

吡喃糖氧化酶的原核表达及初步实验应用

王海生¹, 周亚萍², 于海燕², 郭素梅², 曹利民^{2△}

(1. 常州市武进中医医院检验科, 江苏常州 213161; 2. 江苏艾赛氏生物科技有限公司, 江苏常州 213017)

摘要:目的 原核表达、纯化、鉴定吡喃糖氧化酶(PROD), 为其临床应用奠定基础。方法 利用生物信息软件, 比较不同种属的 PROD 核苷酸同源序列, 优化设计 PROD 基因序列, 委托上海捷瑞生物工程有限公司构建原核表达质粒 pET15b-PROD, 将此质粒导入大肠杆菌工程菌株 BL21(DE3) 中, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达。其超声后的沉淀、上清液经镍离子柱亲和和层析纯化、脱盐后进行活性测定, 并配成应用液检测 50 例(30 例糖尿病患者, 20 例健康对照)血液标本中的葡萄糖水平, 分析其与葡萄糖氧化酶法(GOD 法)和己糖激酶法(HK 法)检测血糖诊断糖尿病的效能。结果 重组质粒 pET15b-PROD 经测序 PROD 基因序列长度为 1 869 bp, 表达 623 个氨基酸。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示该蛋白在相对分子质量 68×10^3 处有一条明显的条带, 该条带在超声后沉淀中很弱, 而在上清中较浓。上清液经纯化后的纯度大于 90%, 活性超过 60 kU/g, 用其测定空腹血糖并用于糖尿病诊断的受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下面积(AUC)为 0.995, 用 GOD 法和 HK 法的 AUC 分别为 0.994、0.992。根据约登指数确定最佳临界点, 上述 3 种方法分别为 7.11、7.16、7.06 mmol/L。结论 本研究生产的 PROD 以上清液中的表达为主, 其纯度优、活性强、产量高, 可用于血糖的检测。在本研究的基础之上可进一步优化条件使之应用于临床标本中 1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-AG)的检测。

关键词: 吡喃糖氧化酶; 原核表达; 糖尿病; 葡萄糖; 1,5-脱水葡萄糖醇

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.002 **中图法分类号:** Q786

文章编号: 1673-4130(2019)07-0774-04 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression and initial experimental application of pyranose oxidase

WANG Haisheng¹, ZHOU Yaping², YU Haiyan², GUO Sumei², CAO Limin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Wujin, Changzhou, Jiangsu 213161, China; 2. Jiangsu Assay Specialist Bioscience Co., Ltd, Changzhou, Jiangsu 213017, China)

Abstract: Objective To express prokaryotically, purify and identify pyranose oxidase (PROD) to lay the foundation for its clinical application. **Methods** The gene sequence of PROD was designed optimally by comparing nucleotide homologous sequences from various species by means of bioinformatics software. The prokaryotic expression plasmid of pET15b-PROD was constructed by Shanghai Generay Biotech Co., Ltd and expressed in E. coli engineering strain BL21 (DE3) which was induced by isopropyl thio-beta-D-galactoside (IPTG). The precipitation and supernatant of this strain after ultrasonic processing was purified by Ni-NTA affinity chromatograph and desalinated, the activity of which was measured then, and the application liquid was prepared. The blood glucose concentrations of 50 patients (30 diabetic patients and 20 healthy controls) were detected by the application liquid, and the diagnostic efficiencies of glucose oxidase method (GOD method) and hexokinase method (HK method) were analyzed. **Results** The length of PROD gene sequence of recombinant plasmid of pET15b-PROD was 1 869 bp, encoding 623 amino acids. SDS-PAGE profile showed an obvious protein band with a relative molecular weight of 68×10^3 , and this band was very weak in precipitation, but fairly thick in supernatant by ultrasound. The purity and activity of the supernatant were more than 90% and 60 kU/g respectively. The area under curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) for the diagnosis of diabetes with fasting blood glucose concentration measured by using the purified supernatant was 0.995, while GOD and HK were 0.994, 0.992, respectively. According to Youden index, the best cut-off points of

作者简介: 王海生, 男, 副主任技师, 主要从事临床免疫与生化检验研究。△ 通信作者, E-mail: limincao@enzymaker.com。

本文引用格式: 王海生, 周亚萍, 于海燕, 等. 吡喃糖氧化酶的原核表达及初步实验应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(7): 774-777.

fasting blood glucose were 7.11, 7.16 and 7.06 mmol/L, respectively. **Conclusion** The PROD produced in this study is mainly expressed in the supernatant. It has high purity, high activity and high yield, and can be used for the detection of blood glucose. On the basis of this study, the conditions can be further optimized for the detection of 1,5-dehydrated glucosol (1,5-AG) in clinical specimens.

