

烟草节杆菌肌酸酶的高效异源表达与应用分析

戴俊^{1,2}, 康振^{1,2}, 张琳培^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{1,2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 肌酸酶(CRE)是临床检测血液和尿液中肌酐的关键酶之一。作者成功地从烟草节杆菌 23710 (*Arthrobacter nicotianae* 23710) 中克隆了 CRE 基因, 并实现了 CRE 在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中的表达。经过硫酸铵分级沉淀、阴离子交换色谱、分子筛后得到了较纯的重组 CRE, 比酶活达到了 20.25 U/mg。重组 CRE 对于螯合剂 EDTA、表面活性剂(Tween20, 和 Triton X-100)以及常用的防腐剂 NaN₃ 有很好的耐受性。

关键词: 肌酸酶; 烟草节杆菌; 重组酶表达; 应用分析

中图分类号: Q 814 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)05—0465—06

Expression and Application Analysis of Creatinase from *Arthrobacter nicotianae*

DAI Jun^{1,2}, KANG Zhen^{1,2}, ZHANG Linpei^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, DU Guocheng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Creatine amidinohydrolase(CRE) is one of the key enzymes for clinical determination of creatinine in serum and urine. In this study, the gene encoding for CRE was successfully amplified from *Arthrobacter nicotianae* 23710 and functionally overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant CRE was purified through a series of operation including ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography and gel filtration chromatography. The specific activity of the purified enzyme reached 20.25 U/mg. The recombinant enzyme shows excellent resistance to the chelating agent EDTA, the surfactants (Tween20 and Triton X-100) and the common preservative NaN₃.

Keywords: creatinase, *Arthrobacter nicotianae*, expression, application analysis

肌酐是人体中重要的代谢产物, 血液中肌酐含量一般维持在 35~150 μmol/L, 多余的肌酐将通过

肾脏系统排到体外^[1]。一旦人体肾脏功能出现问题, 肌酐无法随尿液排出, 血液中的肌酐含量就会随之

收稿日期: 2014-09-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100905); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1135); 国家博士后基金项目(2013M540414); 江苏省自然科学基金项目(BK20141107); 江苏省博士后基金项目(1301010B)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

升高,测定血液和尿液中肌酐的含量就可以出反应肾脏功能^[2]。目前临床使用酶法对肌酐进行检测,酶法主要由3个酶促反应组成,其中的3种关键酶分别为肌酐酶(Creatininase, EC 3.5.2.10)、肌酸酶(Creatinase, 简称为 CRE, EC 3.5.3.3)以及肌氨酸氧化酶(Sarcosine oxidase, EC 1.5.3.1)^[3]。

CRE 作为酶法测定肌酐中的关键酶,可以将肌酸分解为肌氨酸和尿素^[4]。在自然界中,很多种类的菌株可以在诱导条件下产生 CRE, 这些菌株包括:芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[5]、黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[3]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[6]、节杆菌属(*Arthrobacter*)^[2]、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)^[7]、副球菌属(*Paracoccus*)^[8]、梭菌属(*Clostridium*)^[9]等。相应地,针对野生菌产生的 CRE 也有纯化、性质分析以及评估等相关的研究^[10]。智强等人成功地从筛选的 *A. nicotianae* 02181 中纯化出 CRE, 并进行了性质分析, 结果发现, 该 CRE 具有良好的酶学性质, 然而野生菌的 CRE 产量很低^[11], 不适合应用工业进行大规模的生产。因此, 通过构建细胞工厂来生产出具有良好性质的 CRE 是必需的。

在本研究中, 作者成功克隆了来源于 *A. nicotianae* 23710 和 *Pseudomonas putida* KT2440 的 CRE 基因, 随后分别构建重组菌实现了 CRE 的异源表达, 并分析了两种重组菌的表达情况。最后对来源于 *A. nicotianae* 23710 的重组 CRE 进行了应用性质分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 *A. nicotianae* 23710: 购自于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC); 菌株 *E. coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3)、*Lactobacillus reuteri* CICC6124、*P. putida* KT2440 和质粒 pMD19、pET20b; 均为作者所在实验室保藏。

