

## Staphylococcus epidermidis urease의 정제 및 생화학적 특성에 관한 연구

민선희 · 이만형\*

대구가톨릭대학교 약학대학

Received April 16, 2007 / Accepted April 23, 2007

**Purification and Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* Urease.** Seon Hee Min and Mann Hyung Lee\*. College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Hayang, Gyongsan, Gyongbook 712-702, Korea – *Staphylococcus epidermidis* is a coagulase-negative, gram-positive bacterium that normally inhabits the human skin. *S. epidermidis* is also known to be an opportunistic pathogen in infections of various indwelling medical devices. This report describes purification and characterization of the urease of *S. epidermidis* urease, which may act as a virulence factor. The urease from *S. epidermidis* was purified 1,127 fold by using DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Mono-Q and Superdex HR200 column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 993.8 U/mg. Michaelis constant ( $K_m$ ) of the enzyme was estimated to be 8.5 mM urea by using Lineweaver-Burke double reciprocal plot. The native molecular weight of the urease was shown to be 255 kD by using Superose 6HR gel filtration chromatography and the purified enzyme contained 2.2 nickel ions per catalytic unit. The overall stoichiometry of the enzyme subunits appears to be  $(\alpha\beta\gamma)_3$ , which is consistent with the enzymes from other bacteria sources.

**Key words** – *Staphylococcus epidermidis*, urease, nickel

### 서 론

백색 포도상구균 *Staphylococcus epidermidis*는 그람 양성 구균으로 인체의 각종 피부 및 점막 표면에 널리 분포하는 정상 세균이며, 황색 포도상구균 *S. aureus*과는 달리 coagulase-음성인 것이 특징이다[10]. 종래에 인체에는 거의 무해한 것으로 알려져 왔던 *S. epidermidis*는 그러나, 최근 들어 각종 감염증을 일으키는 병원균으로 주목을 받고 있다[10,12,24]. *S. epidermidis*는 특히, 혈관 및 요로 카테터, 인공 심장판막, 인공 관절을 비롯한 각종 정형외과적인 기구 등의 각종 유치 의료장치 (indwelling medical devices) 표면에 흡착하여 바이오필름을 형성함으로써 각종 감염증을 일으키는 것으로 알려져 있다[4,19,22]. 예를 들면, 혈관 카테터 착용 환자의 패혈증[8,16,23], 천연 및 인공심장판막에 의한 세균성 심내막염[1,2], 요로 카테터 착용환자의 요로감염증[14], 휴대복막투석 환자의 복막염[20] 등이 있다.

Urease는 다수의 미생물과 식물에서 발견되고 있으며 이중 특히 세균의 urease는 인체와 동물의 질병원인, 반추 동물의 질소대사 및 영양, 농경지를 포함한 자연에서의 질소화합물의 환경적 변환에 중요한 역할을 담당하고 있다[17,18]. Coagulase-음성 포도상구균이 일으키는 질병에 urease 효소가 일반적으로 관여하는지의 여부는 알려진 바 없으나, 요로

감염증의 원인균인 *S. saprophyticus*의 경우는 urease가 주된 병원성 인자로 알려져 있다[5,6]. 최근에는 바이오필름-비형성 표준균주인 *S. epidermidis* ATCC12228[26] 및 바이오필름-형성 균주이자 methicillin 내성균주인 *S. epidermidis* RP62A [7]의 염색체 염기 서열이 각각 완성되어 발표됨으로써 이 세균의 병원성 인자에 관한 비교 연구가 활발하게 이루어지고 있다. *S. epidermidis*의 잠재적인 병원성 인자인 urease에 관한 연구는, 임상균주인 *S. epidermidis* CNS23에서 urease 유전자를 부분적으로 cloning하여 *S. carnosus*에서 발현을 시도한 것이 전부이며[9], 효소 생화학적인 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 *S. epidermidis* ATCC12228 균주로부터 urease를 분리·정제하여 생화학적인 특성을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양

*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 균주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA) 사로부터 구입하여 사용하였고, 보통 urease 정제 목적으로 적정량의  $\text{NiCl}_2$ 를 함유하는 trypticase soy broth (TSB) 또는 Luria-Bertani (LB) 배지에서 지수 증식기 후반까지 37°C 에서 진탕 배양하였다.

