

重组人精氨酸酶 1 的表达、纯化及性质鉴定*

李益鹏, 丁 瀨**

(复旦大学 生命科学学院, 上海 200438)

摘要: 精氨酸酶催化精氨酸水解生成鸟氨酸和尿素, 是哺乳动物尿素循环的关键步骤之一, 在机体代谢方面起着重要的作用。在分类上精氨酸属于半必需氨基酸, 但在快速增长的组织, 特别是肿瘤组织里却属于必需氨基酸。精氨酸酶可以通过分解精氨酸对肿瘤细胞进行营养剥夺, 进而起到抑制肿瘤细胞生长的作用, 与此同时却较少影响正常组织代谢, 因此可能具有良好的应用前景。精氨酸酶包括精氨酸酶 1 和精氨酸酶 2 两种, 精氨酸酶 1 主要表达于肝脏, 参与肝脏尿素循环。本研究在获得人精氨酸酶 1 全长 cDNA 的基础上, 将其克隆至原核高表达载体, 通过自动诱导系统进行了人肝脏精氨酸酶 1 重组蛋白 (His₁₀-arginase1) 的表达。通过 Ni-NTA 亲和层析和 Mono Q 阴离子交换层析纯化, 重组人精氨酸酶 1 的产量为每升菌液 48.5 mg, 其纯度超过 95%。通过酶活检测, 重组人精氨酸酶 1 活性可达到 128 U/mg。与已报道的精氨酸酶相比较, 我们得到的重组人精氨酸酶 1 具有与之相当的酶活性。本研究为将来进一步深入了解精氨酸酶的生化功能及与相关疾病的关系奠定了基础。

关键词: 精氨酸酶 1; 原核表达; 纯化; 酶活

中图分类号: Q 592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004–390X (2015) 04–0582–06

Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human Arginase 1 in *Escherichia coli*

Li Yipeng, DING Yu

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Arginase is an enzyme that catalyzes the degradation of arginine to produce urea and ornithine, which is crucial in the urea cycle. As a kind of half essential amino acid, arginine is only necessary for the rapid growth organizations, such as the growth of tumor tissue. Arginase could deprive the nutrition of tumor cells through catalyzes the degradation of arginine. There are two kinds of arginases: arginase 1 and arginase 2. Arginase 1 is expressed predominantly in the liver, while arginase 2 is expressed in non-hepatic tissues, with the highest levels of expression in the kidneys. In this article, we first cloned human arginase 1 to the pT7 high expression level vector, then we over-expressed arginase 1 by the auto-induction system. The expressed recombinant His₁₀-arginase1 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and Mono Q anion exchange chromatography. The typical yield of recombinant arginase 1 was 48.5 mg from 1 liter culture medium with purity above 95%. The recombinant His₁₀-arginase1's activity was 128 U/mg. Our research may facilitate further research of arginase 1's biological activity and its role in the related diseases.

收稿日期: 2015–02–13

修回日期: 2015–04–10

网络出版时间: 2015–07–16 17:31

* 基金项目: 国家自然科学基金 (31470764)。

作者简介: 李益鹏 (1989—), 男, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事功能蛋白质克隆、表达与纯化方面的研究。E-mail: lyp2zn@163.com

** 通信作者 Corresponding author: 丁瀨 (1978—), 男, 山东枣庄人, 博士, 副教授, 主要从事结构生物学的研究。E-mail: yuding@fudan.edu.cn

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20150716.1731.015.html

Keywords: arginase 1; prokaryotic expression; purification; arginase activity.

精氨酸酶的作用是催化水解 L-精氨酸生成鸟氨酸与尿素。精氨酸酶存在于有尿素循环的人和哺乳动物体内, 主要分布在肝脏、肾脏、和精巢中, 在尿素循环中起着重要作用^[1]。二价金属离子 (Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} 等) 能够激活精氨酸酶, 而 Hg^+ , Ag^+ , 柠檬酸和硼酸等可使之失活。

