猪-狒狒嵌合体尿酸氧化酶的表达、纯化及酶学性质研究

汪柯欣[1,2]，王亚鹏[2,3]，路建光[2,4]，杨桂英[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：报道了猪 - 狒狒嵌合体尿酸氧化酶（**1**）的发酵表达、分离纯化、活性测定及酶学性质分析。采用重组大肠埃希菌高密度发酵技术，以包涵体形式表达 **1**，发酵产量为 6.88 g/L。包涵体经碱溶液提取、阴离子交换柱色谱纯化后得到纯度为 99.61%的目的蛋白，总酶活收率为 78.95%。样品经质谱鉴定和酶活性分析，单亚基相对分子质量正确，比活达到 6.25 u/mg，证明自制重组 **1** 在大肠埃希菌中成功表达，且具有降解尿酸的能力。本研究为 **1** 类药物的高效率制备提供了方法学借鉴。

关键词：尿酸氧化酶；重组；表达；发酵；纯化；酶学性质

中图分类号：Q815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)08-1148-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.008

Expression, Purification and Enzymatic Properties of Pig-baboon Chimeric Urate Oxidase

WANG Kexin[1,2], WANG Yapeng[2,3], LU Jianguang[2,4], YANG Guiying[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: This paper reported the fermentation expression, separation and purification, activity assay, and enzymatic property analysis of pig-baboon chimeric urate oxidase(**1**). Recombinant *Escherichia coli* high-density fermentation technique was used to express **1** in inclusion body form, and the fermentation yield was 6.88 g/L. The inclusion bodies were extracted by alkali solution and purified by anion-exchange chromatography to obtain the target protein with a purity of 99.61%, and the total enzyme activity yield was 78.95%. According to the results of mass spectrometric identification and enzyme activity analysis, the relative molecular weight of a single subunit was correct, and the specific activity reached 6.25 u/mg, which proved that **1** was correctly expressed in *E. coli* and capable of degrading uric acid. This study provided a methodological reference for efficiently preparing **1** drugs.

Key Words: urate oxidase; recombinant; expression; fermentation; purification; enzymatic property

人类在进化过程中发生了尿酸氧化酶假基因化，尿酸成为人体内嘌呤代谢的最终产物[1]。当嘌呤代谢紊乱，尿酸积累，会导致血尿酸水平持续超标而患高尿酸血症（hyperuricemia，HUA）；长期高尿酸血症可导致弱水溶性尿酸盐饱和，以尿酸单钠晶体的形式析出并沉积于关节处诱发痛风[2]。尿酸氧化酶（urate oxidase，UOX）是嘌呤代谢过程中的关键酶，它可催化尿酸转化为易溶的尿囊素（allantoin）随尿液排出[3]，使该类药物逐渐成为降尿酸治疗领域的研究热点。

目前已上市多种 UOX 类药物用于高尿酸血症相关疾病治疗，如：从黄曲霉中提取天然 UOX 的 Uricozyme®、重组黄曲霉 UOX（rasburicase）的

收稿日期：2022-03-09

作者简介：汪柯欣(1997—)，女，硕士研究生，专业方向：重组蛋白和多肽药物。

通信作者：冯　军(1997—)，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

Fasturtec® 及 Elitek®，但因免疫原性高、半衰期短的缺点，在慢性痛风临床治疗上受到限制[4—5]。为了克服这些问题，美国 Savient 公司开发了一种聚乙二醇（PEG）修饰的重组哺乳动物 UOX——Krystexxa®(pegloticase)，其半衰期为 5 ～ 17 d，远长于 rasburicase[(21±12) h][6]。该药已于 2010 年获得美国 FDA 批准上市，用于常规治疗无效或无法耐受的慢性痛风成人患者[7]。

