

高盐胁迫渗透对 SBD2 重组蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的影响

季 勤¹, 张云峰¹, 罗玉明¹, 徐 春¹, 黄翠香²

(1. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 生物多样性与生物技术江苏省重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 在基因工程的操作中, 包涵体的形成是人们利用大肠杆菌表达外源蛋白质的一大难点. 本研究将环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) 环状糊精糖基转移酶 (CGTase) 的淀粉粒结合域 (SBD) 基因编码序列的两个拷贝通过一连接肽连接 (SBD2) 后, 克隆到大肠杆菌表达载体 pTrcHis B 上, 得到的 pTrcHis B/SBD2 质粒转化大肠杆菌 Top10 研究了不同培养基、不同诱导温度和时间对 SBD2 蛋白表达的影响. 结果表明, 利用相容性溶质山梨醇和甜菜碱等, 在高盐胁迫下, 实现了 SBD2 重组蛋白质在大肠杆菌中的可溶性表达, 这一结果为在体外研究 SBD2 蛋白的功能奠定了基础.

[关键词] SBD 重组蛋白, 相容性溶质, 高盐胁迫, 可溶性表达

[中图分类号] Q 786 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010) 03-0070-06

Effect of Hyperosmotic Stress on Expression of Soluble SBD2 Recombinant Protein in *Escherichia coli*

Ji Qin¹, Zhang Yunfeng¹, Luo Yuming¹, Xu Chun¹, Huang Cuixiang²

(1. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural and Biotechnology Around Hongze Lake, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaiyin 223300, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract An artificial tandem repeat of a starch-binding domain (SBD2) was engineered by two copies of the SBD derived from *Bacillus circulans* cyclodextrin glycosyltransferase via a linker peptide. The SBD2 gene was inserted into an *E. coli* expression vector pTrcHis B to obtain the pTrcHis B/SBD2 vector. Recombinant *E. coli* Top10 cells containing the pTrcHis B/SBD2 construct were grown in LB with 50 µg/mL ampicillin and LB with 50 µg/mL ampicillin, 1 mol/L sorbitol and 2.5 mmol/L glycyl betaine, respectively. Expression of SBD2 protein was induced by adding of IPTG and analyzed by SDS-PAGE. The results show that large amounts of soluble protein were obtained by growing and inducing the cells under osmotic stress in the presence of sorbitol and glycyl betaine.

Key words SBD2 protein, compatible solute, hyperosmotic stress, soluble expression

在前面的研究中, 我们报道了 SBD-转基因平台技术的建立, 该技术是利用 *Bacillus circulans* 环状糊精糖基转移酶 (CGTase) 的淀粉粒结合结构域 (SBD) 与其它结构域分离以后仍然可以与淀粉粒结合这一特性, 用它作为“锚”构建重组基因, 重组基因导入作物体内后的表达产物在淀粉粒形成过程中被锚定在淀粉粒中, 并对淀粉分子结构进行改良, 从而实现在作物体内合成新型淀粉的目的^[1].

为了提高“锚”与淀粉粒的亲合性, 增加外源蛋白在淀粉粒中的积累量, 我们将 SBD 基因编码序列的两个拷贝通过一连接肽连接 (SBD2) 后, 克隆到大肠杆菌表达载体 pTrcHis B^[1, 2]中, 并在大肠杆菌中进行

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30771367)、江苏省高校高新技术产业发展基金 (JHB04-043)、淮阴师范学院教授基金 (06HJSJ025)、“青蓝工程”。

通讯联系人: 季 勤, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学. E-mail: jiqin@hytc.edu.cn

行了表达。但实验结果显示, 大肠杆菌在常规的 LB 培养液中培养和诱导, 所表达出的 SBD2 蛋白几乎全部以不溶性包涵体的形式存在, 而且从沉淀物中恢复变性的重组蛋白质活性较为困难, 这在很大程度上限制了在体外开展对 SBD2 重组蛋白性质以及它们与淀粉粒结合性能的研究。

