

## 节杆菌肌酐水解酶的纯化及特性研究

# Purification and Characteristics of Creatininase from *Arthrobacter* sp.

赵更峰<sup>1,2</sup>, 马晓航<sup>1\*</sup>, 贾小明<sup>1</sup>, 赵宇华<sup>1</sup>, 王园园<sup>1</sup>

ZHAO Geng-Feng<sup>1,2</sup>, MA Xiao-Hang<sup>1\*</sup>, JIA Xiao-Ming<sup>1</sup>, ZHAO Yu-Hua<sup>1</sup> and WANG Yuan-Yuan<sup>1</sup>

1. 浙江大学生命科学院, 杭州 310029

2. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

**摘要** 研究了产自于一株节杆菌的肌酐水解酶。该肌酐水解酶经热处理、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Cellulose 离子交换、疏水层析后, 酶提纯了 145 倍, 比活力达 209u/mg。SDS-PAGE 测定显示该酶亚基质量为 33.7kD。对酶特性的研究表明: 酶在 pH6.0~9.0、60℃ 以下稳定, 对肌酐的  $K_m$  值为 21.14mmol/L。Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 和邻菲罗啉能使酶完全丧失活性, Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对酶活性有明显促进作用。

**关键词** 肌酐, 肌酐水解酶, 特性

**中图分类号** Q814.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0250-04

**Abstract** A creatininase produced from a *Arthrobacter* sp. was purified 145-fold by a series of steps including heat treatment, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Cellulose ion-exchange and hydrophobic chromatography. The specific activity of the pure enzyme was 209u/mg. The subunit molecular mass of creatininase was estimated to be 33 700D by SDS-PAGE. The creatininase was stable in the pH range between 6.0~9.0 and below 60°C. Its  $K_m$  value for creatinine was estimated to be 21.14mmol/L. The enzyme was markedly inactivated by incubation with 1mmol/L of Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and 20mmol/L of 1, 11-Phanthroline respectively. Activation was observed when the enzyme was incubated with 1mmol/L of Co<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>.

**Key words** creatinine, creatininase, characteristic

在临床检验中, 血清中的肌酐浓度是一项判断肾功能的重要指标。目前肌酐的检测方法主要有化学方法和酶促法。化学法测定原理以 Jaffe 反应为基础, 反应特异性差, 血清中许多化学物质都能干扰测定结果, 给疾病的正确诊断造成困难。而酶促方法因其具有专一性强和灵敏度高的优点, 是今后肌

酐测定的发展方向, 越来越受到人们的重视。

在肌酐酶法的测定中, 肌酐在肌酐水解酶的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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量可确定样品中肌酐的浓度。肌酐水解酶是该测定方法中的关键酶之一, 其性能的好坏直

Received: September 20, 2004; Accepted: November 10, 2004.

This work was supported by Grant from the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 001110233-01).

\* Corresponding author. Tel: 86-571-86971962; E-mail: maxiaohong@zjuem.zju.edu.cn

浙江省科技厅资助项目 (No. 001110233-01).

接影响到测定系统的可靠性。

为筛选用于酶法测定的肌酐水解酶,本实验室分离得到一株能产生肌酐降解酶系的节杆菌(菌株42-1),本文研究了该菌所产的肌酐水解酶的纯化及酶学特性。

## 1 材料与方 法

产酶菌株节杆菌42-1,由本实验室从土壤中分离获得。酶的纯化操作均在4℃下进行,所用的缓冲液为pH7.5,10mmol/L的磷酸盐缓冲液。

### 1.1 蛋白质浓度测定

蛋白浓度的测定用Folin-酚法<sup>[1]</sup>。

### 1.2 肌酐水解酶的测定方法

取0.1mL的酶液加入到0.9mL、含有100mmol/L肌酸的磷酸缓冲液(50mmol/L,pH7.5)中,37℃反应10min后加1mol/L NaOH和0.5%苦味酸各1mL终止反应,25℃显色10min后于520nm处测吸光值。酶活单位定义为在上述反应条件下每分钟转化1μmol肌酐所需要的酶量。