Key words: pyranose oxidase; prokaryotic expression; diabetes mellitus; glucose; 1,5-anhydro-D-glucitol

吡喃糖氧化酶(PROD)是葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶家族的成员,以同源四聚体的形式存在,相对分子质量约为 270×10^3 ,黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)是其重要的辅酶。该酶主要能催化吡喃醛糖 2 位碳原子发生氧化生成 2 酮醛糖和过氧化氢^[1]。在临床检验中,人们利用其偶联 trinder 反应检测临床标本中葡萄糖和 1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-AG)的水平以用于诊断糖尿病^[2-3],但该酶需从国外购买。因此,笔者拟通过基因工程原核表达、纯化及鉴定 PROD,并配成应用液检测血糖的水平,分析该法与葡萄糖氧化酶法(GOD 法)、己糖激酶法(HK 法)检测血糖诊断糖尿病的效能,以期实现该试剂原料的国产化,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2017 年 8 月至 2018 年 1 月由常州市武进中医医院内分泌科收治的临床符合 WHO 糖尿病诊断标准的 2 型糖尿病患者 30 例(空腹血糖 > 7.0 mmol/L)纳入本研究。其中,男 16 例,女 14 例,年龄 34~74 岁,排除有应激、肿瘤、肝损伤、心血管事件、非糖尿病性肾脏疾病等患者。另在常州市武进中医医院体检中心选择同期 20 例健康体检者,男 12 例,女 8 例,年龄 35~75 岁。2 组研究对象的年龄、性别等资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入研究者对常州市武进中医医院研究均知情同意,且本研究获得本院伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂 恒温培养振荡器(上海苏坤实业有限公司)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、UV-9600 紫外/可见分光光度计(北京北分瑞利分析仪器有限责任公司)、蛋白电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)、发酵罐(上海鹤禾实业发展有限公司)、日立 7080 生化分析仪(日本 HITACHI 公司)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG,北京百灵威科技有限公司),His-Trap FF crude 柱、Sephadex G-25 S 脱盐柱(美国 GE 公司),咪唑、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、叠氮钠(Sigma 公司),EDTA、Tris、曲拉通 X-100、D-葡萄糖、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、4-氨基安替比林(4AA)均为上海国药集团化学试剂有限公司产品,2-羟基-3-间甲苯胺丙磺酸钠(TOOS,南京旋光科技有限公司)、亚铁氰化钾[生工生物工程(上海)股份有限公司]、过氧化物酶(POD,日本 Toyobo 公

司),HK 法和 GOD 法血糖检测试剂盒、抗坏血酸氧化酶、BSA(上海罗氏诊断有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 pET15b-PROD 重组质粒的构建 通过 DNA Tools、ANTHEPROT 等生物信息软件,比较不同种属的 PROD 核苷酸同源序列,获得可溶性好、活性强的 PROD 核苷酸表达序列,委托上海捷瑞生物工程有限公司合成该核苷酸序列,并构建重组质粒 pET15b-PROD。

1.3.2 融合蛋白的表达 将该重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中。转化子接种至 5 mL LB 培养基(含氨苄西林 50 mg/L)中,37 °C 250 r/min 振荡培养 12 h。然后,按照 1%的比例转种于 250 mL LB 培养液(含氨苄西林 50 mg/L)中,振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,向其中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),20 °C 振荡培养诱导 3 h,离心,收集菌体。

