

猪尿酸氧化酶在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析

吴双林¹, 陈斌^{2,3}, 刘成倩², 欧瑜¹, 易建中²

1 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

2 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

3 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要: 本研究报道了猪尿酸氧化酶(Porcine urate oxidase, pUOX)的原核表达载体的构建、pUOX 的蛋白表达条件的优化以及对 pUOX 经纯化后进行活性检测和酶学性质分析。利用 RT-PCR 从猪肝总 RNA 中克隆 *pUOX*, 定向插入原核表达载体 pET30a(+)中, 构建表达载体 pET30a(+)/pUOX, 并转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中。重组质粒 pET30a(+)/pUOX 经双酶切鉴定和序列分析, 证实已成功构建了重组表达载体。重组表达菌经 IPTG 诱导表达了约为 41 kD 的蛋白, 与预期分子量一致, 并对 pUOX 蛋白表达条件进行了优化, 表达的蛋白主要以包涵体的形式存在于细胞中, 包涵体经过变性、复性后, 用 Ni^{2+} -NTA 对复性蛋白进行亲和纯化, 并对纯化蛋白进行了活性检测和酶学性质分析, 纯化的重组 pUOX 的比活为 50.63 IU/mg, 并发现重组蛋白在最佳温度、热稳定性等方面与天然 pUOX 相同, 为后续动物实验奠定重要的基础。

关键词: 猪尿酸氧化酶, 表达, 包涵体, 纯化, 生物活性

Expression in *Escherichia coli*, purification and enzymatic properties of porcine urate oxidase

Shuanglin Wu¹, Bin Chen^{2,3}, Chengqian Liu², Yu Ou¹, and Jianzhong Yi²

1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China

3 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The aims of this research were to construct prokaryotic expression vector containing the gene of porcine urate oxidase(pUOX), optimize the conditions of the expression of pUOX in recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3), and analyze the in vitro activity and the enzymological properties of pUOX. The *pUOX* gene was amplified by RT-PCR from the extracted total RNA of porcine liver, and was inserted into the prokaryotic expression vector pET30a(+) to construct a recombinant expression vector pET30a(+)/pUOX. We identified the recombinant vector by endonuclease digestion and sequence analysis. The *pUOX* gene was amplified and cloned into the vector pET30a(+) successfully. And then the recombinant vector was transformed into *E. coli*

Received: July 22, 2009; **Accepted:** September 22, 2009

Supported by: Shanghai Pujiang Program (No. PJ[20]).

Corresponding author: Yu Ou. E-mail: ouyu1967@163.com

Jianzhong Yi. E-mail: yijianzhong@yahoo.com

上海市浦江人才计划(No.PJ[20])资助。

BL21(DE3). The expression of pUOX with a molecular of approximately 41 kD was induced by IPTG. We also optimized the expression conditions of the recombinant protein. The recombinant protein was mostly located in the cytoplasm and it was insoluble. After the inclusion body was solved in 8 mol/L urea and refolding in 2 mol/L urea, the recombinant protein was collected and purified by Ni^{2+} -NTA column. This recombinant protein had a specific activity of 50.61 IU/mg and showed similar properties of optimum temperature and thermal stability, base on the enzymatic assay and analysis of enzymological properties. These results would help to analyze the *in vivo* activity by testing animal.

Keywords: porcine urate oxidase, expression, inclusion body, purification, biological activity

