

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001913

低于米氏常数底物浓度下酶动力学参数的测定

景一娴, 饶菁菁, 廖 飞, 杨晓兰

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:联用设定底物浓度下初速度(initial velocity, V_i)和过程分析法所得酶最大反应速度(maximal reaction rate, V_m)与米氏常数(Michaelis-Menten constant, K_m)比值(V_m/K_m),据米氏方程推算酶的 K_m 和 V_m 。**方法:**以苛求芽孢杆菌尿酸酶(*Bacillus fastidious uricase*, BFU)及其突变体(A1R, A1R/V144A)、牛小肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)及大肠杆菌碱性磷酸酶突变体 R168K 为模型。用 $A_{293\text{ nm}}$ 记录尿酸酶反应曲线、 $A_{450\text{ nm}}$ 记录碱性磷酸酶水解 4-硝基-1-萘基磷酸酯(4-nitro-1-naphthyl phosphate, 4NNPP)反应曲线;以反应时间为自变量、用积分速度方程拟合不超过 10% K_m 初始底物浓度下酶反应曲线测定 V_m/K_m , 分析设定底物浓度下初速度反应数据确定初速度 V_i ;据相同酶量 V_i 和 V_m/K_m 按米氏方程计算 K_m ;据所得 V_m/K_m 和 K_m 推算 V_m 。**结果:**以 E-H(Eadie-Hofstee)法分析 50%~200% K_m 底物浓度下 V_i 所得 K_m 均值为其参考值;联用策略测定 V_i 所设定的底物浓度越高,则所得 K_m 相对偏差越小;测定 V_i 所设定的底物浓度从 35% K_m 逐渐升高到 120% K_m , 所得 K_m 趋于稳定且相对偏差不得超过 20%。据此联用策略发现,苛求芽孢杆菌尿酸酶在生理 pH 下活性降低的原因不是其 K_m 明显升高,而是其 V_m 下降。**结论:**当底物溶解度低于 K_m 时,这种联用策略更适合测定酶的 K_m 和 V_m 。

【关键词】米氏常数;尿酸酶;碱性磷酸酶;反应过程分析**【中图分类号】**Q556;R446.61**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-04-25

An integration strategy for the estimation of kinetic parameters of an enzyme at substrate concentrations lower than Michaelis-Menten constant

Jing Yixian, Rao Jingjing, Liao Fei, Yang Xiaolan

(Key Laboratory of Medical Laboratory Diagnostics of the Education Ministry,
College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To estimate Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal reaction rate (V_m) of an enzyme through the integration of kinetic analysis of reaction curve for the ratio of maximal reaction rate (V_m) to Michaelis-Menten Constant (K_m) as V_m/K_m with the initial rate (V_i). **Methods:** *Bacillus fastidiosus uricase* (BFU) and its mutants (A1R, A1R/V144A), calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) and *Escherichia coli* alkaline phosphatase mutant R168K served as the models. Reaction curve of uricase was recorded as absorbance at 293 nm with uric acid as the substrate while that of alkaline phosphatase was monitored by absorbance at 450 nm with 4-nitro-1-naphthylphosphate (4NNPP) as the substrate. V_m/K_m was estimated by nonlinear fitting of the integrated Michaelis-Menten rate equation with the predictor variable of reaction time to a reaction curve at a substrate concentration smaller than 10% of K_m , and V_i was estimated from data for initial rate reaction at a preset substrate concentration. In the integration strategy, K_m was derived from the ratio of V_i to V_m/K_m for the same enzyme quantity and V_m was thus derived from known V_m/K_m and K_m . **Results:** Reference values of K_m were estimated with substrate concentrations ranging from about 50% K_m to about two-fold of K_m by Eadie-Hofstee transformation of data. In the integration strategy, the use of a higher preset substrate concentration to estimate V_i gave K_m closer to the reference value; when the substrate concentrations preset to estimate V_i were varied from 35% to 120% of K_m , the derived K_m was consistent with the reference value. By this integration strategy under optimized conditions, it was found that the decrease of the activities of BFU and its mutants at physiological pH was caused by the decrease of their V_m rather than the increase of their K_m .

Conclusion: The integration of V_m/K_m estimated through kinetic analysis of reaction curve with the initial rates at preset substrate concentrations lower than K_m for the same enzyme quantity is suitable for the estimation of V_m and K_m .