精氨酸酶1 (arginase 1, ARG1) 主要表达于肝脏, 参与肝脏尿素循环^[2-3]。人精氨酸酶1是一种三聚体含锰金属酶, 含有332个氨基酸, 其基因定位于染色体6p23^[4]。相关研究表明在肝细胞癌等营养缺陷性恶性肿瘤细胞中, 精氨酸酶1表达明显下调。精氨酸对于正常组织而言属于非必需氨基酸, 但是由于很多恶性肿瘤细胞(如黑色素瘤、肝癌等)不表达精氨酸琥珀酸合成酶而无法合成精氨酸, 故精氨酸对于上述恶性肿瘤细胞而言是必需氨基酸^[5-7]。精氨酸酶能催化水解精氨酸, 因此精氨酸酶不影响正常细胞的生长, 却使肿瘤细胞生长受到抑制^[8-9]。目前, 氨基酸剥夺已经成为治疗癌症的一种新方法, 而精氨酸酶恰恰利用了肿瘤细胞和正常细胞对精氨酸剥夺耐受力的不同从而对肿瘤细胞生长起到抑制作用。除此之外, 精氨酸酶还有望成为相关恶性肿瘤辅助诊断及评价分化程度的指标之一^[10], 并对癌症靶向治疗等具有一定的意义^[11]。本文利用大肠杆菌原核表达系统大量获取了带有特定标签的并且有活性的重组人精氨酸酶1蛋白, 为今后进一步探索该蛋白的功能以及研究人精氨酸酶1与疾病的相关关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 菌株 (用于质粒扩增), Rosetta (DE3) pLysS 菌株以及质粒 pET21a (用于蛋白表达) 均购自 Novagen 公司; 本研究中使用的 pT7N10 载体由 pET21a 质粒改造而来。

1.1.2 主要生化试剂

高保真 DNA 聚合酶 KOD Plus 购自 NEB 公司; 限制性内切酶购自 Takara 公司; PCR 产物清洁、割胶回收及质粒抽提均使用 Axygen 公司相关试剂盒; 引物合成和 DNA 测序由 Genewiz 公司完

成; Ni-NTA Superflow 亲和层析介质购自 Qiagen 公司; Mono Q HR 16/10 阴离子交换层析柱与 Superdex 200 10/300 GL 分子筛层析柱购自 GE Healthcare 公司; 精氨酸和 α -isonitrosopropiophenone 购自 Sigma 公司; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 His₁₀-arginase1 原核表达质粒的构建

以 HeLa 细胞的 mRNA 反转录所得到的 cDNA 文库作为模板, 经过巢式 PCR 得到 arginase 1 的基因编码区, 并将其克隆至 pT7N10 载体中。利用该载体表达的目的蛋白的氨基端含有 10 个多聚组氨酸标签, 可通过 Ni-NTA 亲和层析进行纯化。

1.2.2 重组 His₁₀-arginase1 蛋白的诱导表达

His₁₀-arginase1 质粒经测序验证后, 转化至 Rosetta (DE3) pLysS 菌, 过夜培养后, 挑取单菌落, 进行小量诱导试验 (37 °C 培养至 OD₆₀₀ 大约为 0.6 后, 培养基内加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 3~4 h)。菌液离心收集、高压破碎后取样进行 SDS-PAGE 电泳检测, 选取表达量高的单菌落进行重组 His₁₀-arginase1 蛋白的大规模表达。

经优化调整后, 最终采用自动诱导培养基进行 His₁₀-arginase1 蛋白的大规模诱导表达。首先将转化有 His₁₀-arginase1 质粒的 Rosetta (DE3) pLysS 表达菌接种至 LB 培养基中 37 °C 振荡培养过夜, 控制 0.5% 接种量, 将其接种至自动诱导培养基中, 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 后 (约 3~4 h), 降温至室温 (20~25 °C) 继续培养 20 h 后收菌冻存。

1.2.3 重组人 His₁₀-arginase1 蛋白的纯化

经多次尝试后, 最终采用以下优化的纯化流程: 表达菌高压破碎后, 高速离心, 离心上清首先通过 5 mL 的 Ni-NTA 亲和层析进行初纯化, 高盐洗涤后在 AKTA-prime 系统中进行梯度洗脱。收集的 Ni-NTA 洗脱液通过 HiTrap Desalting 分子筛更换至低盐缓冲液后, 进一步在 AKTA Purifier 10 蛋白层析系统进行后续纯化。除盐后产物上样至强阴离子交换层析柱 (Mono Q HR 16/10) 后, 以 0~700 mmol/L NaCl 的梯度洗脱, 最终在 100~150 mmol/L NaCl 范围内, 重组人 His₁₀-arginase1 被洗脱。为鉴定重组蛋白聚合