1.1.2 主要试剂 Primer Star DNA 聚合酶、限制性内切酶、Solution I DNA 连接酶、琼脂糖、感受态制备试剂盒、胶回收试剂盒: TaKaRa 公司(大连); 氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒: 上海生工生物有限公司; 蛋白胨、酵母粉: Oxoid 公司; 标准相对分子质量蛋白质、上样蛋白质缓冲液、SDS-PAGE 预制胶: Life Technologies 公司; 其它试剂均为进口分装

或国产。

1.1.3 主要溶液的配制

1) 对-二甲氨基苯甲醛溶液: 称取 2 g 对-二甲氨基苯甲醛, 溶于 100 mL 二甲亚砜, 加入 15 mL 盐酸。

2) 肌酸溶液: 称取 1.492 g 肌酸, 溶于 90 mL PBS 缓冲液中并定容至 100 mL, 要求在使用前配置。

3) PBS 缓冲液(50 mmol/L): 分别配制 0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 0.2 mol/L Na_2HPO_4 母液以备用, 取 95 mL 0.2 mol/L NaH_2PO_4 , 155 mL 0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 加入去离子水并定容至 1 000 mL。

1.1.4 培养基

1) LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10。

2) TB 培养基(g/L): 酵母粉 24, 蛋白胨 12, 甘油 4, K_2HPO_4 16.43, KH_2PO_4 2.32。

3) 检测培养基(g/L): 酵母粉 0.1, 蛋白胨 1, 葡萄糖 1, NaCl 5, KH_2PO_4 2, 肌酸 1, 酚红 0.012。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建 根据 NCBI 数据库中查询到其它来源的 CRE 基因序列, 设计引物 ACRE-F、ACRE-R、PCRE-F、PCRE-R, 引物序列见表 1。以 ACRE-F、ACRE-R 为引物, *A. nicotianae* 23710 基因组为模板进行 PCR 扩增; 以 PCRE-F、PCRE-R 为引物, *P. putida* KT2440 基因组为模板进行 PCR 扩增。将得到的 CRE 基因分别连接 pMD19-T, 得到质粒 pMD19-T/Acre 和 pMD19-T/Pcre, 进行测序。用 *Nde*I 和 *Xho*I 分别双酶切 pMD19-T/Acre 和 pMD19-T/Pcre, 与同样进行双酶切的 pET-20(b) 进行连接, 连接液转入 *E. coli* JM109 后提取质粒进行酶切验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	引物序列
ACRE-F	GAAAGAACATATGCAAATGCCCAAGACCCTGAA AATC
ACRE-R	CGTACTCGAGTTATTTGCGAATGATGTTGTGCTCC
PCRE-F	GAAAGAACATATGACTACCGCCAACATCGCCAC CA
PCRE-R	TTCTCTCGAGTTACGCGTCGATGATGTTGTCTCC

1.2.2 CRE 的诱导表达 将验证正确的质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 挑取单菌落接入 20 mL LB 培养基中, 37 °C 培养 12 h, 转速为 220 r/min。将生

长好的种子液以体积分数 5% 接种至 TB 发酵培养基中, 37 °C 进行培养。待 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 接入 IPTG 进行诱导, 并把温度降至 30 °C 诱导 10 h。

1.2.3 CRE 的平板检测 预先在 LB 平板上将 *L. reuteri* CICC6124 指示菌和需要检测的菌株分别划线, 待划线菌落长到一定大小, 挑取指示菌单菌落于检测平板上, 并将待检测菌株接种于指示菌的附近, 将平板放置于 30 °C 培养箱进行培养, 观察平板上颜色变化^[1]。

1.2.4 CRE 的活性测定 在试管中加入 900 μL 肌酸溶液, 在室温中平衡 5 min 后加入 100 μL 待测酶液, 在 37 °C 反应 10 min, 然后向反应体系中加入 2 mL 对-二甲氨基苯甲醛溶液终止反应, 并置于 25 °C 温育 20 min, 在 435 nm 处测定吸光度值, 以水调零。空白管是在肌酸溶液中先加入对-二甲氨基苯甲醛, 后加入待测酶液, 其它步骤与测定管一致。