【Key words】 Michaelis-Menten constant; uricase; alkaline phosphatase; kinetic analysis of reaction curve

作者介绍: 景一娴, Email: 1102705823@qq.com,

研究方向: 新型免疫检测技术的研究。

通信作者: 杨晓兰, Email: xiaolanyang666@yeah.net。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30200266、30672009、81773625)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0933.022.html>
(2018-11-06)

米氏酶常用米氏常数 (Michaelis-Menten constant, K_m) 和最大反应速率 (maximal reaction rate, V_m) 表征。当酶对底物亲和力低而底物浓度有限时, 通过分子工程降低 K_m 是提高酶催化效力的策略, 但需可靠测定酶及其突变体 K_m 和 V_m 。对米氏酶, 需可靠测定 K_m 才能测定其 V_m 。测定 K_m 可分析初速度 (the initial rate, V_i) 对从远低于 K_m 到远高于 K_m 底物浓度的响应^[1-2], 在无底物/产物抑制时分析远高于 K_m 底物浓度下酶反应动力学过程^[3-4], 或比较一个远高于 K_m 及另一个更低底物浓度下 V_i 对酶量响应曲线斜率的比值^[5-6]。当 K_m 高于底物溶解度时, 现有方法理论上都不适合测定 K_m 。例如, 尿酸酶既是体外诊断关键酶^[7-8], 也是目前治疗难治性痛风的唯一有效药物^[9-11]。尿酸酶的应用常要求其中性 pH 时有高活性和高热稳定性^[7-11]。尿酸酶活性常用不超过 0.13 mmol/L 尿酸测定 293 nm 吸光度 (absorbance, A) 变化初速度表示^[7]。苛求芽孢杆菌尿酸酶 (*Bacillus fastidious uricase*, BFU) 最适 pH 约 9.0 且水溶性特别优良; 其在 pH 7.4 热稳定性好, 但在 pH 7.4 时初速度仅有最适 pH 下的 30%^[12-15]; 多数真核尿酸酶在 pH 7.4 时活性约为最适 pH 下的 60% 但稳定性较差且溶解度很低^[16]。在最适 pH 时 BFU 对尿酸 K_m 很高^[12-15]。室温下, 尿酸在 BFU 最适 pH 下溶解度接近 1.00 mmol/L, 但在 pH 7.4 时溶解度难超过 0.40 mmol/L^[9-10]。尿酸双阴离子作为尿酸酶底物形式在 pH 7.4 时占比肯定降低。BFU 在 pH 7.4 的 K_m 就可能明显增大而降低其初速度, 提高 BFU 对底物亲和力成为其分子改造的方向。显然, 需测定 BFU 的 K_m 及 V_m 对 pH 响应才能明确此分子改造方向是否合理。

在底物浓度远低于 K_m 下分析连续记录的酶反应曲线能可靠测定 V_m/K_m ^[17]。可靠测定 V_m/K_m 和在最大可用底物浓度下测定相同酶量的 V_i , 用 V_i 与 V_m/K_m 比值据米氏方程能估算 K_m 。此策略测定 K_m 称为联用策略 (activity index integration approach, AIIA 法), 预期适用于底物溶解度低于 K_m 的酶。尿酸酶底物在生理 pH 下溶解度可能低于 K_m , 但碱性磷酸酶底物溶解度较高。本文用 BFU 和碱性磷酸酶为模型, 考察此联用策略以低于 K_m 的底物浓度测定初速度以推算 K_m 的可靠性, 再用于探索 BFU 及其突变体活性 pH 效应的原因。结果表明, 联用策略测定酶 K_m 有效且优于现有方法; BFU 在 pH 7.4 时 K_m 并无

明显升高而其 V_m 却明显下降。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

BFU 及其突变体表达载体为此前所用^[10], 大肠杆菌碱性磷酸酶突变体 R168K 表达载体 pET28a 为此前构建^[18], 牛小肠黏膜碱性磷酸酶 CIAP 和尿酸来自 Sigma-Aldrich, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞来自北京鼎国昌盛生物科技有限公司, 4-硝基-1-萘酚 (4NNP) 来自 Alfa-Aesar; 4-硝基-1-萘基磷酸酯 (4NNPP) 委托浙江宁波康贝生化有限公司合成, 硼酸钠、Tris 等来自上海阿拉丁生化有限公司。