### 1.3 肌酐水解酶的提取纯化

菌株接种培养后,5000r/min离心收集菌体,加入2倍体积的50mmol/L磷酸缓冲液悬浮细胞,用超声波破碎,离心去除细胞碎片后得到粗酶液。将粗酶液在60℃水浴中处理30min后离心除去变性的杂蛋白。粗酶液中加入硫酸铵进行分级沉淀,离心收集饱和度为40%~50%之间的沉淀部分,以磷酸缓冲液溶解收集的蛋白,透析后将酶液上到预先用磷酸缓冲液平衡过的DEAE-纤维素层析柱(5.5cm×50cm),以含有0~1.5mmol/L KCl的缓冲液进行线性梯度洗脱,分别收集。合并比活力高的部分。之后将酶液上样于经含35%硫酸铵的缓冲液平衡好的Toyopearl疏水层析柱(5.5cm×50cm),用含有35%~0%硫酸铵的缓冲液进行线性梯度洗脱,合并比活力高的部分,进行纯度分析及酶特性研究。

### 1.4 酶的纯度及分子量测定

用PAGE分析肌酐水解酶的纯度,以SDS-PAGE法测定纯化后酶的分子量<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的提取纯化

因该肌酐水解酶有良好的热稳定性,故采用60℃处理30min后离心的方法以去除热不稳定蛋白。经这一步处理去除的蛋白约占蛋白总量的30%。硫酸铵分级沉淀结果表明该酶在40%~50%饱和度之间可被有效地沉淀分离,经硫酸铵沉淀肌酐水解酶被纯化了32倍左右。之后用离子交换层析法进一步纯化,经DEAE-Cellulose离子交换柱层析(图1)后绝大多数杂蛋白被去除。合并收集的各管测定表明该步骤纯化了2.5倍以上。最后以疏水层析对肌酐酶进行最后纯化,该步将酶的纯度提高了1.3倍。经以上4步纯化,肌酐水解酶的比活由1.44u/mg提高到209u/mg,共提高了145倍,酶纯化结果列于表1。

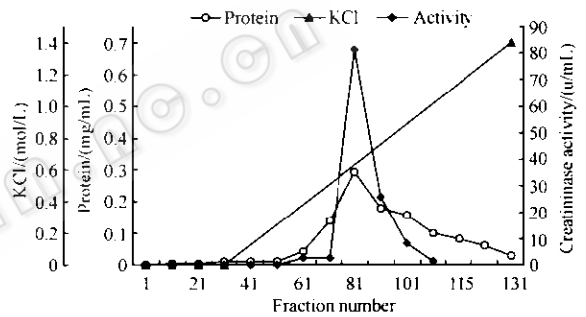


图1 肌酐水解酶的DEAE-纤维素柱层析

Fig.1 Chromatography of creatininase on DEAE-Cellulose column

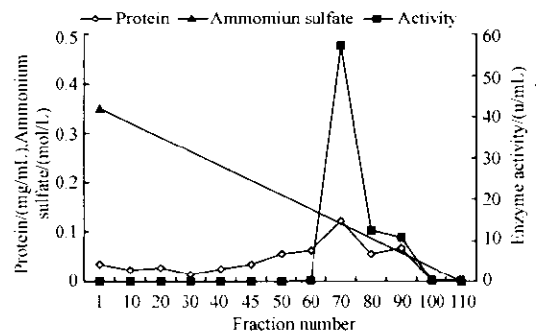


图2 肌酐水解酶的Toyopearl疏水柱层析

Fig.2 Chromatography of creatininase on hydrophobic column

表1 肌酐水解酶的纯化结果

Table 1 Summary of creatininase purification

Step	Volume/mL	Total activity/u	Total protein/mg	Spe. activity/(u/mg)	Purification fold	Recovery/%
Cell-free extract	1621.6	36816.8	25540.2	1.4	1	100
Heat treatment	1565.0	33512.9	17371.5	1.9	1.3	91.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	55.6	20297.9	322.0	63.0	43.7	55.1
DEAE-cellulose	395.0	16458.5	101.6	162.0	112.4	44.7
Hydrophobic chroma.	95.0	2443.9	11.7	209.1	145.0	6.6

2.2 肌酐水解酶的特性

2.2.1 酶的纯度及分子量测定: 酶蛋白在 7.5% 的 PAGE 中显示为一条带, 在 10% 的 SDS-PAGE 测定中 (图 3) 也显示为一条带。将已知蛋白质的分子量绘制成标准曲线, 由标准曲线计算得到肌酐水解酶亚基分子量为 33.7kD, 与报道的节杆菌 *Arthrobacter* sp. TE1826 肌酐水解酶的质量 (30.5 kD) 相近<sup>[3]</sup>。