单位酶活定义: 1 min 内将肌酸水解产生 1 μmol 尿素所需要的酶量。

1.2.5 CRE 的纯化方法 将发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 除去上清液, 用纯水将菌体洗涤两次后加入适量的 PBS 缓冲液悬浮细胞。在冰浴条件下利用超声破碎仪对重组大肠杆菌进行破碎。对破碎后的悬浮液进行硫酸铵分级沉淀, 取饱和度为 60%~80% 的沉淀部分, 以 PBS 缓冲液溶解沉淀并透析过夜。透析后, 利用微孔滤膜 (0.25 μm) 去除酶液中的杂质, 利用 AKTA 蛋白纯化仪进行纯化, 使用的柱子为阴离子交换柱 (HiPrep 16/10 Q_XL)。上样缓冲液 (A 液) 为 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液, 而洗脱缓冲液 (B 液) 为加有 1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液。以 A 液进行上样并平衡 30 min, 之后以 B 液进行线性洗脱, 收集洗脱蛋白质。将有酶活的收集液用凝胶柱 (HiLoad 16/60 superdex 200) 进一步纯化, 缓冲液为 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液。

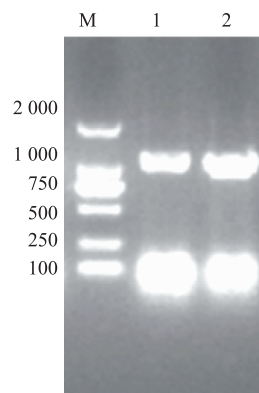
1.2.6 化学物质对 CRE 影响的分析 在酶液中添加一定浓度的化学物质, 在 0 °C 保持 30 min, 测定酶活, 并与不添加任何化学物质的酶液酶活进行比较。

2 结果与讨论

2.1 CRE 重组菌的构建

以 *A. nicotianae* 23710 和 *P. putida* KT2440 基因组为模板分别扩增 *cre* 基因, 凝胶电泳见图 1。在

1.2 kb 处都有一条 DNA 条带, 与预期相符。对来源于 *A. nicotianae* 23710 和 *P. putida* KT2440 的 CRE 基因进行测序, 测序结果见图 2。将测序结果与之前报道的肌酸酶序列进行比对, 发现 *A. nicotianae* 23710 与 *A. nicotianae* 02181 来源的 CRE 基因同源性的 91.7%, *P. putida* KT2440 与 *P. putida* GB-1 来源的 CRE 基因同源性的 93.3%, 而不同属来源的 CRE 同源性较低, *A. nicotianae* 23710 和 *P. putida* KT2440 来源的 CRE 基因同源性仅为 65.1%。



M: DL 1500 DNA 标准相对分子质量; 1: 来源于 *A. nicotianae* 23710 的 CRE 基因; 2: 来源于 *P. putida* KT2440 的 CRE 基因

图 1 CRE 基因琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of CRE gene

对 pMD19-T/Acre 和 pMD19-T/Pcre 双酶切, 回收片段后连接到表达载体 pET20b 上, 并转入 *E. coli* JM109 中。经过菌落 PCR 初步验证得到阳性重组子, 接种过夜培养后提取质粒进行酶切验证, 酶切成功说明重组质粒 pET20b-Acre 与 pET20b-Pcre 构建成功。将验证正确的质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 得到重组表达菌株 *E. coli* BL21A 和 *E. coli* BL21P。

在设计引物时, 在下游引物中加入了 TAA 终止密码子。在 pET20b 质粒上, *Xho* I 酶切位点后有 His-tag, 如果不加入终止密码子, 表达的蛋白质 C-端会带有几个组氨酸。之前为了方便后续的 CRE 纯化, 没有加终止密码子, 将 CRE 与 His-tag 融合表达。虽然外源蛋白质在重组菌中表达了出来, 但均没有 CRE 活性。这可能是因为 CRE 的活性位点位于肽链的 C-端附近, 加入了 His-tag 可能会影响蛋白质的二级结构, 导致表达的蛋白质没有 CRE 酶活。

