

CCK39/UreB 双基因融合表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达

张炜阳^{1*}, 李岩², 吴同山², 罗文华¹, 胡斌³, 胡文锋^{1*}

1 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640

2 广东省东莞市畜牧研究所, 东莞 523086

3 生物源生物技术(深圳)有限公司, 深圳 518055

摘要: 本研究报道了猪源性胆囊收缩素 39 肽(Cholecystokinin 39, CCK39)和猪肠道大肠菌群脲酶 B 亚基(UreaseB, UreB)融合的原核表达载体的构建, 以及兼有 CCK39 和 UreB 功能活性域的融合蛋白的表达。利用 RT-PCR 从猪十二指肠总 RNA 中克隆 CCK39, 再通过 PCR 从猪肠道产脲酶大肠菌群质粒中克隆 UreB, 之后将扩增所得的两基因先后定向插入原核表达载体 pET43a(+)中, 构建双基因融合表达载体 pET43a(+)/CCK39/UreB, 并转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL-21(DE3)中。重组质粒 pET43a(+)/CCK39/UreB 经 PCR、双酶切鉴定和序列分析, 证实已成功构建双基因融合表达载体。重组表达菌经 isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG)诱导表达了分子量约为 80 kD 的融合蛋白, 与预期分子量相同, 主要以可溶蛋白的形式存在于胞质中; 用 Ni²⁺-NTA 对可溶蛋白进行亲和纯化, 纯度大于 95%; Western blotting 分析结果显示重组融合蛋白可分别为 CCK8 和 UreB 抗血清识别, 具有良好的反应原性。本研究所表达的融合蛋白为研制抗 CCK/Urease 双效疫苗奠定了基础。

关键词: CCK39/UreB, 融合表达, 脲酶

Construction and expression of the fusion gene CCK39/UreB in recombinant *Escherichia coli* BL-21(DE3)

Weiyang Zhang^{1*}, Yan Li², Tongshan Wu², Wenhua Luo¹, Bin Hu³, and Wenfeng Hu^{1*}

1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China

2 Dongguan Institute of Animal Husbandry, Dongguan 523086, China

3 Bioforte Biotechnology (Shenzhen) Co. Ltd, Shenzhen 518055, China

Abstract: The aims of this research were to construct prokaryotic expression vector containing fusion gene of Cholecystokinin 39 (CCK39) of pig and Urease subunit B (UreB) of coliform bacteria, and then to express the fusion protein in recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3). The CCK39 gene was amplified by RT-PCR from the extracted total RNA of pig's duodenum, and the UreB gene was then amplified by PCR from the extracted plasmid DNA of bacillus of coliform bacteria from pig's intestinal content. Then the CCK39 and the UreB were inserted into the prokaryotic expression vector pET43a(+) to construct a recombinant fusion expression vector pET43a(+)/CCK39/UreB and then, the recombinant vector was identified by PCR, endonuclease digestion and sequence

Received: August 30, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: Dongguan and Shenzhen Science and Technology Bureau (Nos. 2005D006, 2006022).

Corresponding author: Wenfeng Hu. Tel:+86-20-85280267; E-mail: wfhu@scau.edu.cn; johnwfhu@126.com

广东省东莞市科技局 (No. 2005D006) 和深圳市南山区科技局 (No. 2006022) 资助。

*These authors contributed equally to this work.

analysis. It was identified that the gene fragment of CCK39 at length of 117 bp and UreB at length of 324 bp were amplified and cloned into the vector pET43a(+) successfully. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and induced the expression of CCK39/UreB fusion protein with a molecular mass of approximately 80 kD by using isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) as inducer. The fusion protein was mostly located in the cytoplasm and it was soluble. The soluble protein was collected and purified by Ni²⁺-NTA column chromatograph and then reached a purity of more than 95%. It was proved by western blotting that the fusion protein could react with rabbit anti-CCK8 antiserum and rabbit anti-UreB antiserum. Therefore, the expressed fusion protein has good antigenicity. This work established a good foundation for further study on the production of anti-CCK/Urease vaccines.

