高黏蛋白结合活性尿酸氧化酶的设计、制备及酶学性质研究

李智刚[1,2]，王亚鹏[2,3]，路建光[4]，化浩举[4]，冯 军[2,4*]

（1. 浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心，浙江杭州 310014；2. 中国医药工业研究总院，上海 201203；3. 复旦大学药学院，上海 201203；4. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：口服尿酸氧化酶可促进肠道尿酸排泄，用于痛风治疗。为提高重组猪 - 狒狒尿酸氧化酶（pig-baboon chimeric urate oxidase，PBC）在肠道的黏附性和降解尿酸的效率，该研究将黏蛋白结合蛋白（mucin-binding protein，MUB）片段与 PBC 融合，构建了融合蛋白 N1 至 N7。然后，比较了融合不同 MUB 片段对 PBC 结合活性的影响，并进一步研究了 N5 的高密度发酵、分离纯化及酶学性质。结果表明，融合蛋白 N1 至 N7 的黏蛋白结合活性均有显著提高，其中，N 端连接 MUB 片段 R Ⅳ的融合蛋白 N5 的黏蛋白结合活性提高了近 41 倍。采用高密度发酵、硫酸铵沉淀、聚乙烯亚胺澄清和阴离子交换色谱的纯化方法，N5 的纯度达到 98.7%，发酵产量为 4.47 g/L。此外，N5 的酶比活（0.52 IU/mg）较 PBC 提高了 30%，底物亲和力增强（K_m=14.29 μmol/L），并在常温、碱性条件及常见金属离子环境中均能保持稳定。该研究为口服尿酸氧化酶的后续研发提供了候选药物参考。

关键词：尿酸氧化酶；黏蛋白结合活性；发酵；纯化；酶学性质

中图分类号：R971$^+$.1；TQ920.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2025）07-0877-09

引用：李智刚，王亚鹏，路建光，等．高黏蛋白结合活性尿酸氧化酶的设计、制备及酶学性质研究［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(7)：877-885．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.07.006

Design, Preparation and Enzymatic Properties of Urate Oxidase with High Mucin Binding Activity

LI Zhigang[1,2], WANG Yapeng[2,3], LU Jianguang[4], HUA Haoju[4], FENG Jun[2,4*]

(*1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014; 2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 4. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Oral urate oxidase promotes intestinal uric acid excretion for gout treatment. To enhance the adhesion and uric acid degradation efficiency of recombinant pig-baboon chimeric urate oxidase (PBC) in the intestine, this study fused the mucin-binding protein (MUB) fragments with PBC to construct fusion proteins N1 to N7. By comparing the effects of different MUB fragments on the mucin-binding activity of PBC, and further investigating the high-density fermentation, separation, purification, and enzymatic properties of N5, it was found that the mucin-binding activity of fusion proteins N1 to N7 was significantly improved. Among them, the fusion protein N5, which linked the MUB fragment RIV at the N-terminus, showed a nearly 41-fold increase in mucin-binding activity. Using high-density fermentation, ammonium sulfate precipitation, polyethyleneimine clarification, and anion exchange chromatography, the purity of N5 reached 98.7%, with a fermentation yield of 4.47 g/L. Additionally, the specific activity of N5 (0.52 IU/mg) increased by 30% compared to PBC, with enhanced substrate affinity (K_m=14.29 μmol/L), and it remained stable under room temperature, alkaline conditions, and in the presence of common metal ions. This study provides a reference for the subsequent development of oral urate oxidase as a candidate drug.

Key Words: urate oxidase; mucin binding activity; fermentation; purification; enzymatic property

在人类和某些灵长类动物中，尿酸氧化酶基因已经沉默[1]。尿酸作为人体内嘌呤的最终代谢产物，在血液循环中的动态平衡由肝、肾和肠道共同调节维持[2]。该平衡一旦被打破，血清尿酸水平便会升高，从而诱发高尿酸血症和痛风。过去几十年中，全球高尿酸血症的发病率迅速上升，尿酸氧化酶已越来越多地被用于难治性痛风治疗[3—4]，但其临床应用受限于成本和免疫原性。例如，已上市的聚乙二醇化重组猪 - 狒狒尿酸氧化酶（pig-baboon chimeric urate oxidase，PBC，商品名为 Krystexxa）价格昂贵，并收到 FDA 关于过敏性休克的黑框警告[5]。有研究[6]显示，人体内约有 1/3 的尿酸通过肠道排泄，为痛风治疗开辟了新途径。PIERZYNOWSKA 等[7]报道，口服尿酸氧化酶（如 ALLN-346）在动物试验中显示出降尿酸疗效，并已进入临床Ⅱ期阶段。另有研究[8]报道，一种尿酸氧化酶口服凝胶微球可将尿酸氧化酶固定在肠黏膜上，原位上调肠上皮细胞的尿酸转运蛋白水平，从而加速肠道中的尿酸排泄。然而，尿酸氧化酶口服后难以进入肠道环境，且在肠道停留时间短，导致口服治疗痛风效果不佳[9]。黏蛋白结合蛋白（mucin-binding protein，MUB）是一种在罗伊乳杆菌（*Lactobacillus reuteri*）中发现的细胞表面黏附蛋白，参与肠道细菌与黏液的相互作用和定植[10]。MUB 可形成多个纤维状结构，以增强与黏液受体（包括黏蛋白）的多重相互作用，从而延长细菌在黏液外层的存留[11]。MUB 含有 14 个 Mub 重复序列片段（如图 1A 所示），即 6 个 1 型重复序列 Mub1 拷贝（R Ⅰ至 R Ⅳ）和 8 个 2 型重复序列 Mub2 拷贝（R1 至 R8）[12]。因此，本研究将 MUB 的单一重复序列或混合重复序列与 PBC 融合表达，再探究融合对 PBC 酶比活及其与黏蛋白结合活性的影响，筛选出具有高黏蛋白活性的尿酸氧化酶融合蛋白，并研究其发酵表达、分离纯化及酶学性质，以期为后续口服尿酸氧化酶的临床前研究奠定基础。

收稿日期：2025-04-25

作者简介：李智刚，男，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：冯　军，男，研究员，从事蛋白质及多肽药物的研究与开发工作。