2.2 重组菌的表达

2.2.1 平板检测 检测平板中含有肌酸, 如果待检

```

ATGACTACCGCCAACATCGCCACCAATGTTTCCGAAGTGGCCCGACTGAAGACCTGCACAACGGCGCCAAGGAGCAGCTGACCTTCTCG 90
GATGCCGAGTTCGAGCGCCGCTGGCCGGCCTGCGCCAGATCATGGCCGCGAAGTCGCTGGACGCGGTCTCCTGACCAGCTACCACGGC 180
ATCAAGTACTACTCGGACTTCCTGTACACCACCTTCGGCCGCAACTACGCGCTGGTGGTACCGCCAGCAACTCCACCACCGTCACCGCG 270
AACATCGATGCCGGCATGCCATGGCGCACCAGCTACGGCGACAACATCGTGTACACCGACTGGAAGCGCGACAACCTTCTTCTACGGCCTG 360
CAGGAAGCACTTAAGCGCGACGGCGTGAAGGCAACCCGGATCGGCGTGAAGACGACTTCTGCGGGGCCGACCCGCCAGCAGATCGCC 450
GACACCTTCGACGGCGCAACCTGGTGGATGTCTCGCAGGACGCCATGCGCCAGCGCATGATCAAGTCCGCCGAGGAAATCGAGGTTCATC 540
AAGCACGGTGCACGCATCGGCGACCTGGGCGGCGAAGCCATCAAGGCAGCGATCCGCGAAGGCATCAGCGAATACGAGGTGCGACTGATC 630
GGCACCGAGGCCATGGTGCACGAGATCGCAAGACCTTCCACACCCGCGAAGTGCAGCGACACCTGGGTCTGGTTCAGTCCGGCATCAAC 720
ACCGACGGCGCCCAACTGGGCCACCCCGCAAGCTTCAGCGCGCGACATCTGTCTGCTGAAGTCTTCCCATGACTTCCGGCTAC 810
TACACCGCACTGGAGCGCACCTGTCTCTGGCGAGCGCGATGCCCGAGCTGGAACATCAACGTCGAGGTGCACAAGCGC 900
GGCCTGGAGTGTATCAAGCCCGGTGTCTGTGCAAGGACATCGCCCGAGCTGAACGAGATCTACATCGCCACGGCCTGTCTGCGAAC 990
CGCACCTTCGGCTACGGCCACTCTTCGGCGTGTCTCGCACTACTACGGACGTGAAGCCGGTCTGGAGCTGCGCGAGGACATTGAGACT 1080
GTCCTGGAGCCAGGCATGGTGTCTCGATGGAACCGATGATACCGTCATGGACGGCGAGCCAGGTGCCGGCGGCTACCGCGAGCACGAC 1170
ATCTGGTTCATCGGCGAGGATAACACCGTTGAGAACATCACAAGTTCGGTTTCGGTCCGAGAACATCATCGACGCGTAA 1254

