

# 恶臭假单胞杆菌肌酐酶在大肠杆菌中的表达及其酶学特性分析

侯赣生, 林影, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 肌酐酶 (Creatininase) 是肌酐酶法检测的一个关键酶, 将恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 肌酐酶基因 (Cre) 克隆至原核表达载体 pET-28a (+), 通过 IPTG 的诱导, 实现了肌酐酶 Cre 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 的可溶性表达。表达产物经 60 °C 加热处理、Ni-NTA 亲和层析和 Sephadex G-200 分子筛层析, 分离纯化出重组肌酐酶, 回收率为 29.3%, 其比酶活达到 489.17 U/mg, 是已有文献中报道中的最高水平。进一步进行酶学特性分析, 结果表明其最适反应温度为 60 °C, 50 °C 以下可以稳定保存, 具有良好的热稳定性; 最适 pH 值为 7.0, 在 pH 7.0~8.0 条件下比较稳定; Cu<sup>2+</sup> 会抑制肌酐酶的活性; Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 对肌酐酶有明显的激活作用; EDTA、SDS、Tween-20、Tween-80 和 Triton-100 几乎对酶活力没影响; NaN<sub>3</sub> 不影响酶的活力。以肌酸为底物时, 酶动力学常数 Km 值为 47.38 mmol/L。本研究在大肠杆菌系统成功实现肌酐酶的可溶性表达, 进行分离纯化并测定其酶学性质, 为肌酐酶的表达和潜在工业化应用提供理论基础。

**关键词:** 恶臭假单胞杆菌; 肌酐酶; 大肠杆菌; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2017)9-77-82

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.011

## Expression of Creatininase from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* and Its Enzymatic Characteristics Analysis

HOU Gan-sheng, LIN Ying, LIANG Shu-li

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Creatininase is the key enzyme used for creatinine enzymatic detection. The Cre gene from *Pseudomonas putida* was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a (+) and expressed in the soluble form by *Escherichia coli* BL21 (DE3) after induction of isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside. The expressed product was purified and isolated using heat treatment at 60 °C, nickel-nitrilotriacetic acid affinity chromatography, and Sephadex G-200 gel filtration to yield recombinant creatininase. The recovery rate was 29.3%, and the specific activity was 489.17 U/mg, which was the highest level reported to date. The enzymatic characteristics of Cre were further analyzed, and the results showed that the optimum temperature was 60 °C. Additionally, the recombinant Cre showed good thermal stability and could be stably stored at less than 50 °C; the optimum pH value was 7.0, and the enzyme was relatively stable at pH 7.0~8.0. The activity of Cre could be inhibited by copper (II), but significantly increased by manganese (II), zinc (II), and cobalt (II). (Ethylenedinitrilo) tetraacetic acid(EDTA), sodium dodecyl sulfate(SDS), Tween-20, Tween-80, and Triton-100 had almost no effect on Cre activity, and sodium azide did not have any effect on Cre activity. When creatine was used as a substrate, the enzyme kinetic constant Km value of Cre was 47.38 mM. In summary, the expression of the soluble form of creatininase was successfully achieved in an *E. coli* system, and purification and analysis of the enzymatic characteristics of the creatininase were performed, establishing a theoretical foundation for the expression and potential industrial applications of creatininase.

**Key words:** *Pseudomonas putida*; creatininase; *Escherichia coli*; enzymatic characteristics

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31400062); 广州市创新创业领军人才百人计划项目 (LCY201322); 中央高校基本科研业务费项目 (2017MS103)

作者简介: 侯赣生 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶学与酶工程

肌酐是人体中重要的代谢产物, 血液中肌酐含量需维持在一定的正常水平, 多余的肌酐将通过肾脏系统排到体外<sup>[1]</sup>; 而人体肾脏功能障碍会导致肌酐无法随尿液排出, 从而使得血液中肌酐含量升高, 因此血液和尿液中肌酐的含量是肾脏功能检测指标之一<sup>[2]</sup>。检测肌酐的方法主要有毛细管电泳法<sup>[3]</sup>、碱性苦味酸