大量研究结果已表明, 某些微生物在高盐环境中, 可以通过自身合成或从培养基中吸取相容性溶质和渗透保护物质如甜菜碱 (三甲铵乙内酯)、脯氨酸、海藻糖等^[3-5], 用来平衡细胞渗透压, 或作为化学分子伴侣来稳定蛋白质^[6]。当细菌适应了高盐环境后, 所表达的外源蛋白可溶性会得到明显改善^[4 5 7-9]。除了可以通过改变培养基的组成外, 还可以用较低的诱导温度来提高可溶性重组蛋白的表达量^[10-13]。

本研究的目的是在高盐的 LB 培养基中添加山梨醇和甜菜碱, 在胁迫渗透条件下, 对 SBD2 重组蛋白质的可溶性表达进行研究, 为重组蛋白的可溶性表达提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及基因

大肠杆菌 DH5 α 作为基因克隆的宿主菌, 大肠杆菌 Top10 (Invitrogen, 荷兰) 用作为基因表达的宿主菌。pTrHis B 质粒 (Invitrogen, 荷兰) 用作大肠杆菌表达载体, SBD 等基因片段由荷兰瓦赫宁根大学植物科学系作物育种实验室提供。

1.2 大肠杆菌表达载体的构建及转化

pTrHis B/SBD2 表达载体的构建参阅文献^[1, 2]。表达载体转化大肠杆菌 Top10 后, 在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养。挑取阳性菌落进一步培养, 从大肠杆菌中提取的 pTrHis B/SBD2 质粒 DNA 经多组双酶切鉴定后, 进一步测序检测基因有无移码或突变。

1.3 重组基因的诱导表达

将带有 pTrHis B/SBD2 的大肠杆菌接种到 50 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养液 (pH 7.0) 中, 37°C 振荡培养至 $A_{600} \approx 0.8$

SBD2 重组基因的诱导表达分为两组: 第一组, 取 10 mL 上述的大肠杆菌培养物接种到 500 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的常规 LB 培养液 (LB, pH 7.0) 中, 37°C 振荡培养至 $A_{600} \approx 0.8$ 时, 加入异丙基硫代 β -半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 然后分别在 37°C 和 25°C 条件下诱导 0 2 4 6 8 和 10 h。第二组, 取 10 mL 大肠杆菌培养物接种到 500 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素、1.0 mol/L 山梨醇、2.5 mol/L 甜菜碱和 5% NaCl 的胁迫 LB 培养液 (LB + S/B, pH 7.0) 中, 37°C 振荡培养至 $A_{600} \approx 0.8$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 然后分别在 37°C 和 25°C 条件下诱导 0 2 4 6 8 和 10 h。诱导表达结束后, 离心 (10 000 r/min, 4°C, 10 min) 收集菌体, 用 10 mL 缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0) 洗涤菌体, 重复洗涤 1 次, 菌体用液氮冰冻后保存在 -80°C 备用。

1.4 重组蛋白质的分离及纯化

用 1 mL 上述的缓冲液悬浮等体积的大肠杆菌, 在 4°C 条件下, 用弗氏细胞破碎仪 (French Pressure Cell, Amicon, 美国) 破碎菌体, 压力为 $1.58 \times 10^8 \text{ Pa}$ (20 000 psi)^[4], 离心 (3 000 r/min, 4°C, 10 min) 后分别收集上清液和包涵体沉淀。

在非变性条件下采用亲和层析法从上清液中分离纯化可溶性 SBD2 蛋白质是在上清液中加入 50 μL N+NTA 树脂 (QIAGEN, 德国), 在室温条件下, 缓慢混合 1 h, 离心收集树脂。然后用 pH 7.8 pH 6.0 和 pH 5.5 的缓冲液 (20 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L HCl) 分别洗涤 N+NTA 树脂, 每一缓冲液重复洗涤 3 次, 每次 400 μL 。最后用 200 μL , pH 4.0 洗脱缓冲液 (组成与上述缓冲液相同) 将结合在 N+NTA 树脂上的 SBD2 蛋白洗脱下来。在实验中, 部分样品采用 N+NTA 树脂预装柱进行 SBD2 蛋白质的分离纯化, 洗涤缓冲液和洗脱缓冲液与上述相同。

