

微杆菌属 ZZJ4-1 菌株的耐热尿酸氧化酶基因的克隆及重组酶性质

张鹏程, 卢向锋, 李倩延, 林小清, 刘辉, 马晓航

浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310058

张鹏程, 卢向锋, 李倩延, 等. 微杆菌属 ZZJ4-1 菌株的耐热尿酸氧化酶基因的克隆及重组酶性质. 生物工程学报, 2012, 28(7): 813-822.

Zhang PC, Lu XF, Li QY, et al. Cloning and characterization of a thermostable urate oxidase from *Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 813-822.

摘 要: 为了研究微杆菌 *Microbacterium* sp. ZZJ4-1 菌株的耐热尿酸氧化酶 (Uox) 的性质, 克隆其基因 (*uox*), 得到 1 个 894 bp 的开放阅读框。该基因与多数已报道的 *uox* 无明显同源性, 仅与球形节杆菌 *Arthrobacter globiformis* 的 *uox* 有 72% 的同源性。将基因插入质粒 pET-15b 构成 pET-15b-*uox* 表达载体, 转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中诱导表达。对重组 Uox 的主要理化性质研究表明: 该酶由大小约为 35 kDa 的亚基组成; 其最佳反应温度和 pH 分别为 30 °C 和 7.5; 在 65 °C 以下和 pH 8.5~11.0 范围内稳定; 以尿酸为底物的 K_m 值为 0.22 mmol/L; Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 SDS 均能完全抑制酶活, Tween 20、Tween 80 和 Triton X-100 对酶活有一定的促进作用。该重组酶的耐热性是目前报道的重组 Uox 中最好的, 这一特性有利于其在诊断治疗中的开发应用。

关键词: 重组尿酸氧化酶, 克隆, 序列分析, 微杆菌, 热稳定性

Cloning and characterization of a thermostable urate oxidase from *Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1

Pengcheng Zhang, Xiangfeng Lu, Qianyan Li, Xiaoqing Lin, Hui Liu, and Xiaohang Ma

College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: In order to characterize a thermostable urate oxidase (Uox) from *Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1, we cloned its gene (*uox*). The open reading frame of *uox* contained 894 base pairs and encoded a protein with 297 amino acids. Alignment of gene sequences indicated there was no obvious identity with the most reported *uox* and that 72% identity was found with *uox* from *Arthrobacter globiformis*. We inserted the gene into the plasmid pET-15b to construct an expression

Received: December 1, 2011; **Accepted:** February 23, 2012

Corresponding author: Xiaohang Ma. Tel/Fax: +86-571-88206725; E-mail: maxiaohong@zju.edu.cn

vector pET-15b-*uox* and got it induced expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). After the purification of the recombinant Uox by the His·Bind column, we studied some properties of it. It was composed of subunits with a molecular mass of about 35 kDa. The optimal temperature and pH was 30 °C and pH 7.5. It was stable below 65 °C and from pH 8.5 to 11.0. The K_m value was 0.22 mmol/L with the uric acid as the substrate. Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} and SDS could totally inhibit its activity while Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 had a slight promotion effect. The thermal stability of this enzyme was the most excellent among the reported recombinant Uox. Based on this property, it would be very useful in the application.

Keywords: recombinant urate oxidase, cloning, sequence analysis, *Microbacterium* sp., thermal stability

尿酸氧化酶 (Urate oxidase, Uox, EC 1.7.3.3) 参与嘌呤代谢, 催化代谢产物尿酸与氧、水反应生成 5-羟基异尿酸。5-羟基异尿酸在溶液中缓慢转变成尿囊素, 在体内迅速被特异性酶催化成尿囊素^[1]。Uox 广泛分布于哺乳动物、植物和微生物中^[2]。在人类和某些灵长类动物中, 由于尿酸氧化酶基因 (*uox*) 的无义突变使其丧失活性^[3], 体内的尿酸不能降解而以代谢终产物的形式被排出, 导致尿酸含量偏高。体内过高含量的尿酸容易引发痛风等慢性疾病^[3]。此外, 肿瘤病人的化疗会引发致命的急性高尿酸血症, 如不予控制, 将使治疗过程难以进行^[1]。Uox 能在温和的条件下迅速分解尿酸, 因此在临床上既可用于治疗痛风等慢性病, 也可用于预防和治疗肿瘤溶解综合征引起的高尿酸血症^[4]。此外, 该酶也可用于测定血清^[2]、尿液^[5]等样品中的尿酸含量。