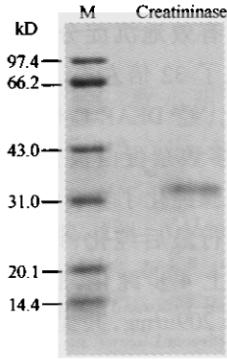


图 3 SDS-PAGE 测定肌酐水解酶的亚基分子量  
Fig.3 The molecular mass of creatininase determined by SDS-PAGE

2.2.2 酶作用的最适 pH 与 pH 稳定性: 在 pH4.0 ~ 11.0 的缓冲液中测定酶活力 (pH4.0 ~ 6.0 为 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH6.0 ~ 8.5 为 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液; pH8.5 ~ 9.5 为 0.05mol/L 硼砂-硼酸缓冲液; pH10.0 ~ 11.0 为 0.05mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液), 结果见图 4, 肌酐水解酶作用的最适 pH 为 7.5。

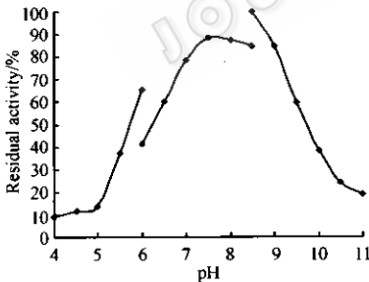


图 4 pH 对酶活力的影响  
Fig.4 The effect of pH on creatininase activity

在上述不同 pH 值的缓冲液中加入酶液, 于 25℃ 保温 24h, 测定酶活力, 结果见图 5。该肌酐酶在 pH6.0 ~ 9.0 稳定。

2.2.3 酶作用的最适温度与热稳定性: 在不同温度下测定酶活力, 结果见图 6, 酶作用的最适温度为 60℃。

将酶液在不同温度下保温 30min 后测定酶活力, 结果见图 7。该酶在 60℃ 处理 30min 酶活力没有丧失。在 65℃ 处理 30min 后, 剩余酶活力为 66%。

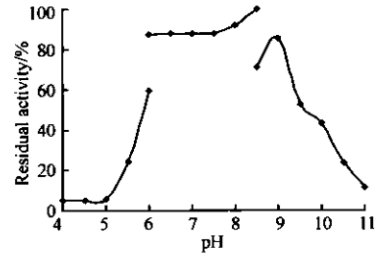


图 5 pH 对酶稳定性的影响  
Fig.5 The effect of pH on the stability of creatininase

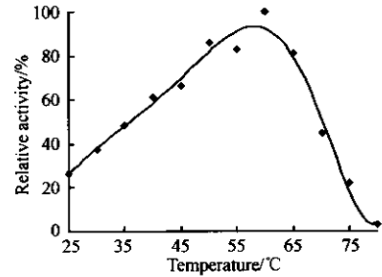


图 6 不同反应温度对肌酐水解酶活力的影响  
Fig. 6 The effect of temperature on creatininase activity

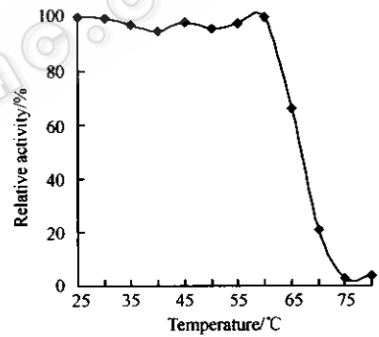


图 7 温度对肌酐水解酶稳定性的影响  
Fig. 7 The effects of temperature on the stability of creatininase

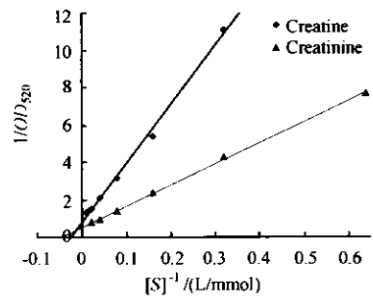


图 8 肌酐水解酶的 Lineweaver-Burk 曲线  
Fig.8 Lineweaver-Burk graph of creatininase

2.2.4 酶的  $K_m$  值: 由于酶催化的肌酐水解反应是一个可逆反应, 故采用了肌酐和肌酸分别测定其正向和反向反应时不同浓度底物对酶活性的影响。用 Lineweaver-Burk 作图法 (图 8) 求得肌酐水解酶以肌酐和肌酸为底物的米氏常数  $K_m$  值分别是 21.14mmol/L 和 40.8mmol/L。