法<sup>[4]</sup>和 HPLC 检测法<sup>[5]</sup>等,但这些方法存在反应特异性差、操作复杂及成本较高的问题。酶法检测肌酐具有反应特异性强及操作简单等优点,目前临床主要是采用酶法对肌酐进行检测,其中三个关键酶分别为肌酐酶(Creatininase, EC 3.5.2.10)、肌酸酶(Creatinase, EC 3.5.3.3)以及肌氨酸氧化酶(Sarcosine oxidase, EC 1.5.3.1)<sup>[6]</sup>。肌酐在肌酐酶作用下水解生成肌酸,肌酸再经肌酸酶和肌氨酸氧化酶转化生成甘氨酸、甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,通过测定甲醛或者 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量可确定样品中肌酐的浓度<sup>[7]</sup>。

作为酶法检测肌酐的关键酶,肌酐酶催化肌酐水解为肌酸的可逆反应。在自然环境中,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)<sup>[8]</sup>、产脉节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)<sup>[9]</sup>、烟草节杆菌(*Arthrobacter nicotianae*)<sup>[10]</sup>等微生物均可产生一定的肌酐酶。但野生菌株<sup>[11~13]</sup>存在着肌酐酶产量低、工业化放大困难的问题,这很大程度上导致肌酐酶生产成本过高,如何进一步实现肌酐酶的高效表达对于促进其在肌酐酶法检测中的应用尤为重要。

Yamamoto K 等<sup>[8]</sup>和 Tang T Y 等<sup>[14]</sup>分别实现了假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)来源和 *P. putida* 来源的肌酐酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的表达,但表达的肌酐酶比酶活不高,且存在纯化方法复杂、酶蛋白回收率低等问题。本研究根据 *E. coli* 密码子偏好性全基因合成来源于 *P. putida* 的肌酐酶基因 Cre,实现其在 *E. coli* BL21 (DE3) 的可溶性高效表达,在建立快速有效纯化方法的基础上,对酶学性质进行分析,为肌酐酶的表达和潜在工业化生产应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* Top10、*E. coli* BL21 (DE3) 和质粒 pET-28a(+)均为华南理工大学生物科学与工程学院微生物学实验室保存。

#### 1.1.2 试剂和培养基

KOD DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PCR Mix、DNA Marker 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,生物素和蛋白质分子量标准购自美津生物公司,酵母氮源 YNB (Yeast Nitrogen Base)、蛋白胨均购自 Difco 公司;酵母抽提物购自 Oxford 公司;其他试剂均为市售国产分析纯。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自捷瑞生物工程有限公司;质粒提取试剂盒(Plasmid Miniprep Kit)和 PCR 纯化试剂盒购自美津生物公司。

酶活测定试剂:肌酸溶液(0.1 mol/L 肌酸,以 50 mmol/L PBS 新鲜配制),0.5 mol/L NaOH 和 1.0% (m/V) 苦味酸。Buffer A:氯化钠 0.5 mol/L, Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8.0; Buffer B:氯化钠 0.5 mol/L, Tris-HCl 20 mmol/L, 咪唑 0.3 mol/L, pH 8.0。

LB 培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10, NaCl 10; TB 培养基(g/L):酵母粉 24,蛋白胨 12,甘油 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.43, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31。

#### 1.1.3 仪器与设备

SKY2102S 小容量恒温培养摇床(上海速坤仪器仪表有限公司)、5804R 型高速冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司)、AKTA 蛋白纯化系统(美国通用电气公司)、UV-2350 型分光光度计(UNICO 公司)、PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)、HisTrap™ FF crude 预装柱(美国通用电气公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因合成及表达载体构建

