

文章编号: 1673-1689(2011)05-0750-07

精氨酸脱亚胺酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及纯化

刘咏梅^{1,2}, 倪晔^{1,2}, 李娜^{1,2}, 李利峰^{1,2}, 孙志浩^{* 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: 通过 PCR 扩增得到菌株编码 ADI 的 *arcA* 基因, 并构建表达载体 pET24a-ADI。将该载体导入大肠杆菌 BL21(DE3), 获得高效表达 ADI 基因的重组菌。对 ADI 诱导表达条件进行优化, 结果发现宿主菌在 A_{600} 达到 1.0 时加入 0.2 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 在 30 °C 诱导 4 h 酶活最高, 为 2.04 U/mL 发酵液。经超声波破碎、HiPrep DEAE FF 阴离子交换层析、SuperdexTM 200 凝胶过滤层析, 可获得 SDS-PAGE 电泳纯重组精氨酸脱亚胺酶 (rADI)。rADI 相对分子质量大小为 92 600, 由两个相同亚基组成, 纯化后的 rADI 比酶活达 20.9 U/mg。

关键词: 精氨酸脱亚胺酶; 克隆; 表达; 纯化

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

Cloning, Expression and Purification of Arginine Deiminase from *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC 039 in *Escherichia coli* BL 1 (DE3)

LIU Yong-mei^{1,2}, NI Ye^{1,2}, LI Na^{1,2},
LI Li-feng^{1,2}, SUN Zhi-hao^{* 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: Arginine deiminase (ADI), an arginine degrading enzyme, has been studied as a potential anti-cancer agent for inhibiting arginine-auxotrophic tumors, such as melanomas and hepatocellular carcinomas (HCCs). In this study, the *arcA* gene that encodes ADI was cloned from *P. plecoglossicida* CGMCC2039 which was isolated and identified by our laboratory previously. The *arcA* gene was subcloned into expression vector pET24a and its product ADI was over-expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The effects of different IPTG concentrations, induction temperatures and induction time were investigated. Under the optimal expression conditions the enzyme activity reached to 2.04 U/mL broth. The rADI was purified using DEAE Fast Flow anion exchange and SuperdexTM 200 gel filtration column chromatography. The rADI had a molecular mass of about 92.6 kDa, and comprised a homodimer of 46 kDa in the native

收稿日期: 2010-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900030); 教育部新教师基金项目(20090093120008)。

作者简介: 刘咏梅(1982-), 女, 四川绵阳人, 发酵工程博士研究生。

* 通信作者: 孙志浩(1941-), 男, 江苏无锡人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程与生物催化方面的研究。Email: sunw@public1.wx.js.cn

condition. The specific activity of rADI was determined to be 20.9 U/mg at pH 6.0 and 37 °C.

Key words: arginine deiminase, cloning, expression, purification

肝细胞癌(HCC)是第五大人类最常见的恶性肿瘤,中国每年新增病例近26万,全世界每年新增病例更达100万。现在对HCC的治疗是不足的,只有约10%局部肝癌患者能接受手术治疗^[1]。美国每年有约20 000新增病例,而有超过18 700病例死亡,该病的发病率和死亡率几乎相等^[2-3]。

精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)作为一种精氨酸降解酶,不可逆催化精氨酸生成瓜氨酸和氨。精氨酸对于人类来讲是一种非必需氨基酸^[4],正常的细胞可经尿素循环通过精氨酸-琥珀酸合成酶(ASS)以及精氨酸-琥珀酸裂解酶(AL)催化瓜氨酸生成精氨酸。一些人类癌细胞(例如:HCC)生长需要精氨酸,但不表达ASS,从而自身不能合成精氨酸;因此,通过精氨酸降解酶切断精氨酸对肿瘤细胞的供给,有可能从根本上消灭或控制精氨酸营养缺陷型癌细胞^[5-10]生长。

1999年3月,ADI-PEG-20,即PEG化重组支原体ADI被美国食品药品监督管理局(FDA)指定为美国罕见病药物,可用于治疗恶性黑色素瘤和HCC。欧洲药品审评署(EMA)也于2005年7月通过ADI-PEG-20作为罕见病药物用于治疗HCC。