**2.2.5 不同化学物质对酶活性的影响:**由表 2 可以看出  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和络合剂邻菲罗啉能使酶完全丧失活性,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Li}^+$  对酶活性有明显的抑制作用, 而  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和 SDS、 $\text{NaN}_3$  对酶活性几乎没有影响,  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对酶活性有明显促进作用, 表面活性剂 Tween 20 和 Tween80 对酶活性没有影响。

表 2 化学物质对酶活性的影响

Table 2 The effect of some chemicals on creatinase

Chemicals	Concentration	Residual activity/%
CK	—	100
$\text{Mn}^{2+}$	1.0 mol/L	170.07
$\text{Co}^{2+}$	1.0 mol/L	130.66
$\text{Mg}^{2+}$	1.0 mol/L	99.61
$\text{Ca}^{2+}$	1.0 mol/L	99.12
$\text{Zn}^{2+}$	1.0 mol/L	95.51
$\text{Pb}^{2+}$	1.0 mol/L	93.95
$\text{Fe}^{2+}$	1.0 mol/L	92.19
$\text{Fe}^{3+}$	1.0 mol/L	94.13
$\text{Ba}^{2+}$	1.0 mol/L	90.82
$\text{Cr}^{2+}$	1.0 mol/L	80.27
$\text{Cu}^{2+}$	1.0 mol/L	37.96
$\text{Li}^+$	1.0 mol/L	6.05
$\text{Ag}^+$	1.0 mol/L	0
$\text{Hg}^{2+}$	1.0 mol/L	0
$\text{NaN}_3$	20 mol/L	103.13
EDTA	20 mol/L	82.81
Phenanthroline	20 mol/L	0
Tween 20	0.1%	100.17
Tween 80	0.1%	100.59
SDS	0.50%	90.23
Triton X-100	0.50%	87.5

表 3 不同来源肌酐水解酶的  $K_m$  值Table 3 The  $K_m$  values of creatinase from different sources

Source	<i>Arthrobacter</i> strain	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Arthrobacter</i>
	42-1	C-83	U-188		PS-7		TE1826
$K_m$ /(mmol/L)	21.1	26	34.5	125	26	42	66

作为检测用酶,  $K_m$  值是酶的一项重要指标。目前报道的肌酐水解酶其  $K_m$  值一般在 26 ~ 125 mmol/L 之间(以肌酐为底物, 表 3)<sup>[4-8]</sup>,  $K_m$  值过高对酶法测定不利。与目前已知的肌酐水解酶相比较, 以菌株 42-1 所产的肌酐水解酶的  $K_m$  值最低, 为 21.1 mmol/L。由于菌株 42-1 所产的肌酐水解酶具有高热稳定性及低  $K_m$  值, 可望在临床检测工作中有较高的应用价值。在另一实验中以纯化后的肌酐水解酶配制成试剂, 对肌酐进行测定结果表明该酶有良好的性能。其测定的线性范围为 0 ~ 4425  $\mu\text{mol/L}$  ( $y = 0.000518x - 0.0495$ ;  $r = 0.9975$ )。

## REFERENCES (参考文献)

[1] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* Protein measurement

## 3 讨论

因来源不同, 肌酐水解酶的性质差异较大。假单胞菌所产生的肌酐水解酶为一金属酶, 其中  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对酶的活性有促进作用, 且该酶对金属离子的络合能力很强, 用 EDTA 无法去除酶中的金属离子。而产碱菌属所产生的肌酐水解酶只能以  $\text{Mn}^{2+}$  作为其反应中心的离子, 其活性可被  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  所抑制。本研究结果表明, 由菌株 42-1 产生的肌酐水解酶也是一种金属酶, 但其特性与以上两种酶均有所不同。其活性可被  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  所激活, 而  $\text{Hg}^+$ 、 $\text{Ag}^+$  对酶活性有强的抑制作用。酶对两种络合剂对反应有所不同: 20 mol/L EDTA 处理后仅抑制了酶活的 17% 左右; 而强络合剂邻菲罗啉则能完全抑制酶的活性。这也说明该酶是一种金属酶, 且金属离子与酶的结合很稳定, 用一般络合剂处理难以将其去除。

菌株 42-1 除了产生肌酐水解酶之外, 还能产生肌酸酶和肌氨酸氧化酶。在其发酵条件的研究中发现肌酐水解酶除了能被肌酐所诱导外还能被其产物肌酸及肌氨酸所诱导。这一现象表明以上三种酶的基因可能位于同一操纵子中。这一结果与 Nishiya 的研究结果一致<sup>[3]</sup>。