E-mail：fengj31@aliyun.com

1　仪器与试药

ZHWY-2112B 型恒温摇床（太仓市华利达实验设备有限公司）；Biotech-5JG-7000 型机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；SpectraMax i3x 型多功能检测平台（美国美谷分子仪器有限公司）；PowerPac Basic 型垂直电泳仪（美国 Bio-Rad 有限公司）；Avanti J-25 型高速离心机、Microfuge 20R 型微量高速离心机（美国贝克曼库尔特有限公司）；JN-02C 型高压均质机［聚能生物科技（广州）有限公司］；SCG-100 型蛋白质纯化系统（苏州赛谱仪器有限公司）；0.22 μm 水相滤膜（天津津腾实验设备有限公司）；Alliance e2695-2489 型高效液相色谱仪、Acquity 超高效液相色谱仪、Xevo G2-XS 型 Q-Tof 高分辨质谱仪、Acquity QDa 质谱检测器（美国 Waters 公司）。

尿酸（上海沃凯药业有限公司，批号 20180621）；硫酸卡那霉素、异丙基硫代 -*β*-D- 半乳糖苷（isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranoside，IPTG）、BCA 蛋白定量试剂盒购于生工生物工程（上海）股份有限公司；猪黏蛋白 2、辣根过氧化酶（horseradish peroxidase，HRP）- 链霉素亲和素、黄嘌呤琼脂糖填料均购于西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；G-MM-IGT 生物素化试剂盒（江苏博美达生命科学有限公司）；Tween-20［梯希爱（上海）化成工业发展有限公司］；Pierce TMB 底物试剂盒、MxsiSorp 型 96 孔酶标板（NUNC™）（美国赛默飞世尔科技公司）；酵母抽提物（湖北安琪酵母股份有限公司）；PAGE 凝胶快速制备试剂盒（上海雅酶生物医药科技有限公司）；牛血清白蛋白（BSA）及其他常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

融合蛋白 N1 至 N7 的重组工程菌由本实验室构建并保存。

2　方法与结果

2.1　培养基及主要溶液配制

LB 液体培养基 /(g·L^{-1})：酵母抽提物 5、大豆蛋白胨 10、氯化钠 10。

发酵培养基 /(g·L^{-1})：葡萄糖 2、甘油 20、酵母抽提物 15、硫酸铵 3、十二水合磷酸氢二钠 17.2、磷酸二氢钾 3、氯化钾 1、氯化钠 0.5。

补料：75%甘油水溶液，121 ℃灭菌 30 min。

微量元素母液 /(g·L^{-1})：六水合氯化钴 1.8、四水合氯化锰 24.4、七水合硫酸锌 20、无水合硫酸铜

7.5、七水合硫酸亚铁 67.2、12 mol/L 盐酸 2.5、纯化水 1 000。

Tris 缓冲液：50 mmol/L Tris 碱，用 6 mol/L 盐酸调至 pH 8.0。

磷酸盐缓冲液：磷酸二氢钾 6.8 g/L，溶解在纯化水中，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 6.8。

尿酸溶液：取尿酸适量，溶解在上述磷酸缓冲盐中，使终浓度为 120 μmol/L。

PBS：取氯化钠 8.5 g、十二水磷酸氢二钠 2.85 g、氯化钠 0.2 g、磷酸二氢钾 0.27 g，加入去离子水 1 000 mL 使溶解，pH 7.4，4 ℃保存备用。

PBS 吐温溶液（PBST）：取 PBS 100 mL，加入 Tween-20 50 μL，混匀。

封闭液：称取 BSA 1 g，加入 PBS 溶液 100 mL，混匀使溶解，4 ℃保存备用。

显色液：根据 Pierce TMB 底物试剂盒说明书，取等体积 TMB 溶液和 Peroxid 溶液混合，现配现用。

2.2 融合蛋白的分子设计

基于本实验室先前对 PBC 的研究成果[13]，将源自罗伊乳杆菌（*Lactobacillus reuteri*）的 6 种 MUB 片段（R1、R5、R Ⅱ、R Ⅳ、R Ⅳ -R5 和 R5-R Ⅳ，如图 1A 所示）通过柔性连接子（GGGGS×3）与 PBC 进行融合，连接到 PBC 序列的 C 端或 N 端。成功构建了 7 种融合蛋白（命名为融合蛋白 N1 至 N7）及对应的重组大肠埃希菌（*Escherichia coli*）菌株，如表 1 所示。

2.3 融合蛋白的摇瓶发酵

分别取 N1 至 N7 的重组工程菌菌液 10 μL，接种于含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基 30 mL 中，于 37 ℃、220 r/min 振荡培养 12 h，然后以体积分数为 2%的接种量转至发酵培养基 100 mL 中，继续培养至光密度（OD_{600}）值为 0.6 ～ 0.8 后，将培养温度降至 30 ℃，加入 IPTG（终浓度为 0.1 mmol/L）诱导表达，继续培养 6 h 后结束摇瓶发酵，离心（10 000×*g*）15 min，收集菌体。

2.4 融合蛋白的分离和纯化

将收集的菌体用 Tris 缓冲液重悬后，设置匀浆压力为 100 000 kPa，冷却循环水温度为 5 ℃，重复 3 次破碎细胞后，离心（10 000×*g*）15 min，收集破胞液上清。取黄嘌呤 - 琼脂糖色谱柱，预先用流动

表 1 PBC 与 MUB 片段形成的融合蛋白

Tab.1 Fusion Proteins Formed by PBC and MUB Fragments

编号	MUB 片段	连接位置	融合蛋白
N1	R1	C 端	PBC-R1
N2	R5	C 端	PBC-R5
N3	R Ⅱ	C 端	PBC-R Ⅱ
N4	R Ⅳ	C 端	PBC-R Ⅳ
N5	R Ⅳ	N 端	R Ⅳ -PBC
N6	R Ⅳ -R5	N 端	R Ⅳ -R5-PBC
N7	R5-R Ⅳ	C 端	PBC-R5-R Ⅳ