已有多种不同微生物来源的ADI基因被克隆,并在大肠杆菌中表达。1989年,Burne等人将链球菌(*Streptococcus sanguis*) ADI途径基因在*E. coli*中表达^[11]。1994年,Takaku等人将支原体(*Mycoplasma arginini*) ADI基因于大肠杆菌克隆表达,表达产物形成包涵体,采用6 mol/L盐酸胍变性,复性后比酶活33.6 U/mg,产率72.5%^[12]。对真核生物*Giardia intestinalis*中的ADI进行鉴定、克隆与表达首次由Knodler等人于1998年完成^[13]。2002年,Oudjama等人从铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中克隆了编码ADI的基因*arcA*,然后在*E. coli*中表达。纯化后的重组*P. aeruginosa* ADI的晶体结构也随之得到解析^[14]。同年,肯塔基州大学Frederick W等人将*Mycoplasma hominis* ADI基因于大肠杆菌中表达,得到的重组精氨酸脱亚胺酶以包涵体形式存在。将包涵体复性后,得到重组酶比酶活为19~21 IU/mg蛋白质(37 °C, pH 7.2)^[15]。2007年,Lee等人将乳球菌(*Lactococcus Latis* ssp *Lactis* ATCC 7962) ADI基因于*E. coli* BL21中表达,比酶活达

140.3 U/mg^[16]。2009年,Megumi等人将支原体(*Mycoplasma hominis*) ADI基因于*E. coli* BL21(DE3)中表达^[17]。同年,Kim等人报道ADI-PEG-20用于治疗ASS缺陷型前列腺癌细胞CWR22Rv1,证明0.3 µg/mL ADI-PEG-20既可诱导该癌细胞凋亡^[18]。2010年,Glazer等人将ADI-PEG-20用于肝细胞癌临床II期研究,结果证明,ADI-PEG-20是治疗肝细胞癌的有效药物^[19]。

作者所在研究室已筛选得到一株产ADI菌株并鉴定为变形假单胞菌(*P. plecoglossicida* CGM-CC2039)^[20],并已经报道成功将编码ADI的*arcA*基因于大肠杆菌中表达,采用pET28a作为表达载体,并通过一步纯化获得N端带有His-Tag的纯酶,比酶活为4.76 U/mg^[21]。作者将ADI的*arcA*基因亚克隆至表达载体pET24a,构建了重组质粒pET24a-ADI,并成功实现ADI的高表达,比酶活达到20.9 U/mg,为ADI的抗癌活性研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039)、大肠杆菌JM109及BL21(DE3):由作者所在实验室保藏;克隆载体pMD18-T Simple:购自Takara公司;表达载体pET-24a:购自Novagen公司。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Ex Taq DNA聚合酶:购自Takara公司;PCR产物纯化试剂盒、DNA小量胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒:购自上海捷瑞生物工程有限公司;IPTG、X-gal、蛋白质相对分子质量标准:购自上海生工生物工程技术服务有限公司;其他试剂均为国产分析纯。Buffer A: 20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液(PBS); Buffer B: 20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液加入1 mol/L NaCl; Buffer C: 20 mmol/L, pH 7.0, 磷酸钠缓冲液加入0.15 mol/L NaCl。

1.3 培养基及培养条件

LB培养基为胰蛋白胍10 g/L,酵母提取物5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0。采用LB/Amp培养基,培养*E. coli* JM109(pMD18-T-ADI),氨苄青霉素质量浓度为100 µg/mL,培养温度为37 °C, 200

r/min。采用 LB/Kan 培养基, 培养 *E. coli* BL21 (DE3) (pET24a-ADI), 卡那霉素质量浓度为 50 μg/mL, 37 ℃、200 r/min 培养至 *A*₆₀₀ 约为 1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 30 ℃、200 r/min 继续培养 4 h。

1.4 精氨酸脱亚胺酶基因的克隆

参考 GenBank 中 *P. putida* KT2240 (NCBI Ne-002947.3 REGION: 1139712-1140965) 编码 ADI 的基因序列, 设计引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

上游引物: 5'-GCTCATATGTCCGCTGAAAAACAGAAGTACG-3' (NdeI)

下游引物: 5'-ATCTCGAGTTAGTAGTTGATCGGGTCGCGCA-3' (XhoI)

以变形假单胞菌菌体为模板, PCR 扩增 ADI 基因片段。反应程序: 94 ℃ 变性 10 min, 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min 反应 30 循环后, 72 ℃ 延伸 10 min。将所得片段胶回收后, 与克隆载体 pMD18-T Simple 连接, 转化 *E. coli* JM109, 挑取白色菌落进行 PCR 验证。将重组质粒命名为 T-ADI, 并测序。