尿酸氧化酶又称尿酸酶(Urate oxidase; Uricase, EC 1.7.3.3, UOX)是生物体内嘌呤降解代谢途径中的关键酶,它以分子氧为受体催化尿酸分解生成可溶性高的尿囊素、 CO_2 和 H_2O_2 ^[1-3]。在大多数的原核和真核生物体内产生具有生物活性的尿酸氧化酶,但在包括人在内的灵长类动物、鸟类和爬行类动物体内缺乏有活性的尿酸氧化酶,只能将可溶性低的尿酸作为嘌呤代谢的最终代谢产物排出体外^[4-5]。人的尿酸氧化酶基因在第33和第187氨基酸序列发生了2个无义突变(CGA/AGA TGA),使编码精氨酸的密码子突变成终止密码子,导致编码区提前终止,这样人类丧失了有功能的尿酸氧化酶^[5-7]。人血液中的尿酸浓度比大部分动物的浓度高,人的嘌呤代谢如果发生紊乱,就会产生过量尿酸或者尿酸排泄受阻导致血液中的尿酸浓度增高,形成高尿酸血症^[8]。由于尿酸氧化酶能迅速降低血液中的尿酸浓度,对人类有着较大的应用价值。对尿酸氧化酶的应用首先是从微生物中提取来降低尿酸浓度,但尿酸氧化酶的来源又极度地限制了它的广泛应用,随着基因工程技术的发展,重组表达尿酸氧化酶能显著提高酶的产量,现在已有多种生物来源的重组尿酸氧化酶得到表达^[9-11],有些用于临床治疗尿酸相关疾病^[12-13]。很多尿酸氧化酶制剂因其免疫原性高、半衰期短和热稳定性差在应用上受到限制,有些学者通过聚乙二醇(PEG)修饰尿酸氧化酶来延长酶的半衰期和降低其免疫原性取得了很大的进展^[8,14-15]。在不同物种的尿酸氧化酶中,动物尿酸氧化酶由于其与人尿酸氧化酶同源性高,酶学性质好,更适合于临床应用。猪尿酸氧化酶(Porcine urate oxidase, pUOX)与人尿酸氧化酶的同源性高达84%,本实验室克隆了猪尿酸氧化酶基因,在大肠杆菌中实现高表达,并对重组尿酸氧化酶的酶学性质进行了研究,为该酶制剂的临床应用打下

基础。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21, 原核表达载体 pET30a 均由本实验室保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶(NEB 公司); dNTPs、KOD 聚合酶(TaKaRa 公司); 小量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒(Axygen 公司); RNA 抽提试剂盒(BioTeke 公司)。

1.2 方法

1.2.1 pUOX cDNA 的制备

取新鲜猪肝,按照高纯总 RNA 快速抽提试剂盒要求提取猪肝总 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测证实具备完整性后,将该总 RNA 逆转录为相应的 cDNA, 置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 pUOX RT-PCR 扩增

根据 GenBank 公布的序列(Accession No. M27697), 利用 Primer Premier 5.0 设计一对特异性引物。上游引物: 5'-GATCGAATTCATGGCTCATTACCGTAATGAC-3' (下划线为 *EcoR* I 识别序列); 下游引物: 5'-CTGGTAAGCTTTCACAGCCTTGAAGTCAGC-3' (下划线为 *Hind* III 识别序列)且包含终止密码子 TGA。以 pUOX cDNA 为模板进行 PCR 扩增 pUOX 基因。PCR 反应条件为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 70 s, 40 个循环; 68°C 10 min。PCR 产物电泳后进行凝胶成像系统分析。

1.2.3 原核表达载体 pET30a(+)/pUOX 的构建

凝胶回收纯化上述扩增产物 pUOX 基因后,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别双酶切纯化后的扩增产物和 pET30a(+)原核表达载体,再分别凝胶回收纯化。载体与 PCR 回收产物按一定比例于 16°C 连接过夜,再转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,卡那霉素抗性筛选;挑取阳性菌落,分别进行菌落 PCR 和抽提质粒

EcoR I、*Hind* III 双酶切鉴定, 将符合预期结果的菌株送往华大基因进行测序, 构建好的质粒编码为 pET30a(+)/pUOX。

1.2.4 重组蛋白 pUOX 在 *E. coli* BL21 中 IPTG 诱导表达条件的优化

最佳诱导浓度的确定: 挑单菌落接种到含卡那霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中, 于 37°C、200 r/min 摇菌过夜。次日, 按 1%的接种量转接到含卡那霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)的新鲜 LB 培养基中, 当 OD_{600} 0.6 时, 加入不同浓度(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mmol/L)的 IPTG, 37°C、250 r/min 培养, 诱导表达, 4 h 后收集诱导菌体蛋白, 同时以含空质粒的表达作对照, 收集其诱导蛋白, 10% SDS-PAGE 电泳分析, 确定 IPTG 最佳诱导浓度。

最佳诱导温度的确定: 在最佳 IPTG 诱导浓度下, 分别于 22°C、25°C、28°C、31°C、34°C、37°C 下诱导 3 h 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 确定 IPTG 最佳诱导温度。

最佳诱导时间的确定: 在最佳 IPTG 诱导浓度、最佳诱导温度下, 分别于 1、3、5、7、10 h 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 确定 IPTG 最佳诱导时间。