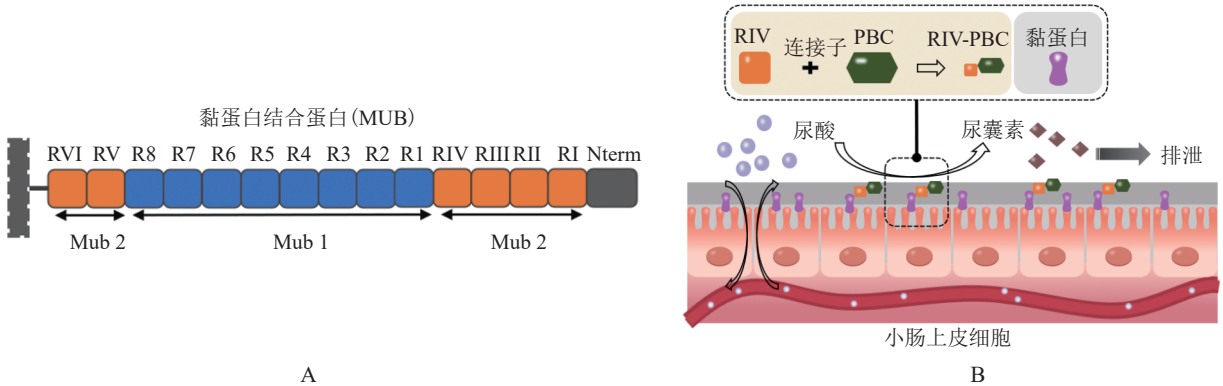
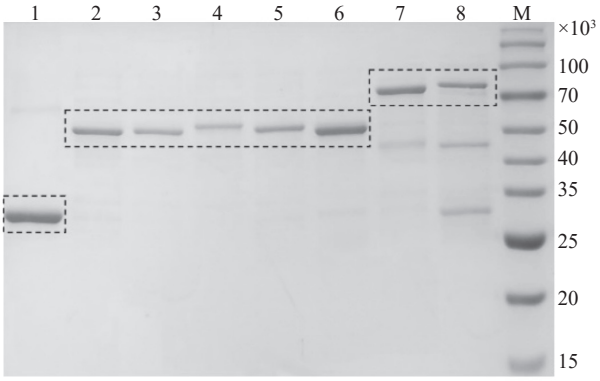


图 1 黏蛋白结合蛋白的结构示意图（A）和融合蛋白的分子设计与作用机制示意图（B）

Fig.1 Schematic Structure of Mucin-binding Proteins (A) and Schematic Molecular Design and Mechanism of Action of Fusion Proteins (B)

相 A（不含磷酸氢二钠，pH 8.5）平衡；破胞液上清经 0.22 μm 水相滤膜过滤后上样，先用流动相 A 冲洗，再用流动相 B（含 50 mmol/L 三乙醇胺、50 mmol/L 氯化钠和 0.5 mmol/L 黄嘌呤，pH 8.5）等度洗脱，检测并收集含有 N1 至 N7 的纯化液。纯化液经 12.5% SDS-PAGE 进行检测，结果如图 2 所示，N1 至 N7 在其理论相对分子质量范围（图 2 中虚线框内）呈现为一条明显的蛋白条带，且纯度较高，可用于后续活性筛选试验。



1—PBC；2 ～ 8—N1 至 N7 纯化液；M—标准质量蛋白。

图 2　PBC 及其融合蛋白 N1 至 N7 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.2　SDS-PAGE Analysis Results of PBC and Its Fusion Proteins N1 to N7

2.5　酶含量及活性测定

酶含量根据 BCA 蛋白定量试剂盒所述方法测定。

酶比活测定方法参考文献[14]。配制不同浓度的尿酸溶液，检测其在 293 nm 处的吸光度值，绘制标准曲线，确定斜率 k。于 pH 6.8、37 ℃的模拟肠液条件下，在石英 96 孔板中加入酶液 50 μL 和尿酸溶液 150 μL 进行反应，用酶标仪测定 3 min 内 293 nm 处吸光度下降值，重复测定 3 次。酶活力以波长 293 nm 处吸光度值的下降速率反映。酶活（enzyme activity，EA）定义为：在 pH 6.8、37 ℃条件下，每 1 min 催化氧化 1 μmol 尿酸所需的酶量为 1 个酶活力单位 IU；计算公式如式①所示。

$$EA=4\times(A-A_0)/(1\,000k\times c) \quad ①$$

式中：A(mAU·min^{-1}) 为样品孔在 293 nm 处测得的吸光度值下降速率；A_0(mAU·min^{-1}) 为空白孔在 293 nm 测得的吸光度值下降速率；c 为样品反应时的浓度。

结果显示，尿酸浓度（c）与 293 nm 处吸光度（y）值的关系为 y=0.007c+0.048，R^2=0.999 7，k=0.007。酶比活测定结果如表 2 所示，可见融合蛋白的酶比活较 PBC 有所降低，仅 N5 显示出与 PBC 相当的酶比活。

表 2　PBC 及其融合蛋白的酶比活及黏蛋白结合活性

Tab.2　Enzyme Activity and Mucin-binding Activity of PBC and Its Fusion Proteins

编号	尿酸氧化酶	酶比活/(IU·mg^{-1})	EC_{50}/(nmol·L^{-1})
—	PBC	0.40±0.05	>200
N1	PBC-R1	0.31±0.03	48.90±22.80
N2	PBC-R5	0.35±0.02	45.99±15.70
N3	PBC-R Ⅱ	0.25±0.02	30.81±1.31
N4	PBC-R Ⅳ	0.28±0.03	11.90±2.50
N5	R Ⅳ -PBC	0.39±0.04	4.74±1.35
N6	R Ⅳ -R5-PBC	0.20±0.04	7.70±5.06
N7	PBC-R5-R Ⅳ	0.17±0.03	6.59±3.05

2.6　ELISA 法测定黏蛋白结合活性

根据生物素化试剂盒说明书，将生物素共价偶联在 PBC 及其融合蛋白 N1 至 N7 的氨基上，生物素化试剂和目标物的物质的量比例为 3 ∶ 1，反应体积为 400 μL。加入所需反应体积的生物素化试剂，与融合蛋白 N1 至 N7 混合均匀，室温反应 30 min 后，用超滤管超滤（截留分子量 10 000）除去游离的生物素。

