

## 芽胞杆菌 BSD-8 肌氨酸氧化酶的纯化与性质

刘辉, 孙桂琴, 马晓航, 孙玲艳, 卢向锋, 张鹏程

浙江大学生命科学院, 杭州 310058

**摘要:** 对一株从土壤中分离到的芽胞杆菌 *Bacillus* sp. BSD-8 菌株所产生的热稳定性较高的肌氨酸氧化酶进行纯化, 并对该酶的特性进行了研究。通过硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素离子交换柱、Toyopearl 疏水层析柱和 Sephadex G-75 分子筛层析, 使酶提纯 25 倍, 比活力达到 5.3 U/mg。研究了纯化后的酶的生化特性, 确定了该酶的主要特性: 该酶为黄素蛋白, 与黄素以非共价键的方式结合, 由单一亚基组成, 其亚基分子量为 51 kDa。酶的最适反应温度及 pH 分别为 60°C 与 8.5。该酶在 60°C 及 pH 8.0~10.0 条件下稳定。以 Lineveaver-Burk 作图法求得该酶米氏常数  $K_m$  值为 3.1 mmol/L。Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、SDS 及 Tween 80 对该酶有强抑制作用, 而 Tween 20 和 Triton X-100 对酶活性无影响。该肌氨酸氧化酶在耐热性质上比以前所报道的肌氨酸氧化酶有很大的提高, 在酶法肌酐测定应用中有明显的优势。

**关键词:** 肌酸, 肌氨酸氧化酶, 热稳定性

## Purification and characterization of a sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. BSD-8

Hui Liu, Guiqin Sun, Xiaohang Ma, Lingyan Sun, Xiangfeng Lu, and Pengcheng Zhang

College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

**Abstract:** We purified a sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. strain BSD-8 isolated from soil. We purified the enzyme by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose, Toyopearl hydrophobic and Sephadex G-75 molecular sieve chromatography and characterized the purified sarcosine oxidase. This sarcosine oxidase was a flavin enzyme containing a noncovalently bound flavin with the subunit molecular mass of 51 kDa. The optimal temperature for this enzyme was 60°C and it showed its highest activity at pH 8.5. It was stable in the pH range of 8.0–10.0 and at the temperature of 60°C. Estimated by Lineveaver-Burk plots, the  $K_m$  of the enzyme was 3.1 mmol/L. Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, SDS and Tween 80 dramatically inhibited the enzyme activity, whereas Tween 20 and Triton X-100 had no effect on enzyme activity. The thermostability of this enzyme was better than reported sarcosine oxidases, and it could be applied in enzymatic measuring of creatinine.

**Keywords:** creatine, sarcosine oxidase, thermostability

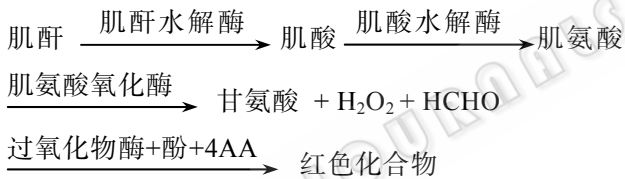
磷酸肌酸是人体内肌肉、脑、神经等易兴奋组织唯一一起能量暂时储存作用的物质。它在肌酸激酶的作用下将 ADP 转化成 ATP, 同时生成肌酸 (Creatine)。

生成的肌酸能被转化成肌酐 (Creatinine), 而肌酐经过肾脏的肾小球滤过由血液进入尿液从而排出体外。血清肌酐正常值为 44~106 μmol/L。但当肾脏功能出现

问题时,血肌酐浓度可达到 141.4~176.8  $\mu\text{mol/L}$ ,严重时甚至会达到 1000  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[1-2]</sup>。为此,临床上将血液和尿液中的肌酐含量作为反映肾小球滤过功能的常用指标。

