman G, et al. Hyperxanthinemia interferes with serum uric acid determinations by the uricase method[J]. Clin Chem, 1979, 25(8): 1492-1494.

[4] Duncan PH, Gochman N, Cooper T, et al. A candidate reference method for uric acid in serum. I. Optimization and evaluation[J]. Clin Chem, 1982, 28(2): 284-290.

[5] Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analysis[J]. Clin Chem, 1994, 40(11 Pt 1): 1996-2005.

[6] 廖 飞. 通过预测本底进行酶法分析定量测定体液尿酸含量的方法：中国，ZL 03135649.4 [P]. 2005-08-31.

[7] Liao F, Zhao YS, Zhao LN, et al. Kinetic method for enzymatic analysis by predicting background using uricase as model[J]. J Med Coll PLA, 2005, 20(6): 338-344.

[8] 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]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(6): 497-502.

[9] Zhao Y, Zhao L, Yang G, et al. Characterization of an intracellular uricase from Bacillus fastidious A.T.C.C. 26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic method[J]. Biotech Appl Biochem, 2006, 45(Pt 2): 75-80.

[10] 赵运胜，赵利娜，杨根庆，等. 苛求芽孢杆菌胞外尿酸酶的表征及其在血清尿酸测定中的应用[J]. 华中科技大学学报（医学版），2007, 36(2): 239-242.

[11] 赵运胜，卜友泉，张宏娟，等. 苛求芽孢杆菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 生物技术，2006, 16(2): 41-42.

[12] Maeda M, Hidaka M, Nakamura A, et al. Cloning, sequencing, and expression of thermophilic Bacillus sp. strain TB-90 urease gene complex in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1994, 176(2): 432-442.

[13] Hibi T, Hayashi Y, Fukada H, et al. Intersubunit salt bridges with a sulfate anion control subunit dissociation and thermal stabilization of Bacillus sp. TB-90 urate oxidase[J]. Biochemistry, 2014, 53(24): 3879-3888.

[14] Feng J, Liu H, Yang X, et al. Comparison of activity indexes for recognizing enzyme mutants of higher activity with uricase as model[J]. Chem Cent J, 2013, 7(1): 69.

[15] Huang Y, Chen Y, Yang X, et al. Optimization of pH values to formulate the bireagent kit for serum uric acid assay[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2015, 62(1): 137-144.

[16] Zhang C, Yang X, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from Bacillus fastidiosus[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1298-1301.

[17] Zhang C, Yang X, Gao A, et al. Comparison of modification of a bacterial uricase with N-hydroxysuccinimide esters of succinate and carbonate of monomethoxyl poly(ethylene glycol)[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2014, 61(6): 683-690.

[18] Feng J, Li X, Yang X, et al. A new practical system for evaluating the pharmacological properties of uricase as a potential drug for hyperuricemia[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(11): 1761-1769.

[19] Feng J, Wang L, Liu H, et al. Crystal structure of Bacillus fastidious uricase reveals an unexpected folding of the C-terminus residues crucial for thermostability under physiological conditions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(19): 7973-7986.

（责任编辑：冉明会）