用 PBS 溶解猪黏蛋白 2 至质量浓度为 4.0 mg/mL，每孔加入 100 μL，37 ℃温育 1 h，使其包被在 96 孔酶标板上。倾去包被液后每孔加入 PBST 200 μL，洗涤 3 次。以质量分数为 1% 的 BSA 作为封闭液，每孔加入 200 μL，于 37 ℃温育 1 h，再用 PBST 洗涤 3 次。分别将生物素化的 PBC 和融合蛋白 N1 至 N7 用 PBS 稀释至不同浓度，按照每孔 100 μL 加入酶标板中，在 37 ℃温育 1 h 后，用 PBST 洗涤 3 次。再加入 HRP- 链霉素（用 PBS 以 1 ∶ 1 000 的倍数稀释），每孔 100 μL，于 37 ℃温育 30 min，然后用 PBST 洗涤 3 次。每孔加入 TMB 溶液 100 μL，避光显色 20 min，加入终止液（2.0 mol/L 硫酸）50 μL 终止显示，及时采用酶标仪检测各样品的 $OD_{450\,nm}$ 值。

结果如表 2、图 3 所示，融合蛋白 N1 至 N7 均表现出黏蛋白结合活性，且结合活性较 PBC 均有所增强；其中，N5 表现出较强的黏蛋白结合活性，较 PBC 提高了近 41 倍。PBC 序列 C 端连接 R Ⅳ的融合蛋白的黏蛋白结合活性分别约是连接 R1、R5、R Ⅱ的 4.1、3.9、2.6 倍，说明 MUB 片段 R Ⅳ能提高黏蛋白结合活性，并且连接在 PBC 的 N 端较 C 端更能提高黏蛋白结合活性。

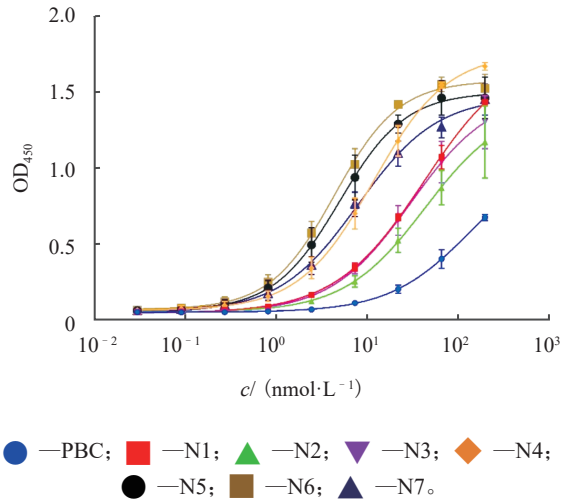
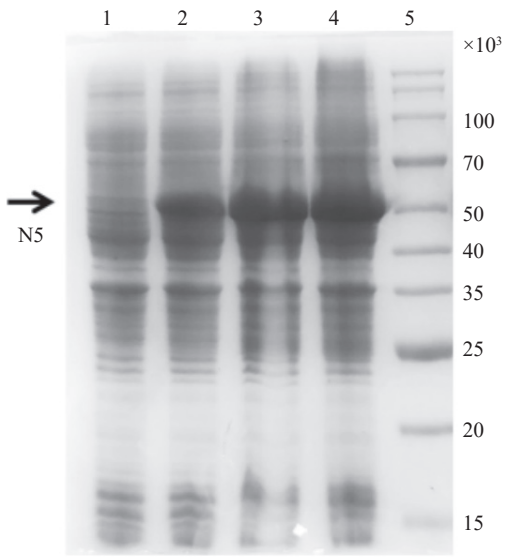


图 3 PBC 及其融合蛋白 N1 至 N7 与黏蛋白的结合曲线（n=3）

Fig.3 Binding Curves of PBC and Its Fusion Proteins N1 to N7 to Mucin (n=3)

2.7 高密度发酵

取 N5 重组工程菌的菌液 10 μL，接种于含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基 30 mL 中，于 37 ℃、220 r/min 振荡培养 12 h 至菌体 $OD_{600\ nm}$ 为 1.0 ～ 2.0 后，接种至含 3 L 发酵培养基的发酵罐中，设置发酵初始温度为 37 ℃、转速为 400 r/min，空气流量为 3 L/min，用 50%氨水调至 pH 7.0±0.1。培养期间，随着重组菌株生长，溶氧逐渐降低，需通过调节转速、罐压、通气量，控制溶氧在 20%以上；培养 12 ～ 13 h，发酵液中溶氧水平迅速上升，开始补料培养。当菌体 $OD_{600\ nm}$ 达到 60±5 时，将温度降至 30 ℃，并加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导，控制溶氧在 20%～ 50%，诱导 6 h 后结束发酵，离心（10 000×g）15 min，收集菌体，所得菌体湿重为（207.3±13.7）g/L。取菌体破胞液上清经 12.5% SDS-PAGE 检测，结果如图 4 所示。融合蛋白 N5 在高密度发酵过程中以可溶形式表达，并随着诱导时间的延长，在相对分子质量 50 000 附近出现一条明显加粗的条带；并且，在 6 h 内的诱导过程中，融合蛋白 N5 在细胞中的含量逐渐增加。



1—未诱导破胞液上清；2 ～ 4—分别诱导 2、4、6 h 时的破胞液上清；5—标准质量蛋白。

图 4 *E. coli* 表达融合蛋白 N5 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE Analysis of Fusion Protein N5 Expressed by *E. coli*

2.8 预处理和分离纯化

2.8.1 预处理

取离心后收集的菌体 30.3 g，用 Tris 缓冲液重悬至体积为 300 mL，按“**2.4**”项下方法破胞，然后离心收集破胞液上清。

硫酸铵沉淀条件摸索：在 25 ℃水浴、搅拌条件下，向破胞液上清中加入饱和硫酸铵溶液（用氢氧化钠调至 pH 8.0），使破胞液中硫酸铵的饱和度分别为 0、10%、25%、35%、45%、50%、60%，静置 30 min，离心（20 000×g）15 min，取上清溶液采用 12.5% SDS-PAGE 进行分析。结果如图 5A 所示，当硫酸铵饱和度≥ 25%时，大部分目的蛋白 N5 存