近年来，我国痛风发病率持续上升，但国内抗痛风药物更新换代相对滞后，尚未有长效 UOX 类药物上市。因此，本研究仿照 pegloticase 氨基酸序列合成了目的基因，通过重组大肠埃希菌（*Escherichia coli*）表达，建立了猪 - 狒狒嵌合体 UOX（pig-baboon chimeric urate oxidase，**1**）的制备工艺，为后续 PEG 修饰产品的开发奠定了基础。

1 仪器与试药

5 L 机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；AH-1500 型高压匀质机（苏州安拓思纳米技术有限公司）；SCG-100 型蛋白纯化系统（苏州赛普仪器有限公司）；JY92- Ⅱ型超声波细胞破碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪（美国美谷分子仪器有限公司）；Powerpac Basic 型垂直电泳仪（美国伯乐实验室有限公司）；GNP-9080 型隔水式恒温培养箱（上海精宏实验设备有限公司）；0.2 μm 水系微孔滤膜（天津津腾实验设备有限公司）；Avanti J-25 型离心机、Microfuge 20R 型离心机均购于美国 Beckman 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 QTof 高分辨质谱仪、Acquity QDa 质谱检测器均购于美国 Waters 公司；HiTrap Q HP 阴离子交换色谱柱（美国 Cytiva 公司）；YMC-Triart Bio C_4 色谱柱（日本 YMC 公司）。

尿酸（上海沃凯生物技术有限公司，纯度 99%，批号 20180621）；硫酸卡那霉素（Kana，纯度 98.0 %，批号 A715BA0002）、异丙基硫代 -β-D- 半乳糖苷（IPTG，纯度 99.0%，批号 H425BA0014）和 BCA 蛋白定量检测试剂盒均购于生工生物工程（上海）股份有限公司；三氟乙酸（TFA，上海泰坦科技股份有限公司，纯度 99.5%，批号 C12228043）；酵母抽提物（湖北安琪酵母股份有限公司，批号 2019022301B9）；PAGE 凝胶快速制备试剂盒、双色预染蛋白 Marker（相对分子质量 10 000 ～ 250 000）均购于上海雅酶生物医药科技有限公司；其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

重组 *E. coli* DMR718 菌株（本实验室构建）。

2 方法与结果

2.1 培养基及主要溶液的配制

LB 培养基 /g·L^{-1}：大豆蛋白胨 10、酵母抽提物 5、氯化钠 10；用 4 mol/L 氢氧化钠调至 pH 7.0，121 ℃灭菌 30 min。

发酵培养基 /g·L^{-1}：葡萄糖 2、甘油 20、酵母抽提物 7.5、枸橼酸铵 2.5、十二水磷酸氢二钠 8、磷酸二氢钾 4、氯化钠 5、硫酸铵 4、无水硫酸镁 0.5、无水氯化钙 0.01；121 ℃灭菌 30 min。

补料培养基：75%甘油、2%无水硫酸镁；121 ℃灭菌 30 min。

微量元素溶液 /g·L^{-1}：七水合硫酸亚铁 10、五水合硫酸锰 0.5、五水合硫酸铜 1、七水合硫酸锌 2.25、硼酸 0.2，含浓盐酸 2.5 ml/L；2 ～ 8 ℃放置备用。

硼酸钠缓冲液：称取硼酸 3.09 g，加去离子水 400 ml 溶解，用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 8.5，加去离子水定容至 500 ml，浓度为 0.1 mol/L。

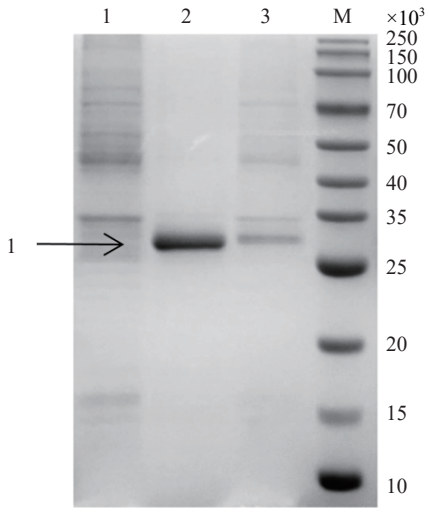
尿酸溶液：称取尿酸 0.001 g，加入 pH 8.5 的硼酸钠缓冲液，振荡至充分溶解，定容至 50 ml，得浓度为 120 μmol/L 的尿酸溶液。现配现用。