#### 증식단계 및 Nickel ion이 urease 활성에 미치는 영향

*S. epidermidis*의 증식 단계에 따른 urease 활성을 측정·비

\*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3611, Fax : +82-53-850-3602

E-mail : mhlee@cuth.cu.ac.kr

교하기 위하여, TSB 50 mL에 세균을 접종하고 37°C에서 배양하면서, 일정한 시간 간격으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하고, 각각 배양액 5 mL씩을 분취하여 4°C에서 6,000 xg로 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 이를 빙냉한 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.0, 이하 PEB)에 현탁시켜 1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)와 lysozyme (1mg/mL)을 가한 후, 얼음 위에서 초음파 파쇄 (70 W, 1 min/mL)한 후, 50,000 xg로 30분간 원심분리하여 상정액에 대하여 urease 효소 활성을 측정하였다.

한편 배지 내의 니켈 이온 농도가 urease 효소 활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 TSB 배지에 NiCl<sub>2</sub>의 최종 농도를 각각, 0, 10, 25, 50, 100, 200, 300 및 500 µM이 되도록 첨가한 후, 37°C에서 지수기 후반까지 18시간 동안 배양하고 위와 동일한 과정을 거쳐 urease 효소 활성을 측정하여 비교하였다.

### S. epidermidis urease의 정제

동결 보존된 *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228을 trypticase soy agar 평판배지 (TSA)에 접종하고 소량의 TSB 배지에서 중균 배양한 후, 50 µM NiCl<sub>2</sub>를 함유하는 LB 배지에 접종하여 37°C에서 지수기 후반까지 배양한 후 4°C에서 8,000 xg로 15분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 빙냉한 20 mM PEB 로 1 회 세척 후 다시 소량의 PEB로 현탁시켰다. 이 세포 현탁액에 lysostaphin (Sigma, USA)을 40 µg/mL로 가해 37°C 수욕상에서 1시간 처리하여 세포벽을 부분 분해하였다. 여기에 PMSF를 최종 농도 1 mM로 하여 가하고 French pressure cell (Aminco, USA) 을 18,000 psi의 압력으로 3회 반복 통과시킴으로써 세포를 파쇄하였다. 이를 4°C, 100,000 xg에서 90 분간 초 원심분리하고 상등액을 분리하여 조추출물을 얻었다. 이를 PEB (pH 7.0)로 미리 평형화시킨 DEAE-Sepharose 컬럼 (2.6 x 40 cm)에 적용시킨 후 완충액 중의 KCl 농도를 0 M에서 1 M로 점진적으로 증가시키며 전개시켰다. 각각의 분획에 대하여 urease 효소 역가를 측정하여, 이중 urease 활성을 나타낸 분획을 수집하여 DEAE-pool로 하고 이를 2 M KCl을 함유한 PEB (pH 7.0)로 평형화시킨 Phenyl-Sepharose 컬럼 (2.6 x 40 cm)에 적용하였다. 완충액 중의 KCl 농도를 2 M에서 0 M까지 다단계로 감소시키며 elution 시켰으며, 위와 같은 방법으로 분획에 대하여 효소 역가를 측정하고 활성 분획을 수집하였다. 이를 FPLC 상에서 PEB (pH 7.0)로 미리 평형화시킨 Mono-Q HR 5/5 column에 적용하였다. 완충액 중의 KCl 농도를 0 M에서 1 M로 다단계로 증가시키면서 전개시킨 후 활성 분획을 수집하여 FPLC상에서 0.15 M KCl을 함유한 PEB (pH 7.0)로 평형화시킨 Superdex HR200 (1.6 x 60 cm) column으로 전개시켰다. 이 중 peak 활성을 보인 분획을 50

mL-stirred ultrafiltration cell (Amicon, USA)에서 농축과 동시에 투석을 시행하였다.