1.2 酶的准备

将 pET28a 表达载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 在 37 °C、180 r/min 摇床放大培养单克隆至细胞悬液 600 nm 光密度在 0.5~0.6, 加终浓度 1.0 mmol/L 的诱导剂 IPTG 在 16 °C 下诱导表达酶 21 h。离心收集细胞, 超声裂解^[10,18], 离心收集裂解液上清。BFU/突变体用 DEAE-纤维素层析 2 次纯化^[12-15]。大肠杆菌碱性磷酸酶 (ECAP) 突变体 R168K 用 Ni²⁺-NTA-琼脂糖层析纯化^[18]。所制备的重组酶通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 显示主成分为单一肽链。

1.3 监测反应曲线

Shimadzu UV 2550 分光光度计以 2~10 s 的间隔, 连续记录酶反应曲线; 监测尿酸酶反应应用 0.20 mol/L pH 7.4 或 pH 9.0 硼酸钠缓冲液, 记录 293 nm 或 308 nm 处 A 值^[19]。用 $A_{293\text{ nm}}$ 和 11.5/(mmol × cm) 毫摩尔消光系数校正尿酸浓度, 以确定尿酸在 308 nm 的消光系数^[3]; 碱性磷酸酶反应应用 1.0 mol/L pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 记录 $A_{450\text{ nm}}$ 变化; 在 450 nm 测定 4NNPP 毫摩尔消光系数为 25.9/(mmol × cm)。对所测定酶, 都用不超过 2.0 min 内的反应数据确定 V_i ; 记录 20 min 内消耗超过 90% 底物反应曲线分析其过程确定 V_m/K_m ^[20]; 据如下所述获得 K_m 则可推算出 V_m 。

1.4 据 V_i 和 V_m/K_m 关系推算 K_m

底物浓度和 K_m 单位为毫摩尔每升 (mmol/L)。用 MS Excel 6.0 回归分析启动反应 30~90 s 间数据所得决定系数大于 0.99 的初速度为 V_i (单位 mmol/min)。将反应曲线数据格式化成文本文件, 用软件 PCFenzyme 分析测定 V_m/K_m ^[20]。4NNPP 在 450 nm 有强吸光度, 用 0.01 mmol/L 4NNPP 记录碱性磷酸酶反应曲线^[19]; 用以反应时间为自变量的积分速度方程分析反应曲线得碱性磷酸酶 V_m/K_m ^[17-20]。BFU 及其突变体 K_m 都超过 0.22 mmol/L; 分析低于 0.02 mmol/L 尿酸反应曲线得 V_m/K_m 。为校正磷酸盐对碱性磷酸酶的竞争性抑制作用, 在其对应积分速度方程中引入磷酸盐抑制项^[21-22]; CIAP 及 ECAP 突变体 R168K 的 K_m 约 0.20 mmol/L; 用 0.20 mmol/L 4NNPP 测定磷酸盐的半抑制浓度估算其抑制常数^[23]。校正酶样稀释效应后,

以设定底物浓度(s)下 V_i 与相同酶量 V_m/K_m 比值为 n ,则由方程(2)得 K_m 。

1.5 其他数据处理方法

经典数据转换方法测定 K_m 分析初速度对至少 5 个底物浓度的响应。Lineweaver-Burk 数据转换分析法简称 L-B 法, Hanes-Woolf 数据转换分析法简称 H-W 法, Eadie-Hofstee 数据转换分析法简称 E-H 法^[1-2]。以决定系数(determination coefficient)比较数据转换方法分析初速度对底物浓度响应的优度。所得 K_m 用 SPSS 11.0 进行处理,计算其平均值、标准偏差(SD)、变异系数(CV)及全距;结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析、独立样本 t 检验对数据进行比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 E-H 法分析 V_i 对 50%~200% K_m 底物浓度响应所得 K_m 为参考值,用于考察不同测定条件下所得 K_m 的相对偏差;如未说明,所有 t 检验都以参考值为比较对象。