1.3.3 融合蛋白的纯化 将上述收集的菌体重悬于原培养液 1/10 体积的裂解液(PBS pH7.4, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 50 μ mol/L FAD)中,冰浴超声破壁 10 min,离心,收集上清及沉淀。接着,将该上清液过滤后上样至预平衡后的 His-Trap FF crude 柱(平衡液 PBS pH7.4, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑),上样结束后再用 10 倍柱床体积平衡液平衡,最后用 5 倍柱床体积洗脱缓冲液(PBS pH7.4, 500 mmol/L NaCl, pH8.0, 500 mmol/L 咪唑)洗脱,每管收集 1 mL 洗脱液。将收集的上清、沉淀及洗脱液通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定。

1.3.4 融合蛋白的脱盐 将上述收集的洗脱液过滤后,上样至预平衡后的 Sephadex G-25 S 脱盐柱(脱盐液 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 50 μ mol/L FAD),上样结束后再用 2~3 倍柱床体积脱盐液脱盐,收集前 2.0~2.5 mL 含 PROD 的脱盐液。

1.3.5 融合蛋白活性的检测 在反应体系为 3 mL, 100 mmol/L MES, pH6.0 中进行,内含 131 mmol/L D-葡萄糖,0.2 mmol/L 4AA,0.3 mmol/L TOOS 和 4 kU/L POD。37 °C 预孵育 5 min 后,加入适量酶液,在 546 nm 波长下连续测定 2~3 min 的吸光度(A),得到酶的每分钟 A 的变化(ΔA 标本),以不加酶液的

反应液为对照,得到空白标本的每分钟 A 的变化(ΔA 空白)。定义每分钟催化葡萄糖生成 1 mmol 过氧化氢为 1 个酶活力单位,按照计算公式:酶活性(U/L)=(ΔA 标本- ΔA 空白) $\times 1\,890 \times$ 稀释倍数,得到 PROD 的活力。

1.3.6 血糖的检测 先用上述纯化的 pET15b-PROD 融合蛋白配成检测血糖的应用液,其中,在 50 mmol/L pH8.0 的 TRIS-HCL 缓冲液中,添加终浓度为 1 mmol/L 4AA,2 kU/L POD,1 kU/L 抗坏血酸氧化酶,0.01% 曲拉通 X-100,0.1% 叠氮钠,搅拌均匀即为 R1 试剂。在 50 mmol/L pH8.0 的 TRIS-HCL 缓冲液中,添加终浓度为 10 kU/L PROD,2 mmol/L TOOS,0.01% 亚铁氰化钾,1% BSA、0.75% EDTA,0.1% 叠氮钠,搅拌均匀即为 R2 试剂。然后在日立 7080 生化分析仪上分别用本法和罗氏诊断公司的 HK 法及 GOD 法血糖检测试剂盒检测上述 50 例纳入研究者空腹时采集的临床血清标本中血糖的水平。

1.4 统计学处理 用 SPSS15.0 软件进行统计分析。3 种方法检测血糖用于诊断糖尿病的性能采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PROD 的基因序列 由上海捷瑞生物工程有限公司构建的重组质粒 pET15b-PROD 经测序可知编码 PROD 的基因由 1 869 个碱基组成,表达 623 个氨基酸,部分测序图见图 1。

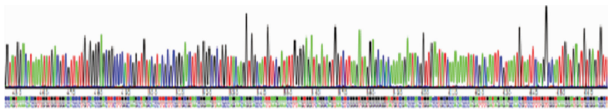


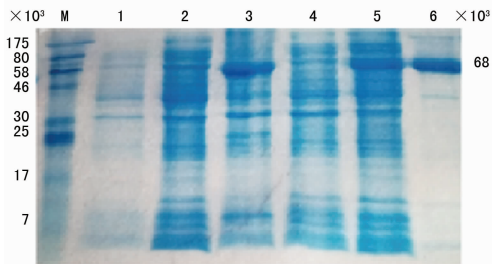
图 1 PROD 部分测序结果

2.2 pET15b-PROD 融合蛋白的表达 与空质粒和重组质粒诱导前相比较,含有 pET15b-PROD 融合基因的表菌株 BL21 经 IPTG 诱导 3 h 后在相对分子质量 68×10^3 处有一条明显的蛋白条带。该菌经超声离心后在沉淀中此处的条带很弱,而在上清中较浓,且上清液经 Ni 柱亲和纯化后此处的蛋白条带纯度达 90% 以上,见图 2。

2.3 pET15b-PROD 融合蛋白的活性 在产生 H_2O_2 的反应中,通过检测得到本批每克纯化后的冻干粉中 PROD 活性超过 60×10^3 个单位。