目前已知的 Uox 多数来自微生物, 其中包括红球菌属 *Rhodococcus*^[6]、拟无枝菌酸菌属 *Amycolatopsis*^[7]、芽胞杆菌属 *Bacillus*^[8]、弯颈霉属 *Tolyocladium*^[9]、假单胞菌属 *Pseudomonas*^[10]、节杆菌属 *Arthrobacter*^[11]、假丝酵母属 *Candida*^[12]、曲霉属 *Aspergillus*^[13] 和微杆菌属 *Microbacterium*^[14] 的菌株。 *Bacillus* 属、 *Arthrobacter* 属、 *Candida* 属和 *Aspergillus* 属的某

些菌株的 *uox* 已在大肠杆菌或酵母菌中克隆并高效重组表达^[11-13,15-16]。研究表明不同微生物来源的 Uox 的理化性质 (如 pH、热稳定性及对金属离子抑制的敏感性等) 有很大差异^[11,17]。不论是应用于临床治疗或是测定, Uox 的热稳定性都非常重要。良好的热稳定性可保证其作为治疗药物在体内有较长的半衰期, 从而减少给药次数; 同时也为尿酸测定试剂的使用、保藏及运输带来极大的便利。

实验室于 2005 年分离到一株产 Uox 的微杆菌 ZZJ4-1 菌株 (*Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1)。该菌的 Uox 有很好的稳定性, 在 65 °C 时保持稳定, 溶液在 37 °C 保存数周而不失活^[14], 故该酶在临床治疗和测定中有很好的应用前景。本研究克隆该菌的 *uox*, 转化至大肠杆菌中高效表达, 并研究了其重组酶的性质。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

野生菌株 ZZJ4-1、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 均为实验室保存。表达载体 pET-15b 购自 Novagen 公司。

1.2 酶与试剂

rTaq 酶、*Pyrobest* DNA 聚合酶、限制性内切

酶、T4 DNA 连接酶、T 载体克隆试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自杭州 Axygen 公司。DNA Walking *SpeedUp* 试剂盒购自韩国 Seegene 公司。His·Bind Resin 购自德国 Merck 公司。其余化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物合成与测序

表 1 中引物均由上海 Invitrogen 公司合成。DNA 测序均由上海生工生物工程有限公司完成。

表 1 克隆 *uox* 使用的引物

Table 1 Primers for *uox* cloning

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer 1	CTCGGCSARAACCAGTA
Primer 2	AGGTCVACCAGGAAGT
Primer 3	GGTCATTGCGGTTGTAGCG
Primer 4	CCGTGTTCTTCTGCGTGTCTG
Primer 5	CGTGCTCGTTGTTGCCCTC
Primer 6	CCGACACGCAGAAGAACAC
Primer 7	TACACGACGCTGCCCCGAGAC
Primer 8	GGCGCTACAACCGCAATG
Primer 9	GCTCGGCATATGACCAACATCATTCTG
Primer 10	AATGGATCCTCAGCAGAAGCCTGCG

1.4 方法

1.4.1 *uox* 基因的克隆

根据 GenBank 中已知 *uox* 的保守序列设计 Primer 1 和 Primer 2, 以菌株 ZZJ4-1 的基因组为模板进行 PCR, 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经测序得

到部分序列后, 根据 DNA Walking *SpeedUp* 试剂盒说明书分别设计 Primer 3、Primer 4、Primer 5 与 Primer 6、Primer 7、Primer 8, 以扩增已知序列的上下游部分。最后拼接测序结果获得 *uox* 的完整序列, 并以此设计带 *Nde* I 位点的 Primer 9 和带 *Bam*H I 位点的 Primer 10, 用高保真的 *Pyrobest* DNA 聚合酶进行 PCR, 扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 4 min, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

1.4.2 表达载体的构建和重组 *Uox* 的表达纯化

分别以 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切高保真 PCR 的纯化产物和 pET-15b 质粒, 连接得到表达载体 pET-15b-*uox*。将表达载体转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中。菌落 PCR 筛选阳性重组子, 接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 TB 培养基中, 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 3.5 时, 加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 22.5 °C 诱导表达 18 h。离心收集菌体, 用硼酸-硼砂缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.5) 洗 1 次后重新悬浮, 超声波破壁后离心取上清, 即为粗酶液。粗酶液根据 His·Bind Resin 说明书进行纯化。