根据肌酐酶 Cre 的蛋白序列(Accession No: 1Q3K\_A)<sup>[15]</sup>,使用 OptimumGene™ 对密码子偏好性进行优化,并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成。根据优化后的全合成 Cre 基因序列,设计克隆引物。质粒 pET-28a (+) 多克隆位点区域自带 6 个编码组氨酸的密码子作为 His 标签,标签后同时自带终止密码子,设计下游引物时去除终止密码子 TAA。上游采用 Nco I 酶切位点,引物为 Cre-F (CGGCCATGGATG TCTAAGTCTGTT)(下划线为酶切位点);下游采用 Xho I 酶切位点,引物为 Cre-R (ATACTCGAG AGTTGGTGGGAAGCTC)(下划线为酶切位点,未加终止密码子)。质粒 pGH-Cre 为模板,以 Cre-F 和 Cre-R 为引物,扩增 Cre 基因序列。Cre 基因和质粒 pET-28a (+) 分别进行双酶切,产物回收后采用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶进行连接。连接产物转入 *E. coli* Top10,涂布于含 0.1 mg/mL 卡那霉素的 LB 平板,37 °C 过夜培养。挑取阳性转化子过夜培养后提取质粒,进行双酶切鉴定并送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

### 1.2.2 酶的诱导表达、纯化、SDS-PAGE 分析及蛋白浓度测定

将重组表达载体 pET-28a-Cre (Cre 的 C 端带有 pET 系列载体的 His 标签)转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中,菌落 PCR 鉴定后,挑取阳性转化子接入 10 mL LB 培养基(含 0.1 mg/mL Kna<sup>+</sup>)中,37 °C、250 r/min 培养 12 h。随后将种子液以 1% 的接种量接种至 TB 发酵培养基(含 0.1 mg/mL Kna<sup>+</sup>)中,37 °C 进行培养。待

OD<sub>600</sub> 达到 0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L 进行诱导, 置于 30 °C、250 r/min 条件下发酵 12 h。

取 550 mL 发酵液(OD<sub>600</sub> 为 3), 常温下 8000 r/min 离心 15 min, 弃上清; 收集菌体, 用纯水洗涤两次后加入 100 mL Buffer A 缓冲液重悬菌体。在冰浴条件下利用超声波细胞破碎仪处理细胞, 破碎条件为 6 mm 变幅杆、功率 300 W, 时间 60 min, 样品体积为 50 mL。超声波处理后 8000 r/min、25 °C, 离心 15 min, 得到的上清为粗酶液。60 °C 下热处理粗酶液 30 min, 将部分杂蛋白沉淀析出。于 4 °C 下 10000 r/min 离心 60 min, 去除杂蛋白并收集上清液。随后利用 AKTA 蛋白纯化系统和 5 mL HisTrap™ FF crude 预装柱纯化加热处理后的上清, 用 80% Buffer B 将目的蛋白洗脱。收集的蛋白洗脱液上样至经 20 mmol/L、pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephadex G-200 分子筛层析柱, 用含有 150 mmol/L KCl 的缓冲液洗脱, 收集目的蛋白。采用 Bradford 法<sup>[16]</sup>测定蛋白浓度。

### 1.2.3 肌酐酶活性测定

肌酸在肌酐酶作用下转化为肌酐, 肌酐与苦味酸在氢氧化钠条件下会生成橘红色复合物。复合物的生成量与肌酐酶酶活成正比, 在 520 nm 波长下测定吸光度。苦味酸肌酐复合物的毫摩尔消光系数为 4.65<sup>[10]</sup>。

取 0.9 mL 肌酸溶液至试管中, 37 °C 放置 5 min; 加入 0.1 mL 酶液, 混匀后于 37 °C 反应 10 min。迅速移取 0.1 mL 反应液至 1.9 mL NaOH 溶液中, 加入 1.0 mL 苦味酸, 于 25 °C 放置 20 min; 在 520 nm 处测定 OD 值。以煮沸的灭活酶液为空白对照。酶活力单位 (U) 定义: 在上述条件下, 产生 1 μmol/min 苦味酸肌酐复合物为 1 个活力单位。