状态,将洗脱产物超滤浓缩后上样至 Superdex 200 10/300 GL 高分辨率分子筛进行分子筛层析。最终的洗脱产物保存在含 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 5 mmol/L MnCl₂ 的缓冲液中。

1.2.4 蛋白质性质鉴定

根据 Pierce 公司提供的操作手册进行了蛋白质浓度的 BCA 法测定;根据《分子克隆试验手册(第3版)》进行了 SDS-PAGE 电泳试验以验证整个表达和纯化过程。

1.2.5 重组精氨酸酶的酶活检测

本试验采用 CORRALIZA 等^[12]的方法,进行重组 His₁₀-arginase1 的分光光度法酶活测定。首先将 1 μg/mL 的 His₁₀-arginase1 放置在 56 °C 中 10 min 进行酶的激活。然后取 50 μL 的 His₁₀-arginase1 与 50 μL 0.5 mol/L arginine (pH 9.7) 混匀,放置于 37 °C 进行反应。定时取样加 800 μL 酸混合物 [$V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_3\text{PO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1:3:7$] 终止反应。终止反应体系中加入 50 μL 9% α-isonitrosopropiophenone, 100 °C 反应 45 min, 测量各样品 540 nm 吸光度,根据公式计算出尿素含量,绘制出尿素浓度—时间曲线,并据此计算酶活性。精氨酸酶 1U 的活性定义为 1 min 催化形成 1 μmol 的尿素。

2 结果与分析

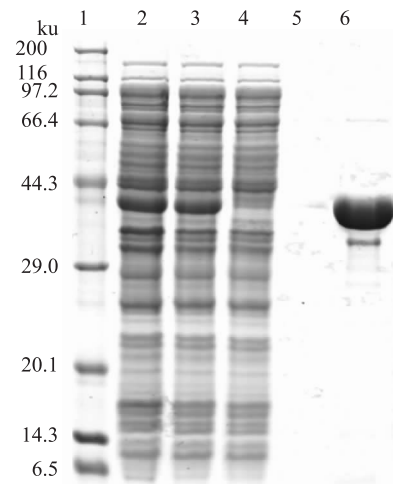
2.1 重组精氨酸酶 1 表达质粒的构建

通过上述提到的反转录和巢式 PCR 扩增技术,得到了编码人 arginase1 基因的 DNA。随后,通过凝胶电泳对 PCR 产物进行了分离和目的 DNA 片段的回收。将回收后的产物经 BamH I 和 Xho I 双酶切处理,连接至同样经过双酶切处理的 pT7N10 载体质粒,最终获得了用于原核表达的 pT7N10-arginase1 质粒,测序显示该质粒正确。

2.2 重组精氨酸酶 1 蛋白的表达

最终采用自动诱导培养基进行 His₁₀-arginase1 重组蛋白的大量表达。自动诱导系统的原理是利用大肠杆菌对葡萄糖和乳糖的不同偏好,当自动诱导培养基中的葡萄糖成分没有消耗完时,大肠杆菌不利用乳糖,一旦葡萄糖全部消耗,大肠杆菌只能利用乳糖时,乳糖会诱导原核表达系统中的乳糖操纵子开始转录:从

而大量生产 His₁₀-arginase1 重组蛋白。研究发现:当诱导温度过高时,重组蛋白经常会有非全长表达;而表达温度太低则会使得蛋白表达效率过低。经过多次试验条件的摸索和优化,最终选择在 20 °C 条件下进行大规模表达试验。SDS-PAGE 电泳检测结果显示(图 1):得到的原核表达的 His₁₀-arginase1 融合蛋白分子量与理论分子量相符(38 ku)。



注:1. 分子量标签;2. 诱导后全菌;3. 诱导后上清;4. Ni-NTA亲和层析上样流过液;5. 洗涤液;6. 300 mmol/L咪唑洗脱液。

Note: 1. Molecular weight marker; 2. Whole cell lysate after induction; 3. Supernatant; 4. Flow through of Ni-NTA chromatography; 5. Wash buffer; 6. Elution buffer (with 300 mmol/L imidazole).

