

猪链球菌国内分离株精氨酸脱亚氨酶的克隆表达及其活性分析

张金秋, 陆承平*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 根据 GenBank 上精氨酸脱亚氨酶(arginine deiminase, AD)序列 AF546864, 设计并合成一对引物, 用 PCR 检测 29 株猪链球菌和 7 株马链球菌兽疫亚种的 *ad* 基因, 发现 29 株猪链球菌均能检出此基因, 而 7 株马链球菌兽疫亚种均未检出。扩增出的猪链球菌 2 型(SS2)强毒株 HA9801 的 *ad* 基因片段, 定向克隆至 pBAD/Myc-HisC 严紧型质粒并转化 TOP10。阳性重组菌经 L-阿拉伯糖诱导, 表达出分子量约 47000Da 的重组蛋白。经镍柱亲和层析, 获得纯化的重组酶。活性分析显示, 该酶具有巯基酶和金属酶的特征, 其最适反应温度为 37°C, 最适 pH 值为 6.5。Western blot 分析显示, 该酶能与 SS2-HA9801 全菌制备的兔抗血清发生特异性反应, 表明其具有一定的免疫原性。检测该酶有助于进一步分析猪链球菌可能的毒力因子。

关键词: 猪链球菌; 精氨酸脱亚氨酶; 克隆表达; 酶活

中图分类号: S852.0936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0860-05

猪链球菌(*Streptococcus suis*)根据其荚膜多糖抗原性的不同, 可分为 35 个血清型(1 ~ 34, 1/2)^[1-3], 主要致病血清型为 1 型、2 型、7 型、9 型、14 型和 1/2 型, 其中以 2 型流行最广, 致病性最强^[4], 可引起猪的脑膜炎、关节炎、肺炎、败血症等^[5-7], 亦可引起人类感染, 是一种重要的人畜共患病病原。近年来的研究认为, 荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)^[8,9]、溶菌酶释放蛋白(muraminidase released protein, MRP)^[10]、胞外因子(extracellular factor, EF)^[10]、溶血素(suilysin, SLY)^[11]和 IgG 结合蛋白(IgG ligand)^[12]等是其重要的毒力因子。但在加拿大等地分离的大多数强毒株并不产生 MRP、EF 等毒力相关蛋白^[13], 这表明猪链球菌存在更为复杂的致病机制, 可能是多种因素共同作用的结果。

蛋白酶在细菌的生命活动中常常发挥重要的作用, 如参与营养物质的运输、细胞的新陈代谢、受体与配体相互作用等^[14], 但在猪链球菌的研究过程中, 有关蛋白酶的报道并不多见。Winterhoff 等^[15]用二维电泳的方法发现了一种新的蛋白, 在猪链球菌 2 型的菌体表面及胞外上清中均有存在。当生长环境的温度升高时, 该蛋白的表达量也会增加。氨基酸测序分析表明, 其与化脓链球菌的链球菌酸性糖蛋白(streptococcal acid glycoprotein, SAGP)具有高度

同源性, 并具有精氨酸脱亚氨酶活性, 故命名为猪链球菌的精氨酸脱亚氨酶(arginine deiminase, AD)。国内尚未有关于此酶的报道。本试验对精氨酸脱亚氨酶的基因在部分国内分离菌株中的分布情况进行检测, 克隆表达其功能片段, 并对表达酶的理化性质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)强毒株 HA9801 由本实验室姚火春等^[16]于 1998 年从江苏分离、鉴定; ZY05719 株由四川省动物防疫总站惠赠; SS2 无毒株 T15 由荷兰 H. Smith 教授^[17]惠赠; 其余 21 株 S22、1 株 SS1、SS7 和 SS9 各两株, 以及 7 株马链球菌兽疫亚种均由本实验室保存。

1.1.2 试剂: Ex TaqTM (5U/ μ L), *Pst* I、*Eco*R I (10U/ μ L) (TaKaRa 公司); 质粒抽提试剂盒、DNA 回收试剂盒 (TaKaRa 公司); Agarose (Promega 公司); His.Bind Resin 镍亲和层析柱 (Novagen 公司); 胰蛋白胍、酵母抽提物 (OXOID 公司); Amp^r (南京第一制药厂); N-甲苯磺酰-L-赖氨酸-氯甲基酮 (TLCK), 1, 10-邻二氮杂菲 (OPA), N-(反式-环氧丁二酰)-L-亮氨酸-胍基丁酰胺 (E-64), 碘乙酰胺 (Iodoacetamide)

基金项目: 国家 973 项目 (2006CB504403)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-25-84396517; E-mail: luep@njau.edu.cn