```

(a)来源于*A. nicotianae* 23710的CRE基因序列

```

ATGCAAATGCCAAGACCCTGAAAATCCGCAATGGCGACAAGGTGCAGCCAACTTTTCCGCTCAGGAATACGCTGCTCGCCACGCCCGG 90
CTGCGGGCCTATATGGCCGAGCAGGACATCGAGGCGGCAATCTTACCTCGTATCACAACGTCAACTATTACAGCGATTTCTTTACTGC 180
TCGTTCGGCCGCCCTTATGCGCTGGTGATACCCAGGACAAGGTGGTCTCGATCAGCGCCAATATCGACGGCGGGCAACCCTGGCGGCGC 270
ACGGTGGGCACTGACAACATCGTCTACACCGACTGGCAGCGCGACAACATTTCTGCTGCCATCCAGCAGGCGTTGCCGCTGGCCTCGCGC 360
ATCGGCGTGGAGTACGACCACCTGAACCTGCAGAACACCGGCAAACTCGCCGCTGTACCCCAAGGCCGAGCTGGTGGACATCGCTGCG 450
CCGTGCATGCGTATGCGCATGATCAAGTCGGCCGAGGAGCAGGCACTTATCCATCAGGTGCACAGGTGGCCGACATCGGCGGGGCGGCA 540
GTGGTCAAGCCCTGCGTGAGCAGGTGCCGAGTACGAGGTGGCACTGCATGCCACCCAGGCGATGGTGCAGGAAATTGCCAAACGCTTC 630
CCCGACGCCGAGCTGATGGACACCTGGACCTGGTTCCAGTCCGGGCTCAACACCGATGGCGCACACCCCGGTACACAGCCGCCGTGTG 720
GGCAAGGGCGAGATCCTCAGCCTCAACTGTTTCCCATGATCGCCGTTATTACACCGCGCTGGAGCGCACCTGTCTCTTGACCACTGC 810
CCGGACGAGTACCTGCGCCTGTGGCAGGCCAACGTCGAAGTGCACGAAGCCGGGCTGCAACTGGTGCAGCCAGGCATGCGCTGCAGCGAT 900
ATCGCCCGCAACTGAACGAGATCTTCTGCGCCACGACCTGTGAGTACCGCACCTTCGGGTATGGCCATTCTGTCGGCACGCTCAGC 990
CATTACTACGGCCGCGAGCGGGGCTGGAGCTGCGCGAGGACATCGATACTGTGTGGAACCGGCATGGTGGTGTGATCGAGCCGATG 1080
ATCATGCTGCTGAAGGGCGACCGGGGCGGGCGGTTATCGCGAGCACGACATCTGATCGTCAACGACAGCGGCGCCGAGAACATCACC 1170
AAGTTCCTGATGGGCGGAGCACAACATCATTTCGAAATAA 1212

```

(b)来源于*P. putida* KT2440的CRE基因序列图2 来源于*A. nicotianae* 23710和*P. putida* KT2440的CRE基因序列Fig. 2 CRE genes from *A. nicotianae* 23710 and *P. putida* KT2440

测菌产CRE,可以分解肌酸得到尿素。而*L. reuteri* CICC6124可以将尿素分解产生氨,使周围培养基pH升高,从而使培养基中的pH指示剂酚红改变颜色。在检测平板上分别接种如下菌株:指示菌*L. reuteri* CICC6124、阴性对照菌*E. coli* BL21(pET20)、待检测菌*E. coli* BL21A、*E. coli* BL21P,观察生长情况。平板检测结果见图3。可以发现,在*E. coli* BL21A、*E. coli* BL21P周围均有红色,且*E. coli* BL21A周围的显色反应比*E. coli* BL21P还要强烈,而*E. coli* BL21(pET20)周围却没有明显红色,说明重组菌*E. coli* BL21A和*E. coli* BL21P可以产CRE。

2.2.2 SDS-PAGE 分析和酶活检测 将摇瓶发酵液1000 r/min离心10 min,去除上清液,以PBS缓冲液悬浮细胞。在0℃下破碎细胞,破碎完全后离心,取上清液分别进行SDS-PAGE分析和酶活检测。SDS-PAGE分析结果见图4。在相应大小处重组

菌上清液均有明显条带,而*E. coli* BL21(pET20)没有明显条带,说明CRE在重组菌中实现了表达,且表达量较高。

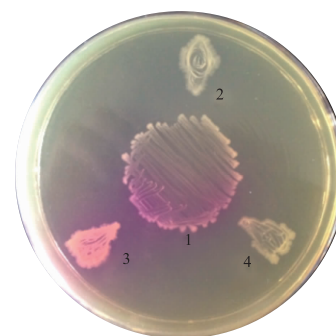
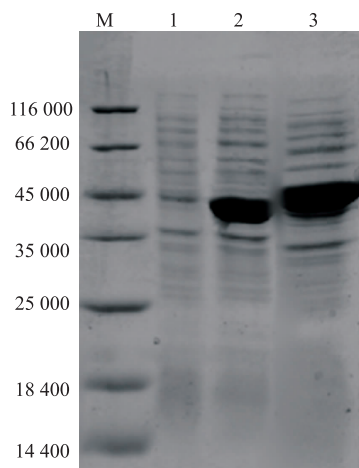
1:*L. reuteri* CICC6124;2:*E. coli* BL21 (pET20b);3:*E. coli* BL21A;4:*E. coli* BL21P