2.2 蛋白表达鉴定

取重组 *E. coli* DMR718 菌液 10 μl，接种于含 25 μg/ml Kana 的 LB 培养基 30 ml 中，37 ℃、220 r/min 振荡培养 12 h，然后以体积分数为 2%的接种量转接于 LB 培养基 100 ml 中，37 ℃、220 r/min 继续培养至 OD_{600} 为 0.6 ～ 0.8，加入 IPTG（至终浓度为 0.1 mmol/L）进行诱导，继续培养 6 h 后结束摇瓶发酵表达。

取菌液 1 ml，4 ℃离心（10 000×*g*）5 min，菌体用 pH 8.0 的 50 mmol/L 三（羟甲基）氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）缓冲液混悬，在冰浴条件下超声破碎细胞（功率 400 W，工作时间 5 s、间歇 10 s、循环 7 次），4 ℃离心（10 000×*g*）5 min，沉淀用 Tris-HCl 缓冲液重悬。对经处理的菌体进行 12.5 % 的十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测，点样量为 5 μl。结果如图 1 所示，在

相对分子质量 34 000 左右呈现一条明显的蛋白条带，与文献报道一致[8]，说明重组菌经 IPTG 诱导后有表达，并且主要以包涵体形式表达。



1－未诱导破胞液；2－诱导后破胞液沉淀；
3－诱导后破胞液上清；M－Marker

图 1　*E. coli* 表达的 1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1　SDS-PAGE Analysis of **1** Expressed by *E. coli*

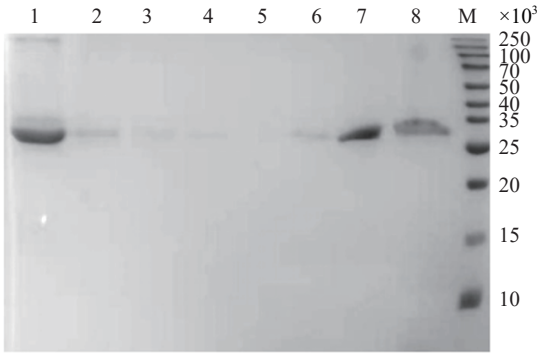
2.3　高密度发酵

取 －80 ℃冷藏保存的重组 *E. coli* DMR718，按体积分数为 1％的接种量接种于 LB 培养基 100 ml 中，并加入终质量浓度为 25 μg/ml 的 Kana，37 ℃、220 r/min 摇床培养 12 h 作为种子液，测得 OD_{600} 为 2 ～ 4。将镜检无污染的种子液转接至 5 L 发酵罐中，设置发酵罐温度为 37 ℃、初始转速为 400 r/min、空气流量为 3 L/min，通过 50％氨水调至 pH 值为 7.0±0.1。在发酵过程中，依次通过提高转速、增加通气量、提高罐压等手段使溶氧保持在 30％以上。当培养至 9 ～ 10 h，OD_{600} 达到 25 ～ 35，溶氧和 pH 值明显上升，说明发酵罐内营养物质耗尽，应开始流加补料。当培养至 OD_{600} 为 60 ～ 80，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达，调整补料速度为 18 ml/h，37 ℃继续诱导培养 12 h 后结束发酵，4 ℃离心 (15 000×*g*)30 min，收集菌体，最终菌体湿重为 175.27 g/L。