### Urease 활성 측정

Urease 활성은 기질 urea로부터 암모니아가 방출되는 속도를 측정 함으로써 결정하였다. 즉, 암모니아가 phenol-hypochlorite와 반응하여 생성된 indophenol을 625 nm에서 흡광도를 측정하는 fixed-time point assay를 시행하였다[25]. Assay에 사용된 기질용액은 50 mM urea, 25 mM HEPES, 0.5 mM EDTA (pH 7.75)로 구성되어 있으며, 반응은 37°C에서 기질용액에 효소를 첨가함으로써 시작되었고, 방출되는 암모니아 농도는 직선형 상관 회귀 분석에 의해 결정되었다. Urease 활성의 1 unit는 urea를 기질로 하여 37°C, 표준 기질용액에서 매 분당 1 µmol의 urea를 가수 분해하는데 필요한 효소의 양으로서 정의하였다.

### SDS-Polyacrylamide 및 Native Gel 전기영동

각 정제단계에서의 단백질 순도는 Laemmli 법[13]에 의한 SDS- polyacrylamide gel 전기영동 (SDS-PAGE)을 시행하여 확인하였다. 각각의 시료는 3% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol를 함유하는 0.0625 M Tris 완충액 (pH 6.8)에 가하여 100°C에서 5분간 변성시킨 후 사용하였다. 이 시료를 두께 1.5 mm의 4.5% stacking gel과 15% polyacrylamide resolving gel에 적용한 후 39 mA로 4 시간 동안 전기영동하여 0.1% Coomassie brilliant blue R-250로 염색한 후 탈색하였다. 시료 중 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry법[15]에 의하거나 MicroBCA™ Protein Assay Kit (Pierce, USA)를 이용하여 측정하였다.

한편 native gel 전기영동은, 시료를 SDS와 β-mercaptoethanol를 가하지 않고 10% glycerol, 0.025% bromphenol blue 만을 함유한 63 mM Tris완충액(pH6.8)에 가하여 끓이지 않고 사용하여, 역시 SDS가 함유되지 않은 6.5% polyacrylamide gel과 전개용 완충액을 사용하여 25 mA로 6 시간 전개하여 시행하였다. 전기영동이 완료된 후, gel을 분리하여 50 mM sodium acetate-1 mM EDTA 완충액 (pH 5.0), 20 mM sodium acetate-1 mM EDTA 완충액 (pH 5.0) 및 0.02% cresol red-1 mM EDTA 용액 (pH 5.0)에 각각 순차적으로 5분씩 평형화시키고, 최종적으로 1.5% urea-0.02% cresol red-1 mM EDTA 용액에 gel을 옮겨 진홍색의 활성 band가 나타날 때까지 방치하였다. 활성 band가 나타난 직후 반응을 종결시키고, band를 불용성의 납 침전물로 보존하기 위하여 0.1 M lead acetate용액으로 처리하였다.

한편, urease를 구성하는 각 subunit를 재확인하기 위한 목적으로, 위에서 제조한 native gel 중의 활성 band를 절편으로 잘라내어 다시 15% SDS- polyacrylamide gel 전기영동을 이전과 같은 방법으로 시행 한 후, Bio-Rad 사의Silver-stain

Plus kit를 사용하여 silver staining을 실시하였다.

***K<sub>m</sub>*, 천연분자량 및 nickel 함량 측정**

[앞에서의 방법에 의거하여] 정제한 urease를 사용하여 Michaelis 상수를 다음과 같이 측정하였다. 즉, 기질인 urea의 농도의 역수(1/[S])가 등 간격이 되도록 urea를 2~20 mM의 범위로서 함유한 assay 완충액 계열을 조제하고 각각 urease assay를 시행하여 반응속도(v)를 측정하였다. Lineweaver-Burk 법에 준하여 각 1/[S]에 대한 v 값을 plot하고 직선 상관회귀법을 이용하여 기울기와 절편을 구한 다음 이를 토대로 *K<sub>m</sub>* 값을 산출하였다.