作者简介: 张金秋 (1982 -), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: jqz03@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-01-15; 接受日期: 2007-03-22; 修回日期: 2007-07-03

苯甲基磺酰氟(PMSF) Diprotin A(Sigma公司);乙二胺四乙酸(EDTA) 2-巯基乙醇(2-ME) SDS、二硫苏糖醇(DTT)(Amresco公司);L-arginine-pNa(Sigma公司);L-ararose(Amresco公司)。

1.1.3 引物设计:根据 GenBank 登录序列 AF546864 利用 Primer 5.0 软件,自行设计一对引物 ArgDP1 和 ArgDP2,引物两端分别添加限制性酶切位点 *Pst* I、*Eco*R I 和保护性碱基,扩增 Arginine Deiminase System 中第一个开放阅读框 13~1347bp 间的片段。引物序列分别为:上游引物 ArgDP1:5'-CATCTGCAGTGAGAGGCAGGAAAGCGTAC-3';下游引物 ArgDP2:5'-CTGGAATTCAAACGGCATTGACATACAAC-3'。

1.2 目的基因的获得

1.2.1 PCR 扩增:CTAB/NaCl 法提取细菌的基因组 DNA^[18]。PCR 采用 25 μ L 体系,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 50s,56 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min30s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。以双蒸水为空白对照。

1.2.2 PCR 产物的回收和酶切:以 SS2-HA9801 为参考株,进行以下试验。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 回收试剂盒回收目的片段,并用 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切 4h,加 10 \times Loading Buffer 终止反应,电泳回收酶切后的目的基因片段。

1.3 重组质粒的构建和测序

1.3.1 重组质粒的构建:在含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 中接种携带 pBAD/Myc-HisC 空质粒的 TOP10 单菌落,37 $^{\circ}$ C 振荡 12~16h,用质粒抽提试剂盒抽提质粒,*Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切后,以 DNA 回收试剂盒回收酶切产物。将 PCR 双酶切回收产物与空质粒双酶切回收产物进行连接,并转化感受态的 TOP10 宿主菌。感受态细胞的制备、转化均按常规方法^[18]进行,利用 Amp 抗性、PCR 方法和限制性酶切进行重组质粒的筛选和鉴定。

1.3.2 重组质粒的序列分析:对 PCR 方法和限制性酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定,由上海 Invitrogen 公司完成,以验证读码框的正确性,并用 DNASTar 和 BLAST 软件进行序列同源性分析。

1.4 重组质粒的诱导表达及纯化

取阳性重组质粒的单菌落,接种含 100 μ g/mL Amp 的 LB,37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡 2~3h,当菌液浓度达到 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 时,加入 L-ararose 至终浓度分别为 2%、0.2%、0.02%、0.002% 和 0.0002%,37 $^{\circ}$ C 继续剧烈振荡培养 6~8h。10000 \times g 离心 5min,收获菌体。沉淀均以 pH7.2 10mmol/L 的 PBS 洗涤 3 次,加等体

积的电泳上样缓冲液煮沸 10min,SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。按最佳条件大量诱导表达重组蛋白,超声波裂解后,离心所得上清用 Novagen 公司的 His-Bind Resin 纯化试剂盒进行融合蛋白的亲亲和层析。

1.5 表达酶的 Western blot

纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE,采用半干电转移法将其转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂乳封闭后,进行 Western blot 分析。一抗为用灭活的 SS2-HA9801 菌体制备的兔抗血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白(HRP-SPA),以二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.6 表达酶的活性分析

采用 Oginsky^[19]方法并稍加改进检测酶的活性。以 L-arginine-pNa 为底物(50mmol/L),在 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5)中,37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,以带有底物的失活酶液作为空白对照,测定其 OD_{405} 。设每分钟 OD_{405} 变化 0.01 为一个酶活单位。改变反应条件,测定该酶在不同的温度和 pH 值时的稳定性。所用的缓冲液系统为:50mmol/L 柠檬酸盐(pH3~6),50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7~8) and 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8~9)。

将纯化的重组酶分别与 10mmol/L 的 EDTA,5mmol/L 的 Iodoacetamide,10mmol/L 的 TLCK,1mM 的 E-64,10mmol/L 的 PMSF,10mmol/L 的 OPA,10mmol/L 的 2-ME,10mmol/L DTT,0.05% 的 SDS 及各种金属离子等室温作用 10min 后,分别加入底物,37 $^{\circ}$ C 反应 30min,测定酶活。以未经处理的酶活力为 100%,其余折合为酶活力的百分数。