2.4　高压匀浆及酶蛋白可溶性分析

取菌体 50 g，以 1 ∶ 10(*m*/*v*) 加入 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液重悬，使用高压匀质机破胞释放胞内产物，设置操作压力为 80 000 kPa，循环冷却水温度为 3 ～ 5 ℃，重复破胞 3 次，得到破胞液 600 ml，4 ℃离心 (15 000×*g*)30 min，收集破胞液沉淀 17 g。

取包涵体以 1 ∶ 200(*m*/*v*) 加入 pH 10.3 的 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液搅拌复溶，用 6 mol/L 盐酸调至 pH 值分别为 9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.5，各取样 1 ml，4 ℃离心 (20 000×*g*)5 min，取上清液进行 15％的 SDS-PAGE 分析，加样量为 5 μl。结果如图 2 所示，目的蛋白在中性条件下不易溶，在 pH 10.0 左右溶解度较好。因此可采用 pH 7.0 ～ 8.0 的缓冲液洗涤包涵体以除去此范围内可溶解的杂蛋白，而有活性的 **1** 可通过 pH 10.0 左右的碳酸钠缓冲液溶解提取。



1 ～ 8－pH 值分别为 10.3、9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.5 的蛋白溶解上清；M－Marker

图 2　1 的可溶性分析

Fig.2　Solubility Analysis of **1**

2.5　分离纯化

将上述包涵体用 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 1 次，于 4 ℃离心 (20 000×*g*)20 min 后湿重为 14.86 g。取洗涤后包涵体 0.6 g，重悬于 pH 10.3 的 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液 120 ml 中，搅拌 1 h，静置 30 min 后于 4 ℃离心 (20 000×*g*)30 min，除去不溶性杂质，保留上清，即得碱液提取样品。

使用蛋白纯化系统对 **1** 进行分离纯化，用洗脱液 A(0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液，pH 10.3) 平衡阴离子交换色谱柱 (HiTrap Q HP)，将碱液提取样品用

0.2 μm 水系微孔滤膜过滤后上样，然后用洗脱液 B（含 0.1 mol/L 碳酸钠和 1 mol/L 氯化钠的溶液，pH 10.3）梯度洗脱，收集并检测洗脱样品，合并含有 **1** 的洗脱液，共 30 ml，即为阴离子交换色谱纯化样品。

将上述纯化样品经还原性 12.5%的 SDS-PAGE 分析，点样量为 5 μl。结果如图 3A 所示，最终纯化后的 **1** 呈现单一的蛋白条带。HPLC 检测结果如图 3B 所示，纯度为 99.61%。

2.6 酶活力和蛋白含量测定

酶活力定义及测定方法参照文献[9]。在 96 孔板中加入底物尿酸溶液 150 μl，于 30 ℃恒温培养箱中预热 5 min，加入稀释 100 倍的酶液 50 μl 快速混匀，放入多功能酶标仪中，30 ℃下连续测定，记录 3 min 内 293 nm 处吸光度的下降值。酶活性定义为在 30 ℃、pH 8.5 条件下，每分钟催化 1 μmol 尿酸所需要的酶量为一个酶活力单位（u）。

采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量，以标准蛋白［牛血清白蛋白（BSA）］在 562 nm 处的吸光度均值为纵坐标、对应的蛋白质量浓度（0 ～ 500 μg/ml）为横坐标绘制标准曲线。根据样品在 562 nm 处的吸光度均值，由标准曲线计算出样品中蛋白质的浓度。

每个样品重复检测 2 次，测得数据取平均值，汇总如表 1 所示，发酵液经高压破胞、包涵体洗涤、碱液提取、阴离子交换色谱纯化后，**1** 的比活达到 6.25 u/mg，酶活收率为 78.95%。由以下关系式计算得 **1** 的发酵产量为 6.88 g/L。