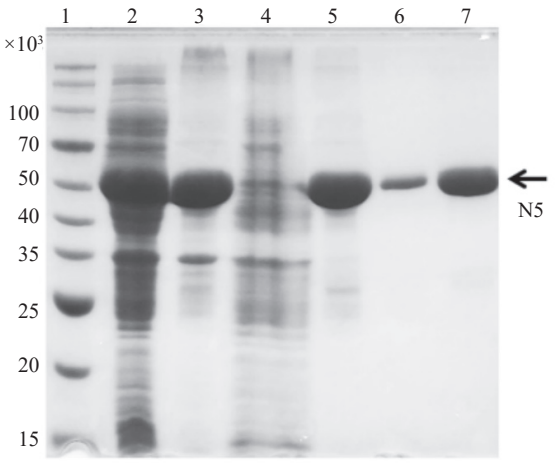
在于沉淀中。

PEI 澄清条件摸索：将硫酸铵沉淀采用 Tris 缓冲液复溶；在 25 ℃水浴、搅拌条件下，将 PEI 溶液缓慢滴加至复溶液中，使 PEI 最终质量分数分别为 0、0.01%、0.02%、0.05%、0.07%、0.10%，搅拌 30 min，离心 (20 000×*g*) 15 min，取 PEI 上清溶观察其澄清度并进行 12.5% SDS-PAGE 分析。结果如图 5B 所示，当 PEI 质量分数为 0.05%时（泳道 4），可去除部分杂蛋白并使复溶液澄清。

故破胞液上清采用饱和浓度至 25%硫酸铵沉淀后用 0.05%的 PEI 澄清预处理。

2.8.2 阴离子交换色谱纯化

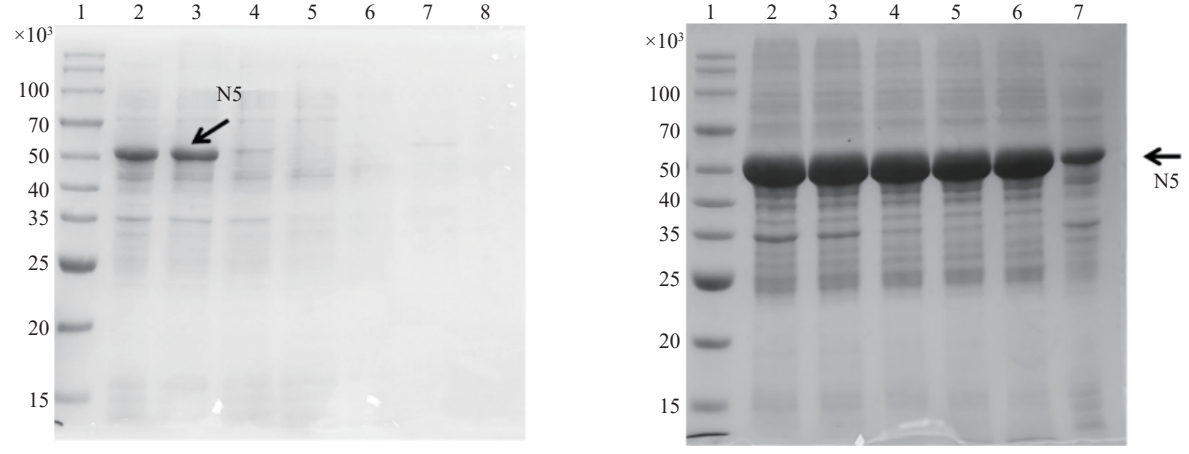
将预处理后样品采用阴离子交换色谱法纯化。色谱条件：色谱柱 5 mL HiTrap Q HP 阴离子交换色谱柱；流动相 A 为 50 mmol/L Tris 盐酸 (pH 8.0)，B 为含 1 mol/L 氯化钠的 50 mmol/L Tris 盐酸 (pH 8.0)；先用流动相 A 平衡色谱柱，将预处理后样品置超滤管（截留分子量 10 000）中，加入流动相 A 超滤至电导率 <5.0 mS/cm，然后经 0.2 μm 水系滤膜过滤后上样；再用流动相 B 梯度洗脱，洗脱方式为 B 25%～100%，10 柱体积 (CV)，流速 5.0 mL/min。收集洗脱液，合并后经 12.5% SDS-PAGE 分析。结果显示，纯化后的融合蛋白 N5 在泳道中显示为单一的蛋白条带（图 6）。重复检测 3 次，酶活收率如表 3 所示，纯化后的 N5 酶比活达 0.52 IU/mg，目的蛋白被纯化了 10.40 倍，总酶活收率为 51.8%，按式②计算 N5



1—标准质量蛋白；2—破胞液上清；3—25%硫酸铵沉淀复溶液；4—25%硫酸铵沉淀上清；5—0.05% PEI 澄清后上清；6—色谱流穿液；7—色谱洗脱合并液。

图 6　分离和纯化过程中融合蛋白 N5 的 SDS-PAGE 分析

Fig.6　SDS-PAGE Analysis of Fusion Protein N5 during Separation and Purification Process



A—硫酸铵沉淀（1—标准质量蛋白；2～8—硫酸铵饱和度为 0、10%、25%、35%、45%、50%、60%上清）；B—PEI 澄清（1—标准质量蛋白；2～7—PEI 最终质量分数为 0.01%、0.02%、0.05%、0.07%、0.10%、0 的上清）。

图 5　SDS-PAGE 分析结果

Fig.5　Results of SDS-PAGE Analysis

发酵产量，为 4.47 g/L。

发酵产量 (g/L)=[层析合并液浓度 (mg·mL^{-1})× 体积 (mL)]/ 预处理菌体质量 (g)× 发酵菌体湿重 (g/L)×1 000 ②

2.9 纯度分析和质谱鉴定

纯化后的融合蛋白 N5 采用 RP-HPLC 分析纯度。色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相 A 为 0.1%三氟乙酸水溶液，B 为 0.1%三氟乙酸乙腈溶液，梯度洗脱 (0—4 min，A 80%；4—24 min，A 80%—35%；24—26 min，A 35%—20%，26—28 min，A 20%—80%，28—35 min，A 80%)；柱温 50 ℃；流速 1.0 mL/min，检测波长 215 nm；进样量 1 μL。

