

黄曲霉尿酸氧化酶突变体的构建、表达、纯化及生物学活性分析

张金龙, 任军, 李冰, 刘树玲, 侯利华, 付玲, 李建民, 陈薇

军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 采用融合 PCR 的方法将黄曲霉尿酸氧化酶(UOX) 基因的 307~309 bp 的 TGC(Cys) 突变为 GCC(Ala), 将所获得的突变体基因克隆到原核表达质粒 pET-42a(+) 后转化大肠杆菌 BL21(DE3)。经 IPTG 诱导, 突变体蛋白 (UOX-Ala¹⁰³) 得到高水平的可溶性表达, 目的蛋白占总蛋白含量的 45%。疏水柱及阴离子柱纯化后, UOX-Ala¹⁰³ 蛋白纯度 > 98%。Western blotting 分析证实 UOX-Ala¹⁰³ 能与抗 UOX 单抗特异结合。与天然型相比较, 其体外生物学活性增加约 60%, 在高尿酸血症小鼠模型体内也有良好的降解尿酸的活性。

关键词: 黄曲霉尿酸氧化酶, 突变体, 半胱氨酸, 表达, 纯化, 生物活性

Construction, expression, purification and characterization of mutant of *Aspergillus flavus* urate oxidase

Jinlong Zhang, Jun Ren, Bing Li, Shuling Liu, Lihua Hou, Ling Fu, Jianmin Li, and Wei Chen

State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Laboratory of Applied Molecular Biology, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: We converted the TGC codon (307-309 bp) of *Aspergillus flavus* urate oxidase (UOX) gene to a GCC codon by using fusion PCR techniques to produce a C103A mutant. This gene was cloned into expression vector pET-42a (+) and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The mutant protein (UOX-Ala¹⁰³) was expressed in soluble form at high levels after induction with IPTG. The expressed rUOX-Ala¹⁰³ accounted for about 45% of total bacterial proteins. rUOX-Ala¹⁰³ of up to 98% purity was obtained after purified using hydrophobic interaction and anion exchange. Western blotting showed that the anti-UOX antibody specifically recognized rUOX-Ala¹⁰³. The mutant protein showed a 60% increased *in vitro* biological activities compared with native protein, and performed a good activity of degrading the uric acid *in vivo*.

Keywords: urate oxidase (UOX), mutant, cysteine, expression, purification, biological properties

尿酸氧化酶 (Uricase, EC1.7.3.4) 是生物体内嘌呤代谢的关键酶, 它能够催化尿酸氧化形成尿囊酸。许多物种体内均发现有尿酸氧化酶, 但是鸟类

和一些高级灵长类动物体内却缺乏此酶, 而以尿酸作为嘌呤代谢的终产物。尿酸及其盐类在血液中溶解度很低, 而尿酸在体内的累积导致了痛风症^[1-6]。

Received: February 26, 2010; Accepted: April 19, 2010

Corresponding author: Jianmin Li. Tel: +86-10-66948692; Fax: +86-10-63815273; E-mail: ljmzq@yahoo.com.cn
Wei Chen. Tel: +86-10-66948565; Fax: +86-10-63815273; E-mail: cw789661@yahoo.com

直接从黄曲霉提取的尿酸氧化酶 (Uricozyme[®]) 和用酵母表达的重组黄曲霉尿酸氧化酶 Rasburicase (Fasturtec[®]/Elitek[®]) 均已经成功应用于控制接受治疗的病人的尿酸水平。但 UOX 的活性会在纯化过程中降低。质谱分析表明活性降低的 UOX 的 Cys¹⁰³ 有一个通过二硫键连接的半胱氨酸加合物。这一现象可能导致了黄曲霉尿酸氧化酶的活性下降^[7]。黄曲霉尿酸氧化酶共有 Cys³⁵、Cys¹⁰³、Cys²⁹⁰ 三个半胱氨酸, 且在正常情况下均不形成分子内或分子间的二硫键。本实验对黄曲霉尿酸氧化酶的 Cys¹⁰³ 基因进行了定点突变, 将其突变为结构上只比 Cys 少一个硫原子的 Ala, 随后成功地表达纯化了该突变体蛋白 (UOX-Ala¹⁰³)。并且在免疫原性、体外活性、及体内活性等方面与天然型 (UOX-Cys¹⁰³) 进行了对比。研究了半胱氨酸残基对 UOX 催化活性的影响, 从而为 UOX 的结构和功能的研究提供相关有用的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、菌株 *E. coli* DH5 α 、原核表达载体 pET-42a(+) 均由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; *Pyrobrest Taq*、*Ex Taq*、pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司; DEAE-Sepharose FF、Phenyl Sepharose FF 和 Phenyl Sepharose HP 填料购自 GE 公司; 抗 UOX 的单克隆抗体为本实验室自行制备; 酵母提取物和蛋白胍购自 Gibco-BRL 公司; 其他化学试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 UOX-Ala¹⁰³ 的定点突变