从包涵体沉淀中分离包涵体 SBD2 蛋白质是在变性条件下进行的, 其操作在 QIAGEN 公司提供的 N+NTA 纯化步骤的基础上, 略做修改。在室温条件下, 用含有 100 mmol/L NaH_2PO_4 和 10 mmol/L Tris-HCl 的 8 mol/L 尿素溶液 (pH 8.0) 悬浮和溶解包涵体沉淀 3 h。包涵体沉淀和尿素溶液的比例为 1:3^[11]。离心 (10 000 r/min, 10 min) 收集上清液。在上清液中加入 50 μL N+NTA 树脂, 在室温条件下, 缓和混合 1 h, 离心收集树脂, 随后用 400 μL 的洗涤缓冲液 (100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿

素, pH 6.3) 重复洗涤 3 次. 用 200 μ L 的洗脱缓冲液 (100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl , 100 mmol/L EDTA, pH 6.3) 洗脱结合在 Ni-NTA 树脂上的 SBD2 蛋白. 在实验中, 部分样品采用 Ni-NTA 树脂预装柱进行 SBD2 蛋白质的分离纯化, 洗涤缓冲液和洗脱缓冲液与上述相同.

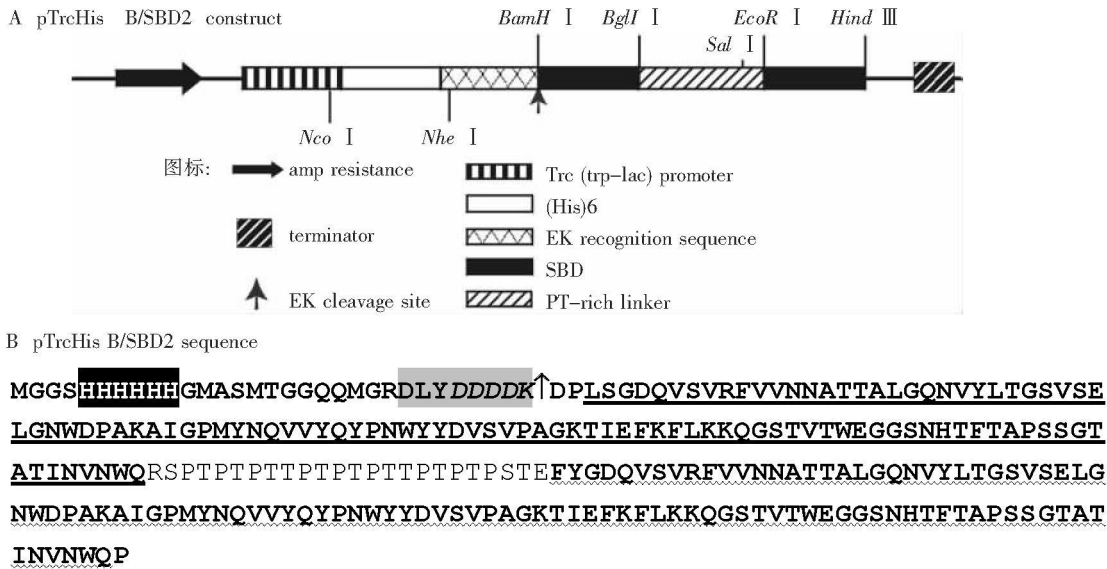
1.5 SDS-PAGE 鉴定

取 10 μ L 纯化的 SBD2 蛋白质样品, 加 10 μ L 2 \times SDS-PAGE 样品缓冲液^[14]混合, 在沸水浴中加热 5 min, 冷却后离心 (2000 r/min) 5 min, 用 Homogeneous 12.5% SDS-PAGE 预制凝胶 (Phamacia 瑞典), 在 PhastSystem 全自动多功能快速水平电泳系统 (Phamacia 瑞典) 上进行蛋白质样品分离, 预染蛋白质 Marker 为 RainBow RPN800 (Amersham, 英国), 分离后用银染法对胶板进行染色处理. 电泳、染色条件和程序参阅仪器操作手册.