图3 CRE酶活平板检测

Fig. 3 Determination of the CRE activity with an indicator plate

酶活检测测得原始菌 *A. nicotianae* 23710 的酶活为 190.19 U/g, *P. putida* KT2440 酶活为 54.92 U/g, 而重组菌 *E. coli* BL21A 酶活为 1 834.04 U/g, *E. coli* BL21P 酶活为 1 380.92 U/g。可以发现重组菌酶活要远高于原始菌酶活,而两种重组菌相比之下, *E. coli* BL21A 比 *E. coli* BL21P 的酶活高出32.8%。



M: 蛋白质标准相对分子质量; 1: *E. coli* BL21(pET20)胞内上清液; 2: *E. coli* BL21P 胞内上清液; 3: *E. coli* BL21A 胞内上清液

图4 重组 CRE SDS-PAGE 分析

2.3 重组 CRE 的纯化

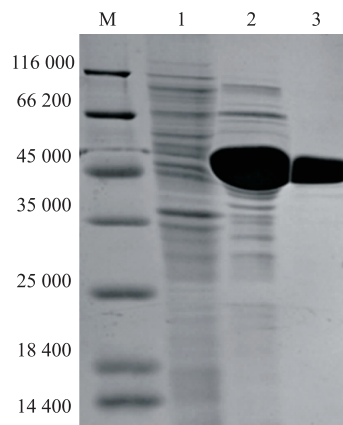
CRE 的整个纯化过程是由硫酸铵沉淀、阴离子柱纯化、分子筛构成的。由于细胞内杂蛋白质含量比较多,不利于目的蛋白质与阴离子柱的结合,需要先去一部分杂质。硫酸铵沉淀作为一种温和的不易使蛋白质变性的纯化方法被广泛应用,所以在使用阴离子柱纯化之前,选择硫酸铵沉淀以去除部分杂蛋白质并浓缩目的蛋白质。进行硫酸铵分级沉淀时,发现重组 CRE 主要在硫酸铵浓度为 60%~80%条件下析出。

CRE 的理论等电点(PI)在 5.0 左右,在 pH 为 7.0 的条件下带负电荷,因此可以选择阴离子交换色谱作为纯化的第二步。发现在 15%~20%B 的洗脱条件下,出现了一个峰形很好的洗脱峰,经酶活检测确实为 CRE 的洗脱峰。

此纯化方法操作方便,且操作步骤较少,可以快速制备纯化样品(见图 5),以便对重组 CRE 的进一步分析。

对纯化的两种重组 CRE 进行比酶活测定,结果

E. coli BL21A 的 CRE 比酶活为 20.25 U/mg,而 *E. coli* BL21P 的 CRE 比酶活为 9.0 U/mg。*E. coli* BL21A 的 CRE 比酶活相比之下高很多,且 *E. coli* BL21A 的产酶量较高,所以将 *E. coli* BL21A 作为后期的主要研究对象。



M: 蛋白质标准相对分子质量; 1: *E. coli* BL21(pET20)胞内上清液; 2: 60%~80%硫酸铵沉淀; 3: 纯酶。

图5 重组 CRE 纯化过程 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purification process of the recombinant CRE

2.4 重组 CRE 的应用分析

在实际应用中,CRE 需要满足一些条件。首先,CRE 的最适温度在 35~45 ℃之间,最适 pH 在 7.0~9.0 之间。其次因为在制备酶试剂盒时,需要在其中加入一定量的 NaN_3 作为防腐剂,所以要求 CRE 能够在一定浓度的 NaN_3 下保持酶活。最后就是 CRE 的纯度要求,保证干扰应用的有害杂酶——过氧化氢酶在 2%以下。根据以上在实际应用中的 CRE 的要求对 *E. coli* BL21A 所产的重组 CRE 进行应用分析。

2.4.1 温度、pH 对重组 CRE 的影响 考察了温度、pH 对重组 CRE 的影响,结果与来源于 *A. nicotianae* 02181 的 CRE 基本一致,最适反应温度为 37 ℃,最适反应 pH 为 7.5^[12]。

2.4.2 化学物质对重组 CRE 的影响 分析了部分化学物质对重组 CRE 的影响,结果见表 2。首先分析了 NaN_3 对 CRE 的影响, 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,在 CRE 的应用过程中作为防腐剂存在。分别设置了 3 种不同浓度的 NaN_3 进行分析,结果发现 NaN_3 对 CRE 没有显