1.2.5 重组蛋白 pUOX 的可溶性分析

参照 1.2.4 的方法, 在最佳诱导条件下表达重组蛋白, 超声破碎细胞、离心后取上清液和包涵体进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 包涵体的制备、蛋白复性及目的蛋白的分离纯化

菌体用溶液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)悬浮后, 超声破碎、离心。取沉淀, 用含有 0.5% Triton X-100 的溶液 A 洗涤沉淀, 即得精制包涵体。将包涵体用溶解液 B(8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L β -巯基乙醇, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)溶解振荡 2 h 后, 离心取上清, 用溶液 C(2 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)进行稀释复性 24 h, 复性温度为 4°C。

低温离心, 收集上清液经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析, 取 His Bind Resin 凝胶 3 mL 装柱, 用 10 mL 平衡液(10 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L

Tris-HCl)上柱处理凝胶。然后将包涵体提取液上柱, 上柱后用 10 mL 洗涤液(20 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)洗柱, 最后用 10 mL 洗脱液(250 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)进行目的蛋白洗脱, 用 1.5 mL 离心管收集目的蛋白。

1.2.7 pUOX 酶活力和蛋白含量测定

活性单位的定义和酶活性的测定方法参照文献[16]。在 3 mL 比色皿中加入 2.5 mL 溶于 0.1 mol/L pH 8.5 硼酸缓冲液的 0.001%尿酸溶液, 加入 0.5 mL 稀释的酶液并混匀, 以硼酸缓冲液作空白, 商品尿酸氧化酶作阳性对照, 在 25°C 下连续测定 293 nm 处吸光值的变化。酶活性定义: 在 pH 8.5、25°C 时, 每分钟催化 1 μmol 尿酸氧化所需的酶量为一个单位。采用 Bradford 法测蛋白含量, BSA 为标准蛋白对照。

1.2.8 酶的最适作用温度和酶的热稳定性

参考文献[17], 分别在 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C 和 70°C 水浴条件下测定尿酸氧化酶样品溶液的酶活力。尿酸氧化酶样品溶液分别于 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 和 80 °C 的水浴条件下精确保温 30 min, 冰水浴迅速冷却后, 在酶最适反应条件下测定各个样品的剩余酶活力。

1.2.9 酶的最适作用 pH 和酶的 pH 稳定性

在猪尿酸氧化酶最适反应温度条件下, 分别于 pH 7.0~10.0 缓冲体系中测定尿酸氧化酶样品溶液的酶活力。猪尿酸氧化酶样品溶液分别在 pH 3.0~12.0 缓冲体系中, 40°C 孵育 40 min, 然后在酶的最适反应条件下测定不同缓冲体系中剩余酶活力(其中 pH 3.0~6.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 7.0~7.5 为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液; pH 8.0~9.5 为 0.1 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液; pH 10.0~12.0 为 0.05 mol/L 硼砂-氢氧化钠缓冲液)。

2 结果

2.1 pUOX RT-PCR 扩增和重组质粒的鉴定

以猪肝总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见在 1000 bp 附近的扩增产物, 扩增的 pUOX 基因的大小与预计的结果相符(图 1)。以构建的重组质粒 pET30a(+)/pUOX 进行 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定,

结果得到长约 915 bp 的片段(图 2), 酶切结果与预期目标一致; 测序结果与 GenBank 公布的猪尿酸氧化酶序列比对, 进一步鉴定证实重组质粒中成功。

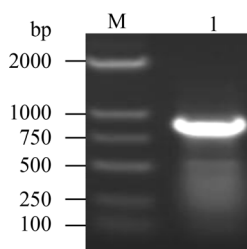


图 1 *pUOX* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *pUOX* gene by RT-PCR. M: DNA marker DL2000; 1: RT-PCR product.

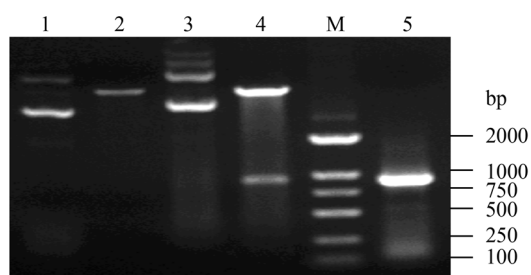


图 2 阳性克隆的 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of positive clone by the double enzyme digestion of *EcoR* I/*Hind* III. M: DNA marker DL2000; 1: pET30a(+) plasmid; 2: the digested product of pET30a(+); 3: recombinant vector pET30a(+)/pUOX; 4: the digested product of pET30a(+)/pUOX; 5: RT-PCR product.