2 结果与分析

2.1 SBD2 基因大肠杆菌表达载体的构建

将环状糊精糖基转移酶的 SBD 基因编码序列的两个拷贝通过一连接肽连接后, 将 SBD2 基因克隆到大肠杆菌表达载体 pTrcHis B 中. 获得 pTrcHis B/SBD2 重组质粒 (见图 1- A), 质粒的测序结果表明, SBD2 基因序列和读码框都与预期的完全一致. SBD2 蛋白由 232 个氨基酸残基组成, 其氨基酸序列以及与 pTrcHis B 载体融合部分的氨基酸序列见图 1- B. 大肠杆菌 SBD2 蛋白质相对分子质量的理论计算值为 29 012



A: pTrcHis B/SBD2 大肠杆菌表达载体结构示意图.
B: 大肠杆菌 SBD2 重组蛋白质的氨基酸序列. 黑色盒部分为蛋白纯化的 His Tag 融合标签. 灰色盒为 antiXpress 抗体的抗原决定部位, 其中斜体字母为肠激酶识别序列, 箭头为肠激酶的切割位点. 黑体划线序列为第一个 SBD 的氨基酸序列, 黑体划波线为第二个 SBD 序列, 非黑体部分为连接肽序列.

图 1 SBD2 重组基因大肠杆菌表达载体
Fig.1 Overview of pTrcHis B/SBD2 vector used for SBD2 expression in *E. coli*

2.2 SBD2 基因诱导表达分析

为了获得可溶性 SBD2 重组蛋白, 在本研究中, 我们探索了重组大肠杆菌培养及其诱导所用的培养基组成、IPTG 诱导的温度和时间等对蛋白质可溶性表达的影响.

pTrcHis B/SBD2 重组质粒转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞后, 将带有重组质粒的大肠杆菌细胞分别接种到常规 LB 和胁迫 LB+ S/B 两种培养液中, 在 37℃ 条件下培养至 $A_{600} \approx 0.8$. 加入 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L) 后, 分别在 37℃ 和 25℃ 条件下诱导, 从而观察不同培养基、不同诱导温度和时间对 SBD2 重组蛋白质表达的影响. 表达结束后利用其重组蛋白上所带的 His Tag 融合标签对 SBD2 蛋白质进行分离纯化和 SDS-PAGE 分析. 根据 SDS-PAGE 图谱上条带的强弱, 将其表达量分为 0+、1+、2+、3+ 和 4+ 五个等级, 它们分别代表无、低、中、较高和高水平表达.

2.2.1 相容性溶质对 SBD2基因表达的影响

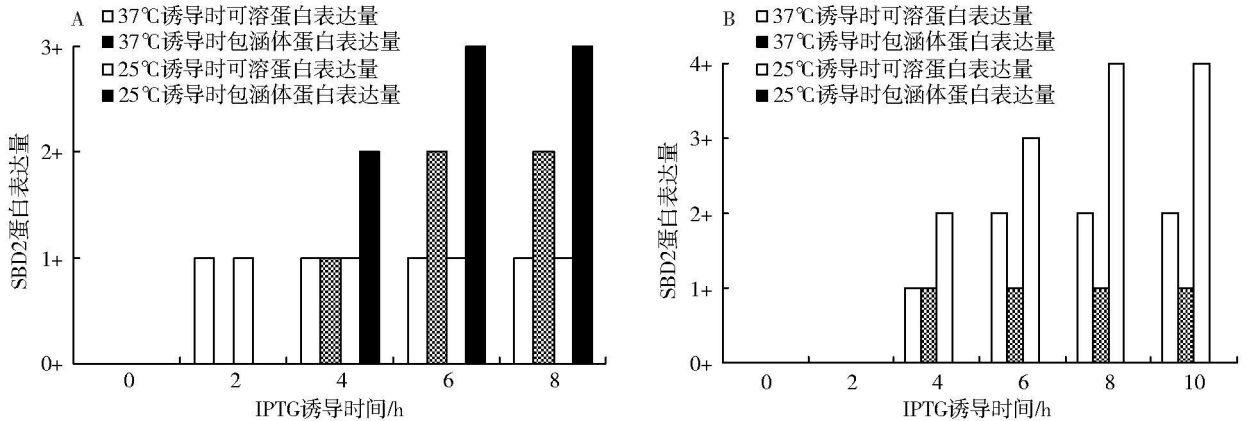
图 2是重组大肠杆菌在 LB 和 LB+ S/B培养液中培养至 $A_{600} \approx 0.8$ 后, 分别在 37℃和 25℃条件下, 诱导不同时间可溶性和包涵体 SBD2表达量的分析结果. 从图 2-A 和 B 中可以看出, 在相同的培养和诱导条件下, 在胁迫 LB+ S/B培养液中, IPTG 诱导所表达的蛋白质绝大多数是以可溶性的形式存在, 而后者绝大多数是包涵体. 研究结果表明, 在大肠杆菌培养液中添加适量的 NaCl 山梨醇和甜菜碱可以提高可溶性 SBD2蛋白的表达量.