长期以来临床上对于肌酐的测定都是利用一种称之为 Jaffe 反应的化学方法进行测定。由于化学反应缺少专一性,许多物质的存在均能影响反应的检测结果。随着生物技术的发展,人们研究出利用酶进行肌酐测定的方法。由于酶催化专一性强,样品不经处理就可进行测定。因而在抗干扰方面酶法测定比化学测定法有无可比拟的优越性。2007 年, Ramanavicius 等<sup>[3]</sup>利用 SOX 制成一种电流生物传感器来检测人体血液和尿液中的肌酐,使 SOX 在临床上的应用更加方便。

在酶法的肌酐测定系统中,肌酐在各种酶的催化作用下被分解生成各种小分子物质及过氧化氢。产生的过氧化氢可在过氧化物酶催化作用下与酚类及 4-氨基反应生成红色化合物。其原理如下:



其中的肌氨酸氧化酶是测定系统中的关键酶之一。该酶的稳定性对试剂的性能有重要的影响。

该酶主要由微生物所产生,已从多种微生物中分离到了肌氨酸氧化酶。目前已知的产肌氨酸氧化酶的微生物主要有铵簇柱胞霉菌 *Cylindrocarpou didymium*<sup>[4]</sup>、变青链霉菌 *Streptomyces lividans*<sup>[5]</sup>、芽胞杆菌 *Bacillus sp.*<sup>[6-7]</sup>、节杆菌 *Arthrobacter sp.*<sup>[8-9]</sup>、棒状杆菌 *Corynebacterium sp.*<sup>[10]</sup>、反硝化产碱菌 *Alcaligenes denitrificans*<sup>[11]</sup>等。但以上报道的微生物所产生的肌氨酸氧化酶的热稳定性不是很好,仅在 40℃ 以下时较为稳定,在试剂的运输及保存过程中都带来许多问题,影响了酶法测定的普及。

本研究从土壤中筛选出一株产热稳定性优良的肌氨酸氧化酶的 *Bacillus sp.* 菌株,并对其所产的肌氨酸氧化酶的纯化和性质进行了研究。其所产的肌氨酸氧化酶的热稳定性较好,最适反应温度为 60℃,

在 60℃ 条件下酶活力依然稳定,为目前所知的热稳定性最高的肌氨酸氧化酶。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

DEAE-Cellulose 离子交换层析柱填料购自上海恒信化学试剂有限公司; Toyopearl HW-65C 疏水层析柱填料购自日本 TOSOH 公司; Sephadex G-75 层析柱填料为进口分装; SDS-聚丙烯酰胺电泳标准蛋白购自上海博亚生物技术有限公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、肌氨酸 (Sarcosine) 均为分析纯; 其余试剂均为国产分析纯。

DEAE-Cellulose 离子交换层析柱、Toyopearl HW-65C 疏水层析柱和 Sephadex G-75 层析柱的规格均为 50 mm×550 mm; JY92-II 型超声波细胞粉碎机为宁波新芝科器研究所生产; 电泳仪及 DYY-III 型垂直电泳槽购自北京市六一仪器厂。

### 1.2 产酶菌株

BSD-8 菌株从土壤中分离,本实验室保存。经形态学、生理生化特征及 16S rRNA 鉴定,该菌株属于 *Bacillus sp.*。

基础培养基 (产 SOX 培养基): 肌酸, 5 g; 酵母膏, 8 g; 磷酸二氢钾, 0.5 g; 磷酸氢二钾, 2.0 g; 硫酸镁, 0.5 g; pH 7.0; 加水至 1000 mL。

### 1.3 粗酶液的制备

将 BSD-8 菌株接种于产酶培养基中, 30℃、120 r/min 培养 24 h, 取产酶发酵液, 5000 r/min 冷冻离心, 收集菌体, 用 50 mmol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液洗细胞 2 次后, 将其悬浮于 2 倍体积的缓冲液中。将细胞破碎后, 5000 r/min 离心 50 min 去除细胞碎片, 得到粗酶液。