1.5 大肠杆菌表达载体的构建

将 T-ADI 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切后, 割胶回收 ADI 基因片段, 再与同样用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切并割胶回收后的 pET24a 载体进行连接, 将得到的重组表达载体命名为 pET24a-ADI, 表达载体构建流程见图 1。

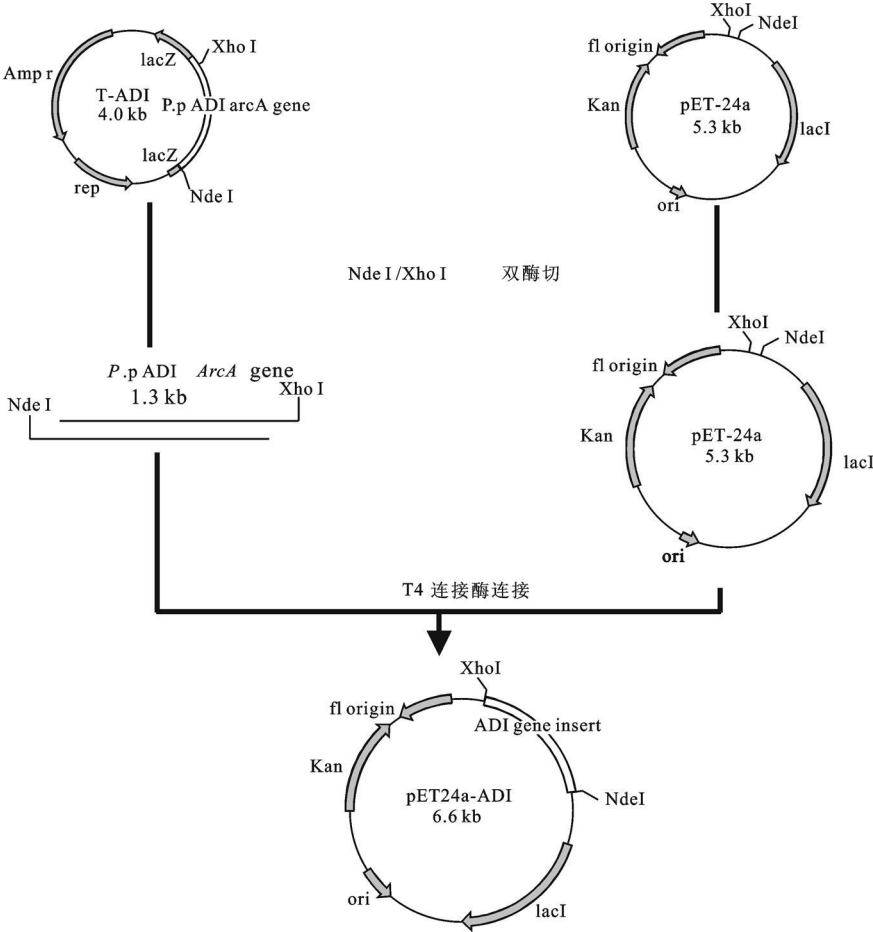


图 1 质粒 pET 4a-ADI 的构建

Fig.1 Construction of pET 4a-ADI

1.6 表达条件的优化

将重组表达载体 pET24a-ADI 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 筛选出阳性转化子。考察诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度对蛋白质表达的影响。

1.7 SDS-PAGE

采用 5 g/dL 浓缩胶, 12 g/dL 分离胶的不连续垂

直平板电泳进行蛋白质的分离, 考马斯亮蓝染色。

1.8 ADI 活性的测定

1.8.1 发酵液酶活测定 取 5 mL 发酵液, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 生理盐水洗涤后采用 1 mg/mL CTAB(十六烷基三甲基溴化铵) 处理菌体 10 min, 离心后将菌体悬浮于底物(将 0.1 mol/L

L-精氨酸盐酸盐溶解于 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0 中, 37 ℃ 条件下水浴 0.5 h。100 ℃ 水浴 5 min 终止反应。稀释一定倍数后按文献[18]测定瓜氨酸含量, 并计算酶活。酶活定义: 37 ℃ 条件下, 每 min 转化 1 μmol 精氨酸盐酸盐生成瓜氨酸的酶量定义为 1 U。