한편으로 정제한 urease 200 µL를 0.15 M KCl을 함유하는 PEB 완충액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 Superose 6 HR10/30 FPLC column에 적용하여 분당 0.2 mL의 유속으로 전개시키고, 동일한 조건하에서 thyroglobulin, gammaglobulin, ovalbumin, myoglobin 및 vitamin B12를 함유하는 gel-filtration 표준 용액 (Bio-Rad Labs)을 전개시켜 작성한 검량선을 토대로 *S. epidermidis* urease의 천연분자량을 측정하였다.

정제된 urease 100 µg에 20% 질산용액을 가하고 MaxiDry-Lyo 진공회전농축기 (Heto-Holten, Denmark)에서 초순수를 반복적으로 가하며 3회 진공농축하였다. 최종적으로 초순수를 가하여 ICP-mass spectrophotometer (VG Elemental, UK)를 사용하여 *S. epidermidis* urease의 nickel 함량을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**증식단계 및 Nickel ion이 urease 활성에 미치는 영향**

세균 유래의 urease는 보통 지수증식기 후반에서 정상증식기에 걸쳐 가장 많이 발견되는 것으로 알려져 있다[17]. *S. epidermidis*의 증식 단계에 따른 urease 활성을 측정·비교하기 위하여, TSB 배양액을 시간 별로 분취하여 urease 효소의 비활성(specific activity)을 측정, 비교하여 본 결과, 역시 지수증식기 후반에서 효소의 활성이 최고조에 달하는 것으로 나타났다.

Urease는 그 활성 부위에 전이 금속인 nickel을 함유하고 있다[18]. LB나 TSB와 같은 고영양 액체 배지에는 금속 이온을 착화합물화시키는 성분이 있으므로 nickel 의존적인 효소의 활성을 위해서는 별도로 nickel을 첨가해줄 필요가 있다. 따라서 배지 중 nickel 농도에 따른 urease 활성의 변화를 측정해 본 결과, 50 µM이상의 nickel 농도에서 비활성이 최대가 됨을 관찰하였다 (Fig. 1).

**Urease 단백질의 분리·정제 및 nickel 함량**

앞에서 기술한 방법에 따라 제조한 *S. epidermidis* 조추출물을 DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Mono-Q 및 Superdex

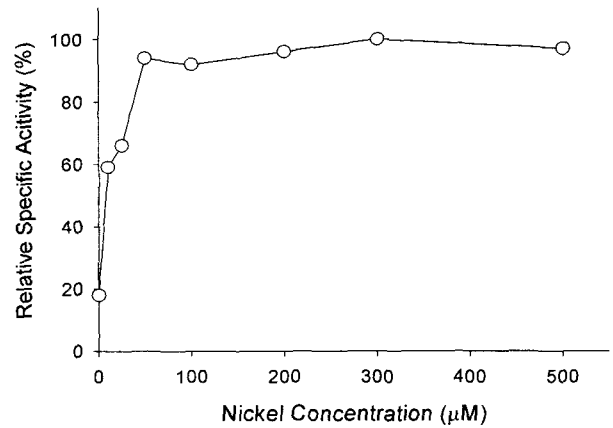


Fig. 1. Effect of nickel chloride concentration on urease activity for cells grown on trypticase soy broth. *S. epidermidis* cells were cultured for 18 h in a trypticase soy broth medium in the presence of various nickel chloride concentrations. The cells were harvested by centrifugation, disrupted by sonication, and assayed for specific activity.