### 1.4 肌氨酸氧化酶酶活力的测定

取酶液 0.1 mL 加入到 0.9 mL 含有 0.01 mol/L 肌氨酸的焦磷酸钠缓冲液 (pH 8.0, 0.1 mol/L) 中, 于 37℃ 反应 10 min 后, 加入 0.25 mL 浓度为 1.0 mol/L 的醋酸终止反应, 再加入 1.5 mL 含有 0.04% 乙酰丙酮的 20% 乙酸铵溶液, 于 37℃ 保温 40 min 后, 在 410 nm 处测定 OD 值。酶活的定义为: 37℃ 每分钟分解 1  $\mu\text{mol}$  肌氨酸的酶量为一个酶活单位。

## 1.5 蛋白浓度测定

蛋白浓度的测定用 Folin-酚法<sup>[12]</sup>。

## 1.6 酶的纯度及分子量测定

酶的纯度及分子量通过电泳的方法测定<sup>[13]</sup>, 用 PAGE 显示一条蛋白条带后, 再用 SDS-PAGE 测定酶的分子量。标准蛋白及分子量为: 兔磷酸化酶 B 97.4 kDa, 牛血清白蛋白 66.2 kDa, 兔肌动蛋白 43.0 kDa, 牛碳酸酐酶 31.0 kDa, 胰蛋白酶抑制剂 20.1 kDa, 鸡蛋清溶菌酶 14.4 kDa。PAGE 用 10% 的分离胶, SDS-PAGE 用 10% 的分离胶, 浓缩胶的浓度为 4%; 染色与脱色用考马斯亮蓝法。

## 1.7 酶的最佳反应温度及热稳定性试验

在 25°C~80°C 的温度范围内, 每隔 5°C 测定酶活力, 以确定酶的最佳反应温度。将酶液在不同温度下处理 10~30 min 后, 再测定酶活力, 确定酶的热稳定性。

## 1.8 酶的最佳反应 pH 及 pH 稳定性试验

在 pH 4.0~11.0 的缓冲液中测定酶活力 (其中 pH 4.0~6.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 6.0~8.5 为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液; pH 8.5~9.5 为 0.05 mol/L 硼砂-硼酸缓冲液; pH 9.5~11.0 为 0.05 mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液), 以确定酶的最佳反应 pH。在上述不同 pH 值的缓冲液中加入酶液, 于 25°C 保温 18 h, pH 8.0 下测定酶活力, 确定酶的 pH 稳定范围。

## 1.9 酶促反应动力学

在 37°C、pH 8.0 下, 以不同浓度的肌酸为底物测定酶活力。以 Lineweaver-Burk 作图法<sup>[14]</sup>, 求出肌氨酸氧化酶对肌氨酸的  $K_m$  值。同时求得该酶的转化数  $K_{cat}$ , 其定义为每个分子酶在单位时间内能催化的底物分子数。

## 1.10 不同化学物质对酶活力的影响

将酶液加入到含不同化学物质的溶液中于 25°C 处理 30 min, 然后在含相同浓度化学物质的反应体系中测定酶活力。

# 2 结果与分析

## 2.1 SOX 的纯化

### 2.1.1 SOX 的纯化过程

粗酶液首先以 20%~80% 的硫酸铵进行分级

沉淀。并分别测定沉淀的蛋白含量及酶活力, 计算比活力。结果表明该酶的最佳分离浓度区间为 60%~70%。

收集的酶液在 pH 7.0、10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中透析后上样至预先平衡好的 DEAE-纤维素层析柱, 用含 0~1.5 mol/L KCl 的缓冲液进行线性梯度洗脱, 分管收集。经该步纯化后, 酶活达到 25.3 U/mL。

之后, 在收集的酶液中加入硫酸铵至 45% 的饱和度, 上样到经含 45% 硫酸铵的缓冲液平衡好的 Toyopearl HW-65C 疏水层析柱, 用含 45%~0% 硫酸铵的缓冲液反向梯度洗脱, 分别收集。该步骤纯化效果明显, 合并的酶活力达到了 60.78 U/mL。

收集的酶液经浓缩, 透析后上样到先用 10 mmol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液平衡好的 Sephadex G-75 分子筛层析柱, 用含有 100 mmol/L KCl 的上述相同缓冲液洗脱, 分管收集, 合并比活力最高的部分。经该步纯化后, 酶比活力达到 5.3 U/mg。