图 1 SDS-PAGE检测重组His₁₀-arginase1的表达与Ni-NTA层析纯化

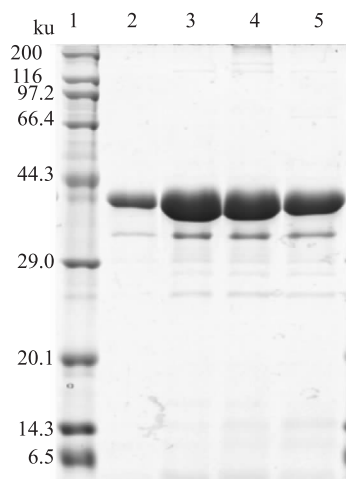
Fig. 1 Verifying the expression and Ni-NTA purification of His₁₀-arginase1 by SDS-PAGE

2.3 重组精氨酸酶 1 蛋白的纯化及聚合状态鉴定

SDS-PAGE 显示:自动诱导得到的重组 His₁₀-arginase1 不仅表达效果较好,而且各批次间重复性好并且产量一致。我们将经过 Ni-NTA 亲和层析纯化的产物除盐后,立即通过 Mono Q 阴离子交换层析进行精细纯化。图 2 所示为 SDS-PAGE 检测 Mono Q 阴离子交换层析纯化 His₁₀-arginase1。His₁₀-arginase1 蛋白洗脱峰基本集中于盐浓度梯度为 100 ~ 150 mmol/L 处。His₁₀-arginase1 的理论等电点为 7.3,在 pH 较低的缓冲液中(如生理 pH 的缓冲液),其与 Mono Q 柱介质的结合相对较弱,在较低盐浓度条件下就会被洗脱。

表1 以1L *E. coli* 菌液表达和纯化重组 His₁₀-arginase1 蛋白Tab. 1 Purification of recombinant His₁₀-arginase1 from 1L cultured *E. coli* cells

项目 items	总蛋白/mg total protein	纯度/% purity	体积/mL volume	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹) concentration	产量/mg yield	回收率/% recovery
Supernatant	2 544.5	2.9	50	1.48	74.0	100.0
Ni-NTA	60.7	90.0	35	1.56	54.6	73.8
Mono Q	51.0	95.1	10	4.85	48.5	65.5



注: A. 1. 分子量标签; 2~5. MonoQ 梯度洗脱样品。

Note: A. 1. Molecular weight marker; 2~5. Eluates of the Mono Q salt gradient.

图2 SDS-PAGE检测Mono Q阴离子交换层析纯化His₁₀-arginase1

Fig. 2 Verifying the purification of His₁₀-arginase1 by MonoQ anion exchange chromatography by SDS-PAGE

为继续了解重组 His₁₀-arginase1 蛋白的基本生化性质, 如其在生理条件下的聚合状态, 将纯化后的 His₁₀-arginase1 通过超滤浓缩后进一步上样至 Superdex 200 分子筛层析柱, 相关结果如图 3A。重组精氨酸酶 1 主峰的中心位置在 13.96 mL 处, 并且主要以单峰形式存在, 根据与相关标准分子量蛋白进行比对计算, 其出峰位置的分子量约为 120 ku, 进而推算出重组 His₁₀-arginase1 主要以三聚体的形式存在。图 3B 为 His₁₀-arginase1 经分子筛层析后的 SDS-PAGE 示意图。

最终的优化流程是 Ni-NTA 亲和层析产物除盐后立即进行 Mono Q 强阴离子层析, 通过以上两步纯化法, 每升自动诱导培养基大约能得到 48.5 mg, 纯度超过 95% 重组 His₁₀-arginase1。