根据 GenBank 公布的序列 (Accession No. X61776) 利用 Primer Premier 5.0 设计 4 条引物 (表 1), 其中 AU-UP 及 AU-LOWER 中的下划线部分为引入的 *Nde* I 及 *Hind* III 酶切位点, AU103-LOWER 中的下划线部分为所突变的位点, 由原序列的 GCA 突变为 GGC, 相应的半胱氨酸被突变为丙氨酸。AU-103UP 及 AU103-LOWER 中的阴影部分是为了

方便拼接而设计的互补序列。采用两轮扩增: 第 1 轮为突变, 分上下游 2 个片段进行。模板为本室保存的含有 UOX 的 cDNA 的 pMD-UOX 质粒^[8], 所采用聚合酶为 *Pyrobrest Taq*, 引物对分别为: 上游片段 (C103A-UP): AU-UP/AU-103-LOWER; 下游片段 (C103A-LOWER): AU-103-LOWER/AU-LOWER。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。回收 PCR 产物后进行第 2 轮 PCR 融合上下游片段: 所采用模板为 C103A-UP+C103A-LOWER; 引物对为 AU-UP/AU-LOWER; 聚合酶为 *Ex Taq*; PCR 反应条件同上轮。PCR 结束后琼脂糖凝胶电泳并回收目的片段。

表 1 定点突变 PCR 引物

Table 1 PCR primers of site-directed mutagenesis

Primer names	Primer sequences (5'-3')
AU-UP:	ACCCATATGTCCGCAGTAAAAGCAGCCG CTACGGCAAG
AU-LOWER	CCCAAGCTTTTACAATTTAGACTTCAGAGA GGACCGCCGACGGT
AU103-UP	CACCGCTGGACCCGGATGGACATTG
AU103-LOWER	CCATCCGGGTCCAGCGGTGGCGACAATG TTGACGTGAGCGGCAT

1.2.2 构建测序载体

凝胶回收后连接 pMD-18T 载体: 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 然后转化 DH5 α 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选, 挑取克隆做菌落 PCR 鉴定, 并用质粒小提试剂盒提取质粒后用 *Nde* I/*Hind* III 作双酶切鉴定, 将符合预期结果的阳性克隆送英骏北京公司测序。

1.2.3 构建表达载体

测序正确的菌株提取的质粒及 pET-42a(+) 载体进行双酶切, 琼脂糖凝胶回收并纯化目的基因片段, 再和载体片段后按一定比例混合后加入 T4 DNA 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 后转化 DH5 α 感受态细胞, 卡那霉素筛选, 挑取克隆做菌落 PCR 鉴定, 并用质粒小提试剂盒提取质粒后用 *Nde* I/*Hind* III 作双酶切鉴定, 结果符合预期的质粒编号为 pET42a-UOX-Ala¹⁰³。并将之转化入表达菌株 BL21 (DE3)。

1.2.4 诱导表达

挑单克隆接种到 2 mL 含有卡那霉素 (30 μ g/mL) 的新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养。

次日, 取 0.2 mL 接种到装有 5 mL 新鲜 LB 培养基的玻璃试管内, 37°C、200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 1.0$ 时, 加入浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG, 37°C、200 r/min 培养, 诱导表达 5 h 后 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 1 mL PBS (pH 7.2) 重悬后超声破碎, 12 000× g 离心 15 min 后分全菌、上清、沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳表达情况及可溶性分析。