### 1.2.4 肌酐酶酶学特性分析

**最适反应温度及热稳定性:** 在 pH 8.0 条件下, 30 °C~80 °C 的温度范围测定酶活力, 确定酶的最适反应温度; 酶分别在 50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 条件下进行保温, 0 h、0.5 h、1 h、2 h 和 3 h 取样测定酶活力, 考察酶的热稳定性。

**最适 pH 及 pH 稳定性:** 在 37 °C 条件下, pH 4.0~11.0 的范围测定酶活力, 确定酶的最适反应 pH; 酶分别在 pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0 和 pH 10.0 条件下进行保温, 0 h、0.5 h、1 h、2 h 和 3 h 取样测定酶活力, 确定酶的 pH 稳定性。

**K<sub>m</sub> 值测定:** 以肌酸为底物, 在底物浓度为 5、10、20、30、40 和 50 mmol/L 时分别进行酶活测定, 以 1/OD<sub>520</sub> 为纵坐标、1/[s] 为横坐标进行双倒数绘图, 从而计算得到 K<sub>m</sub> 值。

**二价金属离子对 Cre 活力的影响:** 将酶液加至含

有 1 mmol/L Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Li<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 或 Co<sup>2+</sup> 溶液中, 以不加金属离子的反应体系作为对照, 于最适反应条件下测定酶活力。

**不同化学物质对酶活力的影响:** 将酶液加至含有 5 mmol/L EDTA、1 mmol/L NaN<sub>3</sub>、1% SDS、1% Tween-20、1% Tween-80 或 1% Trinton-100 的反应体系中测定酶活力, 以不加化学物质的反应体系作为对照, 于最适反应条件下测定酶活力。

所有活力测定均重复三次, 结果以平均值和标准偏差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组工程菌的构建

以质粒 pGH-Cre 为模板扩增 Cre 基因, 在 800 bp 左右有一条 DNA 条带, 与目的基因大小相符。将其用 Nco I 和 Xho I 酶切后与质粒 pET-28a (+) 连接构建重组质粒 pET-28a-Cre。重组质粒通过双酶切鉴定并送样至上海生工生物工程有限公司进行测序, 利用 Clustal X 软件对测序结果进行比对, 结果显示测序结果与目的基因序列一致。随后将重组质粒 pET-28a-Cre 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 得到肌酐酶重组表达菌株。

### 2.2 重组 Cre 的表达和纯化

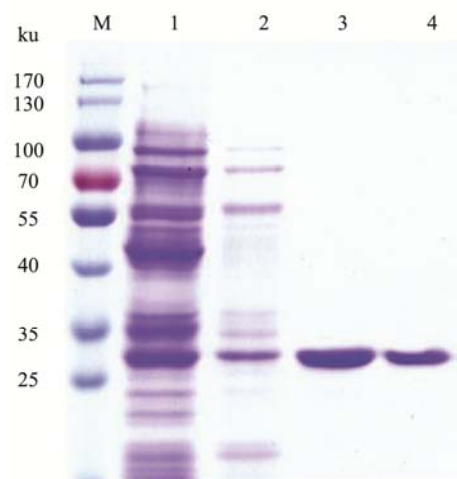


图 1 不同纯化步骤后重组 Cre 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of recombinant Cre purified by different steps

注: M 表示蛋白分子量标准; 1 表示粗酶液; 2 表示热处理; 3 表示 Ni 柱亲和层析; 4 表示 Sephadex G-200 分子筛层析。

挑取阳性转化子, 按照方法 1.2.2 对重组工程菌进行发酵, 收集菌体。超声破碎后制得粗酶液, 其酶活为 74.39 U/mL。在 60 °C 条件下热处理后保留了 82.66% 的总酶活, 而比酶活提高了 1.53 倍。随后利用