Keywords: CCK39/UreB, fusion expression, urease

尽可能提高畜禽采食量,改善养殖效率和养殖环境是畜禽养殖业追求的目标。在不影响畜禽健康的前提下,畜禽采食量越大,用于维持生命体的营养所占的比例就越小,其提高日生产量的几率也越大,并影响其饲料转化率和生产效益。胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)是一种由胃肠道粘膜I细胞分泌产生的多肽,最早是在1928年由Ivy和Oldberg发现并命名的,具有抑制采食及延迟采食的短期效应^[1-3],而且该效应具有剂量依赖性,畜禽的采食量与血液中CCK的浓度呈线性负相关^[4]。由于CCK在畜禽体内的重要生理作用,降低畜禽体内CCK含量成为增加畜禽采食量、提高生产性能的方法之一。

另外,由于畜禽养殖规模化、集约化程度高,畜禽及其废弃物所产生的氨日趋增多,导致畜禽栏舍氨浓度过高,这势必造成负面影响。畜禽肠道内的氨主要是由肠道细菌如大肠杆菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌等分泌的脲酶(Urease)催化尿素水解而成。氨的积累不仅会直接损害畜禽胃肠道粘膜,引起尿道和胃肠道的感染以及损伤呼吸道和眼睛^[5,6],还对周边环境造成污染。因此,降低氨的排放是畜禽养殖者需要解决的问题。抑制脲酶活性是减少氨排放的有效途径。

本研究试图构建CCK 39肽/脲酶B亚基(UreB)双基因融合表达载体制备融合蛋白CCK39/UreB;之后以此作疫苗,制备具有双效价作用的抗CCK/Urease抗体,再通过体外抗原抗体结合降低CCK和脲酶的作用,提高畜禽采食量,并中和肠道脲酶活性,减少氨的排放及饲料蛋白的流失和浪费。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

原核表达载体pET43a(+), *Escherichia coli*

DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)均由华南农业大学动物科学学院家禽实验室惠赠; Ex Taq 酶、限制性内切酶BamH I、Hind III、Not I、T4 DNA连接酶购自宝生生物公司;总RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自深圳依诺金生物技术有限公司;兔抗猪CCK-8一抗、HRP-羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗大肠杆菌UreB一抗为本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 模板的制备

1) CCK39 cDNA的制备:取新鲜猪十二指肠,按照总RNA提取试剂盒要求提取猪十二指肠总RNA;检测证实其具备完整性后,将该总RNA逆转录为相应的cDNA,置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2) 产脲酶大肠菌群质粒的制备:从新鲜猪粪中分离产脲酶大肠菌群单菌落,过夜扩大培养,然后收集该新鲜培养物,提取该菌质粒,溶于TE buffer中并置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 CCK39 RT-PCR 扩增

根据GenBank公布的序列(gi:47523555),利用Primer Premier5.0设计一对特异引物(引物由上海生工生物技术有限公司合成,以下同)。上游引物:5'-GATGGATCCTACATCCAGCAGGCTCGAAAAGC-3'(下划线为BamH I);下游引物:5'-GATAAGCTTAAAATCCATCCAGCCCATGTAGTC-3'(下划线为Hind III),且不含终止密码子。以CCK39 cDNA为模板,PCR扩增猪十二指肠CCK39基因。PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物电泳后进行凝胶成像系统分析。

1.2.3 原核表达载体pET43a(+)/CCK39的构建

凝胶回收纯化上述扩增产物CCK39基因后,用BamH I和Hind III分别双酶切纯化后的扩增产物和

pET43a(+)原核表达载体,再分别凝胶回收纯化。载体与PCR回收产物以一定比例于16°C连接过夜,再转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素抗性筛选;挑取6个阳性菌落,分别进行PCR和 *Bam*H I、*Hind* III双酶切鉴定,将符合预期结果的菌株编号为 *E. coli* DH5 α /pET43a(+)/CCK39,送往上海生工生物技术有限公司进行测序,将测序结果与GenBank的Blastn比对,分析其同源性。

1.2.4 UreB PCR 扩增

根据GenBank上公布的肠杆菌UreB序列(gi:148150),利用Primer Premier5.0设计一对特异引物。上游引物为:5'-GGGAAGCTTATGATCCCCG GTGAAATTA-3'(下划线为*Hind* III);下游引物为:5'-AAA GCGGCCGCTTAATTCTCACTCTCTAA-3'(下划线为*Not* I);参照步骤1.2.2,扩增UreB基因。