2 结果

2.1 联用策略测定 K_m 的条件优化和可靠性

对 BFU 突变体 A1R/V144A,3 种经典数据转换方法分析 50%~200% K_m 底物浓度所得其 K_m 结果间有显著差异。L-B 法所得 K_m 明显高于 H-W 法所得 K_m ,但 3 种经典数据转换方法所得 K_m 的 CV 无统计学差异。对 CIAP,3 种数据转换方法所得 K_m 的均值和 CV 都无统计学差异(表 1)。显然,对 2 种酶,E-H 法所得 K_m 的 CV 都是最小。在用 3 种经典数据转换方法处理所有 V_i 对底物浓度的响应数据时,E-H 法分析所得决定系数最大;用 E-H 法分析超过 K_m 底物浓度时的 V_i 响应所得 K_m 与分析 50%~200% K_m 底物浓度范围 V_i 响应所得 K_m 无统计差异。因此,以下用 E-H 法分析 V_i 对 50%~200% K_m 底物浓度响应所得 K_m 为参考值,以判断联用策略用低浓度底物测定 K_m 可靠性。

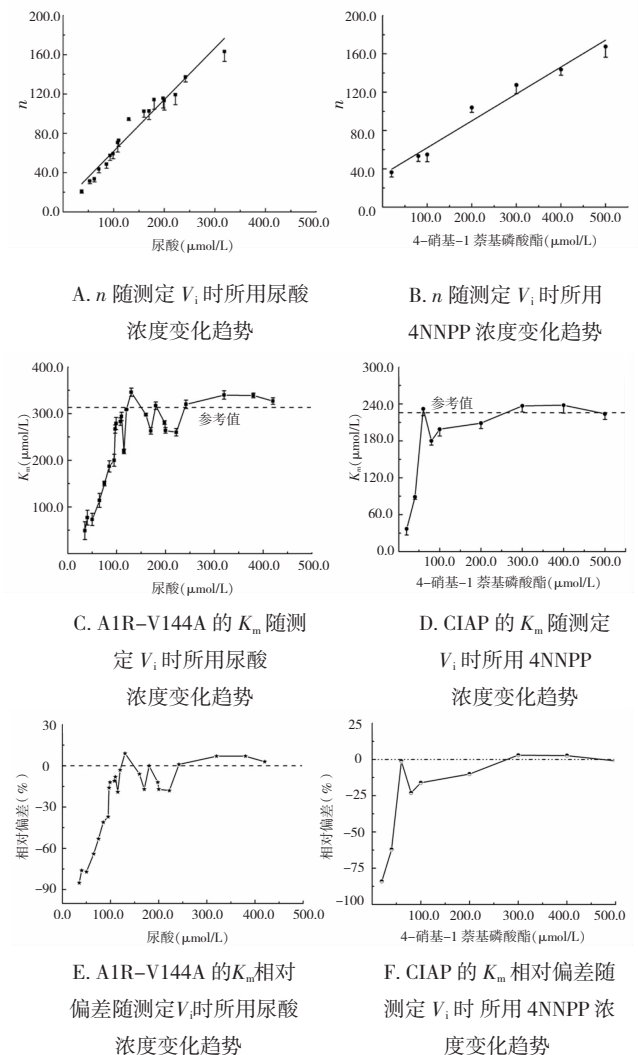
表 1 经典方法分析 50% K_m 至 200% K_m 底物浓度所得 K_m ($n=11$,mmol/L)

酶	方法	K_m		F 值	P 值
		全距	$\bar{x} \pm s$		
A1R/V144A	L-B	0.10	0.34 ± 0.03	3.599	0.040 ^a
	H-W	0.15	0.30 ± 0.04		
	E-H	0.12	0.32 ± 0.03		
CIAP	L-B	0.04	0.25 ± 0.02	2.288	0.119
	H-W	0.06	0.24 ± 0.02		
	E-H	0.05	0.24 ± 0.02		

注:A1R/V144A 用 pH 9.2 缓冲液,CIAP 用 pH 9.0 缓冲液;a:A1R/V144A 在 pH 9.2 时,用 L-B 法与 H-W 法所得 K_m 有显著差异($P=0.013$)

联用策略中,测定 V_i 所设定底物浓度显著影响所得 K_m (图 1)。对 BFU 突变体 A1R/V144A 和 CIAP,设定底物浓度(s)下 V_i 与相同酶量 V_m/K_m 的比值 n 随测定 V_i 时所用底物浓