2 结果

2.1 PCR 扩增和序列分析

PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,29 株猪链球菌均出现约 1.3kb 的清晰条带,与预期大小一致,而 7 株马链球菌兽疫亚种均未出现此条带,空白对照未出现非特异性条带。扩增片段经测序,大小为 1334bp,G/C 含量约 30.1%,经 DNASTar 和 BLAST 软件进行同源性分析,其与已发表的猪链球菌 2 型 I9841/1 株的 ad 序列同源性高达 99%,与化脓链球菌的 *sagp* 和 *plr* 基因同源性分别为 89% 和 88%。

2.2 重组质粒的鉴定

扩增片段定向克隆至 pBAD/Myc-HisC 表达质粒中,获得的重组质粒转化感受态宿主菌 TOP10,经

Amp 抗性筛选得到阳性重组菌。提取重组质粒,经 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切,得到 4.1kb 和 1.3kb 左右的片段,说明 *ad* 基因片段已成功克隆。

2.3 重组质粒的诱导表达、纯化和免疫转印

重组菌株经 0.002% L-ararose 诱导后,菌体蛋白进行 SDS-PAGE,出现明显的约 47000Da 的蛋白条带,而含 pBAD/*Myc*-HisC 空载体的 TOP10 诱导后在该处无特异条带(图 1)。纯化后的蛋白进行免疫印迹,在分子量约 47000Da 处出现一条明显的棕色条带(图 2)。

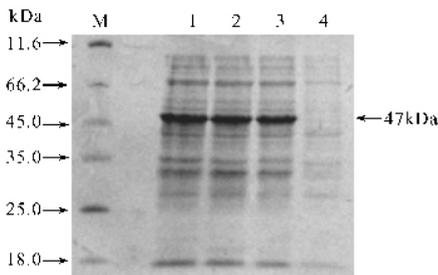


图 1 诱导表达产物 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of expression protease. M:Protein Marker; 1, 2, 3: products of 8h, 6h, 4h after induced by L-ararose, respectively; 4: pBAD/*Myc*-HisC vector without inserted fragment as control.

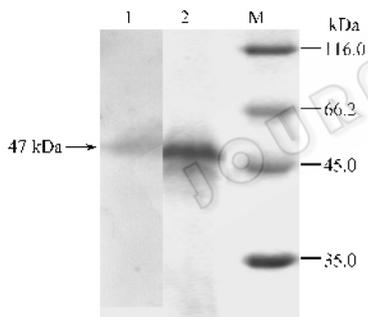


图 2 纯化后的表达酶 SDS-PAGE 和 Western blot 结果

Fig.2 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified expression protease. 1:Western blot analysis; 2:SDS-PAGE of purified expression protease; M:Protein Marker.

2.4 表达酶的活性分析

以 L-arginine-pNa(50mM)为底物,在不同的温度、pH 值、各种抑制剂和金属离子存在的条件下,测定酶的活性。实验结果显示该酶的最适反应温度为 37℃(图 3-A),最适 pH 值为 6.5(图 3-B)。该酶在 28℃至 42℃温度范围内均具有较高的活性,但 56℃作用 30min 后,仅能保持 10%的酶活(以 37℃时的最高酶活为 100%)。Ca²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺等金属离子对酶活有促进作用,而 EDTA、OPA、Diprotin A、TLCK、E-64、Iodoacetamide 等抑制其活性,PMSF 对其无显著影响(表 1、表 2)

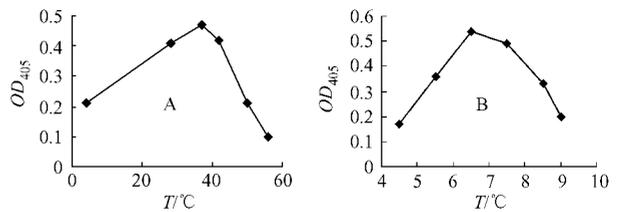


图 3 表达酶的最适反应温度和和最适反应 pH

Fig.3 The optimum temperature (A) and pH (B) of expression protease.