1.2.5 双基因融合表达载体 pET43a(+)/CCK39/UreB 的构建

参照步骤1.2.3进行。

1.2.6 重组融合蛋白 CCK39/UreB 的诱导表达

将鉴定正确的双基因融合表达载体转化至 *E. coli* BL-21(DE3)中,挑取单菌落接种到含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的2 \times YT液体培养基中,于37°C、200 r/min 摇菌过夜。次日,按1%的接种量接种到含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的2 \times YT液体培养基中,当 $OD_{600}\approx 0.9$ 时,加入1 mol/L的IPTG至其终浓度为1 mmol/L,28°C、130 r/min 培养,诱导表达,分别收集1~8 h的菌体蛋白,同时以含空质粒的表达菌作对照,收集其诱导8 h菌体蛋白,12% SDS-PAGE电泳分析。

1.2.7 重组融合蛋白 CCK39/UreB 的可溶性分析

参照1.2.6的方法诱导表达重组融合蛋白,分别收集细胞外上清液、胞间质和包涵体进行SDS-PAGE电泳分析。

1.2.8 重组融合蛋白 CCK39/UreB 的纯化与分析

收集表达菌,采用Ni²⁺-NTA亲和纯化重组可溶蛋白,并备样进行12% SDS-PAGE电泳分析。

1.2.9 融合蛋白 CCK39/UreB Western blotting 分析

参照《分子克隆》第三版的方法步骤进行。

2 结果

2.1 CCK39 RT-PCR 扩增和 UreB PCR 扩增

1.2%琼脂糖凝胶电泳分析显示,RT-PCR和PCR

分别扩增的基因CCK39和UreB的大小均与预计的结果相符,分别为129 bp和338 bp(图1)。

2.2 重组质粒的鉴定与测序结果

以构建的重组质粒pET43a(+)/CCK39/UreB为模板对重组质粒进行PCR检测,结果分别能扩增出与2.1相同大小特异条带(图1);再分别用3组酶:*Bam*H I和*Hind* III;*Hind* III和*Not* I;*Bam*H I和*Not* I进行双酶切后2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果分别得到长约119 bp、327 bp和450 bp的片段(图2),酶切结果与预期目标一致。初步表明2个目的基因已经成功插入至质粒中。将构建好的重组质粒进行测序(图3),测序结果与GenBank的Blastn进行比对发现,新克隆的CCK39基因序列与GenBank上公布的猪源性CCK39基因序列和氨基酸序列(gi:47523555)同源性均为100%;新克隆的UreB基因序列与奇异变形杆菌UreB(gi:137080)的同源性最高,达98%,氨基酸同源性达96.3%,与普通变形杆菌、大肠杆菌的氨基酸同源性分别为91.7%和90.7%(图4),该序列具有较高的保守性。

用MEGA(version 2.1)软件包将本研究扩增的

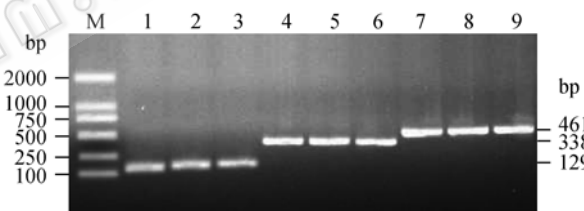


图1 RT-PCR and PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map for RT-PCR and PCR product. M: DNA marker DL2000; 1-3: the PCR product of CCK39; 4-6: the PCR product of UreB; 7-9: the PCR product of CCK39/UreB.

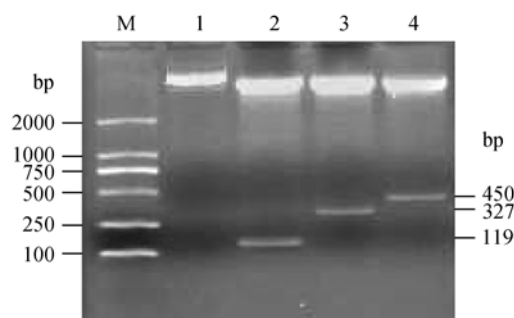


图2 重组质粒酶切鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Bam*H I/*Hind* III, *Hind* III/*Not* I, *Bam*H I/*Not* I). M: DNA marker DL2000; 1: the recombinant plasmid of pET43a(+)/CCK39/UreB; 2: *Bam*H I/*Hind* III digestion; 3: *Hind* III/*Not* I digestion; Lane 4: *Bam*H I/*Not* I digestion.