1.4.3 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定用 Micro biuret 法^[18]。

1.4.4 *Uox* 酶活测定

取 0.2 mL 酶液加至 3.8 mL 含 10 mmol/L 尿酸、9 mmol/L 4-氨基安替比林和 0.375% 苯酚的硼酸-硼砂缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.5) 中, 30 °C 水浴 10 min 后, 于 540 nm 处测定吸光值, 以 0.2 mL 硼酸-硼砂缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.5) 为空白。酶活定义: 30 °C 每分钟分解 1 μ mol 尿酸的酶量为 1 个单位^[14]。

1.4.5 重组 Uox 分子量测定

将纯化的重组 Uox 进行 SDS-PAGE 分析,测定其分子量和纯度。根据氨基酸序列使用软件 DNASTAR 中的 Editseq 确定分子量。

1.4.6 重组 Uox 的最佳反应温度和热稳定性试验

在 20 °C~70 °C 的温度范围内,每隔 5 °C 测定重组酶活性,以确定其最佳反应温度。将酶置于不同温度下水浴 30 min 后测定剩余酶活,以确定其温度稳定范围。上述实验均重复 3 次。

1.4.7 重组 Uox 的最佳反应 pH 和 pH 稳定性试验

在 0.1 mol/L 的 pH 3.0~11.0 的缓冲体系中测定重组酶活性 (pH 3.0~5.5 为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 6.0~8.0 为磷酸盐缓冲液; pH 8.0~9.0 为硼砂-硼酸缓冲液; pH 9.5~11.0 为硼砂-NaOH 缓冲液), 以确定其最佳反应 pH。在上述不同的缓冲体系中加入酶液, 于 25 °C 保温 18 h, 取 0.2 mL 加至酶活测试体系中测定剩余酶活, 以确定酶的 pH 稳定范围。上述实验均重复 3 次。

1.4.8 酶促反应动力学

以 Lineweaver-Burk 作图法^[19], 测定重组 Uox 对尿酸的 K_m 值。根据其比活和分子量确定 K_{cat} 。

1.4.9 不同化学物质对重组 Uox 的影响

在酶液中加入不同的化学物质溶液后 25 °C 水浴 30 min, 取 0.2 mL 酶液加至酶活测试体系中测定剩余酶活。

2 结果与分析

2.1 uox 的克隆结果与序列分析

以 Primer 1 和 Primer 2 为引物的 PCR 产物约 600 bp, 经 DNA Walking SpeedUp 试剂盒扩增上下游序列分别得到约 500 bp 和 450 bp 的产物,

拼接后表明 uox 开放阅读框为 894 bp, 编码 297 个氨基酸。该基因的 GenBank 登录号为 JQ066818。通过 NCBI 的 blastn 和 blastp 将其分别与已报道的 uox 和 Uox 进行比对。其中该 uox 序列与球形节杆菌 *Arthrobacter globiformis*^[11] 同源性最高 (72%), 而与产朊假丝酵母 *Candida utilis*^[12,20]、黄曲霉 *Aspergillus flavus*^[13]、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*^[15]、芽胞杆菌 TB-90 菌株 *Bacillus* sp. TB-90^[17] 均无明显同源性; Uox 序列比对表明同源性分别为 64%、34%、35%、24% 和 26%。使用 OMIGA 2.0 进行氨基酸多序列比对, 结果见图 1。

使用 SWISS-MODEL^[21] 预测该酶的空间结构, 推测其为同源四聚体 (图 2), 尿酸结合位点由 58 位的苏氨酸、59 位的天冬氨酸和相邻亚基上 158 位的苯丙氨酸、175 位的精氨酸、217 位的亮氨酸、218 位的谷氨酰胺构成。

2.2 表达载体 pET-15b-uox 的构建与鉴定

以 Primer 9 和 Primer 10 为引物的高保真 PCR 得到约 900 bp 的产物, 与质粒 pET-15b 分别以 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切后连接, 转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中。双酶切阳性重组子的质粒后电泳, 得到分别约为 900 bp 和 5.7 kb 的两条条带, 与 uox 和空白载体大小相符, 证明筛选成功 (图 3)。