AKTA 蛋白纯化系统进行纯化, 结果表明在 80% Buffer B 条件下洗脱时出现目的蛋白峰; 再经过亲和层析, 肌酐酶比酶活提高至 453.53 U/mg; 最后通过 Sephadex G-200 分子筛层析柱进行进一步纯化。

Inouye Y<sup>[9]</sup>等纯化了来源于 *A. ureafaciens* 的肌酐酶, 回收率为 16.00%, 比酶活为 96.00 U/mg; 赵更峰等<sup>[7]</sup>纯化了一株节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 的肌酐酶, 利用 5 个纯化步骤对其进行纯化, 回收率为仅 6.6%, 比酶活为 209.10 U/mg; 目前公开报道的比酶活最高的是 Rikitake K 等<sup>[13]</sup>报道的肌酐酶, 比酶活为 488.00

U/mg, 但是其经过 6 个纯化步骤获得, 回收率为 11.00%。本研究利用大肠杆菌外源表达的肌酐酶, 经过 3 个纯化步骤纯化得到了电泳纯的肌酐酶 (图 1), 电泳结果显示于 25~35 ku 处有一蛋白条带, 条带大小与预计的 28.4 ku 相符, 与 *P. putida* RS65<sup>[14]</sup>来源的肌酐酶亚基 (28 ku) 大小接近, 而 *Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup>来源的肌酐酶亚基分子量较大, 大小为 33.7 ku。本研究所建立的纯化方法具有简单快速, 回收率高的优势。纯化后, 酶的比活力达到 489.17 U/mg, 酶蛋白回收率达到 29.31% (表 1)。

表 1 肌酐酶的纯化

Table 1 Purification of the recombinant Cre

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	7439.16	179.13	41.53	1.00	100.00
加热	6149.52	58.63	104.89	2.53	82.66
镍柱亲和层析	2399.21	5.29	453.53	10.92	32.25
Sephadax G-200	2181.14	4.45	489.17	11.78	29.32

2.3 肌酐酶最适反应温度及热稳定性

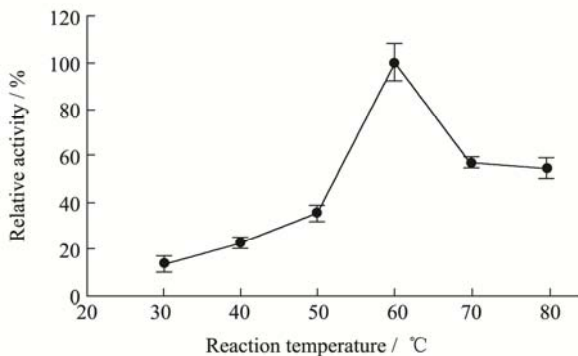


图 2 温度对 Cre 活力的影响

Fig.2 Effects of temperature on the enzyme activity of Cre

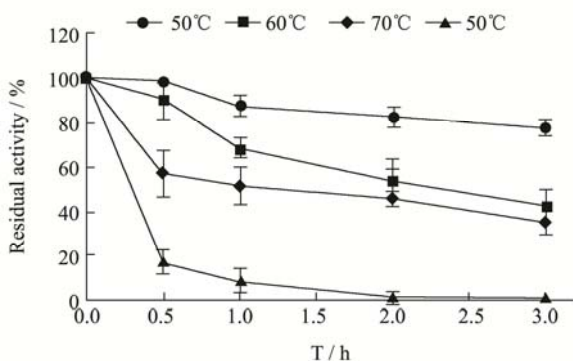


图 3 温度对 Cre 稳定性的影响

Fig.3 Effects of temperature on the thermostability of Cre

根据方法 1.2.4 测定肌酐酶的最适反应温度及其热稳定性, 结果表明重组肌酐酶的最适反应温度为 60 °C, 与报道的 *Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup>所产肌酐酶一致, 高于 *P. putida* RS65<sup>[14]</sup>和 *Arthrobacter* sp. TE 1826<sup>[17]</sup>