GGATCCTACATCCAGCAGGCTCGAAAAGCACCT
TCTGGCCGAGTATCTATGATTAAGAATCTGCAGA
GCCTGGACCCCAGCCACAGAATAAGTGACCGG
GACTACATGGGCTGGATGGATTTTAAGCTTATG
ATCCCCGGTCAAATTAAGGTTAATGCAGCATT
GGCGATATTGAACTGAATGCTGGTCGCGAGACA
AAAACCATACAGGTGGCTAATCATGGCGATAGA
CCTGTACAAGTTGGCTCTCATTACCACTTTTATG
AAGTTAATGAGGCACTCAGGTTTGCACGAGAA
GAGACATTAGGTTTTTCGTTTAAATATTCCTGCTG
GTATGGCTGTGCGCTTCGAGCCAGGTCAAAGTC
GCACTGTTGAGTTAGTGGCTTTTGCAGGAAAAC
GTGAAATTTATGGTTTTTCATGGCAAAGTGACCG
GTAAATTAGAGAGTGAGAATTAAGCGGCCGC

图3 CCK39/UreB 融合基因序列图
Fig. 3 Nucleotide sequence of CCK39/UreB.

UreB 氨基酸序列与其他菌株的 UreB 氨基酸序列进行系统发育分析和进化树的构建(图 5), 结果表明: 所扩增的 UreB 氨基酸序列与奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* (gi:137080)的亲缘性非常接近, 可初步确定该蛋白为奇异变形杆菌 UreB 蛋白, 并且与普通变

形杆菌 *Proteus vulgaris* (gi:137081)、大肠杆菌(gi:148150)具有较近的亲缘性。

2.3 融合蛋白 CCK39/UreB 的诱导表达

表达产物于 12%SDS-PAGE 电泳分析(图 6)显示新生的特异蛋白条带, 分子量大小约为 80 kD, 与预期结果相一致, 初步确定为目标重组融合蛋白。重组融合蛋白在诱导 1 h 并无明显的表达, 从第 2 h 开始较为明显, 随着表达时间的延长表达量逐渐增加, 诱导约 5 h 即到达高峰。

2.4 融合蛋白 CCK39/UreB 可溶性分析

28°C、IPTG 诱导融合蛋白 CCK39/UreB 可溶性情况如图 7 所示。在该诱导条件下, 重组大肠杆菌培养物上清液中并无可溶性重组融合蛋白 CCK39/UreB, 细胞裂解上清液中则含量最高, 细胞裂解沉淀物中仅有少量蛋白。这说明重组融合蛋白主要以可溶形式存在, 只有一小部分以包涵体形式存在。

2.5 融合蛋白 CCK39/UreB 的亲纯化

收集 Elution Buffer 洗脱液进行 12% SDS-PAGE 分析, 结果如图 8。从图中可以看出, 重组融合蛋白

		Percent identity								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Divergence	1	■	90.7	69.6	96.3	91.7	77.4	75.5	71.3	72.2
	2	9.9	■	69.6	88.9	89.8	75.5	76.4	72.2	71.3
	3	38.9	38.9	■	70.6	67.6	73.5	65.7	65.7	68.6
	4	3.8	12.1	37.3	■	91.7	78.3	75.5	73.1	74.1
	5	8.9	11.0	42.2	8.8	■	75.5	73.6	71.3	71.3
	6	27.0	29.7	32.7	25.7	29.7	■	72.1	67.9	68.9
	7	29.7	28.4	45.7	33.3	36.2	34.9	■	39.8	67.9
	8	36.2	34.7	45.7	33.3	36.2	41.8	38.6	■	70.4
	9	34.7	36.2	40.6	31.8	36.2	40.2	41.8	37.7	■
		1	2	3	4	5	6	7	8	9

Colony
Escherichia coli (gi148150)
Nitrosococcus oceani (gi94730642)
Proteus mirabilis (gi137080)
Proteus vulgaris (gi137081)
Pseudomonas putida KT2440 (gi26989563)
Shewanella halifaxensis HAW-EB4 (gi16762)
Vibrio fischeri MJ11 (gi163729466)
Vibrio parahaemolyticus (gi10336583)

图4 本克隆株与其他 UreB 菌株的氨基酸序列同源性比较
Fig. 4 Amino acid sequence homology of UreB among other 8 strains.