2.2 *pUOX* 在 *E. coli* BL21 中 IPTG 诱导表达条件的优化

构建的工程菌在不同 IPTG 浓度(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mmol/L)诱导表达 4 h 后, 取菌体经 SDS-PAGE 分析, 与诱导前相比, 诱导后在 41 kD 左右出现一条带, 与预计的相对分子量相同, IPTG 为 0.1 mmol/L 时, 目的基因表达量最高(图 3), 因此确定最佳的 IPTG 诱导浓度为 0.1 mmol/L。

在 0.1 mmol/L IPTG 诱导下, 分别于 22°C、25°C、28°C、31°C、34°C、37°C 诱导 3 h 后取样, 菌体蛋白经 SDS-PAGE 分析, 发现在 31°C 诱导时, 目的蛋白的表达量最高(图 4)。因此确定最佳诱导温度为 31°C。

在 0.1 mmol/L IPTG 诱导下, 于 31°C 分别在 1、3、5、7、10 h 取样, 经 SDS-PAGE 分析, 发现诱导 7 h, 目的蛋白的表达量最高(图 5), 因此确定最佳诱

导时间为 7 h。

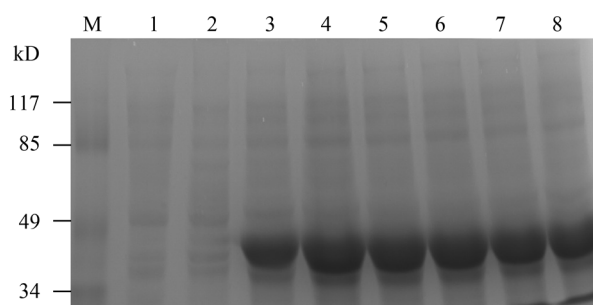


图 3 *pET30a*(+)/*pUOX* 重组蛋白 IPTG 的诱导浓度分析

Fig. 3 Effect of inducing concentration of IPTG on the expression of pET30a(+)/pUOX recombinant protein. M: protein molecular marker; 1: pET30a(+) induced with IPTG; 2: pET30a(+)/pUOX without induction; 3—8: pET30a(+)/pUOX induced with IPTG 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L respectively.

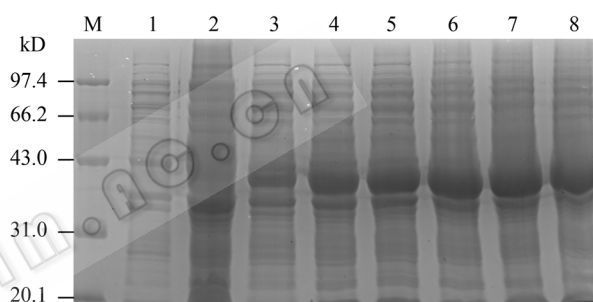


图 4 *pET30a*(+)/*pUOX* 重组蛋白的诱导温度的分析

Fig. 4 Effect of inducing temperature on the expression of pET30a(+)/pUOX recombinant protein. M: protein molecular weight marker; 1: pET30a(+) induced with IPTG; 2: pET30a(+)/pUOX without induction; 3—8: pET30a(+)/pUOX induced with 0.1 mmol/L IPTG at 22°C, 25°C, 28°C, 31°C, 34°C, 37°C respectively.

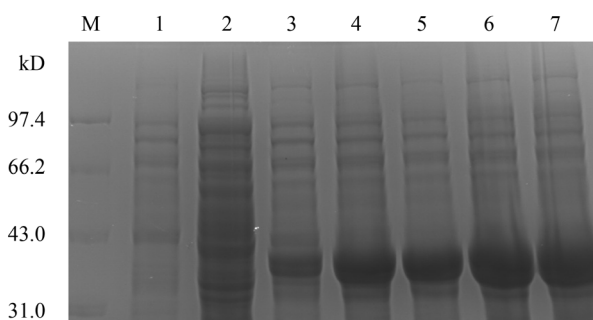


图 5 *pET30a*(+)/*pUOX* 重组蛋白的诱导时间分析

Fig. 5 Effect of inducing time on expression of pET30a(+)/pUOX recombinant protein. M: protein molecular weight marker; 1: pET30a(+) induced with IPTG; 2: pET30a(+)/pUOX without induction; 3-7: pET30a(+)/pUOX induced with 0.1 mmol/L IPTG at 31°C for 1, 3, 5, 7, 10 h respectively.