度增加而升高(图 1A、B),所得 K_m 负偏差同步逐渐减小(图 1C、D)。其中,pH 9.2 时所得 A1R-V144A K_m 参考值为(0.32 ± 0.03) mmol/L;pH 9.0 时所得 CIAP K_m 参考值为(0.24 ± 0.02) mmol/L。联用策略测定 V_i 所设定的底物浓度小于 35% K_m 时,联用策略所得 K_m 有明显负偏差;测定 V_i 对应底物浓度高于 35% K_m 后,所得 K_m 逐步接近参考值并随底物浓度继续增大而围绕参考值随机波动;测定 V_i 对应底物浓度从 35% K_m 逐渐升高到 100% K_m 时,所得 K_m 趋于稳定,且相对偏差不得超过 20%(图 1E、F)。如测定 V_i 所设定底物浓度为 80%~120% K_m ,则联用策略所得 K_m 波动更小且均值更接近参考值。



A、C、E 中 A1R-V144A 用 pH 9.2 缓冲液;B、D、F 中 CIAP 用 pH 9.0 缓冲液

图 1 测定初速度所用底物浓度对 AIIA 法推算 n 和 K_m 的影响

进一步比较联用策略与经典方法在不超过 K_m 参考值 50%的底物浓度下测定 K_m 可靠性。对 A1R/V144A,发现 L-B 法和 H-W 法所得 K_m 与参考值相比其均值增大且全距增大一个数量级,而 E-H 法所得 K_m 与参考值相比其均值降低且

全矩增大,但联用策略所得 K_m 与参考值相比其均值无差异而全矩略微增大(表 2)。对 CIAP,用 L-B 法和 H-W 法所得 K_m 的均值都比参考值减小,且 H-W 法与参考值相比有统计差异。而 E-H 法及联用策略所得 K_m 均值与参考值相比无统计差异。可见,当最大可用底物浓度受溶解度限制不超过 50% K_m 时,联用策略比包括 E-H 法在内的经典方法更适合测定其 K_m 。

表 2 分析底物浓度不超过 50% K_m 的数据所得模型酶 K_m ($n=11, \text{mmol/L}$)

酶	方法	K_m		t 值	P 值
		全距	$\bar{x} \pm s$		
A1R/V144A	L-B	3.56	1.60 ± 1.09^a	3.909	0.003
	H-W	2.65	1.48 ± 0.86^a	4.450	0.001
	E-H	0.35	0.24 ± 0.11^a	-2.381	0.035
	AHA	0.19	0.28 ± 0.07	-1.787	0.096
CIAP	L-B	0.19	0.19 ± 0.07	-2.127	0.057
	H-W	0.08	0.20 ± 0.03^a	-3.401	0.004
	E-H	0.08	0.22 ± 0.04	-1.595	0.133
	AHA	0.13	0.22 ± 0.05	-0.956	0.357

注:A1R/V144A 用 pH 9.2 缓冲液,CIAP 用 pH 9.0 缓冲液;a:表示与参考值比较, $P<0.05$

2.2 联用策略测定 pH 对 BFU 及其突变体催化活性和 K_m 的影响

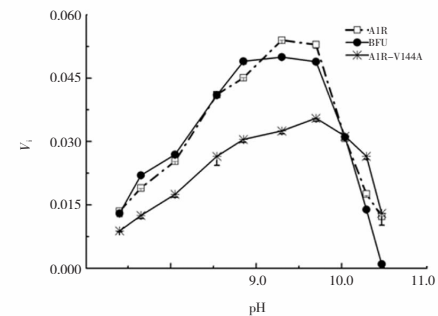
在 pH 7.4 时,尿酸溶解度限制所用最大底物浓度。联用策略中,测定 V_i 所设定底物浓度接近 80% K_m 时结果可靠性有保障。用 0.15 mmol/L 尿酸测定初速度,联用策略测定 BFU 及其突变体 A1R/V144A 在 pH 7.4 的 K_m ,发现所得 K_m 均值和 CV 与 E-H 法在 50%~130% K_m 都无显著差异(表 3)。可见,在 pH 7.4 时,联用策略能可靠测定 BFU 及其突变体 K_m ,从而推算其 V_m 。

表 3 在底物浓度 0.15 mmol/L (高于 50% K_m)测定 pH7.4 时 BFU 及其突变体 K_m ($n=11, \text{mmol/L}$)