2.4 重组精氨酸酶 1 的酶活检测

对表达纯化过程中的各个样品进行酶活测定, 主要包括菌裂解离心上清液、Ni-NTA 亲和层析柱

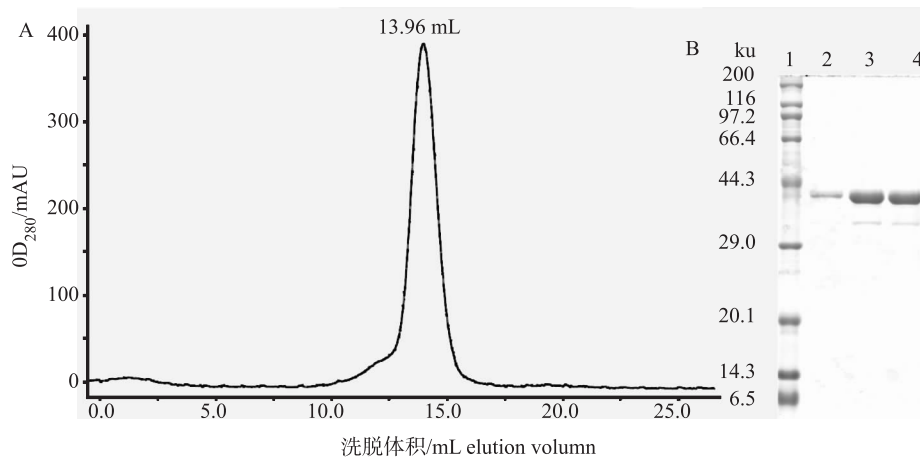
初纯化样品, 经过 Mono Q 强阴离子交换柱精纯化的重组精氨酸酶等样品, 相关结果汇总于表 1。经过 Ni-NTA 亲和层析和 Mono Q 离子交换层析纯化得到的高纯度重组 His₁₀-arginase 蛋白的酶活大约为 128 U/mg, 并可长期 4 °C 保存。

3 讨论

3.1 重组精氨酸酶 1 蛋白的表达纯化

文献中融合蛋白表达技术通常采用的是 IPTG 进行诱导表达, 但是本研究过程中发现自动诱导表达系统进行重组 His₁₀-arginase1 诱导表达获得的蛋白量更高, 同时因为 IPTG 诱导本身存在一些问题, 如诱导效果不理想, 诱导时机不易掌握等, 为此本研究最终采用自动诱导培养基^[13]进行 His₁₀-arginase1 蛋白诱导表达。该培养基以葡萄糖和乳糖两种成分作为主要碳源, 当葡萄糖消耗殆尽 (大肠杆菌优先使用葡萄糖作为碳源) 时乳糖分子可自动诱导大肠杆菌中的乳糖操纵子开始转录融合蛋白。通过优化诱导表达温度, 重组蛋白的质量和数量都可保证。

蛋白质提纯方案中通常首先在目标蛋白中添加适当的纯化标签形成融合重组蛋白, 之后利用该纯化标签进行亲和层析, 后续再通过离子交换层析等方法进行蛋白精提纯。多聚组氨酸、GST 和 MBP 等都是常见的用于亲和层析纯化的标签。由于多聚组氨酸标签分子量较小, 对精氨酸酶的空间折叠影响理论上不大, 同时精氨酸酶本身可溶性不错, 最终选用了多聚组氨酸作为亲和层析纯化的标签。虽然文献中通常选择的是连续 6 或 8 个组氨酸的标签, 但是根据预试验结果和本试验室以往的经验, His₁₀ 标签有更理想的纯化效果。本研究选取在 300 mmol/L 的较高咪唑浓度下将重组精氨酸酶 1 洗脱, 因为添加了 His₁₀ 标签, 可在前期的洗涤过程中,



注: 1. 分子量标签; 2. Superdex200洗脱第13管样品; 3. 第14管; 4. 第15管。

Note: 1. Molecular weight marker; 2. Eluate No. 13 of the Superdex 200 column; 3. Eluate No. 14; 4. Eluate No. 15.

图3 Superdex 200分子筛检测His₁₀-arginase1聚合状态

Fig. 3 Verifying the oligomeric state of His₁₀-arginase1 by Superdex 200 size exclusive chromatography and SDS-PAGE

提高咪唑浓度,降低其他杂蛋白的非特异吸附,从而提高了目的蛋白的纯度。

通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化结果可知自动诱导的表达效果较好。His₁₀-arginase1 的理论等电点为 7.3,与阴离子交换层析柱的结合较弱,所以经过 Ni-NTA 柱亲和层析粗纯后的产物应该除盐以确保能与 Mono Q 层析介质结合。经两步提纯后的重组 His₁₀-arginase1 可长期放置于低温环境中保存而不失活。

3.2 重组精氨酸酶 1 蛋白的酶活测定

文献中报道的关于精氨酸酶活测量方法有很多,包括利用硝基苯乙醛和精氨酸反应后在 480 nm 处有强吸收测量反应后剩余精氨酸量^[14],以及利用高效液相色谱测量 200 nm 处的吸收以此换算成反应产物鸟氨酸的含量^[15]等。CORRALIZA 等^[12]设计的分光光度测定法的主要原理是精氨酸酶催化精氨酸分解产生鸟氨酸和尿素,其中反应产物尿素在酸性环境下可以和 α -isonitrosopropiophenone 反应生成在 540 nm 处有强吸收的红色产物。最终选用了 CORRALIZA 等的方法进行了重组精氨酸酶活性的测定,采用该法有利于将本试验结果与以往报道的同种方法试验数据进行比较外,更主要原因是相对于其他监测精氨酸酶活等的方法而言,CORRALIZA 等的方法仅依赖于吸光度变化,且测定波长处于可见光范围,试验设计简单,结果可靠,重复性高。