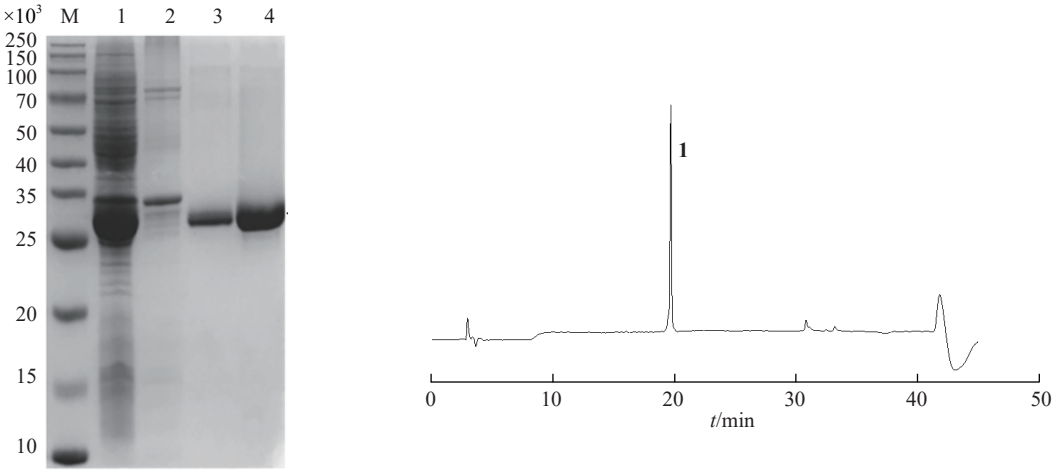
发酵产量 = 包涵体产量 ×**1** 碱液提取收率

包涵体产量 = 洗涤后包涵体质量 / 发酵液体积 =52.09 g/L

1 碱液提取收率 =（**1** 碱液提取质量浓度 × 体积 / 包涵体质量）×100% =（0.66×0.12/0.6）×100% =13.20%

2.7 质谱鉴定

采用液相色谱 - 质谱（LC-MS）联用技术对 **1**



A B

M－Marker；1－ 破胞液；2－ 洗涤液；3－ 碱液提取样品；4－ 阴离子交换色谱纯化样品

图 3 纯化后 1 的 SDS-PAGE 电泳分析（A）和 HPLC 纯度分析（B）

Fig.3 SDS-PAGE Analysis（A）and HPLC Analysis（B）of Purified **1**

表 1 1 的纯化结果汇总（*n*=2）

Tab.1 Summary of Purification of **1**（*n*=2）

名称	质量浓度/mg·ml^{-1}	酶活/u·ml^{-1}	比活/u·mg^{-1}	纯化倍数	总酶活/u	酶活收率/%
破胞液	17.91	20.97	1.17	1.00	508.02	100.00
碱提取	0.66	3.65	5.53	4.72	438.00	86.22
纯化样品	2.14	13.37	6.25	5.34	401.10	78.95

的单体亚基相对分子质量进行分析。

色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱（2.1 mm×150 mm，1.9 μm，孔径 30 nm）；高分辨质谱检测器 Xevo G2-XS QTof；流动相 A 为 0.1%（体积分数）甲酸水溶液，B 为 0.1%（体积分数）甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—2 min，B 5%；2—11 min，B 5%—90%；11—11.1 min，B 90%—5%；11.1—12 min，B 5%）；流速 0.35 ml/min；进样量 1 μl。纯化后的 **1** 经 LC-MS 检测所得的高分辨质谱图如图 4A 所示，利用软件 UniDec v.4.2.0 对质谱原始数据进行去卷积分析，结果如图 4B 所示，计算得 **1** 相对分子质量为 34 193，与原研产品序列的理论值（34 193.28）相符。

2.8 酶学性质

2.8.1 酶动力学常数

配制不同浓度的尿酸溶液（12 ～ 120 μmol/L），在 pH 8.5、30 ℃条件下，使 **1** 与不同浓度的尿酸溶液进行酶促反应，连续测定 3 min 内 293 nm 处吸光度的下降值。将测得的反应初速率（y）与底物浓度（x）通过双倒数作图法绘制酶促反应动力学曲线，所得方程为 y=4.801x+0.314，R^2=0.993 4，计算得样品 **1** 的米氏常数（K_m）为 15.38 μmol/L。