结果如图 7 所示，主峰单一对称纯度为 98.7%。

采用 LC-MS 法表征所制备的融合蛋白 N5 相对分子质量。

色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱 (300 nm×100 nm，1.9 μm，孔径 30 nm)；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为 0.1%甲酸乙腈溶液，梯度洗脱 (0—4 min，A 90%；4—20 min，A 90%—10 %；20—21 min，A 10 % —90 %；21—25 min，A90%)；流速 0.5 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 2 μL。

质谱条件：离子化模式 电喷雾正离子 (ES^+)；质量扫描范围 *m/z* 100 ～ *m/z* 3 000；离子源温度 100 ℃；采样锥电压 40 V；毛细管电压 3.0 kV；脱溶剂气 (N_2) 流速 600 L/h；脱溶剂气温度 250 ℃；锥孔气 (N_2) 流速 50 L/h；碰撞能量 6 eV；检测器电压 2 750 V；数据采集模式 连续谱。

结果如图 8 所示，将所得原始数据用软件 UniDec 8.0.1 软件进行去卷积化分析，得融合蛋白 N5 的相对分子质量为 56 444.1，与其理论相对分子质量 (56 445.4) 相符。

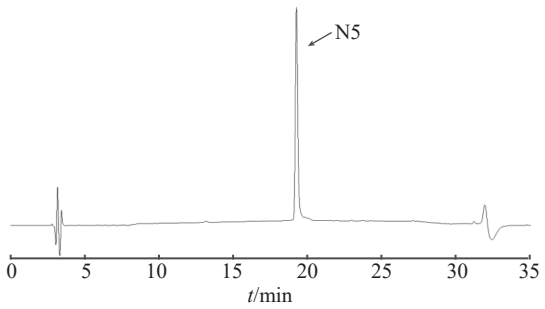


图 7 纯化融合蛋白 N5 的 RP-HPLC 图谱

Fig.7 RP-HPLC Chromatogram of Purified Fusion Protein N5

2.10 酶学性质

2.10.1 酶动力学参数

在 30 ℃、pH 8.0 条件下将 PBC 和融合蛋白 N5 分别与不同浓度 (12 ～ 120 μmol/L) 的尿酸溶液反应，依“**2.5**”项下方法测定反应速率与底物浓度的拟合米氏方程曲线，通过双倒数作图法计算得米氏常数 K_m、最大反应速率 V_{max}、催化常数 K_{cat} 和二级速率常数 K_{cat}/K_m。结果如表 4 所示，融合蛋白 N5 具有与 PBC 相近的底物转化效率和更强的底物亲和力，表明底物结合后的化学转化步骤未被明显加速，说明

表 4 PBC 和融合蛋白 N5 的酶动力学参数 (*n*=3)

Tab.4 Enzyme Kinetic Parameters of PBC and Fusion Protein N5 (*n*=3)

样品	PBC	融合蛋白 N5
K_m/ (μmol·L^{-1})	34.46±3.42	14.29±3.12
V_{max}/ (μmol·L^{-1}·min^{-1})	6.72±0.23	4.20±0.21
K_{cat}/s^{-1}	30.63	31.58
$\frac{K_{cat}}{K_m}$/ (s^{-1} · μmol·L^{-1})	0.22	0.55

表 3 融合蛋白 N5 的纯化结果汇总 (*n*=3)

Tab.3 Summary of Purification of Fusion Protein N5 (*n*=3)

样品名称	体积 /mL	蛋白浓度 / (mg·mL^{-1})	酶比活 / (IU·mg^{-1})	酶活性 [1] / (IU·mL^{-1})	总酶活性 [2]/IU	酶活收率 [3]/%	纯化倍数 [4]
破胞液上清	300	49.60	0.05±0	2.30±0.17	690.82±49.54	100	1.00
硫酸铵沉淀复溶液	300	6.70	0.29±0.01	1.97±0.04	589.83±12.71	90.2±1.9	5.80
PEI 上清	300	4.00	0.44±0.04	1.77±0.15	532.18±45.87	81.4±7.0	8.80
合并液	300	2.18	0.52±0.03	1.13±0.07	338.55±22.31	51.8±3.4	10.40

注：[1] 酶活性 = 酶比活 × 蛋白浓度；[2] 总酶活性 = 酶活性 × 体积；[3] 酶活收率为相对于破胞液上清中总酶活性的百分比；[4] 纯化倍数 = 每步骤酶比活 / 破胞液上清酶比活。