1.8. 纯化后酶液酶活测定 取适量酶液加入到底物中, 37 ℃ 水浴 0.5 h。100 ℃ 水浴 5 min 终止反应, 测定瓜氨酸质量浓度。

1.9 超声波破碎

将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 20 mmol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤两次。按 10: 1(发酵液体积/缓冲液体积)的比例将菌体悬浮于 PBS 缓冲液中, 冰浴条件下超声波破碎 8 min, 超声强度 400 W, 超声 1 s, 间隙 3 s。取破碎液于 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液, 测定其蛋白质质量浓度及酶活。

1.10 HiPrep DEAE FF 层析

首先将 HiPrep DEAE FF 阴离子交换柱用 Buffer A 平衡 2 个柱体积。然后取 15 mL 粗酶液上样, 先用 Buffer A 洗脱未吸附蛋白质, 洗至基线后, 采用 Buffer B 梯度洗脱, 流速 2 mL/min, 收集活性部分, 透析后进行凝胶过滤。

1.11 Superdex™ 00 凝胶过滤层析

Superdex™ 200 凝胶柱用 Buffer C 平衡。上样(0.5 mL)后, 用 Buffer C 以 0.5 mL/min 的流速进行洗脱。收集活性成分, 透析后冷冻干燥备用。

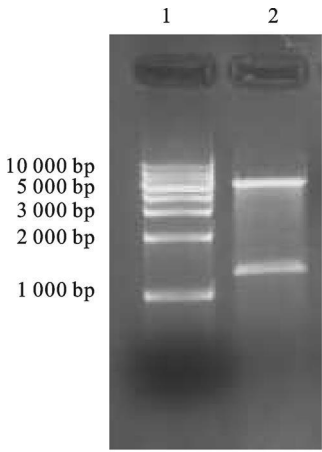
结果与分析

1.1 ADI 基因的克隆及分析

以 *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039 菌体为模板, PCR 扩增得到大小约为 1 250 bp 的片段。将该片段割胶回收纯化后, 连接 pMD18-T Simple 载体, 转化至 *E. coli* JM109 中。挑选阳性克隆, 提取质粒测序。

表达载体的构建

将 T-ADI 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切后, 割胶回收 ADI 基因片段, 再与经相同酶切的 pET24a 载体进行连接, 连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布含卡那霉素的 LB 平板, 37 ℃ 培养至菌落长出后, 挑取单菌落进行重组子的 PCR 鉴定。提取质粒, 重组质粒经 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切, 释放约 5.3 kb 和 1.2 kb 大小片段, 分别对应于 pET24a 和 ADI 的大小, 见图 2。结果表明, 重组质粒构建成功, 将其命名为 pET24a-ADI。



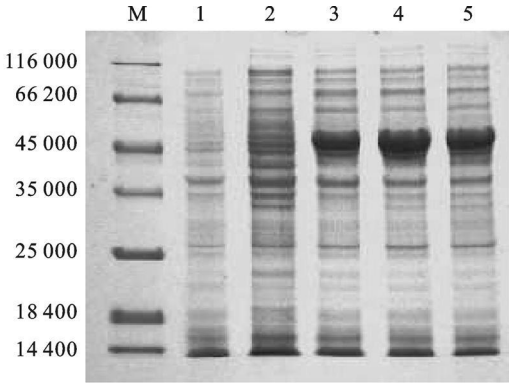
1, DNA Marker; 2, pET24a-ADI *Nde*I/*Xho*I 双酶切产物

图 重组载体 pET 4a-ADI 双酶切

Fig. Double digestion of pET 4a-ADI

3 ADI 基因在 *E. coli* BL 1(DE3) 中表达条件优化

3.1 诱导温度对表达的影响 保持诱导时间(4 h)、IPTG 浓度(0.2 mmol/L)及 A_{600} (约 1.0)不变, 改变诱导温度, 发现温度对 ADI 表达影响明显。测定发酵液酶活, 25 ℃ 下酶活为 1.61 U/mL, 30 ℃ 条件下酶活为 2.04 U/mL, 37 ℃ 下酶活为 0.43 U/mL; 30 ℃ 条件下, 蛋白质表达最多, 见图 3。所以选择 30 ℃ 为蛋白质表达的诱导温度。