来源肌酐酶的最适温度。在 70 °C 和 80 °C 时酶活力保持 60% 左右 (图 2), 亦优于 *Arthrobacter* sp. 42-1 的肌酐酶; 而在温度低于 50 °C 时, 酶活力急剧下降。50 °C 时酶稳定性最好, 保温 3 h 后依然维持 80% 以上的酶活力。70 °C 保温 3 h 后维持 40% 左右的酶活力; 优于 *Arthrobacter* sp. 42-1 肌酐酶的热稳定性; 80 °C 时酶活力下降较快, 保温 2 h 后酶活力几乎丧失 (图 3)。

2.4 Cre 的最适 pH 及 pH 稳定性

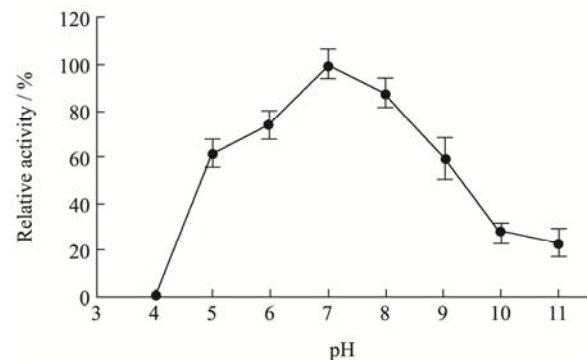


图 4 pH 对 Cre 活力的影响

Fig.4 Effects of pH on Cre activity

在 37 °C 条件下测定重组肌酐酶的最适 pH 值 (图 4), 结果表明酶的最适反应 pH 为 7.0, 与 *P. putida* RS65<sup>[15]</sup>和 *Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup>所产肌酐酶的最适 pH 相近, 酶活力在 pH 值 5.0~9.0 的范围内维持 60% 以上。利用蛋白质结构分析网站 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 预测该酶的等电点为 5.23, 这可能是导致该酶在 pH 为 5.0 时酶活力较低的原因。常温 (25 °C) 条件下, 将酶分别在 pH 6.0~10.0 缓冲溶液

中处理不同时间后测定酶活力，结果显示在 pH 7.0~8.0 条件下处理 3 h，剩余酶活力在 84%以上（图 5）。重组肌酐酶 Cre 在中性条件下具有较好的稳定性，与 *Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup> 所产肌酐酶一致，而 *Alcaligenes* sp. 5071<sup>[9]</sup> 的肌酐酶则在 pH 9.0~11.0 条件下比较稳定。

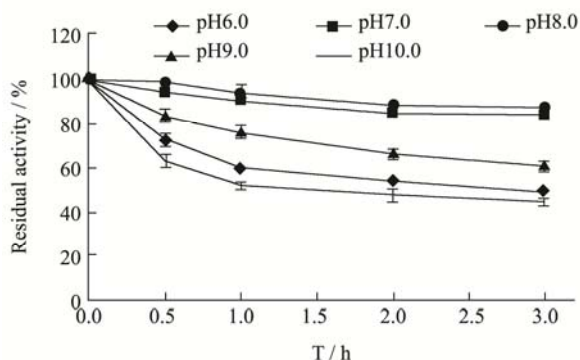


图5 重组Cre的pH稳定性

Fig.5 Effects of pH on the stability of Cre

### 2.5 Cre 的 $K_m$ 值测定

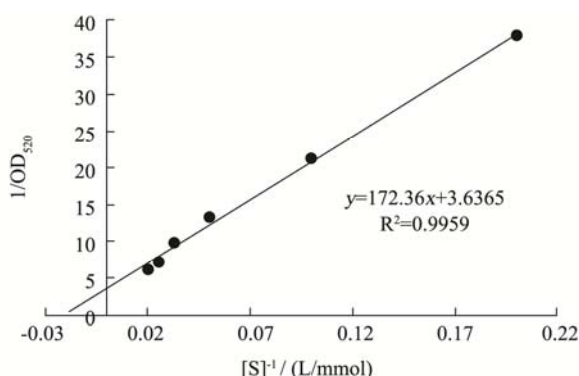


图6 Cre 的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.6 Lineweaver-Burke plot of Cre

