一种快速检测人血清中尿酸酶活性方法的建立与验证

霍一凡[1,2]，满素勤[2]，徐嘉辰[2]，徐婷婷[1,2]，邱云良[2*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：基于尿酸酶催化尿酸分解产生尿囊素、过氧化氢和二氧化碳的原理，该研究建立了在 37 ℃、pH 7.5 的反应体系中，检测尿酸酶活性的方法。方法学验证结果表明，该方法对过氧化氢和尿酸酶的定量范围分别为 0.049 ～ 100.000 μmol/L、0.819 ～ 200.000 mU/mL；方法的批内、批间精密度的变异系数小于 20.0%，准确度相对误差在 ±25.0%范围内；高血脂（血脂指数 3 mg/mL）样品和 2%溶血个体样品相对于普通个体的回收率结果显示，高血脂对尿酸酶活性检测无干扰，而溶血有干扰；人血清尿酸酶样品于室温或 2 ～ 8 ℃放置不超过 24 h、冻融不超过 3 次、－70 ～ －90 ℃放置不超过 64 d，均不影响尿酸酶活性。该方法灵敏度高、精密度好、准确度高，且简便、快速，可支持尿酸酶药物的临床前及临床评价。

关键词：尿酸酶；尿酸；过氧化氢；酶促反应；尿酸酶活性

中图分类号：O657.32；R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)12-1693-05

引用：霍一凡，满素勤，徐嘉辰，等．一种快速检测人血清中尿酸酶活性方法的建立与验证［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(12)：1693-1697．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.12.012

Establishment and Validation of a Rapid Method for Detecting Uricase Activity in Serum of Human

HUO Yifan[1,2], MAN Suqin[2], XU Jiachen[2], XU Tingting[1,2], QIU Yunliang[2*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Based on the principle that uricase catalyzes the decomposition of uric acid to produce allantoin, hydrogen peroxide and carbon dioxide, this paper established a method to detect the activity of uricase at 37 ℃ and pH 7.5. The results showed that the quantitative ranges of hydrogen peroxide and uricase were 0.049－100.000 μmol/L and 0.819－200.000 mU/mL, respectively. The within- and between-run variation coefficients of precision were less than 20.0%, and the relative error of accuracy were within ±25.0%. The results of recovery experiments using hyperlipemia samples (lipid index 3 mg/mL) and 2% hemolysis donor samples compared to normal donor samples showed that hyperlipemia did not interfere with the detection of uricase activity, whereas hemolysis did. Uricase activity was not affected when human serum uricase samples were placed at room temperature or 2－8 ℃ for no more than 24 h, frozen and thawing for no more than 3 cycles, and stored at －70 －90 ℃ for no more than 64 days. In conclusion, the established method is sensitive, precise, accurate, simple, rapid, and can support the evaluation of preclinical and clinical studies of uricase drugs.

Key Words: uricase; uric acid; hydrogen peroxide; enzymatic reaction; uricase activity

尿酸酶，又称尿酸氧化酶，是参与生物体内嘌呤代谢过程的关键酶，在动物、植物、细菌和真菌中均有发现[1]。由于人类尿酸酶编码基因突变而导致尿酸酶活性丧失，人类嘌呤代谢的终产物变为尿酸。当尿酸代谢异常，血液尿酸水平超过 420 μmol/L