1.2.5 破菌及纯化

挑单克隆接种到 50 mL 含有卡那霉素 (30 μg/mL) 的新鲜 LB 培养基中, 37°C、200 r/min 过夜培养。次日, 取 20 mL 接种到装有 1 L 新鲜 LB 培养基的容量为 5 L 的玻璃摇瓶中, 诱导表达、收集菌体条件同 1.2.3。收集到的菌体用 80 mL 溶液 A (20 mmol/L PB, pH 7.2) 重悬后超声破碎、12 000× g 离心 15 min 后取上清, 加入 1/2 体积的溶液 C (20 mmol/L PB, 3 mol/L (NH₄)₂SO₄, pH 7.2) 之后上用溶液 B (20 mmol/L PB, 1 mol/L (NH₄)₂SO₄, pH 7.2) 预平衡的疏水层析柱 (Phenyl Sepharose FF), 目的蛋白结合在层析柱上, 溶液 B 再平衡后, 2 个柱体积、0% A→100% A 梯度洗脱; 疏水层析洗脱蛋白用 G-25 脱盐柱 (HiPrep 26/10 Desalting) 脱盐至溶液 D (20 mmol/L PB, 0.075 mol/L NaCl, pH 8.0) 后过阴离子层析柱 (DEAE-Sepharose FF), 收集流穿液, 加入 1/2 体积的溶液 C, 用疏水层析柱 (Phenyl Sepharose HP) 进一步精纯。精纯后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 Western blotting 分析

UOX-Ala¹⁰³ 蛋白 SDS-PAGE 电泳后电转到 PVDF 膜上 (用 UOX-Cys¹⁰³ 作参照), 用 5% 的脱脂奶粉封闭, 室温 2 h; TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 然后加一抗 (1:10 000 Anti-UOX); 37°C 孵育 2 h 后 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 然后加二抗 (1:5 000 anti-rabbit IgG-HRP); 室温孵育 1 h 后 TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 洗完后用化学发光法显影。

1.2.7 体外和体内活性分析

加 1 μg 纯化后的 UOX-Ala¹⁰³ 到含有 0.3 μmol 尿酸的 4.5 mL 的 TEA 缓冲液 (7.5 g/L 三乙醇胺, 0.38 g/L EDTA, pH 8.9) 中, 30°C 条件下反应 5 min 后加 0.5 mL 的 20% KOH 终止反应。通过检测

292 nm 处吸光度值的下降所反映的尿酸浓度的降低, 从而得出酶的活性。酶活性定义: 在 pH 8.9、30°C 条件下, 每分钟催化 1 μmol 尿酸氧化所需的酶量为一个单位^[8]。

40 只雄性 BLAB/C 小鼠, 体重 22~24 g。10 只腹腔注射 0.5 mL 生理盐水 (含 0.5% 羧甲基纤维素钠), 不给尿酸氧化酶作为空白对照。30 只腹腔注射含尿酸 (按 1 000 mg/kg 体重计) 及羧甲基纤维素钠的生理盐水 0.5 mL。其中 10 只尾静脉注射 UOX-Ala¹⁰³ (按 0.2 mg/kg 体重计); 10 只尾静脉注射等量的同等条件下纯化的 (UOX-Cys¹⁰³), 剩余 10 只不给药作为模型组。给药后分 1 h、2 h、4 h 尾静脉采血, 7 500 r/min、10 min 离心取血清检测尿酸含量。应用 SPSS11.0 统计软件包进行数据处理, 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UOX-Ala¹⁰³ 的基因突变、融合及重组质粒的鉴定

以 pMD-UOX 质粒为模板的第 1 轮扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见上游片段和下游片段分别在约 300 bp 和 600 bp 附近有扩增产物, 与预期相符 (图 1)。第 2 轮 PCR 融合得到长约 903 bp 的片段, 与预期目标一致 (图 1)。测序结果与 GenBank 公布的黄曲霉尿酸氧化酶序列进行比对, 其序列的 307~309 bp 的 TGC (Cys) 突变为 GCC (Ala), 突变成功。所构建的 pET42a-UOX-Ala¹⁰³ 质粒经 *Nde* I/*Hind* III 双酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果得到长约 903 bp 的片段 (图 2), 与预期结果一致, 证明重组质粒构建成功。

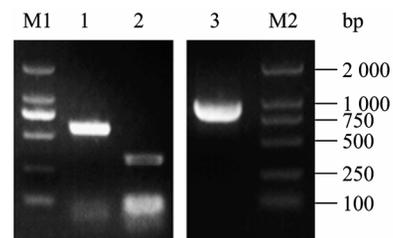


图 1 UOX-Ala¹⁰³ 定点突变

Fig. 1 The site-directed mutagenesis of UOX-Ala¹⁰³ gene by fusion PCR. 1: AU103-UP; 2: AU103-LOWE; 3: UOX-Ala¹⁰³; M1 and M2: DNA marker.