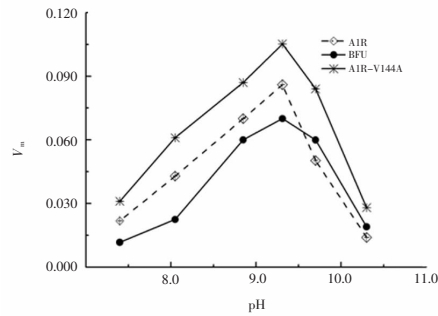
酶	方法	K_m		t 值	P 值
		全距	$\bar{x} \pm s$		
A1R-V144A	E-H	0.09	0.30 ± 0.03	1.053	0.307
	AHA	0.06	0.28 ± 0.02		
BFU	E-H	0.05	0.25 ± 0.02	-1.170	0.263
	AHA	0.02	0.25 ± 0.01		

用 0.08 mmol/L 尿酸发现 pH 显著影响 BFU 及其突变体的 V_i ,在 pH7.4 时其 V_i 都低于最适 pH 下 30%(图 2A);用 0.02 mmol/L 尿酸分析反应曲线所得 V_m/K_m 和所得 K_m 推算 V_m ,也表明 BFU 及突变体在 pH 7.4 下 V_m 都低于其最大值 30%(图 2B)。在不超过 0.40 mmol/L 尿酸时联用策略和 E-H 法测定 K_m ,发现在 pH 7.4 时 BFU 及其突变体 K_m 相对于最适

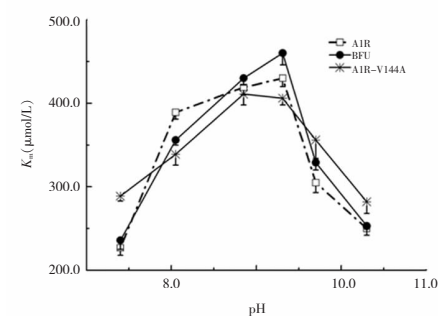
pH 时 K_m 并没有明显上升反而明显下降(图 2C)。因此,BFU 及其突变体 pH 7.4 活性降低仍源自其 V_m 下降,而非 K_m 升高。



A. 对 BFU 及其突变体 V_i 的 pH 效应考察



B. 对 BFU 及其突变体 V_m 的 pH 效应考察



C. 对 BFU 及其突变体 K_m 的 pH 效应考察

图 2 对 BFU 及其突变体的 V_i 、 V_m 和 K_m pH 效应考察

3 讨论

当可用底物浓度受到底物溶解度、底物中抑制性杂质、高浓度底物解离扰动反应体系 pH 等因素限制,经典方法都难以可靠测定酶 K_m 。建立在可用底物浓度受到限制时对常见酶都适用的 K_m 测定新策略/新方法就有明确意义。设定底物浓度下测定碱性磷酸酶产物吸收所得 V_i 可靠性高,各种数据分析方法所得其 K_m 精度较高。尿酸溶解度不超过 BFU K_m 的 130%;在有限尿酸浓度范围内经典数据分析方法所得 K_m 精度很低,而联用策略估算 K_m 精度更高。联用策略所得 K_m 可靠性取决于相同酶量在设

定底物浓度下的 V_i 和 V_m/K_m 的比值 n , 故酶样准确稀释是关键, 并且宜用尽可能高设定底物浓度可靠测定 V_i 。联用策略测定 K_m 时, 测定 V_i 底物浓度需设定在 35%~120% K_m 。可见, 联用策略有望用于测定底物溶解度在 35% K_m 左右的酶米氏常数, 而此前方法都无法测定这类特殊 K_m 。

用联用策略考察 pH 对 BFU 及其突变体 V_m 和 K_m 的影响发现, BFU 及其突变体在 pH 7.4 活性下降的关键原因是其 V_m 下降而不是 K_m 升高, 特别是这些尿酸酶 K_m 在 pH 7.4 时都比最适 pH 下更低; 这些数据表明降低 BFU 及其突变体 K_m 不是其分子工程改造的首选方向。通过量子化学模拟酶反应机制合理设计高活性酶突变体的技术难度太大^[24]。有幸的是最近发现一种真菌尿酸酶最适 pH 为中性, 其 pH 7.0 活性比 pH 9.2 活性还高近 30% (待发表)。目前, 解析此真核尿酸酶最适 pH 的决定因素, 用于指导优化 BFU 最适 pH 到中性而保持其最大活性不降, 成为 BFU 分子工程改造提高其生理 pH 下催化活性的一种全新策略。