收稿日期：2024-04-16

基金项目：上海市科委工程技术研究中心专项项目（17DZ2252900）

作者简介：霍一凡（1995—），女，硕士研究生，专业方向：临床前/临床生物标志物分析。

通信作者：邱云良（1978—），男，博士，研究员，从事药物毒理学、生物标志物及非临床依赖性研究。

E-mail：ylqiu@innostar.cn

时，将引起高尿酸血症[2—3]。高尿酸血症的临床检出率逐年增加，是继高血压、高血糖、高血脂之后的第四“高”，已成为仅次于糖尿病的第二大代谢性疾病[4—6]。尿酸本身无明显生物活性，但溶解度低，若发生沉积便会引发局部炎症反应，从而导致组织细胞损伤，主要引起痛风、肾功能障碍和心血管损害；有效的降尿酸治疗则能防止这些并发症损害[7—10]。目前，降低尿酸水平的药物治疗策略主要包括：减少尿酸生成的黄嘌呤氧化还原酶抑制剂，如别嘌醇和非布司他；抑制肾小管尿酸转运体，减少尿酸重吸收以促进尿酸排泄的药物，如丙磺舒、苯溴马隆等；将微溶性尿酸氧化分解成溶解性更好的尿囊素以提高排泄量的尿酸酶。此外，还包含一些具有多重降尿酸机制的药物[2,6,8]。其中，尿酸酶能从根本上缓解高尿酸血症[3]。

在尿酸酶类药物的临床前和临床研究中，尿酸酶活性的检测是评价该类药物有效性和安全性的重要指标之一。因尿酸酶在催化尿酸盐氧化的过程中无需任何辅助因子参与，所以常用的检测尿酸酶活性的方法均基于该酶促反应，如分光光度法、高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）法以及酶标仪法等[3,11—15]。相较于分光光度法的操作烦琐、重复性差、单次检测样品数量受限、无法实现自动化，以及 HPLC 法的分析成本高、分析时间较长，酶标仪法具有简便、快捷、微量、精确度高、高通量以及高效率等优势。因此，本研究基于酶标仪法建立了一种能快速检测人血清中尿酸酶活性的方法，通过检测尿酸酶催化尿酸分解产生的过氧化氢量来计算尿酸酶活性。该法避免了多次试剂孵育、中止反应、恒温培养，仅需调整酶标仪温度，加入工作液后即可在 8 min 内得到结果，可大幅简化操作，加速检测，提高单日检测样品数量。

1　仪器与试药

SpectraMax® i3x 型多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

Amplex™ Red 尿酸 / 尿酸酶检测试剂盒（Amplex™ Red Uric Acid/Uricase Assay Kit，美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 2456933）；甘油三酯混合物（triglyceride mixture，批号 LRAC7106）、尿酸（批号 BCCH4878）（美国 Sigma-Aldrich 公司）；健康人血清（潍坊高新技术产业开发区人民医院）；96 孔板（美国 Corning 公司）。

2　方法与结果

2.1　试剂配制

根据尿酸 / 尿酸酶检测试剂盒说明书，配制 10 mmol/L Red 试剂、1× 反应缓冲液（pH 7.5）、100 U/mL 辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）溶液、20 mmol/L 过氧化氢溶液、100 U/mL 尿酸酶溶液以及 5 mmol/L 尿酸溶液。

工作液：根据尿酸 / 尿酸酶检测试剂盒说明书，配制 1× 反应缓冲液（pH 7.5）。然后采用 1× 反应缓冲液配制含有 100 μmol/L Red、0.4 U/mL HRP 和 1 mmol/L 尿酸的工作液。

过氧化氢标准曲线样品：采用 1× 反应缓冲液将 20 mmol/L 过氧化氢溶液梯度稀释至浓度分别为 100.000、25.000、6.250、1.563、0.391、0.195、0.098、0.049 μmol/L，作为标准曲线样品。其中，100.000 μmol/L 为定量上限（upper limit of quantification，ULOQ）、0.049 μmol/L 为定量下限（lower limit of quantification，LLOQ）。

尿酸酶样品：将至少 6 个健康人的血清混合，配制成混合人血清。采用混合人血清将 100 U/mL 尿酸酶溶液配制成浓度为 4 000.000、2 000.000、1 000.000、500.000、200.000、80.000、32.000、12.800、5.120、2.048、0.819、0.328 mU/mL 的尿酸酶样品。

方法学验证试验样品：采用混合人血清将 100 U/mL 尿酸酶溶液分别配制成高浓度质控（high concentration quality control，HQC）、中浓度质控（medium concentration quality control，MQC）和低浓度质控（low concentration quality control，LQC）的溶液，浓度分别为 200.000、50.000 和 6.250 mU/mL。

选择性试验样品：采用来自 6 个供体的健康人血清，分别制备 2% 溶血基质和高血脂基质（血脂指数为 3 mg/mL）。分别用每个供体的健康血清（普通基质）、溶血基质、高血脂基质将 100 U/mL 尿酸酶溶液配制 HQC 和 LQC 水平的选择性试验样品。