2.2.2 不同诱导温度和时间对 SBD2基因表达的影响

从图 2-A 中可以看出, 当使用常规 LB 培养液, 在 37℃和 25℃下诱导 2 h, 在细胞上清液中检出可溶性 SBD2蛋白, 其表达量均为 1+. 当诱导时间为 4 h 时, 包涵体沉淀中检出 SBD2蛋白, 当诱导时间延长至 6 h, 包涵体中 SBD2蛋白表达量达到最高点, 37℃诱导条件下的为 2+, 25℃条件下是 3+, 而两种诱导温度下的可溶性 SBD2表达量依然是 1+. 如果诱导时间继续延长, 蛋白的表达量无明显增加 (见图 2-A).

当使用胁迫 LB+ S/B 培养液, 在 37℃和 25℃下诱导 4 h 时, 才检出 SBD2蛋白 (见图 2-B), 在 25℃下诱导, 所表达的 SBD2蛋白是可溶性的, 其表达量为 2+, 而 37℃条件下的诱导, 可溶性与包涵体蛋白的表达量相同, 均为 1+. 随着诱导时间延长至 8 h, 在 25℃温度条件下诱导, 依然无包涵体蛋白检出, 可溶性蛋白的表达量由最初的 2+ 增加至 4+, 是 37℃条件下表达量的 2倍. 当诱导时间继续延长到 10 h, 蛋白的表达量已趋饱和 (见图 2-B).

从上述的结果中可以看出, 不论是使用常规 LB 还是胁迫 LB+ S/B 培养液, 在 25℃条件下诱导, SBD2的总表达量 (可溶性和包涵体蛋白质之和) 均高于 37℃诱导相同时间段的, 这表明较低的诱导温度有利于 SBD2蛋白的表达, 如在培养液中添加 NaCl 相容性溶质山梨醇和甜菜碱可以改善表达蛋白的可溶性, 但对表达量没有影响. 实验结果表明, 重组大肠杆菌在胁迫 LB+ S/B 培养液中, 在 25℃条件下, IPTG 诱导 8 h, SBD2蛋白质全部以可溶性形式表达.



A: 重组大肠杆菌在 LB 培养液中培养和诱导 SBD2 蛋白质表达; B: 重组大肠杆菌在 LB+S/B 培养液中培养和诱导 SBD2 蛋白质表达

图 2 大肠杆菌 SBD2 蛋白质表达水平分析

Fig.2 Analysis of SBD2 protein expression in *E. coli*

2.3 重组 SBD2蛋白的分离和纯化

利用重组蛋白 N端融合的 His- Tag融合标签的特性, 用 Ni-NTA 亲和层析法分离纯化 SBD2蛋白. 图 3-A 是重组大肠杆菌在不同培养液中, 在 25℃下 IPTG 诱导 6 h 后, 可溶性 SBD2表达和纯化的 SDS-PAGE电泳图谱. 从图 3-A 可以看出, 在细胞裂解上清液的 SDS-PAGE全蛋白质的电泳图谱中, 在相对分子质量约 29 000处有明显的表达带 (well 1和 5), 当加入 Ni-NTA 树脂后, 上清液全蛋白质的电泳图谱中的这一条带消失 (见图 3-A, well 2和 7), SDS-PAGE检测 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白显示, 虽然在 SBD2蛋白质纯化样品中存在少量其它杂蛋白, 但相对分子质量约为 29 000的蛋白条带清晰可见, 与预期分子量大小一致 (见图 3-A, well 3和 6), 在 LB 培养液中 (well 2), 可溶性 SBD2蛋白的表达量为 1+, 而在 LB+ S/B 培养液中 (well 6), 可溶性 SBD2蛋白的表达量为 3+. 图 3-B为重组大肠杆菌在不同培养液中