2.3 重组 Uox 的主要性质

2.3.1 重组 Uox 的分子量

重组 Uox 经纯化后在 SDS-PAGE 中显示为单一条带, 表明它由一种大小约为 35 kDa 的亚基组成 (图 4)。软件 DNASTAR 中 Editseq 计算其大小为 35 857.55 Da, 与电泳结果相符。

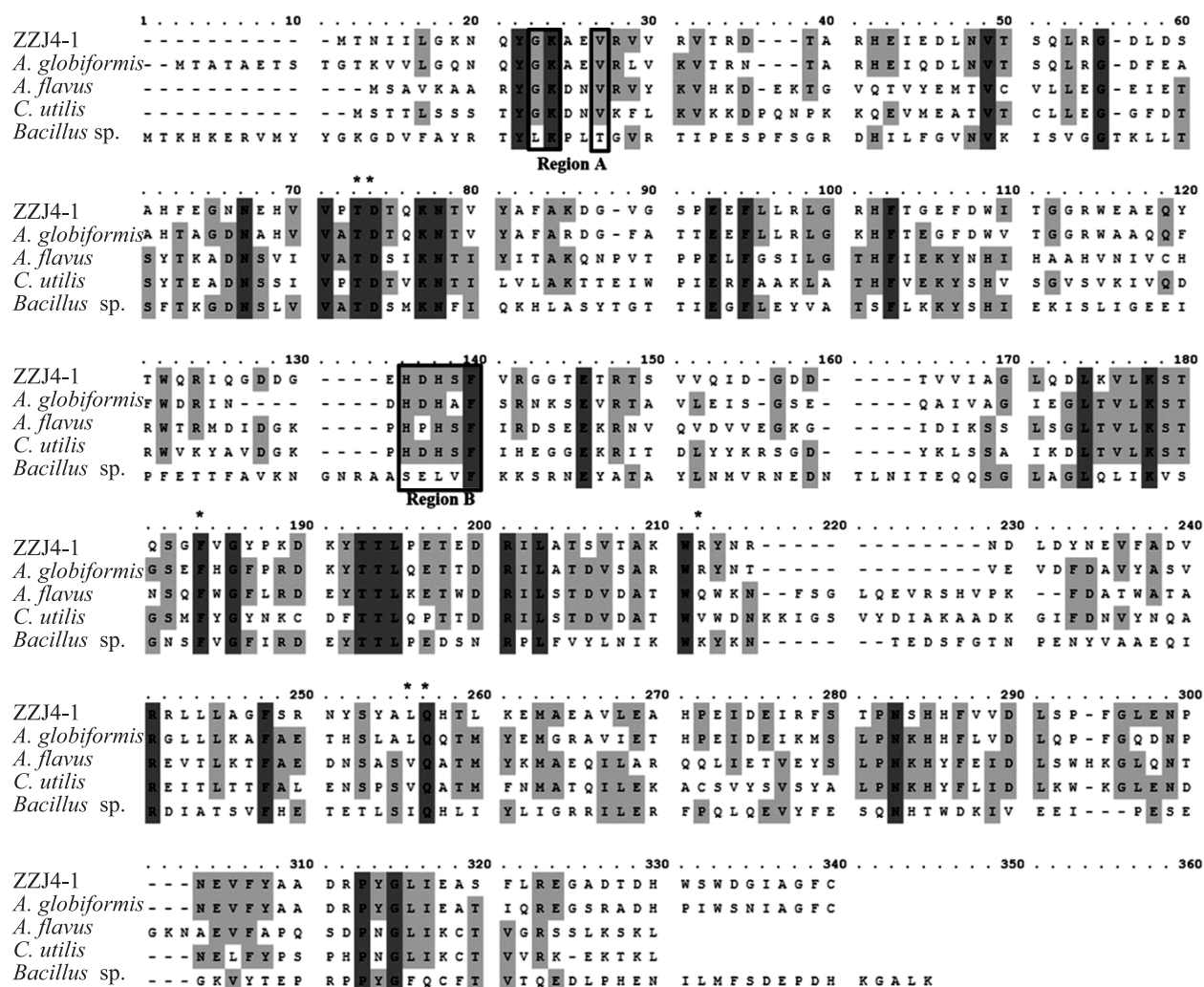


图 1 不同微生物 Uox 的多序列比对

Fig. 1 A multiple alignment of Uox from different microorganisms. Uox from strain ZZJ4-1 was aligned with those from *A. globiformis*^[11], *A. flavus*^[13], *C. utilis*^[12] and *Bacillus* sp. TB-90^[17]. The light grey areas indicate low conserved sequences, the dark grey areas indicate high conserved sequences. The asterisks indicate the putative uric acid binding site of Uox from stain ZZJ4-1.