以肌酸作为反应底物，测定不同浓度底物对酶活性的影响，再通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程求得 Cre 的米氏常数  $K_m$  值为 47.38 mmol/L。以肌酸为反应底物时，*Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup> 所产肌酐酶  $K_m$  值为 21.14 mmol/L，*Alcaligenes* sp. 5071<sup>[9]</sup> 产生的肌酐酶  $K_m$  值为 60.90 mmol/L，*Arthrobacter* sp. TE 1826<sup>[17]</sup> 所产肌酐酶  $K_m$  值为 66.00 mmol/L，相较而言本研究表达的重组 Cre 对底物肌酸有较好的底物亲和力。

### 2.6 金属离子及化学物质对肌酐酶活力的影响

在含不同金属离子的溶液中进行酶活力测定，结果如表 2 所示。Cu<sup>2+</sup> 可以部分抑制酶的活性，Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 对酶活有明显的促进作用。*Alcaligenes* sp.

5071<sup>[9]</sup> 所产的肌酐酶只能以 Mn<sup>2+</sup> 作为反应中心的离子，Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 会起到抑制作用。Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 能激活 *Arthrobacter* sp. 42-1<sup>[7]</sup> 所产的肌酐酶，活性可被 Cu<sup>2+</sup> 所抑制。

稳定剂和保护剂在酶的制剂化和使用过程中至关重要，本研究进一步分析了不同化学物质对酶活力的影响。结果如表 3，可能是由于酶蛋白内部结构的金属离子被紧密包裹的原因，金属离子螯合剂 EDTA 只有轻微的抑制作用，而 SDS、Tween-20、Tween-80 和 Trinton-100 对酶活力没影响，NaN<sub>3</sub> 的存在也不影响酶的活力，这为重组酶 Cre 的保存和使用提供一定的理论依据。

表2 不同金属离子对 Cre 活力的影响

Table 2 Effects of different metal ions on Cre activity

Metal	Final concentration / (mmol/L)	Relative activity / %
No addition	-	100
Ba <sup>2+</sup>	1	98.34±3.16
Ca <sup>2+</sup>	1	97.65±5.91
Mg <sup>2+</sup>	1	97.36±3.78
Fe <sup>2+</sup>	1	102.92±7.74
Mn <sup>2+</sup>	1	127.58±5.43
Zn <sup>2+</sup>	1	133.06±9.25
Co <sup>2+</sup>	1	110.28±5.97
Ni <sup>2+</sup>	1	94.71±6.11
Cu <sup>2+</sup>	1	80.42±5.63

表3 不同化学物质对 Cre 活力的影响

Table 3 Effects of different chemicals on Cre activity

Chemicals	Final concentration	Relative activity / %
No addition	-	100
EDTA	5 mmol/L	95.18±5.89
Tween-20	0.1%	92.37±3.12
Tween-80	0.1%	95.41±6.24
Trinton-100	0.1%	94.73±5.53
SDS	0.1%	91.69±8.75
NaN <sub>3</sub>	1 mmol/L	100.63±4.33

### 3 结论

Cre 作为酶法测定肌酐中的关键酶，在临床检测肾脏功能中起着重要作用，开发稳定性好、酶活力高、耐性强的肌酐酶尤为必要。本研究在实现 *P. putida* 肌酐酶 Cre 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中可溶性表达的基础上，进行酶的分离纯化并分析其酶学特性。肌酐酶比酶活达 489.17 U/mg， $K_m$  值为 47.38 mmol/L。最适温