2.3 目的蛋白可溶性分析和分离纯化

所构建的工程菌,在 IPTG 为 0.1 mmol/L 下,于 31°C 培养诱导 7 h 后的可溶性情况如图 6 所示。在最佳诱导条件下,细胞裂解上清液中仅有少量蛋白,细胞裂解沉淀物中则含量最高。这说明重组 pUOX 主要以包涵体形式存在,且有一小部分以可溶性形式存在。包涵体经洗涤后,可除去大部分杂

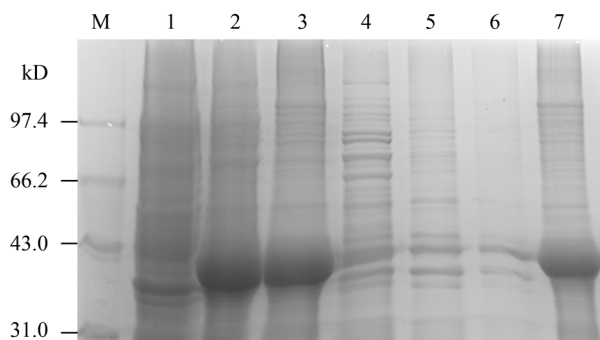


图 6 重组蛋白 pUOX 可溶性分析和分离制备包涵体

Fig. 6 Identification of expression forms of recombinant protein pUOX and isolation of inclusion body. M: protein molecular weight marker; 1: total bacterial protein before induction; 2: total bacterial protein after induction; 3: precipitation after ultrasonication; 4: supernatant after ultrasonication; 5: the first supernatant of washing pellet; 6: the second supernatant of washing pellet; 7: inclusion body.

精制包涵体经变性、复性后低温离心, Ni^{2+} -NTA 亲和层析。洗脱收集的蛋白液经 SDS-PAGE 分析,在 41 kD 左右可见明显的目的蛋白条带(图 7)。

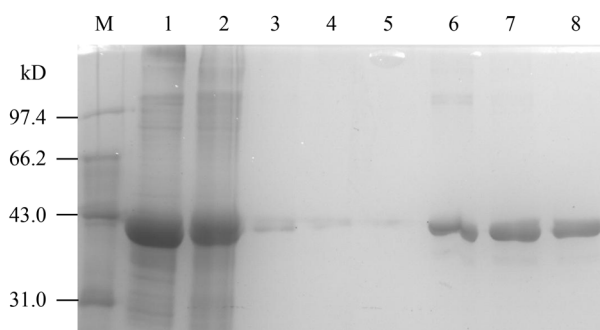


图 7 纯化蛋白 pUOX 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the purification of the protein pUOX. M: protein molecular weight marker; 1: inclusion body; 2: total protein in 8 mmol/L urea; 3: total protein after refolding; 4: flow-through fraction of Ni affinity column; 5: washing of Ni affinity column; 6-8: elution of Ni affinity column.

蛋白。

2.4 pUOX 酶活力的测定

纯化后的 pUOX 的蛋白浓度: 0.0555 mg/mL; 酶活力约为 2.81 IU/mL; 比活力约为: 50.63 IU/mg。

2.5 酶的最适温度和热稳定性

将尿酸氧化酶样品分别于 20°C~70°C 条件下进行反应。从 20°C 到 40°C 酶的活力随着温度升高而升高, 40°C 酶活力最高。当温度超过 40°C 时, 酶活力随着温度的升高而迅速降低, 70°C 时的酶活力只有 40°C 时的 67%。因而重组猪尿酸氧化酶的最适反应温度为 40°C。尿酸氧化酶样品在 20°C~60°C 范围内的热稳定性较好, 当温度超过 60°C 时, 酶活力急剧下降, 70°C 保温 30 min, 酶活力仅为 7%, 80°C 保温 30 min 活性全部丧失(图 8)。