Nishiya 对节杆菌 *Arthrobacter* TE1826 菌株所产生的肌酐水解酶的研究表明该酶的最佳反应温度为 40℃, 而菌株 42-1 为 60℃, 两者差异较大。此外该酶有较好的热稳定性, 这在实际应用中对酶的纯化非常有利, 在本实验中仅通过加热处理这一简单步骤就去除了大量的杂蛋白, 使纯化过程大为简化。

- with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265-275
- [2] Wang JZ (汪家政), Fan M (范明). Manual of protein technology (蛋白质技术手册), Beijing: Science Press (科学出版社), 2000
- [3] Nishiya Y, Toda A, Oka M. Characterization and structural prediction of the *Arthrobacter* creatinase. *J Analytical Bio-Science*, 2001, **24**(2): 144-149
- [4] Kaplan A, Szabo LL. Creatinine hydrolase and creatine amidinohydrolase: II. Partial purification and properties. *Mol Cell Biochem*, 1974, **3**(1): 17-25
- [5] Rikitake K, Oka I, Ando M *et al.* Creatinine amidohydrolase (creatinase) from *Pseudomonas putida*: purification and some properties. *J Biochem*, 1979, **86**(4): 1109-1117
- [6] Suzuki M, and Saito N. Japan patent 34983, 1978
- [7] Yamamoto K, Oka M, Kikuchi T *et al.* Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from *Pseudomonas* sp. PS-7. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(7): 1331-1332
- [8] Nishiya Y, Toda A, Kawamura Y. Japan patent 154574, 1997

接影响到测定系统的可靠性。

为筛选用于酶法测定的肌酐水解酶,本实验室分离得到一株能产生肌酐降解酶系的节杆菌(菌株42-1),本文研究了该菌所产的肌酐水解酶的纯化及酶学特性。

## 1 材料与方 法

产酶菌株节杆菌42-1,由本实验室从土壤中分离获得。酶的纯化操作均在4℃下进行,所用的缓冲液为pH7.5,10mmol/L的磷酸盐缓冲液。

### 1.1 蛋白质浓度测定

蛋白浓度的测定用Folin-酚法<sup>[1]</sup>。

### 1.2 肌酐水解酶的测定方法

取0.1mL的酶液加入到0.9mL、含有100mmol/L肌酸的磷酸缓冲液(50mmol/L,pH7.5)中,37℃反应10min后加1mol/L NaOH和0.5%苦味酸各1mL终止反应,25℃显色10min后于520nm处测吸光值。酶活单位定义为在上述反应条件下每分钟转化1μmol肌酐所需要的酶量。

### 1.3 肌酐水解酶的提取纯化

菌株接种培养后,5000r/min离心收集菌体,加入2倍体积的50mmol/L磷酸缓冲液悬浮细胞,用超声波破碎,离心去除细胞碎片后得到粗酶液。将粗酶液在60℃水浴中处理30min后离心除去变性的杂蛋白。粗酶液中加入硫酸铵进行分级沉淀,离心收集饱和度为40%~50%之间的沉淀部分,以磷酸缓冲液溶解收集的蛋白,透析后将酶液上到预先用磷酸缓冲液平衡过的DEAE-纤维素层析柱(5.5cm×50cm),以含有0~1.5mmol/L KCl的缓冲液进行线性梯度洗脱,分别收集。合并比活力高的部分。之后将酶液上样于经含35%硫酸铵的缓冲液平衡好的Toyopearl疏水层析柱(5.5cm×50cm),用含有35%~0%硫酸铵的缓冲液进行线性梯度洗脱,合并比活力高的部分,进行纯度分析及酶特性研究。

### 1.4 酶的纯度及分子量测定

用PAGE分析肌酐水解酶的纯度,以SDS-PAGE法测定纯化后酶的分子量<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的提取纯化

因该肌酐水解酶有良好的热稳定性,故采用60℃处理30min后离心的方法以去除热不稳定蛋白。经这一步处理去除的蛋白约占蛋白总量的30%。硫酸铵分级沉淀结果表明该酶在40%~50%饱和度之间可被有效地沉淀分离,经硫酸铵沉淀肌酐水解酶被纯化了32倍左右。之后用离子交换层析法进一步纯化,经DEAE-Cellulose离子交换柱层析(图1)后绝大多数杂蛋白被去除。合并收集的各管测定表明该步骤纯化了2.5倍以上。最后以疏水层析对肌酐酶进行最后纯化,该步将酶的纯度提高了1.3倍。经以上4步纯化,肌酐水解酶的比活由1.44u/mg提高到209u/mg,共提高了145倍,酶纯化结果列于表1。