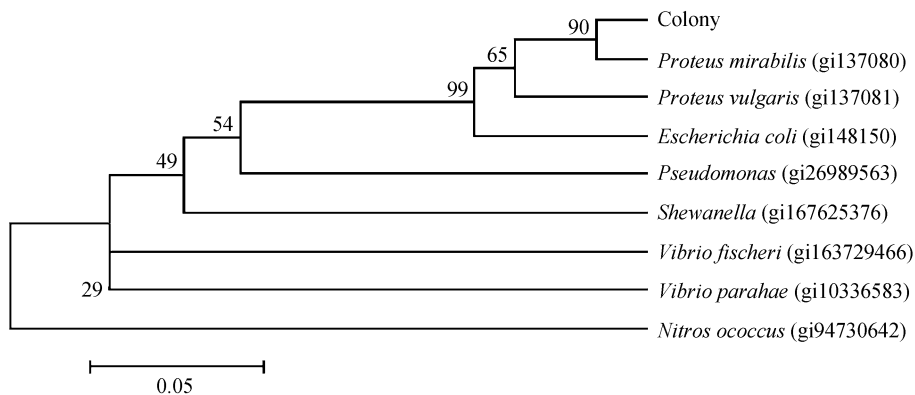


图5 不同菌株 UreB 氨基酸系统进化分析
Fig. 5 Phylogenetic analysis of UreB from different organisms. The sequences used for the analysis were amino acid sequences of different organisms.

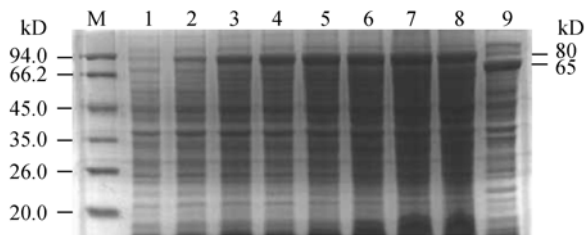


图 6 重组大肠杆菌诱导表达融合蛋白 CCK39/UreB 之 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression of the fusion protein CCK39/UreB induced by IPTG in recombinant *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1-8: pET43a(+)/CCK39/UreB induced by IPTG in recombinant *E. coli* BL21(DE3) for one to eight hours, respectively; 9: pET43a(+) induced by IPTG in recombinant *E. coli* BL21(DE3) induced for eight hours.

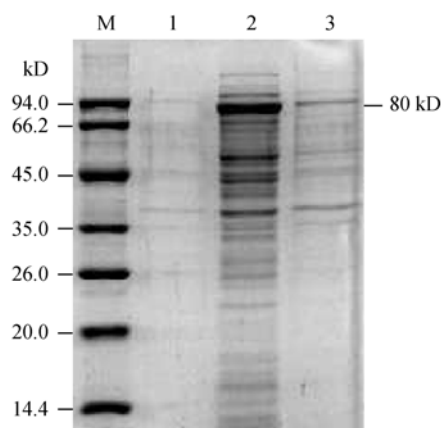


图 7 重组融合蛋白 CCK39/UreB 可溶性分析

Fig. 7 Identification of expression forms of recombinant fusion protein CCK39/UreB. M: protein marker; 1: supernatant before ultrasonic treatment; 2: supernatant of the bacterial lysate; 3: sediment of the bacterial lysate.

的洗脱峰主要集中在第 2~4 次, 到第 5 次基本洗脱完全。因此, 收集第 2~4 次洗脱液作进一步的处理。图 8 还显示在洗脱液中的重组融合蛋白 CCK39/UreB 纯度较高, 大于 95%。

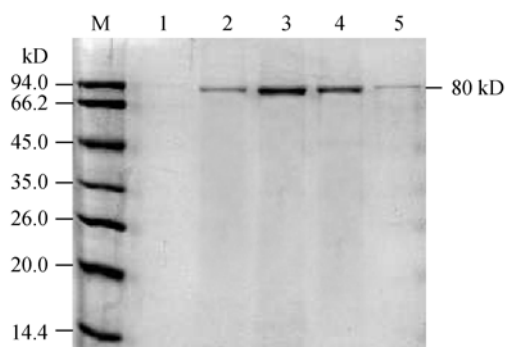


图 8 重组融合蛋白 CCK39/UreB 纯化结果 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of the purification of the fusion protein CCK39/UreB. M: protein marker; 1-5: fusion protein of CCK39/UreB washed for the first to fifth, respectively.