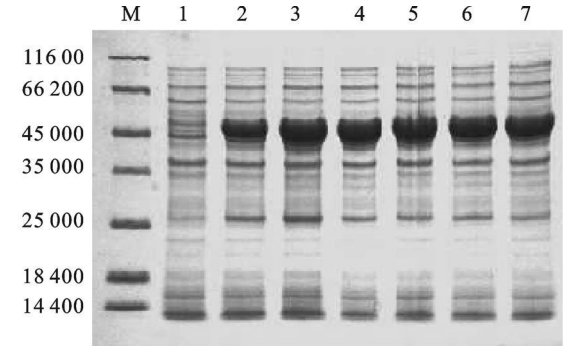
M: Protein maker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET 24a, IPTG 诱导; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET 24a-ADI, 无 IPTG 诱导; 3~5: *E. coli* BL21(DE3)/pET 24a-ADI, IPTG 诱导, 诱导温度分别为 25、30、37 ℃

图 3 SDS-PAGE 分析诱导温度对 ADI 表达的影响

Fig. 3 SDS-PAGE analysis for *E. coli* (pET 4a-ADI) with different induction temperatures

3. 诱导时间对表达的影响 保持诱导温度(30 ℃)、IPTG 浓度(0.2 mmol/L)、 A_{600} (约 1.0)不变, 研究诱导时间对 ADI 表达的影响。一般而言, 随着诱导时间的延长, 目的蛋白质会进一步积累, 当然也会有可能进一步降解, 这相当于动态平衡。由图 4 可以看出, 在开始诱导的前 4 小时内, 随着时间的延长, 目的蛋白质迅速积累。但是 4 h 后, 蛋白

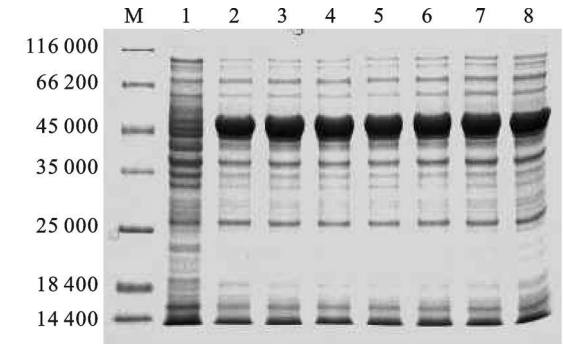
质的表达积累变得缓慢。测定发酵液酶活,酶活在诱导 4 h 时达到最高,为 2 04 U/mL,之后缓慢降低。因此推测在菌落对数生长期时可溶性蛋白质迅速增加,当进入稳定期时,蛋白质表达量过大而迅速形成包涵体,活性不再增加。综合以上分析,由此确定诱导时间为 4 h。



M: Protein maker; 1~ 7 诱导时间分别为 0、2、4、6、8、10、14 h
图 4 SDS-PAGE 分析 IPTG 诱导时间对 ADI 表达的影响

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for *E. coli* (pET 4a-ADI) with different induction times

3.3 IPTG 浓度对 ADI 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达的影响 通常 IPTG 浓度越高,蛋白质表达量越大,但是 IPTG 浓度太高时,不仅对细胞本身有一定的毒害作用,而且可能造成包涵体大量形成,所以有必要首先对诱导剂 IPTG 浓度对 ADI 表达的影响进行考察。保持诱导温度(30 ℃)、诱导时间(4 h)、 A_{600} (约 1.0)不变,观察到 IPTG 浓度在 0.1~1.2 mmol/L 对 ADI 表达量影响不明显,见图 5。但通过对发酵液酶活检测发现, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 时,酶活最高为 2 04 U/mL(以发酵液计),IPTG 浓度大于 0.2 mmol/L 以后,随着 IPTG 浓度的增加,酶活逐步降低。



M: Protein maker; 1~ 8 IPTG 诱导浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L

图 5 SDS-PAGE 分析 IPTG 浓度对 ADI 表达的影响
Fig. 5 SDS-PAGE analysis for *E. coli* (pET 4a-ADI) in different IPTG induction concentration