2.3.2 重组 Uox 的最佳反应温度与热稳定性

在不同的温度下测定酶活性, 结果见图 5, 酶的最佳反应温度为 30 °C。在不同的温度下水浴 30 min 后测定剩余酶活, 结果见图 6, 该酶在 65 °C 处理后仍保留 92.2% 的酶活。

2.3.3 重组 Uox 的最佳反应 pH 与 pH 稳定性

在不同 pH 的缓冲液中测定酶活性, 结果见图 7, 重组 Uox 的最佳反应 pH 为 7.5, 缓冲液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液。酶液在不同 pH 的缓冲液中 25 °C 水浴 18 h 后测定剩余酶活, 结果见

图 8, 该酶在 pH 8.5~11.0 的缓冲液中有较好的稳定性。

2.3.4 酶促反应动力学

以 Lineweaver-Burk 作图法求得重组 Uox 以尿酸为底物的 K_m 为 0.22 mmol/L。根据比活和分子量计算其 K_{cat} 为 2.2/s。

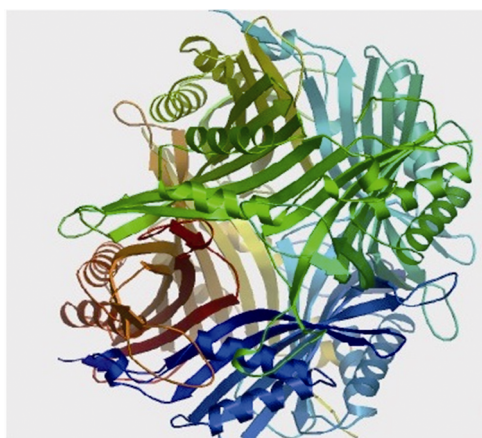


图 2 预测的 Uox 同源四聚体结构

Fig. 2 Predicted tetramer structure of Uox.

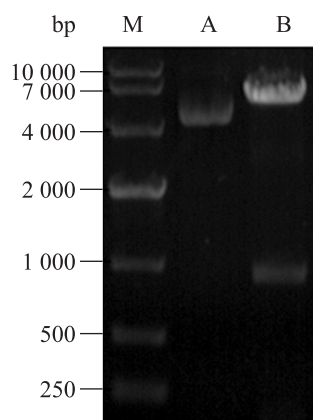


图 3 表达载体 pET-15b-uox 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of expression vector pET-15b-uox by enzyme digestion. M: marker; A: pET-15b-uox; B: pET-15b-uox digested with *Nde* I and *Bam*H I.

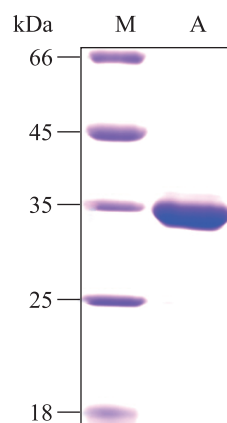


图 4 重组 Uox 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant Uox. M: marker; A: purified recombinant Uox.

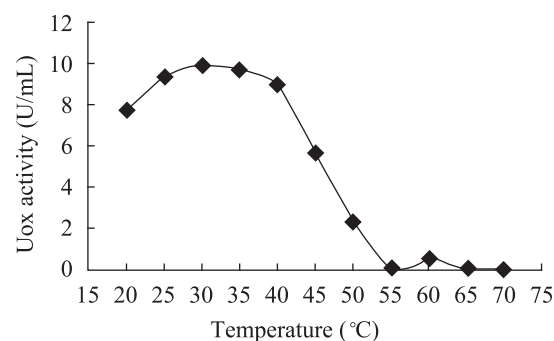


图 5 不同温度下重组 Uox 的活性

Fig. 5 Effects of temperature on recombinant Uox activity.