2.8.2 最适反应温度和热稳定性

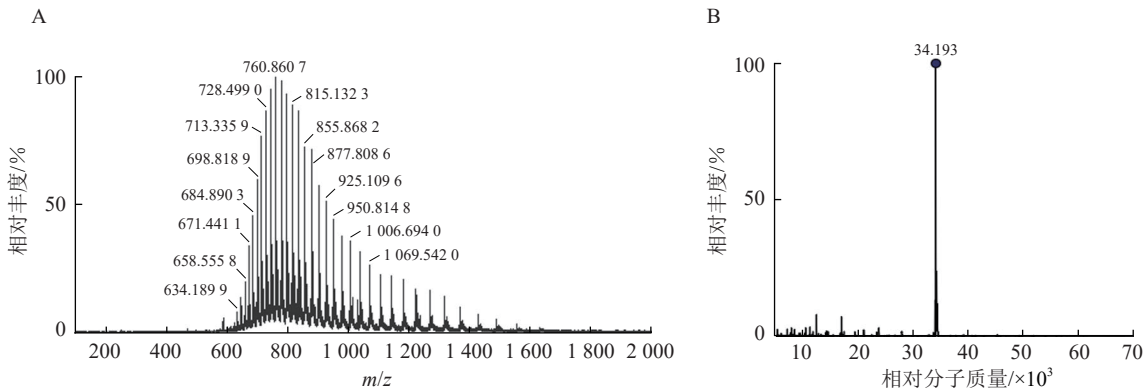
最适反应温度：将样品 **1** 和尿酸溶液分别在 20、30、40、50、60 ℃的条件下保温 5 min，按“**2.6**”项下方法测定各温度下的相对酶活力，每个样品重复检测 3 次。结果如图 5A 所示，50 ℃时相对酶活力达到最高值，为最适反应温度。在 36 ～ 40 ℃时，相对酶活力较高，达到 90%以上，提示在正常体温条件下 **1** 有较高的反应效率。

热稳定性：将样品 **1** 分别在 4、30、40、50、60 ℃条件下温育 2 h，然后在 30 ℃下平衡 20 min，按“**2.6**”项下方法测定相对酶活力，每个样品重复检测 3 次。结果如图 5B 所示，在 4 ～ 50 ℃时，相对酶活力保持均可保持在 80%以上，但当温度超过 50 ℃时，相对酶活力会迅速下降。

2.8.3 最适反应 pH 和 pH 稳定性

最适反应 pH：将样品 **1** 和尿酸分别稀释在 pH 6.8、7.4、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0 的缓冲体系中，按“**2.6**”项下方法测定各 pH 体系中 **1** 的相对酶活力，每个样品重复检测 3 次。测得结果如图 6A 所示，可见该酶最适反应 pH 为 9.0，在 pH 8.5 ～ 10.0 条件下相对酶活力较高，均达到 80%以上。在生理 pH 7.4 条件下，相对酶活力约为 37%，虽然不是最适反应 pH，但仍保持一定的酶活性。对于此情况，一方面可考虑多剂量或多次给药来达到临床治疗目标，另一方面可考虑采用 PEG 进行修饰。相关报道表明，经 PEG 修饰的 UOX 不仅可增强 pH 稳定性，并且在生理环境下（pH 7.4，37 ℃）比天然 UOX 有更高的活性[10]。

pH 稳定性：将样品 **1** 在 pH 6.8、7.4、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0 的缓冲液体系中放置 8 h，取