2.2 数据统计分析

本方法通过多功能酶标仪采集数据，SoftMax Pro V7.0 软件进行曲线拟合、数据分析，Microsoft Excel 2013 软件进行一般计算。所有参与统计的结果均来源于标准曲线符合接受标准的分析批，且 k 值均来源于 $R^2 \geqslant 0.95$ 的拟合直线。相对误差（relative error，RE）即测得浓度相对于理论浓度的误差；变异系数（coefficient of variation，CV）即标准偏差与平均值的比值；回收率指特殊基质样品 k 值与普通基质样品 k 值的比值；相对偏差（relative deviation，RD）指 2 次测定值之差与 2 次测定值均值的比值。相应计算公式如下。

$$RE=(c_{测得}-c_{理论})/c_{理论}\times 100\%$$

$$CV=\text{标准偏差}/\text{平均值}\times 100\%$$

$$\text{回收率}=k_{特殊基质}/k_{普通基质}\times 100\%$$

$$RD=(k_{稳定性样品}-k_{新鲜配制})/\text{平均值}_{k\,稳定性样品,k\,新鲜配制}\times 100\%$$

2.3 尿酸酶活性的检测方法

向 96 孔板中每孔加入样品 50 μL、工作液 50 μL，混匀后立即通过酶标仪，在 37 ℃、激发光 530 nm、发射光 590 nm 的条件下检测荧光强度，每 1 min 检测 1 次，共检测 9 次。以检测时间点（t）为横坐标、过氧化氢浓度（c）为纵坐标，进行线性回归，拟合所得直线的斜率 k 被定义为尿酸酶的反应速率，即尿酸酶活性。

2.4 标准曲线和定量范围

取过氧化氢标准曲线样品，按“**2.3**”项下方法检测荧光强度。以过氧化氢浓度（c）为横坐标、荧光强度（I）为纵坐标，进行四参数拟合，建立标准曲线。共统计 7 个分析批，每个分析批建立包含 9 个时间点的标准曲线，每条标准曲线有不少于 7 个浓度点参与拟合。计算复孔间浓度的 CV 值和各浓度点的测得浓度与理论浓度之间的 RE 值，标准曲线需满足各浓度点复孔间 CV 值≤ 20.0%（ULOQ 和 LLOQ 的 CV 值≤ 25.0%）、RE 值在 ±20.0%范围内（ULOQ 和 LLOQ 的 RE 值在 ±25.0%范围内）。

结果（表 1）显示，本方法检测过氧化氢的定量范围为 0.049 ～ 100.000 μmol/L。标准曲线上 ULOQ 和 LLOQ 的 CV 值在 0 ～ 23.8 % 范围内，RE 值为 －2.5%～ 7.3%；其余各浓度点的 CV 值为 0 ～ 19.3%，RE 值为 －11.6%～ 12.9%。

表 1 标准曲线上各个浓度样品的 **CV** 值和 **RE** 值（n=7）

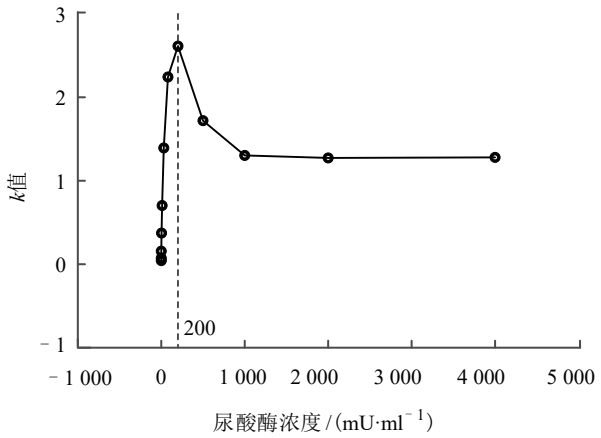
Tab.1 CV and RE Values of Samples at Different Concentrations on the Standard Curve (n=7)