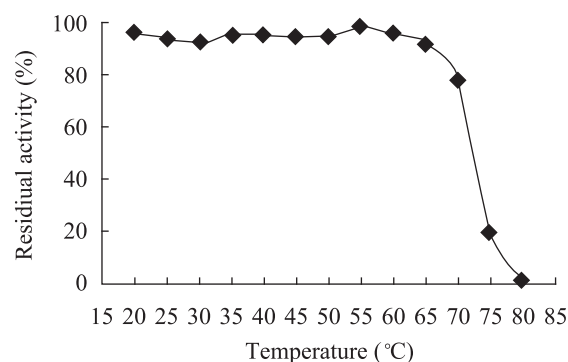


图 6 重组 Uox 的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of recombinant Uox.

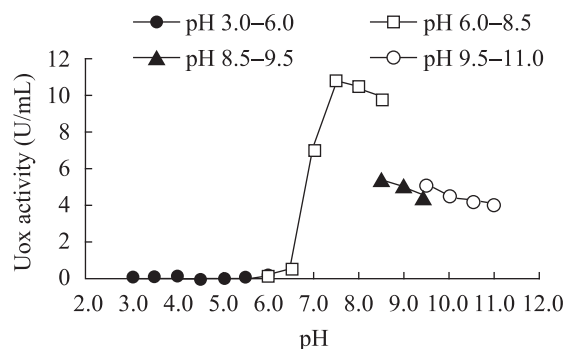


图7 不同 pH 下重组 Uox 的活性

Fig. 7 Effects of pH on recombinant Uox activity. pH 3.0–6.0: 0.1 mol/L citrate buffer; pH 6.0–8.5: 0.1 mol/L phosphate buffer; pH 8.5–9.5: 0.1 mol/L borate buffer; pH 9.5–11.0: 0.1 mol/L borax-NaOH buffer.

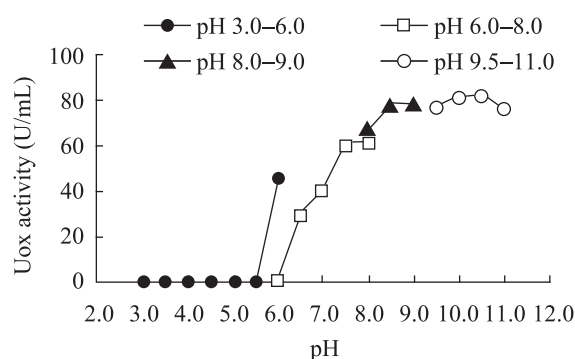


图8 重组 Uox 的 pH 稳定性

Fig. 8 pH stability of recombinant Uox. pH 3.0–6.0: 0.1 mol/L citrate buffer; pH 6.0–8.0: 0.1 mol/L phosphate buffer; pH 8.0–9.0: 0.1 mol/L borate buffer; pH 9.5–11.0: 0.1 mol/L borax-NaOH buffer.

2.3.5 不同化学物质对酶活的影响

由图9可知,浓度均为1 mmol/L的 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 使重组 Uox 几乎完全失活,而 Mn^{2+} 、 Li^+ 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶活没有显著影响。表2显示表面活性剂 Tween 20、Tween 80 和 Triton X-100 对酶活有一定的促进作用,而 SDS 可使酶几乎完全失活; NaN_3 和金属螯合物

1,10-菲罗啉、EDTA 能轻微抑制酶活。

2.4 重组 Uox 和原酶的性质比较

比较重组 Uox 和 Zhou^[22]报道的原酶性质,结果见表3、4。除了最佳温度相同外,两者其他性质均有差异。重组酶热稳定性略优于原酶,最佳反应 pH 7.5 小于原酶的 8.5, pH 稳定范围则从原酶的 7.0~10.0 变为 8.5~11.0, K_m 和 K_{cat} 均小于原酶。两者受 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 1,10-菲罗啉影响差异较大。

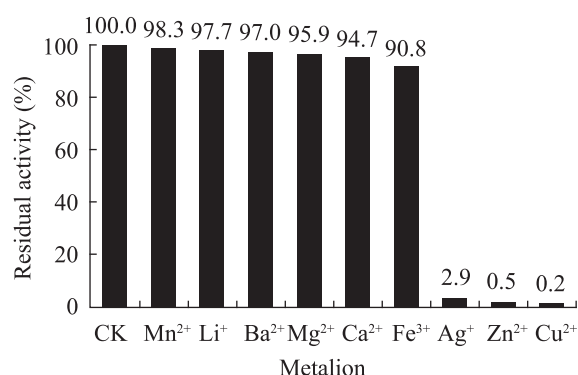


图9 不同金属离子对重组 Uox 的影响

Fig. 9 Effects of metal ions on recombinant Uox.