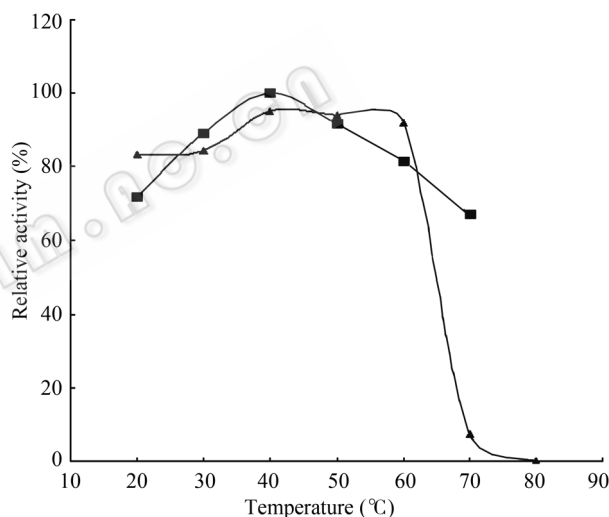


图 8 温度对 pUOX 酶活的影响

Fig. 8 Effect of temperature on the enzyme activity of the recombinant protein pUOX. —■— determination of the optimal temperature of the recombinant protein pUOX; —▲— test of thermal stability of the recombinant protein pUOX.

2.6 酶最适 pH 和 pH 稳定性

尿酸氧化酶在 pH 9.5 时的活力最强。pH 高于或低于 9.5, 尿酸氧化酶的活力都会下降。因而重组酶的最适反应 pH 为 9.5。从 pH 3.0~12.0 这个范围内考察了尿酸氧化酶的 pH 稳定性。尿酸氧化酶在 pH 5.0 以上环境中较为稳定, 活力仍能保持原来的 90% 左右。在 pH 3.0 条件下酶活力有较大幅度下降, 仅为原来酶活力的 14%(图 9)。

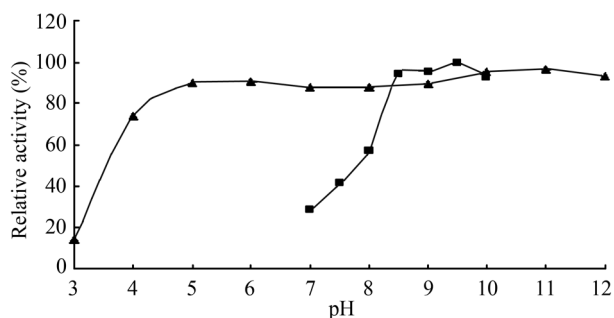


图9 pH对pUOX酶活的影响

Fig. 9 Effect of pH on the enzyme activity of the recombinant protein pUOX. —■— determination of the optimal pH of the recombinant protein pUOX; —▲— test of pH stability of the recombinant protein pUOX.

3 讨论

随着人民生活水平的提高和饮食结构的改变,高尿酸血症及痛风的患病率直线升高。此外,在肿瘤化学治疗过程中,会出现肿瘤溶解综合征(Tumor lysis syndrome, TLS)^[18],引起新陈代谢紊乱。高尿酸血症及并发症最容易在 TLS 中出现,即细胞大量死亡引起血液中的尿酸浓度升高,导致急性肾功能衰竭。重组尿酸氧化酶有望成为治疗这种继发引起的高尿酸血症的新药^[19-21]。

大肠杆菌是最早被用来生产重组蛋白药物的工程菌,且其大规模发酵培养工艺比较成熟。与其他表达系统相比,有着遗传背景明确、安全性高、生长周期短和易于进行工业化批量生产等优越性。本研究成功地把 *pUOX* 基因插入到原核表达载体中并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了高效表达,且克隆的 DNA 所编码的氨基酸序列与数据库中资料比对完全一致。表达的蛋白是包涵体,进行复性使酶恢复活性,在复性的过程中酶的活性可能会降低,但包涵体避免了蛋白酶对外源蛋白的降解,整体上提高了蛋白的表达量,包涵体杂蛋白少有利于后续的分离纯化。本实验过程曾试图通过降低诱导温度、加入乙醇等诱导条件来实现目的蛋白的可溶性表达,发现在 16°C 表达量很低,在 25°C 表达为包涵体,加入乙醇也表达量低,最终选择在最佳诱导条件下表达大量包涵体,通过变性、复性获得有活性的 pUOX。

本研究中进行了 pUOX 的重组表达,表达的目的

蛋白的含量远远高于天然来源的材料,从少量的发酵液中就可以得到大量的纯化的目的蛋白,这样节省了材料,降低了纯化工艺的难度。为进一步研究 pUOX 在动物实验以及在临床上的生物功能提供了物质来源。