column에 순차적으로 적용하여 urease를 정제하였다. DEAE-Sepharose 수지에 흡착된 *S. epidermidis* urease는 0.57 M의 KCl 농도에서 용출되었으며, 보다 강한 음이온 교환 수지인 Mono-Q column의 경우에는 0.45 M의 KCl 농도에서 용출되었다. 2M KCl 농도에서 Phenyl-Sepharose column에 흡착되었던 urease는 0 M KCl step gradient에서 용출되었으나, 정제 효과는 그리 크지 않은 것으로 나타났다 (Table 1 및 Fig. 2, lane 4). 각 단계 별 정제 결과는 Table 1에 요약된 바와 같고, 최종 정제된 *S. epidermidis* urease의 비활성은 993.8 U/mg으로서 조추출물에 비하여 1,127배 정제된 것으로 나타났다. 정제 단계 별 urease 시료에 대하여 15% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동을 시행한 결과, 최종 단계인 Superdex HR-200 크로마토그래피에서 얻은 urease 시료는 urease subunit로 추정되는 67, 16.1 및 12.7 Kd 크기의 펩타이드 외에도 44.5 및 24 Kd 크기의 펩타이드 밴드가 관찰되었다 (Fig. 3, lane 4). 기 발표된 DNA 염기서열을 근거로 예상된 *S. epidermidis* urease의 3개 subunit 분자량은 각각 62,085 (UreC), 14,916 (UreB) 및 11,792 (UreA) dalton이므로 위의 44.5 및 24 Kd 펩타이드는 정제 과정 중의 불순물로 추정된다. 한편, ICP-mass spectrophotometer로 측정한 결과,

Table 1. Purification of the *S. epidermidis* ATCC12228 urease.

Purification steps	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)
Crude extract	0.9	1.0
DEAE-Sepharose	4.5	5.0
Phenyl-Sepharose	6.1	6.9
Mono-Q HR 5/5	33.0	37.4
Superdex HR 200	993.8	1,126.7

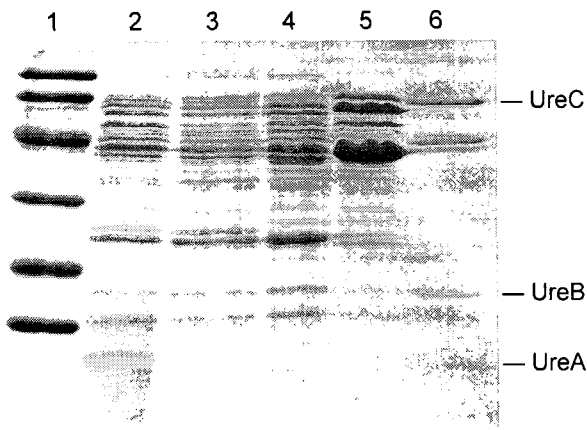


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the *Staphylococcus epidermidis* urease at each purification step. Cell extracts from *S. epidermidis* (lane 2) and aliquots from DEAE-Sepharose pool (lane 3), phenyl-Sepharose pool (lane 4), Mono-Q HR5/5 pool (lane 5), and Superdex HR200 pool (lane 6) were subjected to the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using a 15% resolving gel, followed by Coomassie blue staining. The molecular weight markers (lane 1) were phosphorylase b, Mr = 97,400; bovine serum albumin, Mr = 66,200; ovalbumin, Mr = 45,000; carbonic anhydrase, Mr = 31,000; soybean trypsin inhibitor, Mr = 21,500; and lysozyme Mr = 14,400.

정제된 *S. epidermidis* urease는 catalytic unit당 2.2개의 nickel 이온을 함유하고 있는 것으로 나타났으며 이는 기타 세균 유래의 효소의 특성과 일치하는 것이다.

**Native gel 전기 영동, 활성 염색 및 효소 Subunit의 확인**

정제된 urease 시료에 대하여 앞에서 기술한 방법에 따라 native gel 전기영동을 실시하고 기질인 urea 및 cresol red를 사용하여 활성 염색을 실시한 결과, urease 활성에 기인한 2 개의 진홍색 펩타이드 밴드가 나타났다 (Fig. 3, A). 이 활성 밴드를 잘라내어 다시 15% SDS-polyacrylamide gel에 적용하여 전기영동을 실시하고 silver 염색한 결과, 전향에서 관찰된 67, 16.1 및 12.7 Kd 크기의 펩타이드 밴드로 구별되어 이들이 각각 진정 urease subunit를 구성하는 UreC, UreB 및 UreA 펩타이드임을 확인할 수 있었다 (Fig. 3, B).