表2 不同化学物质对重组 Uox 的影响

Table 2 Effects of chemicals on recombinant Uox

Chemicals	Final concentration	Residual activity (%)
CK	—	100.0
Tween 20	1.0%	107.6
Tween 80	1.0%	107.9
Triton X-100	1.0%	109.2
SDS	0.5%	1.1
NaN_3	20.0 mmol/L	88.1
1,10-phenanthroline	10.0 mmol/L	80.1
EDTA	20.0 mmol/L	89.3

表 3 原酶和重组 Uox 的性质比较

Table 3 Properties of native Uox and recombinant Uox

Property	Native Uox	Recombinant Uox
Optimal temperature (°C)	30.0	30.0
Residual activity after 30 min at 70 °C (%)	64.0	77.9
Optimal pH	8.5	7.5
pH stability	7.0–10.0	8.5–11.0
K_m (mmol/L)	0.3	0.2
K_{cat} (/s)	3.0	2.2

表 4 原酶和重组 Uox 受化学物质影响的差异

Table 4 Effects of different chemicals on native Uox and recombinant Uox

Chemicals	Residual activity (%)	
	Native Uox	Recombinant Uox
Cu^{2+}	98.9	0.2
Zn^{2+}	100.7	0.5
1,10-phenanthroline	1.2	80.1

3 讨论

预测的菌株 ZZJ4-1 的 Uox 的尿酸结合位点与 *A. globiformis*^[11] 的 Uox 的位点一致, 并与其他微生物来源的 Uox 的位点有较高的同源性^[12-13,17,20] (图 1)。菌株 ZZJ4-1、*A. globiformis*^[11]、*A. flavus*^[13] 和 *C. utilis*^[12,20] 的 Uox 在区域 A 和区域 B 高度同源, 而与 *Bacillus* sp. TB-90^[17] 的 Uox 有较大差异 (图 1)。Koyama 等^[12] 敲除区域 A 后发现丧失酶活, 推测其对酶的活性是必需的; 区域 B 与真核生物的二型铜离子结合位点 H-X-H-X-F 相同。Suzuki 等^[11] 报道的 *A. globiformis* 的 Uox 含铜离子, 但序列中存在该

结合位点的 *A. flavus*^[1] 的 Uox 中却不含铜离子, 而 Yamamoto 等^[17] 报道的 *Bacillus* sp. TB-90 的 Uox 不含该结合位点, 也不与铜离子结合。菌株 ZZJ4-1 的 Uox 含有该结合位点 H-D-H-S-F, 且被 1,10-菲罗啉强烈抑制, 推测该酶含铜离子。

该酶在大肠杆菌中重组表达后, 菌液的酶活可达 36.7 U/mL, 比菌株 ZZJ4-1 菌液的酶活 1.0 U/mL 提高了 35 倍^[14]。重组酶比原酶热稳定性好, 这一现象也出现在 Yamamoto 等^[17] 和 Zhu 等^[20] 的重组表达研究中, 可能是重组酶比原酶多十几个氨基酸保护结构, 使其不易热变性。与 Zhu 等^[20] 报道的重组酶相同, 本研究的重组酶最适 pH 也变小, 这可能是组氨酸标签的影响。根据 1,10-菲罗啉对原酶和重组酶影响的差异, 推测重组酶比原酶更紧密地结合金属离子, 使其免受络合物的影响。

不同来源的 Uox 对各种金属离子的反应有很大的差异。Suzuki 等^[11] 比较了来自 *Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属和 *Candida* 属的 Uox 受不同金属离子的影响情况。其中 *Arthrobacter* 属和 *Candida* 属的 Uox 与本研究的酶相似, 几乎被铜离子完全抑制, 而 *Bacillus* 属的仍保留 40% 的酶活; *Arthrobacter* 属的 Uox 和本研究的酶均能被锌离子完全抑制, *Candida* 属的剩余 64% 酶活, 而 *Bacillus* 属的完全不受其影响; 受银离子抑制最明显的是 *Candida* 属的 Uox 和本研究的酶, *Bacillus* 属的受轻微抑制, 而 *Arthrobacter* 属的不受影响; 铁离子几乎完全抑制 *Bacillus* 属和 *Candida* 属的 Uox, 但几乎不影响 *Arthrobacter* 属的和本研究的酶。