A：质谱图，B：质谱去卷积图

图 4　质谱图

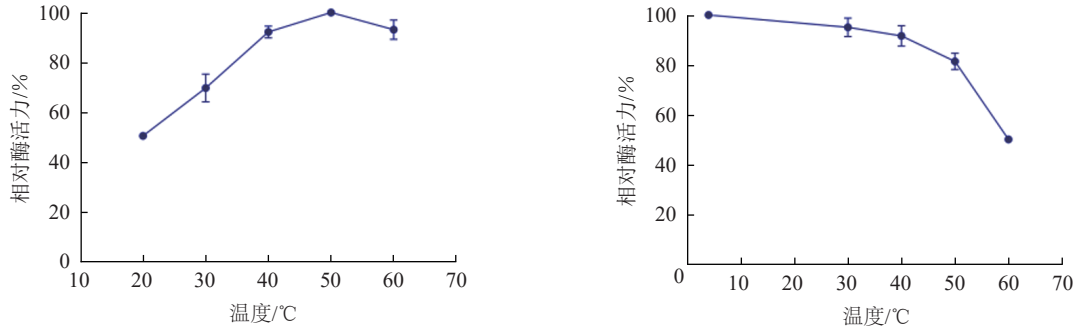
Fig.4　Mass Spectra

出后在 30 ℃、最适 pH 条件下测定其相对酶活力，每个样品重复检测 3 次。测得结果如图 6B 所示，可见 pH 7.4 ～ 11.0 条件下相对酶活力保持较好，均在 88%以上。

3 讨论

UOX 是一种重要的医药用酶，广泛存在于细菌、真菌和真核生物中[11]。最早上市的 Uricozyme® 是从工业培养的黄曲霉中提取的天然 UOX[12]，产率低且主成分不均一；2002 年美国上市的 Fasturtec® 是通过酿酒酵母以胞内可溶的形式表达的重组黄曲霉 UOX[13]，培养周期长、工艺复杂、成本高。此外，微生物来源的 UOX 具有较高的免疫原性，在临床推广使用上受到限制。本研究选择的 **1** 源于猪 - 狒狒嵌合体，与人源 UOX 的同源性更高、免疫原性更低，且与猪 UOX 相比具有更高的活性，在治疗高尿酸血症等方面有巨大的应用潜力。在小鼠体内，未经 PEG 修饰的 UOX 半衰期在 2 h 内，修饰后半衰期为 48 h 左右[14]，因此美国 Savient 公司开发了 PEG 修饰的 **1**[即 Krystexxa®(pegloticase)]并获批上市。

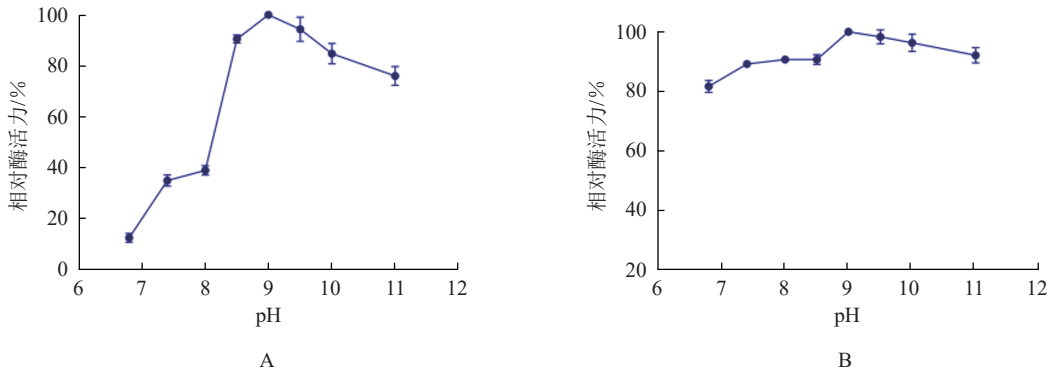
本工艺通过重组 *E. coli* 高效表达 **1**，培养周期短、成本低廉，发酵产量为 6.88 g/L，远高于 LI 等报道的产量 (0.238 g/L)[15]。产物以包涵体形式表达，避免了蛋白酶对外源蛋白的降解，包涵体经碱液提取后通过一步阴离子交换色谱纯化即可获得高纯度的目的蛋白，下游纯化工艺简单，便于后续的中试