**천연분자량 및 Km의 측정**

정제된 urease 시료를 표준분자량 물질과 함께 동일한 조건 하에 Superose 6 HR 10/30 gel filtration column에 적용하여 상대 이동성 (K<sub>av</sub>)을 측정하고, 이로부터 천연분자량을 산출한 결과, *S. epidermidis* urease의 천연분자량은 약 255 Kd인 것으로 나타났다. 이 결과는 *S. epidermidis* urease의 (UreA-UreB-UreC) catalytic unit의 예상분자량 88,793을 기준으로 판정할 때 약 3개의 catalytic unit로 구성된 3량체로 존재하는 것을 암시하며, 기존의 타 세균 유래의 urease 효소

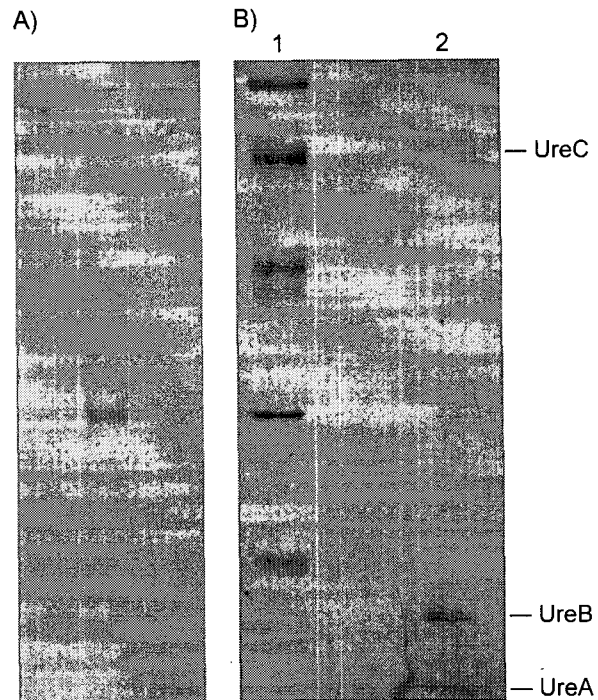


Fig. 3. Native polyacrylamide gel electrophoresis and activity staining of *S. epidermidis* urease. Purified urease (10 µg) was subjected to 6.5% native polyacrylamide gel electrophoresis, followed by activity staining using urea and cresol red solution (A). The protein band showing the urease activity was cut from the native gel and loaded onto a 15% SDS-polyacrylamide gel. The molecular weight markers (lane 1) were the same as in Fig. 2. After electrophoresis, the gel was stained with silver-staining reagents, revealing the three urease subunits (B).

의 X-선 결정구조 분석의 결과들과도 일치하는 것이다[3,11]. 한편, Lineweaver-Burk 법에 따라 산출한 *S. epidermidis* urease의 Michaelis 상수 값은 37°C, pH 7.0에서 8.5±0.7 mM로 나타났고 (Fig. 4), 이는 같은 coagulase-음성 포도상구균이며 요로감염증 원인 병원균인 *Staphylococcus saprophyticus* urease의 K<sub>m</sub> 값 9.5 mM과 비교되는 수치이다[21]. 그러나, 이 세균이 보통으로 처하게 될 생리적인 환경에서의 이러한 K<sub>m</sub> 값이 가지는 의미는 분명치 않다.