著影响。之后又分析了几种工业中常用的表面活性剂和螯合剂对 CRE 的影响,发现 SDS 能够使 CRE 完全失活,而螯合剂 EDTA 和其它类型的表面活性剂(Tween20 和 Triton X-100)对 CRE 没有抑制作用。

表 2 不同化学物质对 CRE 的影响

Table 2 Effect of chemicals on CRE activity

化学物质	浓度	残余活力/%
NaN ₃	5 mmol/L	105
NaN ₃	10 mmol/L	106
NaN ₃	20 mmol/L	101
EDTA	1 mmol/L	110
Tween20	1 g/L	112
SDS	5 g/L	1
Triton X-100	5 g/L	115

2.4.2 重组 CRE 的纯度检测 对重组 CRE 进行纯化后测定其中过氧化氢酶酶活,结果发现纯化的重组 CRE 中检测不到过氧化氢酶活性,满足应用要求。

综上,CRE 的最适温度为 37 ℃,最适 pH 为 7.5,能够耐受 NaN₃,且纯化的 CRE 中不含过氧化氢酶,因此满足实际应用。

3 结 语

CRE 作为酶法测定肌酐方法中的关键酶,在临床检测肾脏功能中起着重要作用。作者成功克隆来源于 *A. nicotianae* 23710 的 CRE 基因,并构建了重组表达菌 *E. coli* BL21A。通过对重组菌 *E. coli* BL21A 进行诱导表达,发现重组菌酶活达到 1 834.04 U/g,与原始菌的酶活 190.19 U/g 相比,提高了 9.6 倍之多。此外还对重组 CRE 进行了纯化和性质分析,所采用的纯化方法简单有效,可以快速得到较纯 CRE 进行分析。重组 CRE 的最适反应温度为 37 ℃,最适反应 pH 为 7.5,在常用防腐剂 NaN₃ 的作用下也不会影响酶活。

本研究实现了 CRE 的高效表达,为降低肌酸水解酶的生产成本和扩大应用范围奠定基础。

参考文献:

- [1] Eun J K, Tesrya H, Yasuko Y. 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] Koyama Y, Kitao S, Yamamoto-Otake H, et al. Cloning and expression of the creatinase gene from *Flavobacterium* sp. U-188 in *Escherichia coli*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(6): 1453-1457.
- [4] Schumacher G, Hilscher W, Mollering H, et al. Engineering enzymes for clinical diagnosis [J]. *Annales de Biologie Clinique*, 1993, 51(9): 815-819.
- [5] Suzuki K, Sagai H, Sugiyama M, et al. Molecular cloning and high expression of the *Bacillus creatinase* gene in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76(2): 77-81.
- [6] Hoeffken H W, Knof S H, Bartlett P A, et al. Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1988, 204(2): 417-433.
- [7] Matsuda Y, Wakamatsu N, Inouye Y, et al. Purification and characterization of creatine amidinohydrolase of *Alcaligenes* origin[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1986, 34(1): 2155-2160.
- [8] Wang Y Y, Ma X H, Zhao W F, et al. Study on the creatinase from *Paracoccus* sp strain WB1[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(9): 2072-2077.
- [9] Minka H, Hans-Jugen K, Norbert M. Creatinine and N-methylhydantoin in two newly isolated *Clostridium* species[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 145: 322-328.
- [10] Yoshimoto T, Oka I, Tsuru D. Purification, crystallization, and some properties of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1976, 79(6): 1381-1383.
- [11] Chang M C, Chang C C, Chang J C. Cloning of a creatinase gene from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* by using an indicator plate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3437-3440.
- [12] 罗侃, 崔有宏, 曾志南. 烟草节杆菌 02181 肌酸酶的纯化和理化特性[J]. 甘肃科学学报, 2006, 18(1): 60-63.
LUO Kan, CUI Youhong, ZENG zhinan. Purification and characteristics of creatinase from *Arthrobacter nicotianae* 02181 [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2006, 18(1): 60-63. (in Chinese)