本研究的重组酶在 65 °C 处理 30 min 后仍保

留 92.2% 的活性, 70 °C 处理后保留 77.9%, 其耐热性优于其他微生物来源的 Uox 的重组酶^[11-12,15,17,20], 是目前已知序列的 Uox 中热稳定性最佳的。Lotfy 等^[23]在 *Bacillus thermocatenulatus* 中发现的 Uox 在 75 °C 处理 45 min 后仍保留 100% 的活性, 在 80 °C 处理 45 min 后保留 70% 的活性, 比菌株 ZZJ4-1 的 Uox 热稳定性更好, 但迄今为止未报道其基因和蛋白的研究结果, 故该酶的详细情况未知。

鉴于该重组酶高效的表达和良好的热稳定性, 相信其在临床治疗和测定中会有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Gabison L, Prangé T, Colloc'h N, et al. Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide: mechanistic implications. *BMC Struct Biol*, 2008, 8(1): 32–39.
- [2] Huang SH, Shih YC, Wu CY, et al. Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(12): 1627–1633.
- [3] 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.
- [4] Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *Int J Med Sci*, 2007, 4(2): 83–93.
- [5] Zhang FF, Wang XL, Ai SY, et al. Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Anal Chim Acta*, 2004, 519(2): 155–160.
- [6] Mcleod MP, Warren RL, Hsiao WWL, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(42): 15582–15587.
- [7] Zhao W, Zhong Y, Yuan H, et al. Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Ammycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Res*, 2010, 20(10): 1096–1108.
- [8] Deng Y, Zhu YG, Wang PX, et al. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol*, 2011, 193(8): 2070–2071.
- [9] Hongoh Y, Ishikawa H. Evolutionary studies on uricases of fungal endosymbionts of aphids and planthoppers. *J Mol Evol*, 2000, 51(3): 265–277.
- [10] Abdel-Fattah YR, Saeed HM, Gohar YM, et al. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Process Biochem*, 2005, 40(5): 1707–1714.
- [11] Suzuki K, Sakasegawa SI, 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] Koyama Y, Ichikawa T, Nakano E. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the *Candida utilis* urate oxidase (uricase). *J Biochem*, 1996, 120(5): 969–973.
- [13] Legoux R, Delpech B, Dumont X, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J Biol Chem*, 1992, 267(12): 8565–8570.
- [14] Zhou XL, Ma XH, Sun GQ, et al. Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production conditions. *Process Biochem*, 2005, 40(12): 3749–3753.
- [15] Pfrimer P, de Maria LMP, Galdino AS, et al. Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *J Biomed Biotechnol*, 2010:

- 674908.
- [16] Chen ZY, Wang ZY, He XP, et al. Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(4): 545–554.
- [17] Yamamoto K, Kojima Y, Kikuchi T, et al. Nucleotide sequence of the uricase gene from *Bacillus* sp. TB-90. J Biochem, 1996, 119(1): 80–84.
- [18] Goa J. A micro biuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand J Clin Lab Invest, 1953, 5(3): 218–222.
- [19] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc, 1934, 56(3): 658–666.
- [20] Zhu XJ, Liu JG, Li GX. Cloning and expression of urate oxidase and its application in serum uric acid analysis. Chin J Biotech, 2001, 17(1): 68–72.
朱献军, 刘建国, 黎高翔. 尿酸氧化酶基因的克隆、表达及其产物的应用. 生物工程学报, 2001, 17(1): 68–72.
- [21] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. Nucl Acids Res, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [22] Zhou XL. Isolation of a uricase-producing bacterium and study on the characteristics of the uricase [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
周学来. 一株产尿酸氧化酶菌株的分离及酶特性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [23] Lotfy WA. Production of a thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenulatus* strain. Bioresour Technol, 2008, 99(4): 699–702.

《生物工程学报》创刊以来全部论文数据库上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 《生物工程学报》对 1985 年创刊以来的全部论文进行了数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库。检索或浏览我刊已发表的论文请从我刊首页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>) “过刊检索”进入, 可以按照题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息检索, 欢迎浏览下载。