表 1 各种化学试剂对酶活性的影响

Chemicals	Type	Concentration(mmol/L.)	Relative activity/%
EDTA	Metallo	10	48
TLCK	Cysteine/serine	10	44
E-64	Cysteine	1	34
Iodoacetamide	Cysteine	5	49
PMSF	Serine	10	102
Diprotin A	Metallo	5	14
OPA	Zn ²⁺ /Fe ²⁺	10	20
2-ME	Reducer	10	78
DIT	Reducer	10	63
SDS	Detergent	0.05%	79

表 2 各种金属离子对酶活性的影响

Metal ion /10(mmol/L.)	Relative activity/%	Metal ion /10(mmol/L.)	Relative activity/%
MgCl ₂	95	MnCl ₂	86
NaCl	100	CuCl ₂	94
ZnCl ₂	107	CoCl ₂	85
CaCl ₂	126	BaCl ₂	109
FeCl ₂	105	KCl	101

3 讨论

猪链球菌 2 型(SS2)是一种重要的人畜共患病病原,我国于 1990 年在广东省首次分离鉴定到 SS2,随后对 SS2 的研究主要集中于毒力因子方面,对蛋白酶方面的报道尚不多见。本试验首次在猪链球菌国内分离株中检测到精氨酸脱亚氨酶基因,发现该基因不仅存在于 2 型菌株中,也存在于 1 型、7 型和 9 型中,且强毒株与无毒株在基因序列上无显著差异(试验选取 SS2 强毒株 HA9801、ZY05719 和无毒株 T15 同时进行了测序分析)。另外,从 1997 至 2005 年间,在江苏、上海、四川、安徽、江西等地,不同年代及不同地域分离的菌株都能检出该基因,表明其具有一定的保守性。DNASar 分析显示其编码的蛋白含有 432 个氨基酸,分子量约 46800,与化脓链球菌和肺炎链球菌的 SAGP 同源性分别为 90% 和 86%,其蛋白质序列比核酸序列具有更高的同源性。

精氨酸脱亚氨酶系统(Arginine Deiminase System)广泛存在于很多原核生物体内,主要由精氨酸脱亚氨酶(AD),鸟氨酸氨甲酰转移酶(ornithine carbamoyltransferase,OCT)和氨基甲酸激酶(carbamate kinase,CK)3种酶组成。其中AD催化精氨酸转化为瓜氨酸,同时生成 NH_3 和ATP;瓜氨酸再经OCT和CK催化降解,最终生成 CO_2 、 NH_3 和ATP。推测该系统的功能可能有以下几个方面:(1)催化精氨酸的代谢,为细菌的生命活动提供ATP;(2)提供氨基甲酰磷酸酶,参与瓜氨酸和嘧啶的合成(后者是参与细菌DNA合成的重要物质);(3)通过产生 NH_3 ,增强细菌对酸性环境的抵抗能力^[20]。对已发表的猪链球菌2型参考株P1/7的全基因组进行分析,结果显示编码这3个酶的基因在排列上紧密相连,提示它们可能位于同一个操纵子内;而且其上游和下游存在多个调控基因,表明AD系统的表达可能受诸多外界因素(温度、氧气、pH值等)的调控,这可能是该酶的表达量受温度调节的证据之一。已报道的铜绿假单胞菌、化脓链球菌、肺炎链球菌及口腔链球菌的AD系统亦存在类似的操纵子结构^[21,22],表明该系统在进化上可能具有较高的保守性。

另外,Degnan和Fontaine等^[23]的研究发现,表达精氨酸脱亚氨酶的化脓链球菌,在酸性环境下(如吞噬小体内)的存活率远远高于不表达该酶的突变株,可能是由于该酶催化的代谢反应过程中产生的 NH_3 能提高环境的pH值,从而有利于增强细菌抵抗酸性环境破坏的能力,而此过程中产生的ATP,则可以为细菌的生命活动提供能量。Degnan和Palmer等^[24]的研究还发现,产生AD的化脓链球菌(野生株)在体外能够抑制受抗原刺激的人外周血单核细胞及T细胞的增殖,而该酶的缺失突变株不存在此种抑制效应;用HEp-2C细胞进行细菌侵袭力实验,发现野生株比突变株侵袭细胞的能力强3~5倍。猪链球菌同样产生此酶,其是否存在类似的功能,有待于进一步的研究。

试验选择pBAD/Myc-HisC严紧型质粒进行原核表达,其融合蛋白仅2kD,所以对表达产物的活性和免疫原性不会产生较大影响,比常用的pET、pGEX等表达系统具有更大的优越性。酶活试验表明,该原核表达产物具有天然酶的活性,能催化精氨酸的降解,金属酶抑制剂(EDTA、OPA、Diprotin A)和半胱氨酸抑制剂(TLCK、E-64、Iodoacetamide)能显著降低其活性,提示其活性中心附近可能有半胱氨酸存在,具有金属酶和巯基酶的特征。