4 ADI 纯化

4.1 HiPrep DEAE FF 层析 培养 1 L 重组菌,离心,收集菌体,按照 1.9 方法超声波破碎菌体,离心取上清液即为粗酶液。按照 1.10 方法对粗酶液进行 HiPrep DEAE FF 阴离子交换层析,层析图谱见图 6。

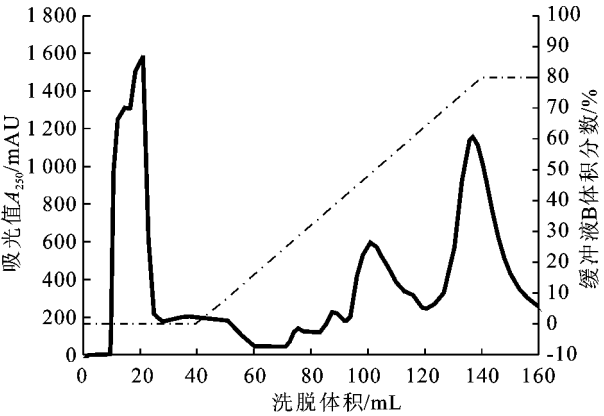


图 6 HiPrep DEAE FF 离子交换层析图谱

Fig. 6 HiPrep DEAE FF profile of crude rADI enzyme

上样后采用 Buffer A 洗脱 2 个柱体积,将未被结合的蛋白质洗脱;然后采用 Buffer B 梯度洗脱,经 5 个柱体积 Buffer B 体积分数从 0 增加到 80%,在 Buffer B 体积分数为 80% 条件下再洗脱 1 个柱体积。rADI 活性成分于 0.33~0.46 mol/L NaCl 浓度范围内收集得到。

4. Superdex™ 200 凝胶过滤 按照方法 1.11 对 HiPrep DEAE FF 阴离子交换后收集到的酶液进行 Superdex™ 200 凝胶过滤,层析图谱见图 7。

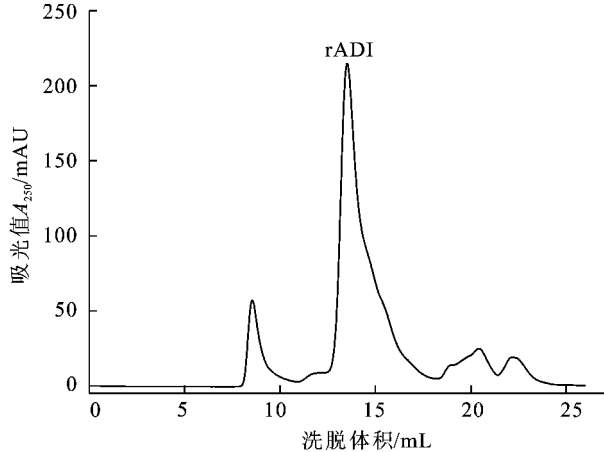


图 7 Superdex™ 200 凝胶过滤

Fig. 7 Superdex G-200 profile of crude rADI enzyme

由图 7 可知,用 Buffer C 进行洗脱,目的蛋白质在 Superdex™ 200 凝胶柱中的洗脱体积为 13.1~14.2 mL,收集 rADI 活性峰。

以洗脱体积对 IgMr 作标准曲线,见图 8。根据 rADI 的洗脱体积计算得到 rADI 相对分子质量为

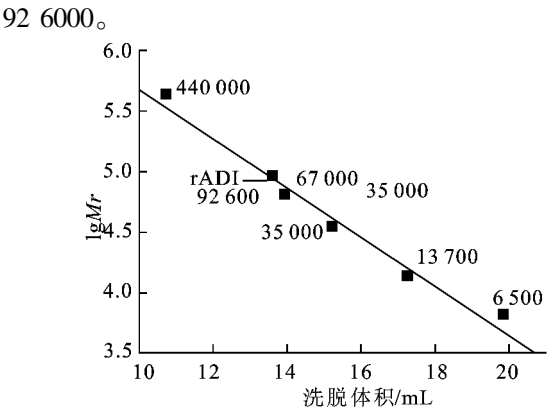
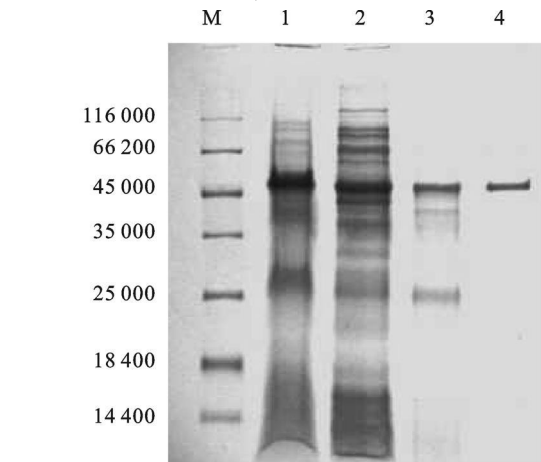