3.3 重组精氨酸酶 1 蛋白的活性、产量及产率

通过原核表达得到的重组精氨酸酶 1 与天然

产物活性相当,通过对温度、保存条件等因素对酶活的影响来看,重组精氨酸酶 1 也与天然产物的酶学特征一致^[16]。长期以来,精氨酸酶的获取主要通过分级提取肝脏、肾脏等相关组织细胞得到^[17],不仅操作流程繁琐,而且产量和产率都较低,虽能勉强满足酶学等生化研究需要,但是对于进一步研究精氨酸酶的生化功能以及与相关疾病等来说,传统方法无法满足对大量高纯度精氨酸酶的需求。本研究获得的重组精氨酸酶 1,无论是从产量上亦或是产率上,都远高于传统的提取方法,并且其活性也比天然提取产物略高^[18]。综上所述,通过大肠杆菌中进行重组精氨酸酶 1 表达和纯化的方法,在试验操作流程、目的蛋白的产量、产率和比活力均优于传统的直接从生物体内提取的方法。

[参考文献]

- [1] MORRIS S M. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism [J]. Annual Review of Nutrition, 2002, 22 (1): 87 - 105.
- [2] CEDERBAUM S D, YU Hong, GRODY W W, et al. Arginases I and II: Do their functions overlap? [J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2004, 81 (S1): S38 - S44.
- [3] VIELIE-BREITBURD F, ORTH G. Rabbit liver L-Arginase purification, properties, and subunit structure [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247 (4): 1227 - 1235.
- [4] KHOURY O, GHAZALE N, STONE E, et al. Human recombinant arginase I (Co)-PEG5000 [HuArgI

- (Co) -PEG5000] -induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human glioblastoma cells [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2015, 122 (1): 75 - 85.
- [5] LEWIS K E, RASMUSSEN A L, BENNETT W, et al. . Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis; Changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11 (3): 55 - 72.
- [6] NISSIM I, LUHOVYY B, HORYN O, et al. . The role of mitochondrially bound arginase in the regulation of urea synthesis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (18): 17715 - 17724.
- [7] ARISTOTELES L R, RIGHETTI R F, PINHEIRO N M, et al. . Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model [J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2013, 13 (8): 52 - 64.
- [8] KORRER M J, ROUTES J M. Possible role of arginase-1 in concomitant tumor immunity [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3): e91370 - e91380.
- [9] DI COSTANZO L, SABIO G, MORA A, et al. . Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (37): 13058 - 13063.
- [10] OZÜYAMAN B, GRAU M, KELM M, et al. . RBC NOS: Regulatory mechanisms and therapeutic aspects [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, 14 (7): 314 - 322.
- [11] TOUNSI N, MEGHARI S, MOSER M, et al. . Lyso-phosphatidylcholine exacerbates *Leishmania* major-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and indoleamine 2, 3-dioxygenase activities [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 25 (1): 1 - 9.
- [12] CORRALIZA I M, SOLER G, EICHMANN K, et al. . Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 206 (2): 667 - 673.
- [13] STUDIER F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41 (1): 207 - 234.
- [14] 王新成. 分光光度法在血清精氨酸酶活性检测中的应用 [J]. *中国民康医学*, 2006, 18 (12): 1021 - 1022.
- [15] 缪宁梅, 马婕. 高效液相色谱法测定门冬氨酸鸟氨酸注射液的含量 [J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28 (1): 52 - 53.
- [16] BELIK J, SHEHNAZ D, PAN Jingyi, et al. . Developmental changes in arginase expression and activity in the lung [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008, 294 (3): L498 - L504.
- [17] QUE L G, KANTROW S P, JENKINSON C P, et al. . Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia [J]. *The American Journal of Physiology*, 1998, 275 (1Pt1): L96 - L102.
- [18] HARELL D, SOKOLOVSKY M. Beef-liver arginase. Isolation and molecular properties [J]. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 1972, 25 (1): 102 - 108.