### 2.1.2 SOX 提纯结果

肌氨酸氧化酶经过上述提纯后, 结果见表 1。各步提取的酶样品用 PAGE 检测, 结果见图 1。纯化后 SOX 比活力达到 5.3 U/mg, 提纯 25 倍, 得率为 22.3%。

## 2.2 BSD-8 SOX 的理化性质

### 2.2.1 SOX 的分子量

纯化后的 SOX 在 10% 的 PAGE 中显示单一的条带, 在 SDS-PAGE 中也显示为单一条带, 表明 SOX 由单一亚基组成。通过与标准蛋白的比较计算, 得到其亚基分子量为 51 kDa (图 2)。

表 1 肌氨酸氧化酶的提纯总结

Table 1 Summary of the purification of SOX

Steps of purification	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude enzyme sup.	20216	96269	0.2	1	100
Ammonium sulfate ppt.	16480	30519	0.5	2.5	81.5
DEAE-cellulose	13504	4117	3.3	15.6	66.8
Toyopearl HW-65	7596	2151	3.5	16.8	37.6
Sephadex G-75	4510	859	5.3	25.0	22.3

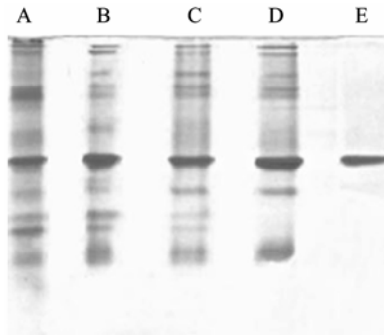


图 1 各步提纯样品的 PAGE 图谱

Fig. 1 PAGE pattern of SOX samples from different steps of purification. A: crude extract; B: ammonium sulfate precipitation fraction; C: DEAE-cellulose fraction; D: Toyopearl HW-65 fraction; E: Sephadex G-75 fraction.

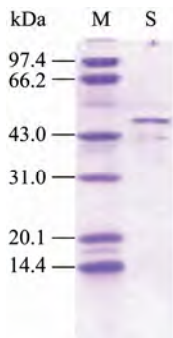


图 2 SDS-PAGE 测定 SOX 亚基分子量结果，经过计算得出分子量为 51 kDa

Fig. 2 Molecular weight of SOX subunit was 51 kDa which was determined by the calculation from the result of SDS-PAGE.

2.2.2 SOX 的最适作用温度与热稳定性

在不同温度下测定 SOX 酶活力，结果见图 3，酶作用的最适温度为 60℃。在 pH 8.0 磷酸盐缓冲液中不同温度分别处理 10 min、30 min 后测定酶活力，结果见图 4。该酶在 60℃处理 10 min 还可保留 94% 的酶活。

2.2.3 SOX 的最适 pH 与 pH 稳定性

在 pH 4.0~11.0 的缓冲液中测定酶活力，结果见图 5，SOX 作用的最适 pH 为 8.5。在上述不同 pH 值的缓冲液中加入酶液，于室温保温 18 h，测定酶活力。结果显示该酶在 pH 7.0~10.0 稳定 (图 6)。

2.2.4 酶促反应动力学

以不同浓度肌氨酸为底物，于 37℃测定酶活力。Lineweaver-Burk 作图法求得肌氨酸氧化酶的米氏常数  $K_m$  值为 3.1 mmol/L。根据所测定的 SOX 的比活和分子量，计算出该酶的  $K_{cat}$  为 4.5/s。

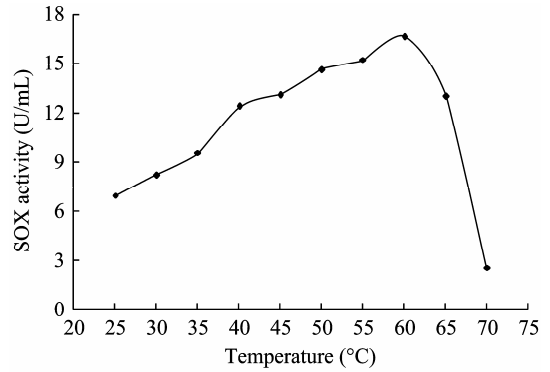


图 3 不同反应温度对 SOX 活力的影响

Fig. 3 Effects of temperature on SOX activity.