图 8 洗脱体积与分子量的关系标曲

Fig. 8 Standard curve of elution volume and lgMr

4.3 SDS-聚丙 烯酰胺凝胶电泳 对经过超声波破碎、HiPrep DEAE FF 阴离子交换层析、Superdex™ 200 凝胶过滤, 并对最终收集的目的蛋白质透析脱盐, 进行冷冻干燥, 所获得 rADI 进行 SDS-聚丙 烯酰胺凝胶电泳, 电泳结果见图 9。



M: SDS-PAGE Protein Molecular Weight Marker; 1: *E. coli* BL21(DE3) 带有 pET24a-ADI IPTG 诱导; 2: 粗酶液; 3: HiPrep DEAE FF 阴离子交换层析; 4: Superdex™ 200 凝胶过滤层析

图 9 rADI SDS PAGE 图

Fig. 9 SDS PAGE profile of purified rADI

由图 9 可知, 重组精氨酸脱亚胺酶在 SDS-PAGE 中为单一条带, 证明采用上述纯化手段可以得到电泳纯 rADI, 电泳条带大小为 46 000。根据凝胶过滤实验得出该酶相对分子质量大小为 92 600, 说明该酶由两个相同的亚基组成。

分别测定纯化各步骤 rADI 的酶活、蛋白质质量、比酶活, 结果见表 1。

参考文献 (References):

[1] Verhoef C, Visser O, de Man RA, et al. Hepatocellular carcinoma in the Netherlands incidence, treatment and survival patterns [J]. *European Journal of Cancer*, 2004, 40: 1530- 1538

表 1 重组精氨酸脱亚胺酶纯化结果

Tab. 1 Summary of isolation and purification procedures of rADI

纯化步骤	总蛋白质质量/ mg	总活力/ U	比活力/ (U/ mg)	纯化倍数	回收率/ %
粗酶液	156. 4	1174. 5	7. 5	1	100
离子交换层析	69. 2	1041. 6	15. 1	2. 0	88. 7
凝胶过滤层析	36. 3	756. 4	20. 9	2. 8	72. 6

由表 1 可以看出, 每升发酵液中可获得 36 3 mg 活性蛋白质, 每毫克蛋白质酶活为 20 9 U, 纯度提高至初酶液的 2 8 倍, 回收率为 72 6%。

3 结 语

作者由本研究室筛选鉴定的变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039) 扩增得到 ADI 基因, 成功构建表达载体 pET24a-ADI, 并转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中表达。重组菌经 IPTG 诱导后, 经 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 该基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中获得高表达, 表达产物相对分子质量大小为 46 000。对 ADI 诱导表达条件进行优化, 结果发现, 宿主菌在 A₆₀₀ 达到 1. 0 时加入 0 2 mmol/L IPTG, 在 30 ℃ 诱导 4 h 酶活最高, 为 2 04 U/mL (以发酵液计)。将重组菌诱导培养, 经超声波破碎、HiPrep DEAE FF 阴离子交换层析、Superdex™ 200 凝胶过滤, 可获得 SDS-PAGE 电泳纯重组精氨酸脱亚胺酶。每升发酵液经过纯化, 可获得 36 3 mg 活性蛋白质, 蛋白质的比活力达 20 9 U/mg, 纯化倍数为 2. 8 倍, 回收率为 72. 6%。凝胶过滤测得重组精氨酸脱亚胺酶相对分子质量大小为 92 600; 将纯化的重组酶进行 SDS-PAGE, 为单一条带, 大小为 46 000。由此可以得出该酶为含有两个相同亚基二聚体。

由肯塔基州大学、美国凤凰生物科技公司合作研发的 ADI-PEG-20 为支原体 (*Mycoplasma hominis*) 来源的重组 ADI, 现已进入肝癌治疗临床实验阶段^[22]。但是支原体是具有很强毒性的病原体, 其生物安全性存在一定隐患; 变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039) 无疑为 ADI 的研究提供了新的菌源。