A：不同温度下 **1** 的相对酶活力，B：**1** 的热稳定性

图 5 温度对酶活的影响（*n*=3）

Fig.5 Effect of Temperature on Enzyme Activity (*n*=3)



A：不同体系中 **1** 的相对酶活力，B：**1** 的 pH 热稳定性

图 6 pH 对酶活的影响（*n*=3）

Fig.6 Effect of pH on Enzyme Activity (*n*=3)

放大和工业化生产。纯化后 **1** 的比活为 6.25 u/mg，优于原研文献报道水平（5.5 u/mg）[14]。测得米氏常数 K_m 为 15.38 μmol/L，表明具有较好的底物亲和性。**1** 在 36 ～ 40 ℃时相对酶活力均在 90％以上，在 pH 7.4 条件下具有较好的稳定性，提示该酶在生理环境下可适用，具有降尿酸的临床应用潜力。

目前国内关于 **1** 的制备研究报道较少，本研究探索得到一条高效、稳定、简单的 **1** 制备工艺路线，并对产物的理化性质、酶学特性进行表征，为后续 UOX 类药物的进一步开发及性能改造提供了研究基础。

参考文献：

[1] CHANDRATRE P, RODDY E, CLARSON L, *et al*. Health-related quality of life in gout: a systematic review [J]. *Rheumatology* (Oxford), 2013, **52**(11): 2031-2040.

[2] YELDANDI A V, YELDANDI V, KUMAR S, *et al*. Molecular evolution of the urate oxidase-encoding gene in hominoid primates: nonsense mutations [J]. *Gene*, 1991, **109**(2): 281-284.

[3] JUAN E C M, HOQUE M M, SHIMIZU S, *et al*. Structures of *Arthrobacter globiformis* urate oxidase-ligand complexes [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, **64**(8): 815-822.

[4] MAHMOUD H H, LEVERGER G, PATTE C, *et al*. Advances in the management of malignancy-associated hyperuricaemia [J]. *Br J Cancer*, 1998, **77**(S4): 18-20.

[5] PUI C H. Rasburicase: a potent uricolytic agent [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, **3**(4): 433-442.

[6] SHERMAN M R, SAIFER M G P, PEREZ-RUIZ F. PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**(1): 59-68.

[7] GUTTMANN A, KRASNOKUTSKY S, PILLINGER M H, *et al*. Pegloticase in gout treatment-safety issues, latest evidence and clinical considerations [J]. *Ther Adv Drug Saf*, 2017, **8**(12): 379-388.

[8] NYBORG A C, WARD C, ZACCO A, *et al*. A therapeutic uricase with reduced immunogenicity risk and improved development properties [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(12): e0167935.

[9] WANG Y P, LU J G, HUANG Z Q, *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.

[10] TIAN H, GUO Y, GAO X D, *et al*. PEGylation enhancement of pH stability of uricase via inhibitive tetramer dissociation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, **65**(1): 53-63.

[11] 开　雷, 岳　珂, 马晓航. 尿酸氧化酶的研究及其应用[J]. 科技通报, 2008, **24**(2): 183-187.

[12] LEACH M, PARSONS R M, REILLY J T, *et al*. Efficacy of urate oxidase (uricozyme) in tumour lysis induced urate nephropathy [J]. *Clin Lab Haematol*, 1998, **20**(3): 169-172.

[13] LEGOUX R, DELPECH B, DUMONT X, *et al*. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(12): 8565-8570.

[14] HERSHFIELD M, KELLY S J. Urate oxidase: US, 7056713B1 [P]. 2006-06-06.

[15] LI J M, CHEN Z, HOU L H, *et al*. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, **49**(1): 55-59.