参 考 文 献

- [1] Jones OTG. Enzymes (Third Edition)[J]. FEBS Lett, 1981, 130(1):160.
- [2] Purich DL. Kinetics—enzyme kinetics; catalysis & control[J/OL]. (2010-01-00) [2017-06-01]. https://www.researchgate.net/publication/281761329_Enzyme_Kinetics_Catalysis_Control.
- [3] Liao F, Zhu XY, Wang YM, et al. The comparison of the estimation of enzyme kinetic parameters by fitting reaction curve to the integrated Michaelis-Menten rate equations of different predictor variables[J]. J Biochem Bioph Methods, 2005, 62(1):13-24.
- [4] Johnson KA. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013[J]. FEBS Lett, 2013, 587(17):2753-2766.
- [5] Atkins GL, Nimmo IA. A comment on the design of experiments to estimate the Michaelis-Menten parameters of enzyme-catalysed reactions[J]. Experientia, 1981, 37(2):122-123.
- [6] Liao F, Yang X, Zhou Q, et al. Fast estimation of Michaelis-Menten constant of arylesterase with a pair of medium concentrations of substrate[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2003, 18(5):312-316.
- [7] Zhao Y, Yang X, Lu W, et al. Uricase based methods for determination of uric acid in serum[J]. Microchimica Acta, 2009, 164(1):1-6.
- [8] Huang Y, Chen Y, Yang X, et al. Optimization of pH values to formulate the bireagent kit for serum uric acid assay[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2015, 62(1):137-144.
- [9] George RL Jr, Sundry JS. Pegloticase for treating refractory chronic gout[J]. Drugs Today (Barc), 2012, 48(7):441-449.
- [10] Yang X, Yuan Y, Zhan CG, et al. Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: current states and future directions[J]. Drug Dev Res, 2012, 73(2):66-72.
- [11] Zhang C, Pu J, Yang X, et al. Extracorporeal delivery of a therapeutic enzyme[J]. Sci Rep, 2016, 6:30888.
- [12] Zhao Y, Zhao L, Yang G, et al. Characterization of a uricase from *Bacillus fastidious* A.T.C.C. 26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic uricase method[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2006, 45(Pt 2):75-80.
- [13] Zhang C, Yang X, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from *Bacillus fastidiosus*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6):1298-1301.
- [14] Zhang C, Yang X, Gao A, et al. Comparison of modification of a bacterial uricase with N-hydroxysuccinimide esters of succinate and carbonate of monomethoxyl poly(ethylene glycol)[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2014, 61(6):683-690.
- [15] Feng J, Wang L, Liu H, et al. Crystal structure of *Bacillus fastidious* uricase reveals an unexpected folding of the C-terminus residues crucial for thermostability under physiological conditions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(19):7973-7986.
- [16] Tian H, Guo Y, Gao X, et al. PEGylation enhancement of pH stability of uricase via inhibitive tetramer dissociation[J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65(1):53-63.
- [17] Meyeralmes FJ, Auer M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy: a new algorithm for the derivation of k_{cat}/K_m and K_i values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant[J]. Biochemistry, 2000, 39(43):13261-13268.
- [18] Li Y, Long G, Yang X, et al. Approximated maximum adsorption of His-tagged enzyme/mutants on Ni^{2+} -NTA for comparison of specific activities[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 74:211-217.
- [19] Feng J, Liu H, Yang X, et al. Comparison of activity indexes for recognizing enzyme mutants of higher activity with uricase as model[J]. Chem Cent J, 2013, 7(1):69.
- [20] Liu M, Yang X, Yuan Y, et al. PCFenzyme for kinetic analyses of enzyme reaction processes[J]. Procedia Environmental Sciences, 2011, 8(1):582-587.
- [21] Schmidt ND, Peschon JJ, Segel IH. Kinetics of enzymes subject to very strong product inhibition: analysis using simplified integrated rate equations and average velocities[J]. J Theor Biol, 1983, 100(4):597-611.
- [22] Duggleby RG. Product inhibition of reversible enzyme-catalysed reactions[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1209(2):238-240.
- [23] Cheng YC, Prusoff WH. Relation between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes fifty per cent inhibition (I50) of an enzymic reaction[J]. Biochem Pharmacol, 1973, 22(23):3099-3108.
- [24] Zheng F, Xue L, Hou S, et al. A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design[J]. Nat Commun, 2014, 5:3457.

(责任编辑: 冉明会)