- [2] El-Serag H B, Mason A C, Key C. Trends in survival of patients with hepatocellular carcinoma between 1977 and 1996 in the United States [J]. **Hepatology**, 2001, 33: 62– 65.
- [3] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view[J]. **Clin Gastroenterol**, 2002, 35: S72– S78
- [4] Izzo F, Marra P, Beneduce G, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies[J]. **J Clin Oncol**, 2004, 22(10): 815– 822.
- [5] Takaku H, Takase M, Miyazaki K, et al. In vivo anti-tumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginini*[J]. **Int J Cancer**, 1992, 51: 244– 249.
- [6] Takaku H, Misawa S, Hayashi H, et al. Chemical modification by polyethylene glycol of the anti- tumor enzyme arginine deiminase from *Mycoplasma arginini* [J]. **Jpn J Cancer Res**, 1993, 84: 1195– 1200.
- [7] Takaku H, Matsumoto M, Misawa S, et al. Anti-tumor activity of arginine deiminase from *Mycoplasma arginini* and its growth- inhibitory mechanism[J]. **Jpn J Cancer Res**, 1995, 86: 840– 846.
- [8] Miyazaki K, Takaku H, Umeda M, et al. Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a *Mycoplasma*-infected cell line[J]. **Cancer Res**, 1990, 50: 4522– 4527.
- [9] Sugimura K, Ohno T, Fukuda S, et al. Tumor growth inhibitory activity of a lymphocyte blastogenesis inhibitory factor [J]. **Cancer Res**, 1990, 50: 345– 349.
- [10] Sugimura K, Ohno T, Kusuyama T, et al. High sensitivity of human melanoma cell lines to the growth inhibitory activity of mycoplasmal arginine deiminase *in vitro* [J]. **Melanoma Res**, 1992, 2: 191– 196.
- [11] Burne R A, Parsons D T, Marquis R E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the genes of the arginine deiminase system of *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 [J]. **Infect Immun**, 1989, 57(11): 3540– 3548.
- [12] Misawa S, Aoshima M, Takaku H, et al. High-level expression of *Mycoplasma* arginine deiminase in *Escherichia coli* and its efficient renaturation as an anti- tumor enzyme[J]. **Biotechnol**, 1994, 36: 145– 155.
- [13] Knodler L A, Sekyere E O, Stewart T S, et al. Cloning and expression of a prokaryotic enzyme, arginine deiminase, from a primitive eukaryote *Giardia intestinalis* [J]. **Biol Chem**, 1998, 273(8): 4470– 4477.
- [14] Oudjama Y, Tricot C, Stalon V, et al. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X- ray crystallographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* L-arginine deiminase[J]. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 2002, 58: 2150 – 2152.
- [15] Holtsberga F W, Ensora C M, Steinerc M R, et al. Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties[J]. **J Contro Release**, 2002, 80: 259– 271.
- [16] Kim J E, Jeong D W, Lee H J. Expression, purification, and characterization of arginine deiminase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 in *Escherichia coli* BL21[J]. **Protein Expr Purif**, 2007, 53: 9– 15.
- [17] Megumi K, Eriko S, Masatoshi F. Growth inhibition of human melanoma cells by a recombinant arginine deiminase expressed in *Escherichia coli*[J]. **Vet Med Sci**, 2009, 71: 1343– 1347.
- [18] Kim R H, Coates J M, Bowles T L, et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis[J]. **Cancer Res**, 2009, 69(2): 700– 709.
- [19] Glazer E S, Piccirillo M, Di Giacomo R, et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma[J]. **J Clin Oncol**, 2010, 28: 2220– 2226.
- [20] Liu Y M, Sun Z H, Ni Y, et al. Isolation and identification of an arginine deiminase producing strain *Pseudomonas plecoglossocida* CGMCC2039[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 2008, 24: 2213– 2219.
- [21] 钱嘉南, 孙志浩, 刘宇鹏, 等. 二乙酰-一脒-氨基硫脲比色法测定酶转化液中的 L-瓜氨酸[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38 (7): 519– 522.
- Qian Jia-nan, Sun Zhi-hao, Liu Yu-peng, et al. Determination of L-citrulline in enzymatic conversion solution by diacetyl-monoxime thiosemicarbazide colorimetry[J]. **Chin J Pharmaceuticals**, 2007, 38 (7): 519– 521. (in Chinese)