理论浓度 /（μmol·L^{-1}）	CV/%	RE/%
100.000（ULOQ）	0 ～ 4.2	－1.3 ～ 0.6
25.000	0 ～ 2.2	－1.5 ～ 5.2
6.250	0.3 ～ 13.7	－8.5 ～ 0.1
1.563	0 ～ 2.7	－3.4 ～ 5.7
0.391	2.2 ～ 10.7	－5.2 ～ 9.0
0.195	0.2 ～ 14.3	－5.6 ～ 3.1
0.098	2.6 ～ 19.3	－11.6 ～ 12.9
0.049（LLOQ）	0 ～ 23.8	－2.5 ～ 7.3

2.5 尿酸酶定量范围

取尿酸酶样品，按“**2.3**”项下方法检测并计算 k 值。各浓度点需满足复孔间 CV 值≤ 20.0%的要求。

结果（图 1）显示，尿酸酶浓度 <0.819 mU/mL 时，测得过氧化氢浓度低于标准曲线定量范围（0.049 ～ 100.000 μmol/L）。当尿酸酶浓度 > 200.000 mU/mL 时，过氧化氢的初始检测浓度较高，但随时间延长的增长缓慢，k 值偏低，推测原因是工作液中加入过高浓度的尿酸酶后，尿酸酶迅速消耗掉工作液中的尿酸，然后反应速度因尿酸浓度降低而变慢，导致测得的反应速率降低，所以本方法尿



注：尿酸酶为 0.328 mU/mL 时，检测结果低于过氧化氢定量范围的下限。

图 1 尿酸酶浓度与 k 值的关系

Fig.1 Relationship between Uricase Concentrations and k Values

酸酶定量范围为 0.819 ～ 200.000 mU/mL。

2.6 精密度试验

在 4 个不同日期，由 2 个实验员，取方法学验证样品，按“**2.3**”项下方法检测，并计算 *k* 值，进行 6 个独立分析批检测，以评价本方法的批内和批间精密度。每浓度水平的质控样品平行配制 3 份，需满足 *k* 值的批间及批内 CV 值≤ 20.0%的要求。验证结果（表 2）显示，所有浓度样品 *k* 值的批内 CV 值均在 1.1%～ 9.5%，批间 CV 值在 10.0%～ 13.9%。

表 2　精密度验证结果（*n*=6）

Tab.2　Results of the Precision Verification Tests (*n*=6)

样品 /（mU·mL^{-1}）	*k* 值 /（$\bar{x}$±*s*）	批内 CV/%	批间 CV/%
200.000（HQC）	1.979±0.275	1.1 ～ 6.4	13.9
6.250（LQC）	0.362±0.036	1.9 ～ 9.5	10.0
50.000（MQC）	1.393±0.167	1.8 ～ 6.4	12.0

2.7 准确度试验

在 3 个不同日期，由 2 个实验员，平行配制 3 份方法学验证样品，按“**2.3**”项下方法检测，计算每个浓度水平样品的 *k* 值，进行 6 个独立分析批检测，以评价本方法分析批内和批间的精密度。测定结果需满足 *k* 值的批间及批内 RE 值在 ±25.0%范围内的要求。同时，以尿酸酶作为标准品建立酶浓度标准曲线（定量范围为 0.819 ～ 200.000 mU/mL），并以尿酸酶浓度（*c*）对 *k* 值作四参数拟合，最终通过所建立的酶浓度标准曲线计算得质控样品的测得浓度。验证结果（表 3）显示，所有浓度质控样品测得浓度的批内 RE 值为 －23.5%～16.0%，批间RE值为 －19.2%～ －0.1%。

2.8 选择性试验

取选择性试验样品，按“**2.3**”项下方法检测，并计算 *k* 值，以评价方法的选择性。将每个供体的溶血样品和高血脂样品测得的 *k* 值作为相应供体普通基质样品 *k* 值的回收率，需满足回收率为 80%～ 120%的要求。结果（表 4）显示，在 2%溶血基质样品中，HQC 样品的 *k* 值回收率为 65.2 %～ 83.0 %，LQC 样品的 *k* 值回收率为 51.5 %～ 86.2 %；在高血脂基质（血脂指数为 3 mg/mL）样品中，HQC 样品的 *k* 值回收率为 90.2 %～ 107.0 %，LQC 样品 *k* 值回收率为 85.6 %～ 99.6 %。