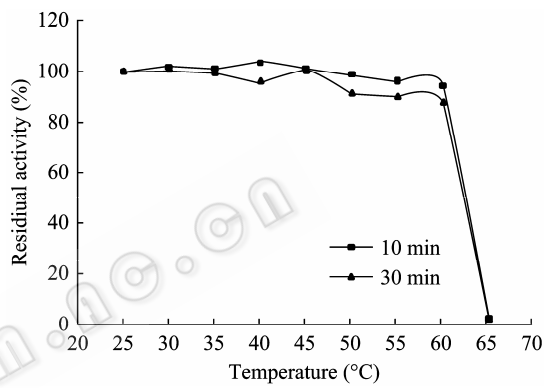


图 4 温度对 SOX 稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the stability of SOX.

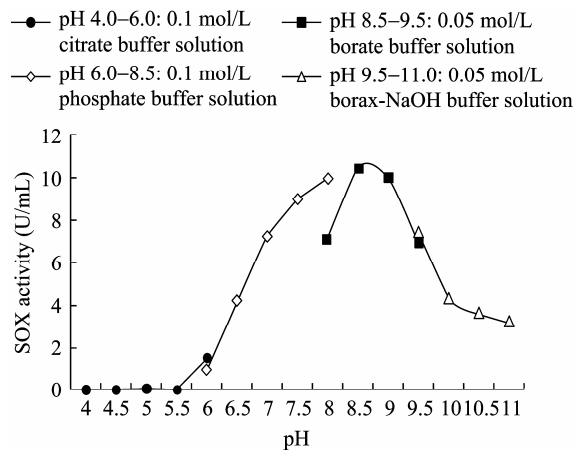


图 5 不同 pH 对酶活力的影响

Fig. 5 Effects of pH on SOX activity. pH 4.0–6.0: 0.1 mol/L citrate buffer solution; pH 6.0–8.5: 0.1 mol/L phosphate buffer solution; pH 8.5–9.5: 0.05 mol/L borate buffer solution; pH 9.5–11.0: 0.05 mol/L borax-NaOH buffer solution.

2.2.5 不同化学物质对酶活性的影响

由表 2、表 3 可以看出， $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$ 、SDS 能使该酶几乎完全失活， $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Li^+$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $NaN_3$  对酶活性几乎没有影响， $Ba^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  对酶活性有一定促进作用，表面活性剂 Tween 20 和

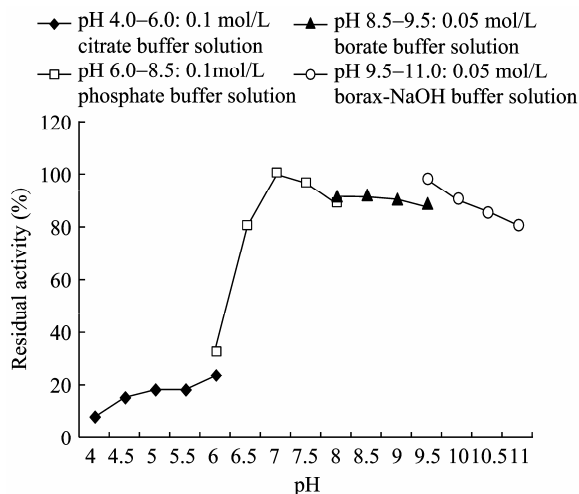


图 6 不同 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 6 Effects of pH on the stability of SOX. pH 4.0–6.0: 0.1 mol/L citrate buffer solution; pH 6.0–8.5: 0.1 mol/L phosphate buffer solution; pH 8.5–9.5: 0.05 mol/L borate buffer solution; pH 9.5–11.0: 0.05 mol/L borax-NaOH buffer solution.