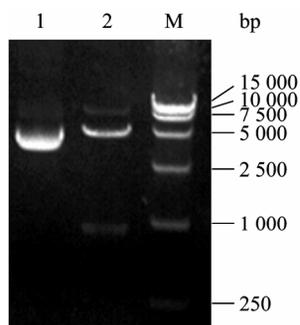


图2 质粒 pET42a-UOX-Ala¹⁰³ *Nde I/Hind III* 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid pET42a-UOX-Ala¹⁰³ by the double enzyme digestion of *Nde I/Hind III*. 1: plasmid pET42a-UOX-Ala¹⁰³; 2: pET42a-UOX-Ala¹⁰³ digested with *Nde I/Hind III*; M: DNA marker.

2.2 诱导表达及可溶性鉴定

所构建的表达菌株诱导表达后, 超声破菌, 离心后将全菌、上清、沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 与诱导前相比, 诱导后在约 34 kDa 处出现一条明显的条带, 约占全部菌体蛋白的 45%, 且绝大多数在上清中。说明重组 UOX-Ala¹⁰³ 诱导表达成功。并主要以可溶性形式存在。与未经突变的重组 UOX-Cys¹⁰³ 一致 (图 3)。

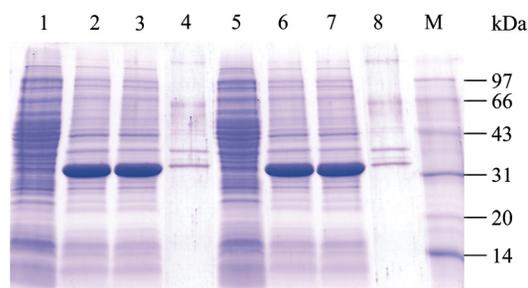


图3 SDS-PAGE 分析 UOX-Ala¹⁰³ 表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of UOX-Cys¹⁰³ expression. 1-4: UOX-Cys¹⁰³; 5-8: UOX-Ala¹⁰³; 1 and 5: total bacterial protein without induction; 2 and 6: total of the bacterial lysate after induction; 3 and 7: supernatant of the bacterial lysate after induction; 4 and 8: pellet of the bacterial lysate after induction; M: protein marker.

2.3 纯化结果 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析结果

诱导表达后的菌体超声破碎离心后的上清经三步纯化, 得到纯度大于 98% 的 UOX-Ala¹⁰³ 重组蛋白 (图 4A)。Western blotting 分析结果证明其能够与抗 UOX 的单克隆抗体特异结合 (图 4B)。

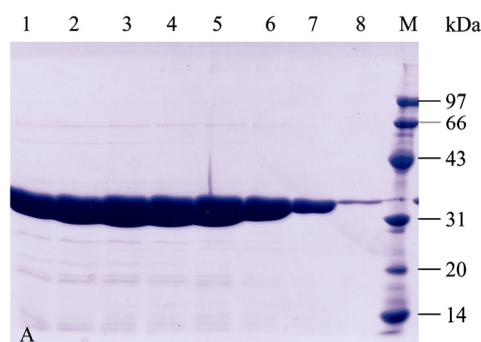


图4 三步纯化后的 UOX-Ala¹⁰³ 蛋白的 SDS-PAGE 分析 (A) 及 Western blotting 分析 (B)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis and of UOX-Ala¹⁰³ Western blotting analysis after three-step purification. (A) SDS-PAGE analysis. 1-8: UOX-Ala¹⁰³ after three-step purification; M: protein marker. (B) Western blotting analysis. 1: UOX-Cys¹⁰³; 2: UOX-Ala¹⁰³.