培养, 在 25℃条件下诱导 8 h, 可溶性和包涵体蛋白纯化后的电泳图谱. 从 SDS-PAGE 电泳图谱可以看出, 分离纯化所得到的蛋白质条带与标准 SBD2 蛋白质 (经 Western 印迹杂交验证) 条带大小相同, 这一结果表明, 用 Ni-NTA 亲和层析法纯化得到的蛋白即为 SBD2 重组. 此外, 从图谱上还可以看出, 用 Ni-NTA 树脂预装柱分离纯化可以得到不含杂蛋白的 SBD2

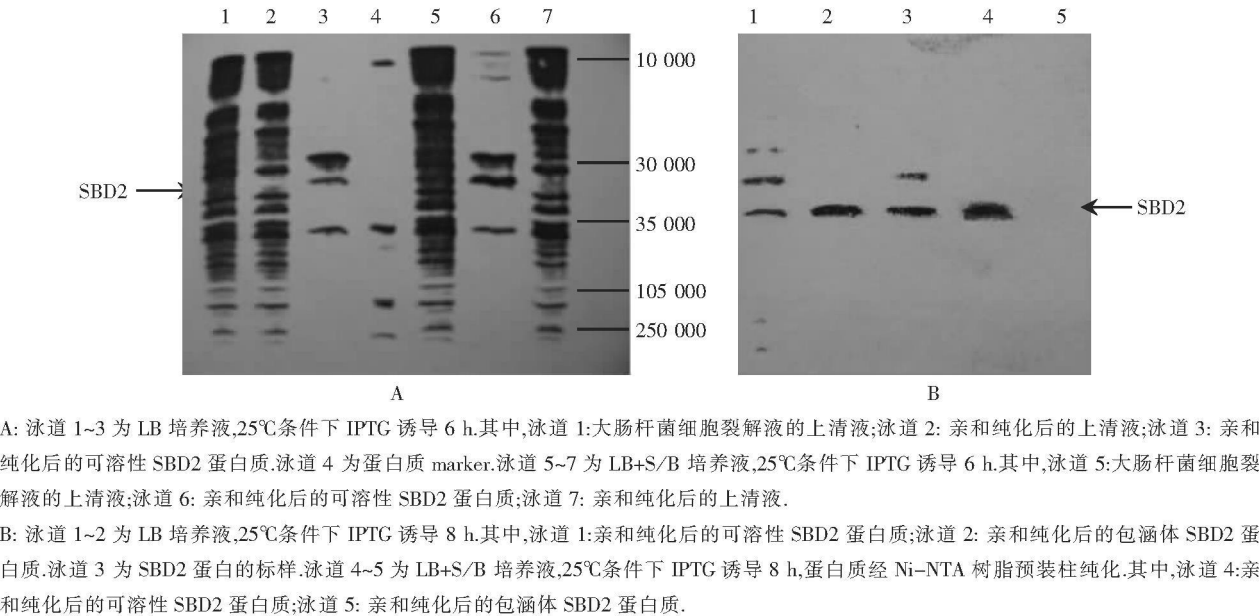


图 3 SBD2 的表达与纯化的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SBD2 protien expression and purification

3 讨论

本研究将带有 pTrHis B/SBD2重组质粒 Top10大肠杆菌在含有山梨醇 1.0 mol/L、甜菜碱 2.5 mmol/L 和 5% NaCl 的 LB/Amp 培养液中, 在 37℃条件下培养至 $A_{600} \approx 0.8$ 然后在 25℃条件下用 IPTG 诱导 8 h SBD2 重组蛋白全部以可溶性形式表达. 这比在常规 LB 培养液中, 可溶性蛋白的表达量提高了约 4 倍. 但与此同时我们也观察到了在高盐条件下, 以及山梨醇、甜菜碱等相容性溶质的存在时会降低细胞生长速率, 导致大肠杆菌生长达到相同 A_{600} 值 (结果未给出) 和 SBD2 蛋白达到相同表达量所需要的时间延长, 这主要是因为高盐胁迫渗透条件下细菌需要时间进行适应环境的暂时生理调整, 此时细菌可以通过自身合成或从培养基中吸取相容性溶质和渗透保护物质用来平衡细胞渗透压, 缓和盐对细胞生长的影响, 我们的这一观察结果和 Sarah 等人的报道^[6]是一致的.