2.4 3 种方法检测血糖诊断糖尿病的 ROC 曲线分析 通过绘制 ROC 曲线可知:GOD 法、PROD 法及 HK 法检测血糖诊断糖尿病的 ROC 曲线下面积分别为 0.994、0.995、0.992(均 $P=0.000$)。根据约登指数得知它们检测空腹血糖诊断糖尿病的最佳临界点分

别为 7.16、7.11、7.06 mmol/L。



注:M 为蛋白质相对分子质量标准带;1 为空白质粒;2 为重组质粒诱导前;3 为重组质粒诱导后;4 为沉淀;5 为上清;6 为纯化的蛋白

图 2 重组质粒 pET15b-PROD 原核表达产物 SDS-PAGE 的电泳分析

3 讨 论

PROD 作为一种氧化还原酶型生物催化剂,在其催化的还原反应中,吡喃醛糖等底物还原 FAD 形成 FADH₂ 和 2-酮醛糖,而在其催化的氧化反应中,氧等电子受体接受 FADH₂ 的氢产生过氧化氢,但该氧化反应受到 pH 值的控制,当 pH 值小于 7.6 时易于形成 C₄ α -过氧化氢黄素蛋白中间体进而产生过氧化氢^[4]。在其还原性底物中,葡萄糖是其最适底物,其 K_m 值为 0.83~3.1 mmol/L^[1],且 PROD 能同时作用于 α -和 β -D-葡萄糖,而 GOD 和 HK 只能作用于 β -D-葡萄糖,因此,PROD 无需加入变旋酶即可测定标本中葡萄糖水平。除了葡萄糖外,PROD 还有一些其他的还原性底物如 1,5-AG,半乳糖等。其中,1,5-AG 能反映糖尿病患者近期(1 d 至 1 周)的血糖水平,因此,利用 PROD 检测葡萄糖水平可实施对糖尿病患者血糖水平的短期监控^[5-6]。在其氧化性电子受体中,氧是便宜、干净电子受体,氧接受电子后生成的过氧化氢,一方面,对木质纤维素的降解有着重要作用,另一方面,人们可利用该反应制成生物传感器或生物燃料电池^[7-10]。此外,PROD 除了催化吡喃醛糖 C₂ 位氧化,还可催化其 C₃ 位氧化,制备一些稀有的糖类如塔格糖等^[11]。正由于该酶在临床检验、生物工程及有机化学合成等方面的应用,近年来越来越受到重视。

目前,PROD 可通过真菌类微生物如 *Trametes multicolor* 提取获得,但其产量低、纯化工艺繁杂,因此,通过基因工程大量获取高纯度的 PROD 仍是首选。为此,构建优良的 PROD 生产菌株尤为重要。参考相关文献,本研究所表达的 PROD 由 623 个氨基酸组成。其中,167 号组氨酸通过 N3 与 FAD 的 C8 位甲基共价连接,由 452~457 氨基酸残基构成的环是葡萄糖等底物结合位点^[1],166 号苏氨酸、448 号谷氨酰胺、545 号和 547 号亮氨酸及 593 号天冬酰胺都与氧的反应性密切相关^[12],另外,593 号天冬酰胺也与 PROD 对底物的 C₂ 氧化功能有关^[13]。在诱导表达

时,通常低温能增加可溶性蛋白的表达,减少包涵体的形成^[14]。因此,本课题组直接选择 20℃ 诱导表达,SDS-PAGE 电泳显示,PROD 主要以可溶性蛋白表达为主,表达量达到 200 mg/L,这避免了蛋白以包涵体出现而活性不佳的情况。因融合蛋白带有 6 个 His 标签,因此,本课题组采用 Ni²⁺亲和层析柱亲和纯化蛋白,在纯化过程中,发现含 500 mmol/L 咪唑的洗脱液能很好地去除杂蛋白。此外,由于 FAD 是 PROD 的辅酶,对其催化功能至关重要^[1],因此,本课题组在整个纯化和脱盐过程中均通过添加 FAD 保证其良好的活性,收获的冻干粉中每克 PROD 活性超过 60×10³ 个单位,远高于其他试剂原料商每克 10×10³ 个单位,这是由于本课题组在整个生产过程中实验条件得到了很好的优化。用此高活性蛋白配制的应用液和 GOD 法及 HK 法血糖检测试剂盒检测血糖,其 ROC 曲线下的面积均大于 0.99,根据约登指数得到的诊断糖尿病的空腹血糖的临界值均与 WHO 确诊糖尿病的空腹血糖值 7.0 mmol/L 相接近,这表明本法与 GOD 法和 HK 法一样,在检测血糖诊断糖尿病方面具有很好的诊断效能,可用于血糖的检测。同时,也说明该融合蛋白带有的 His 标签并未影响其功能^[15]。后期该菌株经 100 升发酵罐放大培养得到约 14 克活性蛋白,故可批量生产以满足试剂厂商原料要求。