表 3　准确度验证试验结果（*n*=6）

Tab.3　Results of the Accuracy Verification Tests (*n*=6)

样品 /（mU·mL^{-1}）	测得浓度 /（mU·mL^{-1}）	批内 RE/%	批间 RE/%
200.000（HQC）	161.608±8.432	－23.5 ～ －15.1	－19.2
6.250（LQC）	6.246±0.590	－14.2 ～ 16.0	－0.1
50.000（MQC）	46.418±4.278	－17.4 ～ 8.9	－7.2

表 4　选择性验证试验结果（*n*=6）

Tab.4　Results of the Selectivity Verification Tests (*n*=6)

基质类型	样品 /（mU·mL^{-1}）	*k* 值（$\bar{x}$±*s*）	回收率 /%
普通基质	200.000（HQC）	1.486±0.389	—
	6.250（LQC）	0.288±0.032	—
2%溶血基质	200.000（HQC）	1.075±0.172	65.2 ～ 83.0
	6.250（LQC）	0.191±0.023	51.5 ～ 86.2
高脂血基质	200.000（HQC）	1.471±0.435	90.2 ～ 107.0
	6.250（LQC）	0.264±0.032	85.6 ～ 99.6

注：“—”表示不适用。

2.9 稳定性试验

配制方法学验证样品，浓度分别为 HQC、LQC，在不同条件下放置特定时间后，按“**2.3**”项下方法检测，并计算 *k* 值，以评价样品的稳定性。每个样品平行配制 3 份，具体放置条件如表 5 所示。计算给定条件下稳定性样品 *k* 值与新鲜样品 *k* 值的 RD，需满足 |RD| ≤ 30.0%的要求。结果（表 5）显示，尿酸酶稳定性样品冻融 1 次、冻融 3 次、冷藏冰箱（2 ～ 8 ℃）放置 24 h、室温放置 24 h、超低温冰箱（－70 ～ －90 ℃）放置 36 和 64 d 后的 RD 值均符合要求。

3　讨论

近年来，高尿酸血症的发病率逐年递增，降尿酸药物也逐渐成为研发热点。其中，尿酸酶类药物因能有效降低尿酸水平，是降尿酸药物开发的重点。该类药物的临床前及临床研究中，除了监测血尿酸水平外，尿酸酶活性也是评价该类药物有效性和安全性的重要指标之一。

在已报道的检测尿酸酶活性的方法中，大多是通过检测底物中尿酸减少的量来计算尿酸酶活性，如基于尿酸在 293 nm 处有特定吸收峰（如铁氰化钾紫外法检测尿酸）或尿酸与某些试剂作用生成具有特定吸收峰的物质（如铁 - 邻二氮菲测量法）的现象，采用分光光度法检测。这类方法虽然简单、方便，但操作过程复杂、重复性差、灵敏度低[11—12]。

表 5 稳定性试验的验证结果（*n*=3）

Tab.5 Verification Results of the Stability Tests (*n*=3)

稳定性条件	样品 /(mU·mL^{-1})	*k* 值	RD/%
新鲜配制	200.000(HQC)	1.823±0.036	—
	6.250(LQC)	0.328±0.016	—
冻融 1 次	200.000(HQC)	1.975±0.059	3.0 ～ 5.3
	6.250(LQC)	0.421±0.015	11.5 ～ 14.4
冻融 3 次	200.000(HQC)	2.197±0.138	7.6 ～ 12.3
	6.250(LQC)	0.370±0.004	4.0 ～ 7.8
2 ～ 8 ℃，24 h	200.000(HQC)	1.989±0.145	2.0 ～ 6.4
	6.250(LQC)	0.409±0.013	10.1 ～ 12.3
室温，24 h	200.000(HQC)	2.914±0.045	4.8 ～ 5.1
	6.250(LQC)	0.398±0.011	8.6 ～ 10.6
－70 ～ －90 ℃，36 d	200.000(HQC)	2.168±0.122	7.0 ～ 11.3
	6.250(LQC)	0.380±0.011	5.2 ～ 10.3
－70 ～ －90 ℃，64 d	200.000(HQC)	2.142±0.024	7.5 ～ 8.5
	6.250(LQC)	0.397±0.005	7.2 ～ 11.7