由于实验中采用弗氏细胞破碎仪破碎菌体, 而且可溶性 SBD2 蛋白的分离纯化是在非变性条件下进行, 因此 SBD2 蛋白分离纯化后无需复性, 就可直接用于其理化性质及其功能等方面的研究. 与以前的包涵体蛋白质变性、复性过程相比, 这一方法具有明显的优势, 同时也为在细菌中高水平表达可溶性蛋白提供了实验和理论依据.

致谢: 感谢荷兰瓦赫宁根大学作物科学系作物育种实验室提供 SBD2 基因片段.

[参考文献]

[1] Ji Q, Vincken J P, Suurs L C J M, et al. Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis[J]. Plant Mol Biol 2003, 51(5): 789-801.
[2] Ji Q, Oomen R J F J, Vincken J P, et al. Reduction of starch granule size by expression of an engineered tandem starch-binding domain in potato plants[J]. Plant Biotechnol J 2004, 2(3): 251-260
[3] Roberts M E. Osmoadaptation and osmoregulation in Archaea[J]. Frontiers in Bioscience 2000, 4: 796-812
[4] John R B, Roger H. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form[J]. FEBS

- 1991, 295(1/2/3): 10-12
- [5] Mesta L, Rascle C, Durand R, et al. Construction of a chimeric xylanase using multidomain enzymes from *Neocallimastix frontalis* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29: 456-463
- [6] Diamant S, Rosenthal D, Azan A, et al. Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49: 401-410
- [7] Barth S, Huhn M, Matthey B, et al. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1572-1579.
- [8] 任永明, 张明生, 何丹, 等. 相溶性溶质支持下重组免疫毒素的周质腔可溶性表达及葡萄糖对其表达的影响 [J]. *遗传*, 2003, 25(1): 40-44
- [9] Picaud S, Olsson M E, Brodelius P E. Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51(1): 71-79
- [10] Hannig G, Makrides S C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Tib Tech*, 1998, 16: 54-60
- [11] Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. *Tib Tech*, 1994, 12: 456-463
- [12] Weickert M J, Doherty D H, Best E A, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Bio Biotechnol*, 1996, 7: 494-499
- [13] 雒军, 宫晓燕, 魏炜, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II 在大肠杆菌中的重组表达及重组酶性质测定 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2009, 32(3): 92-98
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 69 页)

- [6] Lubbers M W, Rodriguez S B, Honey N K, et al. Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Can J Microbiol*, 1996, 42(2): 132-140
- [7] 邱业先, 彭仁, 汪金莲. 红壤稻田脲酶与微生物生物量的变化规律及其相关性研究 [J]. *中国学术期刊文摘: 科技快报*, 1999, 5(10): 1307-1309
- [8] 邱业先, 彭仁, 汪金莲. 红壤稻田脲酶产生途径研究 [J]. *中国学术期刊文摘: 科技快报*, 2000, 6(1): 97-100
- [9] 范秀容, 李广武, 等. *微生物学实验* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998
- [10] 邱祖明. 曲霉脲酶特性及其表达的初步研究 [D]. 南昌: 江西农业大学林学院, 2005
- [11] Weatherbum M W. Phenohypochlorite reaction for determination of ammonia [J]. *Anal Chem*, 1967, 39: 971-974
- [12] Witte C P, Escobar N M. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction [J]. *Anal Biochem*, 2001, 290: 102-107
- [13] Breitenbach J M, Hausinger R P. *Proteus mirabilis* urease: Partial purification and inhibition by boric acid and boronic [J]. *Biochem*, 1988, 250(3): 917-920
- [14] Todd M J, Ausinger R P. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes* [J]. *Biol Chem*, 1987, 262(13): 5963-5967

[责任编辑: 顾晓天]