2.4 体外和体内活性分析结果

按照 1.2.6 所述方法测定, 纯化后的 UOX-Ala¹⁰³ 比活力为 20.14 IU/mg, 同等条件下表达纯化的 UOX-Cys¹⁰³ 比活力为 12.62 IU/mg, 103 位的 Cys 突变为 Ala 之后比活增加了 59.57%。体内活性实验结果如表 2 所示, 相对于空白组, 模型组的小鼠血清中的尿酸的含量在各时间点均有很大提高 (1 h, 2 h: $P < 0.01$; 4 h: $P < 0.05$), 造模成功。与模型组相比较, UOX-Cys¹⁰³ 及 UOX-Ala¹⁰³ 组的小鼠血清中的尿酸含量下降明显 (各时间点 $P < 0.001$), 证明二者均有降低高尿酸血症模型小鼠体内尿酸的作用, UOX-Cys¹⁰³ 与 UOX-Ala¹⁰³ 相比无统计学意义差异, 在本次实验内未能观测到 UOX 的 Cys¹⁰³ → Ala¹⁰³ 突变后对体内活性的影响。

表2 注射 UOX 后小鼠体内的尿酸浓度 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)
Table 2 Concentration of uric acid in mouse after UOX was injected ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

<i>t</i> (h)	Concentration of uric acid in mouse ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)		
	1	2	4
Blank control	115±30	144±32	127±31
Model	263±16	296±25	187±38
UOX-Cys ¹⁰³ (0.2 mg/kg)	0±0	60±22	59±21
UOX-Ala ¹⁰³ (0.2 mg/kg)	0±0	59±37	52±27

3 讨论

黄曲霉尿酸氧化酶的活性形式是由 4 个分子量约为 34 kDa 的单体组成的同四聚体, 4 个亚基围在

一起形成了一个隧道式结构。整个结构好像一个高 70 Å、外径约为 60 Å、内径约为 12 Å 的桶。四聚体的稳定主要靠接触面上的反向平行的 β 折叠主链原子之间的氢键维系。每个四聚体含有 4 个活性中心, 由 Phe¹⁵⁹、Arg¹⁷⁶、Gln²²⁸、Asn²⁵⁴、His²⁵⁶ 及相邻的亚基的 Lys¹⁰、Thr⁵⁷ 组成^[9-13], 用 *Launch Discovery Studio* 软件对 UOX 的晶体结构 (1R56.pdb) 进行分析发现四聚体内的活性位点位于 2 个相邻亚基之间的交界处 (图 5), 故推测其活性对四聚体的结构变动较为敏感。UOX 含有 3 个半胱氨酸 Cys³⁵、Cys¹⁰³、Cys²⁹⁰, 晶体结构表明, 其中 Cys³⁵、Cys²⁹⁰ 的硫原子朝向四聚体孔道的内部, 与溶液中的游离半胱氨酸接触几率很小, 纯化后的成品中此 2 个位置不含 Cys 加合物。而 Cys¹⁰³ 的硫原子朝向四聚体的外表面 (图 6), 与溶液中的游离半胱氨酸接触几率很大。所以 UOX-Cys¹⁰³ 在制备过程中, Cys¹⁰³ 会与游离的 Cys 通过二硫键结合, 使之多出一个 Cys 加合物, 从而引起等电点降低、极性增加、活性下降等现象^[7]。本研究中将 Cys¹⁰³ 突变为侧链不含硫原子的 Ala, 所以纯化后的蛋白质中不含 Cys 加合物, 从而使其在体外活性增加。体内活性实验中, 二者在体内降解尿酸的能力相当, 原因可能是因为体内环境下没有维系二硫键的有利氧化势, 这种非正常的二硫键会

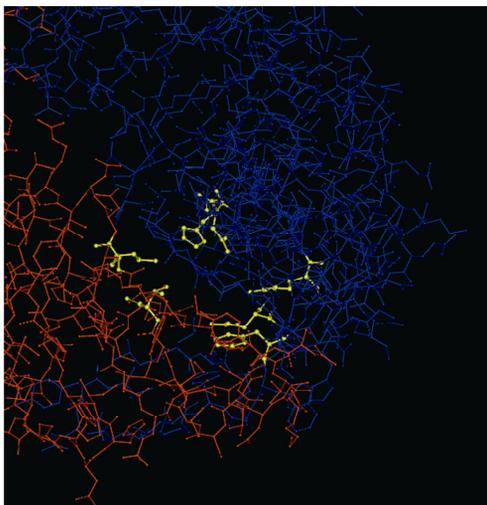


图 5 UOX 活性位点与四聚体中各亚基的位置关系
Fig. 5 Relative position of active site with subunits in the tetramer. Amino acids constituted active site is shown in yellow. The A subunit is shown in blue. The B subunit is shown in brown.