注：“—”表示不适用。

HPLC 法可实现同时分离和检测尿酸，并可通过尿酸浓度计算尿酸酶活性。该方法虽然精密度较高、样品用量少，但需要对样品进行前处理、寻找合适的色谱条件，此外还依赖高精密仪器[13—15]。

本研究建立的检测人血清中尿酸酶活性的方法，为酶催化动力学检测。基于尿酸酶催化尿酸反应得到的产物过氧化氢量，而非底物尿酸减少的量。基于此原理的方法报道较少。本法更加简便、快速，可操作性强，无需中止反应，加入工作液后即可在 8 min 内得到结果，大幅提高检测效率。方法学验证结果说明本法的精密度、准确度、回收率、选择性以及稳定性均较好，适用于人血清中尿酸酶活性的检测。综上所述，本研究建立的基于酶标仪检测尿酸酶活性的方法可支持尿酸酶类药物临床前及临床评价，辅助尿酸酶类药物的研究，为高尿酸血症患者的治疗带来新希望。

参考文献：

[1] 段韵笛, 陈建华. 尿酸酶假基因研究进展 [J]. 科学技术创新, 2020, (13): 25-26.

[2] 宋梦瑶, 张 曦. 高尿酸血症的药物治疗 [J]. 医学信息, 2021, **34**(9): 58-61.

[3] 张慧颖, 江 筠, 张林焱, 等. 微孔板酶底物检测尿酸酶活性方法的建立及验证 [J]. 微生物学免疫学进展, 2022, **50**(1): 30-34.

[4] ZHU C L, CUI R, GAO M M, *et al*. The associations of serum uric acid with obesity-related acanthosis nigricans and related metabolic indices [J]. *Int J Endocrinol*, 2017, **2017**: 5438157.

[5] PASCART T, RICHETTE P. Current and future therapies for gout [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, **18**(12): 1201-1211.

[6] 刘 鹏, 靳 京, 孟晓燕, 等. 高尿酸血症及其治疗药物与肾脏疾病相关性的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, **44**(9): 2013-2019.

[7] BESLON V, MOREAU P, MARUANI A, *et al*. Effects of discontinuation of urate-lowering therapy: a systematic review [J]. *J Gen Intern Med*, 2018, **33**(3): 358-366.

[8] 胡欣瑜, 张 楠, 董鲜祥, 等. 高尿酸血症的防治策略研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2019, **40**(3): 131-135.

[9] 张彩霞, 侯艳培, 李 冰. 高尿酸血症的肾损害 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, **20**(4): 366-368.

[10] JOHNSON R J, SÁNCHEZ-LOZADA L G, NAKAGAWA T, *et al*. Do thrifty genes exist? Revisiting uricase [J]. *Obesity*, 2022, **30**(10): 1917-1926.

[11] 江民川, 赵 阳, 马芳芳, 等. 尿酸检测方法的研究进展 [J]. 化工科技, 2021, **29**(3): 75-79.

[12] 邹瑟音, 雷 达, 凌连生, 等. 基于尿酸酶－钯纳米粒子的比色分析定量检测血清尿酸的方法建立及初步应用评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2021, **42**(6): 653-660.

[13] 陈 思, 李 辉, 马娇颖, 等. HPLC 法测定猪尿酸酶活性 [J]. 化学与生物工程, 2012, **29**(6): 88-91.

[14] 刘旭圆, 商 倩, 李 川, 等. HPLC 法用于小鼠高尿酸模型中血尿酸测定及相关药物评价 [J]. 药物评价研究, 2017, **40**(3): 319-323.

[15] 余 飞, 秦艳飞, 王 洲, 等. 酶标仪法测定微孔板发酵液中林可霉素 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, **44**(1): 47-51.