2.6 重组融合蛋白 CCK39/UreB Western blotting 分析

从图 9 可以看出, 在硝酸纤维素膜上均能检测到特异性条带, 大小约为 80 kD, 与 SDS-PAGE 分析的蛋白大小一致, 空载体 pET43a(+) 的诱导蛋白(对照组)并未出现。该结果表明融合蛋白 CCK39/UreB 在大肠杆菌中获得了正确表达, 可分别为 CCK8 和 UreB 抗血清识别, 具有良好的反应原性。

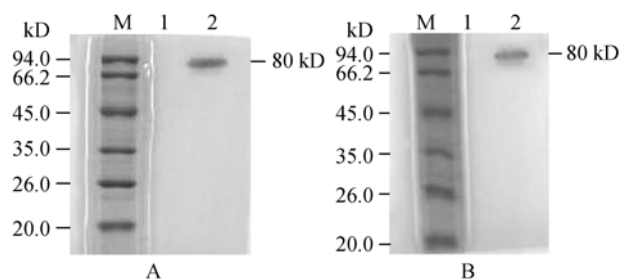


图 9 重组融合蛋白 CCK39/UreB Western blotting 检测

Fig. 9 Western blotting analysis of the fusion protein CCK39/UreB. A: rabbit anti-CCK8 antibody. B: rabbit anti-UreB antibody. M: protein marker; 1: pET43a(+) vector protein; 2: fusion protein of CCK39/UreB.

3 讨论

3.1 目的基因的选择

CCK 是一种存在多种分子形式脑-肠肽, 经 CCK 前体翻译后加工形成。目前已发现有 CCK-83、CCK-58、CCK-39、CCK-33、CCK-25、CCK-22、CCK-18、CCK-12、CCK-8、CCK-7、CCK-6、CCK-5 和 CCK-4 等, 它们都具有生物活性的 C-端四肽, 区别在于氨基酸残基向 N-端不同长度的延伸。其中以羟基端酰胺化的 CCK-8 和 CCK-33 为主要形式。CCK 是在脑和肠道内生成的, CCK-8 等小分子主要由大脑生成, 而较大分子的 CCK 则由肠道产生, 如 CCK-12、CCK-22、CCK-33、CCK-39、CCK-58 和 CCK-83 等。CCK-39 是 CCK-33 向 N-端延伸了 6 个氨基酸残基的多肽分子, 比 CCK-33 稳定得多, 常用于制备抗体^[7-10]。所以本研究选择了 CCK39。

脲酶(Urease)广泛存在于各种细菌、真菌、放线菌和植物中, 具有高度保守的核苷酸和蛋白质序列^[11], 可以催化尿素生成氨气和二氧化碳。具有催化活性的脲酶基因共有 7 个读码框(ORF), 分别为 UreA、UreB、UreC、UreD、UreE、UreF 和 UreG, 其中 UreA、UreB 和 UreC 为结构基因^[12], 分别编码催

化亚基 γ 、 β 和 α ，三者结合形成脲酶酶原三聚物($\alpha\beta\gamma$)^[13]。在 UreD、UreE、UreF、UreG、UreH 和 UreI 基因编码的辅助蛋白配合下，每一摩尔三聚物分子摄入 6 个镍离子后被激活成为具有活性的脲酶^[14,15]。结构基因中以 UreB 的抗原性最强，常以此来制备疫苗。从图 7 和图 8 结果可以推测，将本研究表达的重组融合蛋白制备疫苗免疫动物产生的抗体可中和胃肠道常见微生物产生的脲酶。

3.2 融合蛋白

本研究首次利用人工融合的方法将 CCK39 和 UreB 两段基因编码区连接在一起，表达出兼有 CCK39 和 UreB 功能活性域的融合蛋白。融合蛋白技术正在从基础研究走向临床应用，已经逐步成熟、完善并有所创新。新型多结构域的人工蛋白在诸多临床领域具有潜在应用价值。在自然界中，许多的多结构域(或多功能域)蛋白是由数个多肽链片段拼接在一起而形成的。有一种观点认为，由相对较小的结构域拼装成较大的多功能蛋白是自然进化中的一个重要因素。Robert BR 在分析了多例由插入形成的多功能域的蛋白的结构后得出这样的推论：结构域的插入可能是自然界形成已有的多结构域组合的一种策略^[16]。总之，蛋白的结构常常可以容许包括整个结构域的插入与融合，在自然界中，通过结构域的插入与融合从而形成大的多功能蛋白是一种较为普遍存在的现象。