4 结 论

本研究生产的 pET15b-PROD 融合蛋白可溶、纯度优、活性强、产量高。该法测定血糖诊断糖尿病时,与 GOD 法和 HK 法一样,具有很高的准确性,可用于血糖的检测。在此研究之上可进一步优化条件使之应用于临床标本中 1,5-AG 的检测。

参考文献

- [1] HALLBERG B M, LEITNER C, HALTRICH D, et al. Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase [J]. J Mol Biol, 2004, 341(3): 781-796.
- [2] 刘巍,李家伟,张东升. 对吡喃糖氧化酶法测定血清中葡萄糖的评价[J]. 国际检验医学, 2007, 28(6): 527-529.
- [3] 张丽,安恒庆,许大成,等. 血清 1,5-脱水葡萄糖醇测定对糖尿病血管损伤的诊断价值[J]. 国际检验医学, 2014, 35(14): 1620-1621.
- [4] PRONGJIT M, SUCHARITAKUL J, PALFEY B A, et al. Oxidation mode of pyranose 2-oxidase is controlled by pH[J]. Biochemistry, 2013, 52(8): 1437-1445.
- [5] ADAMSON T L, COOK C B, LABELLE J T. Detection of 1, 5-Anhydroglucitol by electrochemical impedance spectroscopy[J]. J Diabetes Sci Technol, 2014, 8(2): 350-355.
- [6] ZHOU Z, ZHAO L, WANG Z, et al. Colorimetric detection of 1, 5-anhydroglucitol based on graphene quantum dots and enzyme-catalyzed reaction[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112(12): 1217-1224.
- [7] GOKOGLAN T C, SOYLEMEZ S, KESIK M, et al. Selenium containing conducting polymer based pyranose oxidase biosensor for glucose detection [J]. Food Chem, 2015, 172(1): 219-224.
- [8] KIM J H, HONG S G, WEE Y, et al. Enzyme precipitate coating of pyranose oxidase on Carbon nanotubes and their electrochemical applications[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87(1): 365-372.
- [9] 毕春元,张金玲,张利群,等. 吡喃糖氧化酶电极对葡萄糖和木糖的响应特征[J]. 山东科学, 2015, 28(2): 47-52.
- [10] GULER E, SOYLEYICI H C, DEMIRKOL D O, et al. A novel functional conducting polymer as an immobilization platform[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 40(1): 148-156.
- [11] SALAHEDDIN C, SPADIUT O, LUDWIG R, et al. Probing active-site residues of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* by semi-rational protein design[J]. Biotechnol J, 2009, 4(4): 535-543.
- [12] BRUGGER D, KRONDORFER I, SHELSWELL C, et al. Engineering pyranose 2-oxidase for modified Oxygen reactivity[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109242.
- [13] BRUGGER D, SÜTZL L, ZAHMA K, et al. Electrochemical characterization of the pyranose 2-oxidase variant N593C shows a complete loss of the oxidase function with full preservation of substrate (dehydrogenase) activity [J]. Phys Chem Chem Phys, 2016, 18(47): 32072-32077.
- [14] 王东方,刘晔,米立娟,等. 小反刍兽疫病毒 N 蛋白的原核表达、纯化及其抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(8): 838-842.
- [15] 王攀,刘运超,魏蕾,等. 狂犬病病毒 G 蛋白的原核表达及反应原性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(4): 108-112.

(收稿日期:2018-10-11 修回日期:2019-01-12)