Western blot显示,该酶能与猪链球菌2型全菌蛋白制备的抗血清发生特异性反应,表明其具有一定的免疫原性。由于该酶在猪链球菌多个血清型中具有高度的保守性,且广泛存在于菌体表面和胞外上清中,因此对建立新的猪链球菌病血清学诊断方法和开发新的亚单位疫苗,具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**(4): 2633 - 2636.
- [2] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Characterization of six new capsular types (23 - 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**(7): 2590 - 2594.
- [3] Higgins R, Gottschalk M, Henrichsen M. Description of six new capsular type (29 - 34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Investig*, 1995, **7**(2): 405 - 406.
- [4] MacInnes, Desrosiers R. Agents of the 'suis-ide diseases' of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res*, 1999, **62**(5): 83 - 89.
- [5] Vecht U, Van Leengoed LA, Verheyen ER. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (part one). *Vet Q*, 1985, **7**(3): 315 - 321.
- [6] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**(1): 131 - 137.
- [7] Clifford Hadley FA. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J*, 1983, **139**(1): 1 - 5.
- [8] Charland N, Harel J, Kobisch M, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, 1998, **144**(10): 325 - 332.
- [9] Charland N, Jacques M, Lacouture S, et al. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1/2 and 1/2. *Microbiology*, 1997, **143**(9): 3607 - 3614.
- [10] Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1991, **59**(5): 3156 - 3162.
- [11] Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (sulysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*, 1994, **62**(10): 1742 - 1748.
- [12] Serhir B, Dubreuil D, Higgins R, et al. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J Bacteriol*, 1995, **177**(2): 3830 - 3836.
- [13] Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, et al. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res*, 1998, **62**(11): 75 - 79.
- [14] 陆承平. 兽医微生物学. 第三版. 北京: 中国农业出版社,

- [15] Winterhoff N , Goethe R , Gruening P , *et al.* Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes* . *J Bacteriol* , 2002 , **184** (9) : 6768 – 6776 .
- [16] 姚火春 陈国强 陆承平 . 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定 . 南京农业大学学报 , 1999 , **22** (2) : 67 – 70 .
- [17] Smith HE , de Vries R , van 't Slot R , *et al.* The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2 : genetic determinant for the synthesis of sialic acid . *Microbial Pathogenesis* , 2000 **29** (4) : 127 – 134 .
- [18] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T . 分子克隆实验指南 . 金冬雁 黎孟枫 等译 . 第三版 . 北京 科学出版社 , 1998 .
- [19] Oginsky . Isolation and determination of arginine and citrulline . *Methods Enzymol* , 1957 **3** (2) : 639 – 643 .
- [20] Casiano-Colon A , Marquis RE . Role of arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance . *Appl Environ . Microbiol* , 1988 **54** (11) : 1318 – 1324 .
- [21] Baur H , Luethi E , Stalon V , *et al.* Sequence analysis and expression of the arginine-deiminase and carbamate-kinase genes of *Pseudomonas aeruginosa* . *Eur J Biochem* , 1989 , **179** (9) : 53 – 60 .
- [22] Mercenier A , Stalon V , Simon JP , *et al.* Mapping of the arginine deiminase gene in *Pseudomonas aeruginosa* . *J Bacteriol* , 1982 , **149** (17) : 787 – 788 .
- [23] Degnan BA , Fontaine MC , Doebereiner AH , *et al.* Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein . *Infect Immun* , 2000 **68** (5) : 1530 – 1534 .
- [24] Degnan BA , Palmer JM , Robson T , *et al.* Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity . *Infect Immun* , 1998 **66** (21) : 3050 – 3058 .

Cloning , expression and characterization analysis of the arginine deiminase of *Streptococcus suis* of China isolates

ZHANG Jin-qiu , LU Cheng-ping*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology , Ministry of Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : PCR analysis demonstrated the presence of the *ad* gene in all 29 *S. suis* strains tested , but none of the seven *S. equi* subsp. *zooepidemicus* strains . The fragment of *ad* gene of virulent isolate SS2-HA9801 was later cloned into pBAD/Myc-HisC vector *via* restriction endonuclease and then transformed into host strain TOP10 . A recombinant protein of 47000Da was highly expressed after induced by L-ararose and purified by Ni-nitrilotriacetic acid affinity chromatography . Western blotting demonstrated that the recombinant protein can reacted to the polyclonal antibody raised against whole-cell protein of SS2-HA9801 , which suggested that it possessed some immunogenicity and may be important for further research . Enzymatic assay revealed that the optimum temperature for its activity is 37°C and pH is 6.5 . Studies with class-specific inhibitors supported the assignment of a sulfhydryl enzyme with some metallo class characteristics .

Keywords : *Streptococcus suis* ; arginine deiminase ; cloning and expression ; enzymatic activities