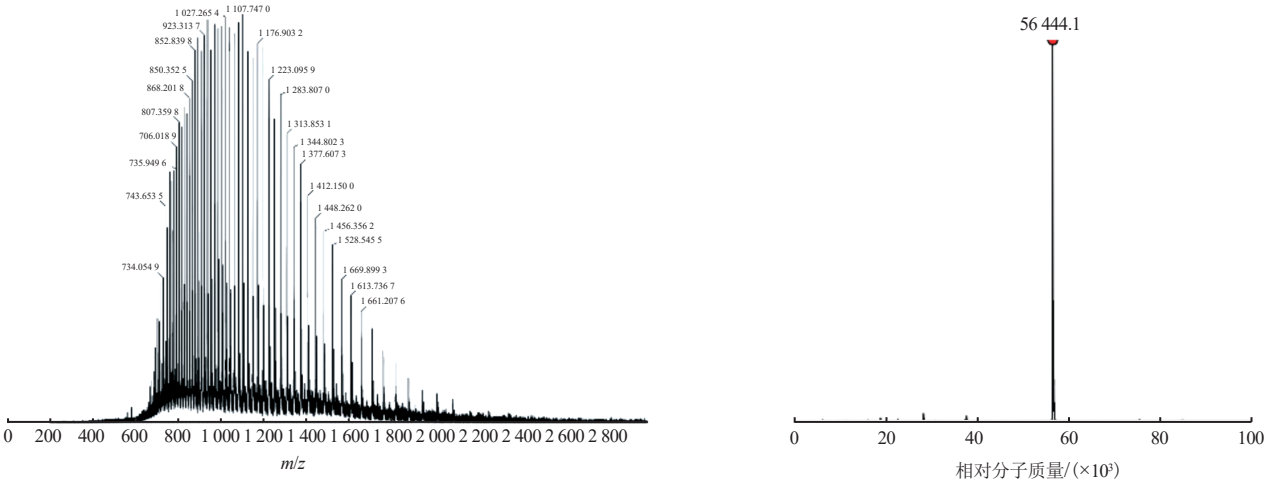


图 8　融合蛋白 N5 的质谱结果图（A）和去卷积分析图（B）

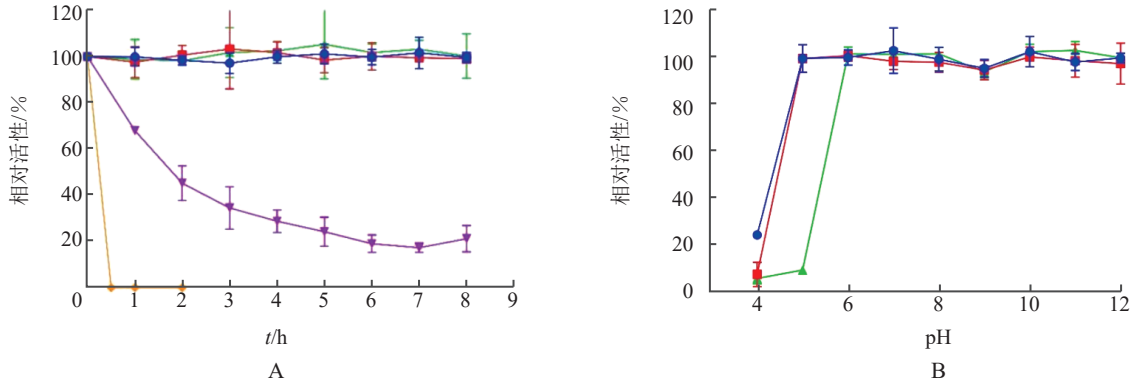
Fig.8　Mass Spectrometry Result Chart (A) and Deconvolution Analysis Chart (B) of Fusion Protein N5

N5 可能集中于“结合阶段”，而非“催化阶段”，可能受限于催化残基的空间排布。

2.10.2　稳定性

热稳定性：纯化后的融合蛋白 N5 溶液分别在 30、40、50、60、70 ℃水浴 8 h，每隔 1 h 取样，冰浴 30 min 以恢复其自然折叠后，然后在 37 ℃、pH 6.8 条件下测量酶比活。每种条件测定 3 份。残余活性以初始活性的百分比表示，结果如图 9A 所示。可见，融合蛋白 N5 在 30 ～ 50 ℃的稳定性较好，60 ℃条件下随处理时间的延长而逐渐失活，70 ℃条件下处理 0.5 h 即失活。

酸碱稳定性：取纯化后的融合蛋白 N5 溶液，分别加至不同 pH 值溶液（pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0；pH 4.0 ～ 5.0、pH 6.0 ～ 10.0 和 pH 11.0 ～ 12.0 的缓冲系统分别为乙酸钠缓冲液、Tris- 盐酸缓冲液和磷酸氢二钠 - 氢氧化钠缓冲液）中，再于 4、25、37 ℃分别孵育 4 h。在 37 ℃，pH 6.8 下测量酶活，残余活性以初始活性的百分比表示，每种条件测定 3 份。结果如图 9B 显示，在 pH 6.0 ～ 12.0 内酶活保持稳定。



A—热稳定性（●—30 ℃；■—40 ℃；▲—50 ℃；▼—60 ℃；◆—70 ℃）；B—酸碱稳定性（●—4 ℃；■—25 ℃；▲—37 ℃）。

图 9　融合蛋白 N5 的热稳定性和酸碱稳定性（*n*=3）

Fig.9　Thermal Stability and Acid-base Stability of Fusion Protein N5 (*n*=3)

2.10.3 金属离子对酶活影响

取纯化后的融合蛋白 N5 溶液，分别与 1 mmol/L 的 KCl、$MnCl_2$、$CaCl_2$、NaCl、$CuCl_2$、$CoCl_2$、$MgSO_4$ 溶液在 4 ℃下孵育 1 h，然后在 pH 8.0、37 ℃条件下测量酶比活。每种条件测定 3 份。以不含上述金属离子抑制剂的活性为 100%，考察金属离子对酶活的影响，结果如图 10 所示。可见，Co^{2+} 对融合蛋白 N5 的酶活性有抑制作用，其他金属离子对融合蛋白 N5 活性的影响不显著。

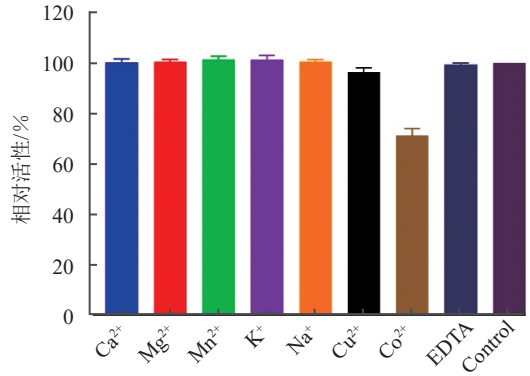


图 10 金属离子对酶活的影响（*n*=3）

Fig.10 Effect of Metal Ions on Enzyme Activity（*n*=3）

3 总结与讨论

MUB 片段与治疗性蛋白融合，通过黏附在小肠黏液层的黏蛋白上，可增加融合蛋白在肠道中的滞留时间，使治疗性蛋白在肠道中获得更长的活性窗口期[15]。本研究设计并筛选了 PBC 融合蛋白 N1 至 N7，其中 N 端连接 MUB 片段 R Ⅳ能显著提高 PBC 的黏蛋白结合活性，且未降低原始尿酸氧化酶的酶活性。

融合蛋白 N5 与市售注射给药的聚乙二醇化 PBC（可能会引发输注反应和过敏反应）不同，专门设计为仅在肠道降解尿酸，因相对分子质量较大而不会在肠道中经被动扩散机制吸收，也未涉及已知的肠道转运蛋白主动吸收机制，因此在一定程度上降低了免疫原性风险。此外，融合蛋白 N5 在常温、碱性条件和常见金属离子条件下均能保持稳定，便于保存和运输；制备工艺简单，适用于工业化生产。综上所述，PBC 融合蛋白 N5 可作为一种具有高酶比活和高黏蛋白结合活性的口服尿酸氧化酶候选化合物，后续将进一步通过高尿酸血症动物体内模型试验评价其开发潜力。

参考文献：

[1] LI Z, HOSHINO Y, TRAN L, *et al*. Phylogenetic articulation of uric acid evolution in mammals and how it informs a therapeutic uricase [J]. *Mol Biol Evol*, 2022, **39**(1): msab312.