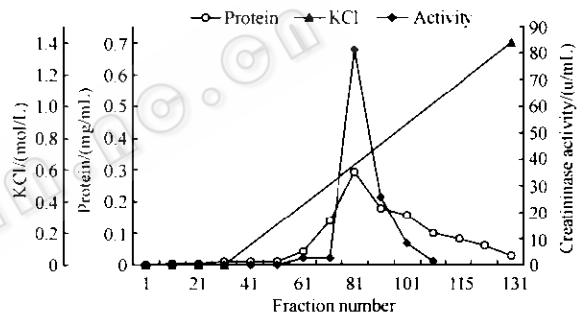


图1 肌酐水解酶的DEAE-纤维素柱层析

Fig.1 Chromatography of creatininase on DEAE-Cellulose column

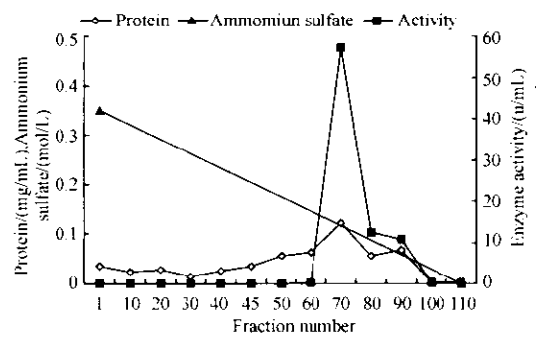


图2 肌酐水解酶的Toyopearl疏水柱层析

Fig.2 Chromatography of creatininase on hydrophobic column

表1 肌酐水解酶的纯化结果

Table 1 Summary of creatininase purification

Step	Volume/mL	Total activity/u	Total protein/mg	Spe. activity/(u/mg)	Purification fold	Recovery/%
Cell-free extract	1621.6	36816.8	25540.2	1.4	1	100
Heat treatment	1565.0	33512.9	17371.5	1.9	1.3	91.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	55.6	20297.9	322.0	63.0	43.7	55.1
DEAE-cellulose	395.0	16458.5	101.6	162.0	112.4	44.7
Hydrophobic chroma.	95.0	2443.9	11.7	209.1	145.0	6.6

2.2 肌酐水解酶的特性

2.2.1 酶的纯度及分子量测定: 酶蛋白在 7.5% 的 PAGE 中显示为一条带, 在 10% 的 SDS-PAGE 测定中 (图 3) 也显示为一条带。将已知蛋白质的分子量绘制成标准曲线, 由标准曲线计算得到肌酐水解酶亚基分子量为 33.7kD, 与报道的节杆菌 *Arthrobacter* sp. TE1826 肌酐水解酶的质量 (30.5 kD) 相近<sup>[3]</sup>。

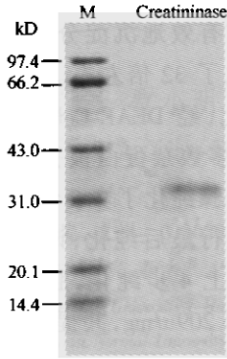


图 3 SDS-PAGE 测定肌酐水解酶的亚基分子量  
Fig.3 The molecular mass of creatininase determined by SDS-PAGE

2.2.2 酶作用的最适 pH 与 pH 稳定性: 在 pH4.0 ~ 11.0 的缓冲液中测定酶活力 (pH4.0 ~ 6.0 为 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH6.0 ~ 8.5 为 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液; pH8.5 ~ 9.5 为 0.05mol/L 硼砂-硼酸缓冲液; pH10.0 ~ 11.0 为 0.05mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液), 结果见图 4, 肌酐水解酶作用的最适 pH 为 7.5。

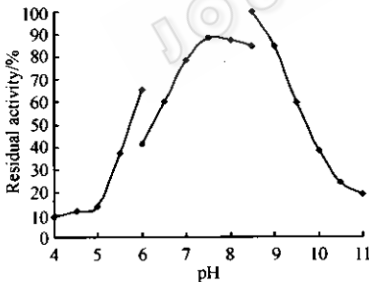


图 4 pH 对酶活力的影响  
Fig.4 The effect of pH on creatininase activity

在上述不同 pH 值的缓冲液中加入酶液, 于 25℃ 保温 24h, 测定酶活力, 结果见图 5。该肌酐酶在 pH6.0 ~ 9.0 稳定。

2.2.3 酶作用的最适温度与热稳定性: 在不同温度下测定酶活力, 结果见图 6, 酶作用的最适温度为 60℃。

将酶液在不同温度下保温 30min 后测定酶活力, 结果见图 7。该酶在 60℃ 处理 30min 酶活力没有丧失。在 65℃ 处理 30min 后, 剩余酶活力为 66%。