3.3 外源蛋白可溶性表达

本研究采用新推出的 pET-43a(+)表达载体，该载体具有通过大量系统筛选而得到的一种过量表达时具有极高溶解性的大肠杆菌蛋白 Nus-Tag 融合伴侣和标签，进一步提高了重组融合蛋白的可溶性，避免了包涵体的缺点。

本研究成功地构建了双基因融合表达载体 pET43a(+)/CCK39/UreB，且成功地表达出兼有 CCK39 和 UreB 功能活性域的融合蛋白，为研制抗 CCK/Urease 疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Gulley S, Covasa M, Ritter RC, *et al.* Cholecystokinin receptors mediate the increase in Fos-like immunoreactivity in the rat myenteric plexus following intestinal oleate infusion. *Physiol Behav*, 2005, **86**: 128–135.
- [2] Sullivan CN, Raboin SJ, Gulley S, *et al.* Endogenous cholecystokinin reduces food intake and increases foslike immunoreactivity in the dorsal vagal complex but not in the myenteric plexus by CCK1 receptor in the adult rat. *Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, **292**: R1071–1080.
- [3] Raybould HE, Gayton RJ, Dockray GJ. Mechanisms of action of peripherally administered cholecystokinin octapeptide on brain stem neurons in the rat. *Neurosci*, 1988, **8**: 3018–3024.
- [4] Zhou L. *Gastrointestinal Physiology*. Beijing: Higher Education Press, 1998: 181–182.
周吕. *胃肠生理学*. 北京: 高等教育出版社, 1998: 181–182.
- [5] Urbain B, Gustin P, Prouvost JF, *et al.* Quantitative assessment of aerial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs. *Vet Res*, 1994, **55**: 1335–1340.
- [6] Gerber DB, Mancl KM, Veenhuizen MA, *et al.* Ammonia, carbon monoxide, carbon dioxide, hydrogen sulfide and methane in swine facilities. *Com Cont Educ Pract*, 1991, **13**: 1483–1488.
- [7] Dockray GJ, Gregory RA, Harris JI, *et al.* Two cholecystokinin-like octapeptides from brain: isolation, structure, immunochemical characterization and biological activity. *Physiol*, 1978, **280**: 16–17.
- [8] Rehfeld JF. Immunochemical studies on cholecystokinin. *Biol Chem*, 1978, **253**: 4022–4033.
- [9] Ebenezer IS. Effects of the CCK receptor antagonist MK-329 on food intake in pigs. *Physiol Behav*, 1990, **47**: 145–148.
- [10] Beinfeld MC, Connolly KJ, Pierce RC. Cocaine treatment increases extracellular cholecystokinin (CCK) in the nucleus accumbens shell of awake, freely moving rats, an effect that is enhanced in rats that are behaviorally sensitized to cocaine. *Neurochem*, 2002, **81**: 1021–102.
- [11] Mobley HL, Huasinger R. PMicorbiol urases: significance, regulation, and molecular characterization. *Micorbiol Rev*, 1989, **53**(1): 85–108.
- [12] Sarah EF D'orazio, Carleen M Collins. The plasmid-encoded urease gene cluster of the family enterobacteriaceae is positively regulated by UreR, a member of the AraC family of transcriptional activators. *J Bacteriol*, 1993, **175**(11): 3459–3467.
- [13] Collins CM, DorZaio SEF. Bacterial uerases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol Micorbiol*, 1993, **9**(5): 907–913.
- [14] Lee MH, Muirone SB, Renner MJ, *et al.* Klebsiella aerogenes urease gene cluster: sequence of UreD and demonstration that four accessory genes (UreD, UreE, UreF, and UreG), are involved in nickel metallocenter biosynthesis. *Bacteriol*, 1992, **174**(13): 4324–4330.
- [15] Mulrooney SB, Huasinger RP. Sequence of the Klebsiella aerogenes urease genes and evidence for accessory protein facilitating nickel incorporation. *Bacteriol*, 1990, **172**(10): 5837–5843.
- [16] Robert BR. Domain insertion. *Protein Eng*, 1994, **7**: 1407–1410.