表 2 不同金属离子对酶活性的影响

Table 2 Effects of metal ions on SOX activity

Metal	Final concentration (mmol/L)	Residual activity (%)
CK	----	100
Ba <sup>2+</sup>	1	113.9
Mn <sup>2+</sup>	1	111.0
Ca <sup>2+</sup>	1	107.7
Zn <sup>2+</sup>	1	96.7
Cr <sup>3+</sup>	1	91.9
Li <sup>+</sup>	1	91.5
Fe <sup>3+</sup>	1	89.7
Cu <sup>2+</sup>	1	88.9
Ag <sup>+</sup>	1	9.19
Hg <sup>2+</sup>	1	0.3

表 3 不同化学物质对酶活性的影响

Table 3 Effects of chemicals on SOX activity

Chemicals	Final concentration	Residual activity (%)
CK	----	100.0
NaN <sub>3</sub>	1 mmol/L	95.9
o-Phenanthroline	1 mmol/L	82.9
EDTA	20 mmol/L	89.3
Tween20	0.10%	97.4
Tween80	0.10%	56.2
Triton X-100	0.10%	96.7
SDS	0.50%	2.6
p-CMB*	0.1 mmol/L	61.1

\*p-CMB: p-Chloromeruribenzoate.

Triton X-100 对酶活性没有影响, 而 Tween 80 可使 50% 酶活丧失。

### 2.2.6 BSD-8 SOX 与黄素的结合

据报道肌氨酸氧化酶为一种黄素蛋白, 辅基黄素 (FAD 或 FMN) 与其的结合方式前文已有叙述, 共分两种, 一种结合方式为共价结合, 另一种结合方式为非共价结合。将 BSD-8 SOX 纯酶的酶液加入 5% 或 10% 的三氯乙酸, 沸水处理 10 min, 发现上清均呈现黄色。而 Mori 等<sup>[4]</sup>和 Matsuda 等<sup>[6]</sup>报道的单聚体肌氨酸氧化酶经相同处理之后, 上清无任何色素, 也即酶蛋白没有释放任何色素, 则认为黄素与酶以共价键结合。此外, Ogushi 等<sup>[9]</sup>报道产脉节杆菌 *Arthrobacter ureafaciens* 四亚基 SOX 经 10% 三氯乙酸沸水处理 15 min, 上清液呈现黄色, 表明有非共价键结合的黄素存在。根据上述结果, 初步推测 BSD-8 的 SOX 与黄素以非共价键的方式结合。

## 3 讨论

目前所报道的 SOX 根据其来源的不同, 酶的性质变化很大。如 *Cylindrocarpon didymium* M-1、*Corynebacterium* sp. U-96<sup>[10]</sup>、*Arthrobacter ureafaciens* 和 *Bacillus* sp. B-0618 的 SOX 分子量分别为 48 kDa、174 kDa、185 kDa 和 42 kDa。根据 SOX 亚基的组成可分为四亚基 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )、双亚基 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) 和单亚基酶。即使是相同属的不同菌株产生的 SOX, 其结构也不一定相同。如 *Arthrobacter* 中不同菌株能产生四亚基和单亚基两种不同的 SOX。BSD-8 菌株所产生的 SOX 纯化后经 PAGE 和 SDS-PAGE 均显示出单一的条带。根据电泳结果分析该酶由单一亚基组成, 亚基分子量应为 51 kDa。

该酶在 pH 8.5, 温度 60°C 时反应活性最高; 其在 60°C 以下, pH 7.0~10.0 范围内可稳定存在。已报道的热稳定性较好的肌氨酸氧化酶是由 *Bacillus* sp. KS-11A<sup>[15]</sup>和 *Bacillus* sp. NS-129<sup>[16]</sup>所产生的, 其热稳定温度在与本实验相同的条件下测定 (热处理时间 10 min) 分别为 50°C 和 55°C。而由菌株 BSD-8 所产的 SOX 其热稳定性温度为 60°C, 相比而言该酶的热稳定性更好一些。