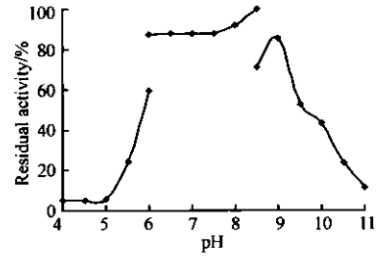


图 5 pH 对酶稳定性的影响  
Fig.5 The effect of pH on the stability of creatininase

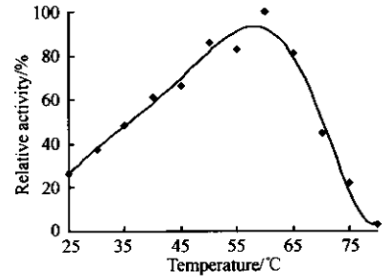


图 6 不同反应温度对肌酐水解酶活力的影响  
Fig. 6 The effect of temperature on creatininase activity

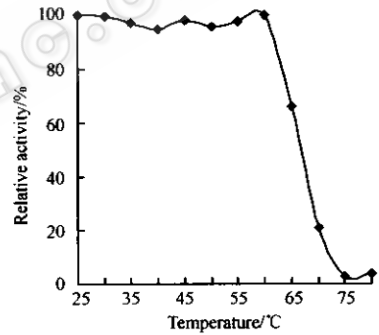


图 7 温度对肌酐水解酶稳定性的影响  
Fig. 7 The effects of temperature on the stability of creatininase

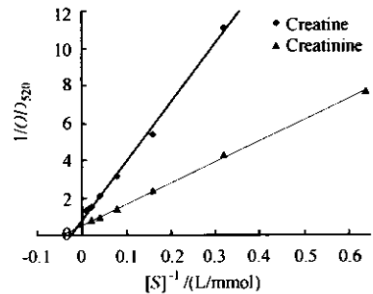


图 8 肌酐水解酶的 Lineweaver-Burk 曲线  
Fig.8 Lineweaver-Burk graph of creatininase

2.2.4 酶的  $K_m$  值: 由于酶催化的肌酐水解反应是一个可逆反应, 故采用了肌酐和肌酸分别测定其正向和反向反应时不同浓度底物对酶活性的影响。用 Lineweaver-Burk 作图法 (图 8) 求得肌酐水解酶以肌酐和肌酸为底物的米氏常数  $K_m$  值分别是 21.14mmol/L 和 40.8mmol/L。

2.2.5 不同化学物质对酶活性的影响:由表 2 可以看出  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和络合剂邻菲罗啉能使酶完全丧失活性,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Li}^+$  对酶活性有明显的抑制作用, 而  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和 SDS、 $\text{NaN}_3$  对酶活性几乎没有影响,  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对酶活性有明显促进作用, 表面活性剂 Tween 20 和 Tween80 对酶活性没有影响。

表 2 化学物质对酶活性的影响

Table 2 The effect of some chemicals on creatinase

Chemicals	Concentration	Residual activity/%
CK	—	100
$\text{Mn}^{2+}$	1.0 mol/L	170.07
$\text{Co}^{2+}$	1.0 mol/L	130.66
$\text{Mg}^{2+}$	1.0 mol/L	99.61
$\text{Ca}^{2+}$	1.0 mol/L	99.12
$\text{Zn}^{2+}$	1.0 mol/L	95.51
$\text{Pb}^{2+}$	1.0 mol/L	93.95
$\text{Fe}^{2+}$	1.0 mol/L	92.19
$\text{Fe}^{3+}$	1.0 mol/L	94.13
$\text{Ba}^{2+}$	1.0 mol/L	90.82
$\text{Cr}^{2+}$	1.0 mol/L	80.27
$\text{Cu}^{2+}$	1.0 mol/L	37.96
$\text{Li}^+$	1.0 mol/L	6.05
$\text{Ag}^+$	1.0 mol/L	0
$\text{Hg}^{2+}$	1.0 mol/L	0
$\text{NaN}_3$	20 mol/L	103.13
EDTA	20 mol/L	82.81
Phanthroline	20 mol/L	0
Tween 20	0.1%	100.17
Tween 80	0.1%	100.59
SDS	0.50%	90.23
Triton X-100	0.50%	87.5