[2] HUANG Z, XIE N, ILLES P, *et al*. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 162.

[3] CAI L M, LI Q, DENG Y B, *et al*. Construction and expression of recombinant uricase-expressing genetically engineered bacteria and its application in rat model of hyperuricemia [J]. *Int J Mol Med*, 2020, **45**(5): 1488-1500.

[4] SCHLESINGER N, PÉREZ-RUIZ F, LIOTÉ F. Mechanisms and rationale for uricase use in patients with gout [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2023, **19**(10): 640-649.

[5] F D A. Krystexxa (pegloticase) injection for intravenous infusion [EB/OL]. [2024-12-03]. https://fda. report/media/79472/Krystexxa-Medication-Guide. pdf.

[6] MANDAL A K, MOUNT D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, **77**: 323-345.

[7] PIERZYNOWSKA K, DESHPANDE A, MOSIICHUK N, *et al*. Oral treatment with an engineered uricase, ALLN-346, reduces hyperuricemia, and uricosuria in urate oxidase-deficient mice [J]. *Front Med* (Lausanne), 2020, **7**: 569215.

[8] TANG Y K, DU Y W, YE J N, *et al*. Intestine-targeted explosive hydrogel microsphere promotes uric acid excretion for gout therapy [J]. *Adv Mater*, 2024, **36**(3): e2310492.

[9] ZHAO R, LI Z M, SUN Y Q, *et al*. Engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 with urate oxidase and an oxygen-recycling system for hyperuricemia treatment [J]. *Gut Microbes*, 2022, **14**(1): 2070391.

[10] MACKENZIE D A, TAILFORD L E, HEMMINGS A M, *et al*. Crystal structure of a mucus-binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(47): 32444-32453.

[11] ETZOLD S, KOBER O I, MACKENZIE D A, *et al*. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal

（下转第 892 页）

tuberculosis-macrophage interaction: molecular updates［J］. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, **13**: 1062963.

［8］ MATA E, TARANCON R, GUERRERO C, *et al*. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis［J］. *Sci Immunol*, 2021, **6**(63): eabc2934.

［9］ 余海燕, 杨国平. 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌系统与宿主巨噬细胞相互作用的研究进展［J］. 中国人兽共患病学报, 2023, **39**(12): 1218-1225.

［10］ ABDALLA A E, YAN S, ZENG J, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis Rv0341* promotes *Mycobacterium* survival in *in vitro* hostile environments and within macrophages and induces cytokines expression［J］. *Pathogens*, 2020, **9**(6): 437.

［11］ ROXO C, KOTKOWIAK W, PASTERNAK A. G-quadruplex-forming aptamers-characteristics, applications, and perspectives［J］. *Molecules*, 2019, **24**(20): 3781.

［12］ HONISCH C, RAGAZZI E, HUSSAIN R, *et al*. Interaction of a short peptide with G-quadruplex-forming sequences: an SRCD and CD study［J］. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(8): 1104.

［13］ 张雅婷, 李文娜, 彭伟盼. G- 四链体功能性核酸在微 RNA 生物传感器中的应用［J］. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, **39**(5): 692-698.

［14］ 李继荣, 王志坚, 陶保菊. 潜伏期结核感染研究进展［J］. 医学理论与实践, 2023, **36**(3): 394-396.

［15］ LI C H, WANG H H, YIN Z N, *et al*. Ligand-induced native G-quadruplex stabilization impairs transcription initiation［J］. *Genome Res*, 2021, **31**(9): 1546-1560.

［16］ DINH V T, LOAËC N, QUILLÉVÉRÉ A, *et al*. The hide-and-seek game of the oncogenic Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 protein with the immune system: an RNA G-quadruplex tale［J］. *Biochimie*, 2023, **214**(Pt A): 57-68.

［17］ HORSBURGH B C, KOLLMUS H, HAUSER H, *et al*. Translational recoding induced by G-rich mRNA sequences that form unusual structures［J］. *Cell*, 1996, **86**(6): 949-959.

［18］ HARRIS L M, MERRICK C J. G-quadruplexes in pathogens: a common route to virulence control?［J］. *PLoS Pathog*, 2015, **11**(2): e1004562.

［19］ SHANMUGANATHAN G, ORUJYAN D, NARINYAN W, *et al*. Role of interferons in *Mycobacterium tuberculosis* infection［J］. *Clin Pract*, 2022, **12**(5): 788-796.

［20］ WIK J A, SKÅLHEGG B S. T cell metabolism in infection［J］. *Front Immunol*, 2022, **13**: 840610.

［21］ BEDARD M, VAN DER NIET S, BERNARD E M, *et al*. A terpene nucleoside from *M. tuberculosis* induces lysosomal lipid storage in foamy macrophages［J］. *J Clin Invest*, 2023, **133**(6): e161944.

［22］ BIAN W X, XIE Y, WANG X N, *et al*. Binding of cellular nucleolin with the viral core RNA G-quadruplex structure suppresses HCV replication［J］. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(1): 56-68.

［23］ DAVID A P, PIPIER A, PASCUTTI F, *et al*. CNBP controls transcription by unfolding DNA G-quadruplex structures［J］. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(15): 7901-7913.

（上接第 885 页）

mucus［J］. *Environ Microbiol*, 2014, **16**(3): 888-903.

［12］ ROOS S, JONSSON H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components［J］. *Microbiology* (Reading), 2002, **148**(Pt 2): 433-442.

［13］ 汪柯欣, 王亚鹏, 路建光, 等. 猪 - 狒狒嵌合体尿酸氧化酶的表达, 纯化及酶学性质研究［J］. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(8): 1148-1154.

［14］ WANG Y, LU J, HUANG Z, *et al*. Process development of recombinant *Aspergillus flavus* urate oxidase production in *Pichia pastoris* intracellularly and its characterization as a potential biosimilar［J］. *Process Biochem*, 2021, **102**: 376-385.

［15］ MARCUS R, NIKKI D, MOULAY HICHAM A I. Mucin-binding fusion proteins: US, 20210246176A1［P］. 2021-08-12.