度和最适 pH 分别为 60 °C 和 7.0; 在 50 °C 条件下处理 3 h 剩余酶活力仍可以保留 80% 以上, 在 pH 7.0~8.0 条件下处理 3 h 剩余酶活力亦可以保留 84% 以上。 $\text{Cu}^{2+}$  可以抑制酶的活性; 而  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  对酶活有明显的促进作用, 可作为酶的激活剂。EDTA 处理对酶活没有显著影响,  $\text{NaN}_3$  能够抑制细胞色素氧化酶的活力从而抑制细菌的生长, 不影响酶的活力, 因而可以作为保护剂在酶的制备和保存中使用。本研究表达的 Cre 具有良好的酶学性质, 可以用简单快速的方法进行纯化, 但蛋白表达量依然有提高的空间, 可以尝试对表达元件进行一定的改造或对发酵条件进行优化以提高 Cre 的表达量; 将有助于肌酐酶生产成本的降低, 从而为肌酐酶的制剂化及其潜在工业化生产应用提供基础。

### 参考文献

- [1] Eun J K, Tesrya H, Yasuko Y, et al. Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 394(2-3): 225-231
- [2] Zhi Q, Kong P Y, Zang J T, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel high activity creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* strain 02181 [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(4): 460-465
- [3] Costa A C O, Costa J L D, Tonin F G, et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1171(1-2): 140-143
- [4] Pu F S, Chiou W L. Creatinine VII: Determination of saliva creatinine by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1979, 68(4): 534-535
- [5] Vasiliades J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex [J]. *Clinical Chemistry*, 1976, 22(10): 1664-1671
- [6] Fossati P, Prencipe L, Berti G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement [J]. *Clinical Chemistry*, 1983, 29(8): 1494-1496
- [7] 赵更峰, 马晓航, 贾小明, 等. 节杆菌肌酐水解酶的纯化及特性研究 [J]. *生物工程学报*, 2005, 21(2): 250-253  
ZHAO Geng-feng, MA Xiao-hang, JIA Xiao-ming, et al. Purification and characteristics of creatininase from *Arthrobacter* sp. [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(2): 250-253
- [8] Yamamoto K, Oka M, Kikuchi T, et al. Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from *Pseudomonas* sp. PS-7 [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1995, 59(7): 1331-1332
- [9] Inouye Y, Matsuda Y, Naid T, et al. Purification and characterization of creatinine amidohydrolase of *Alcaligenes* origin [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1986, 34(5): 2155-2160
- [10] 崔有宏, 罗侃, 郑强, 等. 肌酐测定工具酶产生菌-烟草节杆菌 02181 的筛选及其产酶条件 [J]. *甘肃科学学报*, 2005, 17(2): 49-53  
CUI You-hong, LUO Kan, ZHENG Qiang, et al. *Arthrobacter Nicotianae* 02181, which produces enzymes for diagnostic measurement of creatinine, and its selected conditions for producing enzymes [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2005, 17(2): 49-53
- [11] 崔有宏, 罗侃, 郑强, 等. 肌酐测定的酶学方法 [J]. *西北国防医学杂志*, 2003, 24(2): 129-131  
CUI You-hong, LUO Kan, ZHENG Qiang, et al. Enzymatic method for determining creatinine [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2003, 24(2): 129-131
- [12] Parekh A C, Cook S, Sims C, et al. A new method for the determination of serum creatinine based on reaction with 3, 5-dinitrobenzoyl chloride in an organic medium [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1976, 73(2): 221-231
- [13] Rikitake K, Oka I, Ando M, et al. Creatinine amidohydrolase (creatininase) from *Pseudomonas putida*: purification and some properties [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1979, 86(4): 1109-1117
- [14] Tang T Y, Wen C J, Liu W H. Expression of the creatininase gene from *Pseudomonas putida* RS65 in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 24(1): 2-6
- [15] Beuth B, Niefind K, Schomburg D. Crystal structure of creatininase from *Pseudomonas putida*: a novel fold and a case of convergent evolution [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(1): 287-301
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248-254
- [17] Nishiya Y, Toda A, Imanaka T. Gene cluster for creatinine degradation in *Arthrobacter* sp. TE1826 [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1998, 257(5): 581-586