除此之外研究还发现 *p*-CMB 和  $\text{Cu}^{2+}$  对酶活性的影响与已报道的 SOX 有所不同。除了 *Bacillus* sp. B-0618 外, *p*-CMB 可使其他的 SOX 完全失活, 而 BSD-8 菌株的 SOX 与 B-0618 相似, *p*-CMB 对酶活的影响不如其他的 SOX 显著;  $\text{Cu}^{2+}$  对 BSD-8 SOX 活性也无明显抑制作用, 而其他所有的 SOX 经  $\text{Cu}^{2+}$  处理后即完全失活。

Mori 等<sup>[4]</sup>和 Matsuda 等<sup>[6]</sup>报道的单聚体肌氨酸氧化酶加入三氯乙酸经沸水处理, 结果表明黄素与 SOX 以共价键结合。而 Ogushi 等<sup>[9]</sup>和 Mukoyama 等<sup>[17]</sup>报道的四亚基 SOX 酶液经处理后, 结果表明有非共价的黄素存在。BSD-8 SOX 经三氯乙酸处理得到的结果结合上述报道的试验结果, 初步推测 BSD-8 的 SOX 与黄素以非共价键的形式结合。

根据本研究结果, 该酶的特性适合于酶法肌酐测定, 其热稳定性优良, 作为测定用酶有明显的优势。其次, 如上所述, 该酶除了热稳定性较好外, 在其他特性方面与已报道的 SOX 也有明显差异, 它们之间是否存在必然的联系? 值得今后进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] Khan GF, Wernet W. A highly sensitive amperometric creatinine sensor. *Anal Chim Acta*, 1997, **351**: 151–158.
- [2] Kim EJ, Haruyama T, Yanagida Y, *et al.* Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system. *Anal Chim Acta*, 1999, **394**: 225–231.
- [3] Ramanavicius A. Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**: 1899–1906.
- [4] Mori N, Sano M, Tani Y, *et al.* Purification and properties of sarcosine oxidase from *Cylindrocarpus didymium* M-1. *Agric Biol Chem*, 1980, **44**(6): 1391–1397.
- [5] Suzuki K, Ogishima M, Sugiyama M, *et al.* Molecular cloning and expression of a *Streptomyces* sarcosine oxidase gene in *Streptomyces lividans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, **56**(3): 432–436.
- [6] Matsuda Y, Hoshika H, Inouye Y, *et al.* Purification and characterization of sarcosine oxidase of *Bacillus* origin. *Chem Pharm Bull*, 1987, **35**(2): 711–717.
- [7] Ichikawa T, Sasaki H, Koike H, *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. NS-129. *J Struct Biol*, 1997, **120**(1): 109–111.
- [8] Nishiya Y, Imanaka T. Cloning and sequencing of the sarcosine oxidase gene from *Arthrobacter* sp. TE1826. *J Ferment Bioeng*, 1993, **75**: 239–244.
- [9] Ogushi S, Nagao K, Emi S, *et al.* Sarcosine oxidase from *Arthrobacter ureafaciens*: purification and some properties. *Chem Pharm Bull*, 1988, **36**(4): 1445–1450.
- [10] Suzuki M. Purification and some properties of sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96. *J Biol Chem*, 1981, **89**: 599–607.
- [11] Kim JM, Shimizu S, Yamada H. Crystallization and characterization of sarcosine oxidase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**(4): 1167–1168.
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265–275.
- [13] Wang JZ, Fan M. *Manual of Protein Technology*. Beijing: Science Press, 2000: 77.  
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 77.
- [14] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, 1934, **56**: 658–666.
- [15] Toshio I, Masaru S, Taiji K, *et al.* New sarcosine oxidase M of specified amino acid sequence-used for enzymatic assay of creatinine or creatine: JP, 5115281-A. 1993-05-14.
- [16] Suzuki M. New heat-stable sarcosine oxidase-N-for use in creatine and creatinine enzymatic determination, produced e.g. by *Bacillus* sp. NS-129 ferm BP-671: JP, 89034035-B. 1989-07-17.
- [17] Mukoyama E, Ohsawa H, Suzuki H. Cofactors in sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96. *J Protein Chem*, 2002, **21**: 59–64.