本研究得到的重组 pUOX 与天然的 pUOX^[22]在最佳反应温度、热稳定性两种性质上基本保持一致,重组的 pUOX 的最佳 pH 值为 9.5,比天然的 pUOX 最佳 pH 8.4 稍微偏碱一些, pH 稳定性在弱酸环境以及碱性环境中比较稳定。以上重组蛋白 pUOX 的酶学特征和活性测定表明具有酶活的重组 pUOX 在大肠杆菌中得到了成功表达和纯化,为后续动物实验打下了基础。

REFERENCES

- [1] Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T. Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. Intraperoxisomal localization of hepatic allantoinase and purification of its peroxisomal membrane-bound form. *J Biol Chem*, 1989, 264(6): 3211–3215.
- [2] Alamillo JM, Cárdenas J, Pineda M. Purification and molecular properties of urate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1076(2): 203–208.
- [3] Bhargava AK, Lal H, Pundir CS. Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, 39(3): 125–136.
- [4] Yeldandi AV, Yeldandi V, Kumar S, et al. Molecular evolution of the urate oxidase-encoding gene in hominoid primates: nonsense mutations. *Gene*, 1991, 109(2): 281–284.
- [5] Oda M, Satta Y, Takenaka O, et al. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(5): 640–653.
- [6] Wu XW, Lee CC, Muzny DM, et al. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(23): 9412–9416.
- [7] Wu XW, Muzny DM, Lee CC, et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol*, 1992, 34(1): 78–84.
- [8] Kelly SJ, Delnomdedieu M, Oliverio MI, et al. Diabetes insipidus in uricase-deficient mice: a model for evaluating therapy with poly(ethylene glycol)-modified uricase. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(5): 1001–1009.
- [9] Li J, Chen Z, Hou L, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged

- Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, **49**(1): 55–59.
- [10] Chen Z, Wang Z, He X, *et al.* Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(4): 545–554.
- [11] Suzuki K, Sakasegawa S, Misaki H, *et al.* Molecular cloning and expression of uricase gene from *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *J Biosci Bioeng*, 2004, **98**(3): 153–158.
- [12] Roche A, Pérez-Dueñas B, Camacho JA, *et al.* Efficacy of rasburicase in hyperuricemia secondary to Lesch-Nyhan syndrome. *Am J Kidney Dis*, 2009, **53**(4): 677–680.
- [13] Macfarlane RJ, McCully BJ, Fernandez CV. Rasburicase prevents tumor lysis syndrome despite extreme hyperleukocytosis. *Pediatr Nephrol*, 2004, **19**(8): 924–927.
- [14] Bomalaski JS, Holtsberg FW, Ensor CM, *et al.* Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies. *J Rheumatol*, 2002, **29**(9): 1942–1949.
- [15] Cai L, Gao XD, Zhu S, *et al.* Research on PEG modification of uricase. *J China Pharm Univ*, 2008, **39**(6): 557–562.
- 才蕾, 高向东, 朱姝, 等. 聚乙二醇修饰尿酸酶的研究. 中国药科大学学报, 2008, **39**(6): 557–562.
- [16] Liu J, Li G, Liu H, *et al.* Purification and properties of uricase from *Candida* sp. and its application in uric acid analysis in serum. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **47**(1): 57–63.
- [17] Hongoh Y, Sasaki T, Ishikawa H. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding a uricase from the yeast-like symbiont of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, **30**(2): 173–182.
- [18] Baeksgaard L, Sørensen JB. Acute tumor lysis syndrome in solid tumors—a case report and review of the literature. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, **51**(3): 187–192.
- [19] Campara M, Shord SS, Haaf CM. Single-dose rasburicase for tumour lysis syndrome in adults: weight-based approach. *J Clin Pharm Ther*, 2009, **34**(2): 207–213.
- [20] Reeves DJ, Bestul DJ. Evaluation of a single fixed dose of rasburicase 7.5 mg for the treatment of hyperuricemia in adults with cancer. *Pharmacotherapy*, 2008, **28**(6): 685–690.
- [21] Hochberg J, Cairo MS. Rasburicase: future directions in tumor lysis management. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, **8**(10): 1595–1604.
- [22] Kou WE, Rong J, Yu Q. Study on dynamic characteristics of Uricase from pig. *Chin Med Biotechnol*, 2009, **4**(2): 128–133.
- 寇文娥, 荣俊, 于勤. 猪尿酸酶动力学特性研究. 中国医药生物技术, 2009, **4**(2): 128–133.