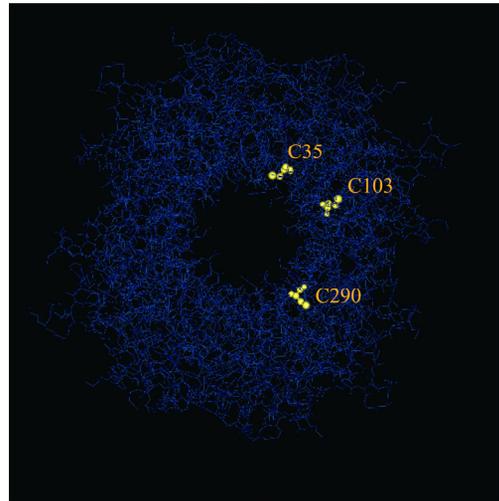


图 6 UOX 一个亚基中的半胱氨酸在四聚体中的位置
Fig. 6 Representation of one monomer's cysteine in the tetramer. The cysteine is shown in yellow.

在二硫化物异构酶的作用下解开, 消除了 Cys 加合物对其结构的影响, 也有可能是因为所采用的标准剂量 (0.2 mg/kg 体重) 对于本实验来说过高, 所以掩盖了二者的差异, 有待进一步的实验验证。

黄曲霉尿酸氧化酶是罕见的隧道式蛋白 (Tunneling-fold protein) 家族 4 个成员中最新发现的一个, 其中心孔道的作用至今尚不明确^[12]。而黄曲霉尿酸氧化酶的催化相对于其他的氧化还原酶类是十分独特的, 因为它没有金属离子或其他辅基参与到电子传递之中^[9]。其催化机理还存在很多的争议。本研究通过突变的方法获得了体外活性比野生型更高的 UOX-ala¹⁰³ 突变体, 可以使其在尿酸的各种体外检测中更加有效。另外, 本研究为从结构上进一步研究隧道式蛋白结构与功能之间的关系及黄曲霉尿酸氧化酶的催化原理打下基础。

REFERENCES

- [1] Wu X, Lee CC, Muzmy DM, *et al.* Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(23): 9412-9416.
- [2] Oestreicher N, Scazzocchio C. Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 1993, **268**(31): 23382-23389.
- [3] Coiffier B, Mounier N, Bologna S, *et al.* Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the

- prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-hodgkin's lymphoma: results of the GRAAL1 (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Trial on Rasburicase Activity in Adult Lymphoma) study. *J Clin Oncol*, 2003, **21**(23): 4402–4406.
- [4] 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.
- [5] Oda M, Satta Y, Takenaka O, *et al.* Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**(5): 640–653.
- [6] Wu SL, Chen B, Liu CQ, *et al.* Expression in *Escherichia coli*, purification and enzymatic properties of porcine urate oxidase. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(11): 1664–1670.
吴双林, 陈斌, 刘成倩, 等. 猪尿酸氧化酶在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析. *生物工程学报*, 2009, **25**(11): 1664–1670.
- [7] Bayol A, Capdevielle J, Malazzi P, *et al.* Modification of a reactive cysteine explains differences between rasburicase and uricozyme, a natural *Aspergillus flavus* uricase. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002, **36**: 21–31.
- [8] Li J, Chen Z, Hou L, *et al.* High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, **49**(1): 55–59.
- [9] Colloc'h N, Girard E, Dhaussy AC, *et al.* High pressure macromolecular crystallography: the 140-MPa crystal structure at 2.3 Å resolution of urate oxidase, a 135-kDa tetrameric assembly. *Biochim Biophys Acta*, 2006 **1764**(3): 391–397.
- [10] Retailleau P, Colloc'h N, Vivares D, *et al.* Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: a reassignment of the active-site binding mode. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**: 453–462.
- [11] Gabison L, Prange 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**: 32.
- [12] Retailleau P, Colloc'h N, Vivarès D, *et al.* Urate oxidase from *Aspergillus flavus*: new crystal-packing contacts in relation to the content of the active site. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61**: 218–229.
- [13] Colloc'h N, el Hajji M, Bachet B, *et al.* Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**: 947–952.