表 3 不同来源肌酐水解酶的  $K_m$  值Table 3 The  $K_m$  values of creatinase from different sources

Source	Arthrobacter strain	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Arthrobacter</i>
	42-1	C-83	U-188		PS-7		TE1826
$K_m$ /(mmol/L)	21.1	26	34.5	125	26	42	66

作为检测用酶,  $K_m$  值是酶的一项重要指标。目前报道的肌酐水解酶其  $K_m$  值一般在 26 ~ 125 mmol/L 之间(以肌酐为底物, 表 3)<sup>[4-8]</sup>,  $K_m$  值过高对酶法测定不利。与目前已知的肌酐水解酶相比较, 以菌株 42-1 所产的肌酐水解酶的  $K_m$  值最低, 为 21.1 mmol/L。由于菌株 42-1 所产的肌酐水解酶具有高热稳定性及低  $K_m$  值, 可望在临床检测工作中有较高的应用价值。在另一实验中以纯化后的肌酐水解酶配制成试剂, 对肌酐进行测定结果表明该酶有良好的性能。其测定的线性范围为 0 ~ 4425  $\mu\text{mol/L}$  ( $y = 0.000518x - 0.0495$ ;  $r = 0.9975$ )。

## REFERENCES (参考文献)

[1] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement

## 3 讨论

因来源不同, 肌酐水解酶的性质差异较大。假单胞菌所产生的肌酐水解酶为一金属酶, 其中  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对酶的活性有促进作用, 且该酶对金属离子的络合能力很强, 用 EDTA 无法去除酶中的金属离子。而产碱菌属所产生的肌酐水解酶只能以  $\text{Mn}^{2+}$  作为其反应中心的离子, 其活性可被  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  所抑制。本研究结果表明, 由菌株 42-1 产生的肌酐水解酶也是一种金属酶, 但其特性与以上两种酶均有所不同。其活性可被  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  所激活, 而  $\text{Hg}^+$ 、 $\text{Ag}^+$  对酶活性有强的抑制作用。酶对两种络合剂对反应有所不同: 20 mol/L EDTA 处理后仅抑制了酶活的 17% 左右; 而强络合剂邻菲罗啉则能完全抑制酶的活性。这也说明该酶是一种金属酶, 且金属离子与酶的结合很稳定, 用一般络合剂处理难以将其去除。

菌株 42-1 除了产生肌酐水解酶之外, 还能产生肌酸酶和肌氨酸氧化酶。在其发酵条件的研究中发现肌酐水解酶除了能被肌酐所诱导外还能被其产物肌酸及肌氨酸所诱导。这一现象表明以上三种酶的基因可能位于同一操纵子中。这一结果与 Nishiya 的研究结果一致<sup>[3]</sup>。

Nishiya 对节杆菌 *Arthrobacter* TE1826 菌株所产生的肌酐水解酶的研究表明该酶的最佳反应温度为 40℃, 而菌株 42-1 为 60℃, 两者差异较大。此外该酶有较好的热稳定性, 这在实际应用中对酶的纯化非常有利, 在本实验中仅通过加热处理这一简单步骤就去除了大量的杂蛋白, 使纯化过程大为简化。

- with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265-275
- [2] Wang JZ (汪家政), Fan M (范明). Manual of protein technology (蛋白质技术手册), Beijing: Science Press (科学出版社), 2000
- [3] Nishiya Y, Toda A, Oka M. Characterization and structural prediction of the *Arthrobacter* creatinase. *J Analytical Bio-Science*, 2001, **24**(2): 144-149
- [4] Kaplan A, Szabo LL. Creatinine hydrolase and creatine amidinohydrolase: II. Partial purification and properties. *Mol Cell Biochem*, 1974, **3**(1): 17-25
- [5] Rikitake K, Oka I, Ando M et al. Creatinine amidohydrolase (creatinase) from *Pseudomonas putida*: purification and some properties. *J Biochem*, 1979, **86**(4): 1109-1117
- [6] Suzuki M, and Saito N. Japan patent 34983, 1978
- [7] Yamamoto K, Oka M, Kikuchi T et al. Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from *Pseudomonas* sp. PS-7. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(7): 1331-1332
- [8] Nishiya Y, Toda A, Kawamura Y. Japan patent 154574, 1997