**요 약**

본 연구에서는 피부상재균이며 기회병원균이기도 한 *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228로부터 urease 효소를 4 단계 크로마토그래피 방법을 사용하여 1,127배 정제하고 그 생화학적인 특성을 규명하였다. 정제된 urease 효소는 SDS-PAGE 전기영동분석 및 gel-filtration 크로마토그래피를 이용한 천연분자량 분석결과, 67, 16.1 및 12.7 kDa의 3개 subunit가 3량체로 회합되어 존재하는 것으로 나타났으며

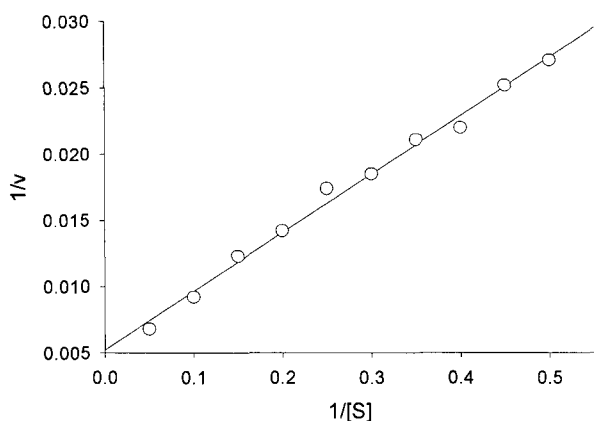


Fig. 4. Lineweaver-Burk double reciprocal plot of the purified *S. epidermidis* urease. The rate of urea hydrolysis was monitored with different urea concentrations, ranging from 2 to 20 mM.

catalytic unit 당 2.2 개의 니켈 원소를 함유하는 것으로 측정되었다. 정제된 효소의 비활성은 993.8 U/ mg,  $K_m$  값은 8.5 mM로 각각 산출되었다.

### 참 고 문 헌

1. Archer, G. L., G. J. Vazquez and J. L. Johnston. 1980. Antibiotic prophylaxis of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **142**, 725-731.
2. Baddour, L. M., T. N. Phillips and A. L. Bisno. 1986. Coagulase-negative staphylococcal endocarditis. Occurrence in patients with mitral valve prolapse. *Arch. Intern. Med.* **146**, 119-121.
3. Benini, S., W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletti, S. Ciurli and S. Mangani. 1999. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*. **7**, 205-216.
4. Dunne, W. M., Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155-166.
5. Gatermann, S., J. John and R. Marre. 1989. *Staphylococcus saprophyticus* urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. *Infect. Immun.* **57**, 110-116.
6. Gatermann, S. and R. Marre. 1989. Cloning and expression of *Staphylococcus saprophyticus* urease gene sequences in *Staphylococcus carnosus* and contribution of the enzyme to virulence. *Infect. Immun.* **57**, 2998-3002.
7. Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson and C. M. Fraser. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426-2438.
8. Goldmann, D. A. and G. B. Pier. 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 176-192.
9. Gruter, L., M. Endres and S. Gatermann. 1992. Cloning and expression of *Staphylococcus epidermidis* urease gene sequences in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 33-35.
10. Huebner, J. and D. A. Goldmann. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* **50**, 223-236.
11. Jabri, E., M. B. Carr, R. P. Hausinger and P. A. Karplus. 1995. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* **268**, 998-1004.
12. Kloos, W. E. and T. L. Bannerman. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 117-140.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
14. Leighton, P. M. and J. A. Little. 1986. Identification of coagulase-negative Staphylococci isolated from urinary tract infections. *Am. J. Clin. Pathol.* **85**, 92-95.
15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
16. Martin, M. A., M. A. Pfaller and R. P. Wenzel. 1989. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. Mortality and hospital stay. *Ann. Intern. Med.* **110**, 9-16.
17. Mobley, H. L. and R. P. Hausinger. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* **53**, 85-108.
18. Mobley, H. L., M. D. Island and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59**, 451-480.
19. O'Gara, J. P. and H. Humphreys. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* **50**, 582-587.
20. Rubin, J., W. A. Rogers, H. M. Taylor, E. D. Everett, B. F. Prowant, L. V. Fruto and K. D. Nolph. 1980. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann. Intern. Med.* **92**, 7-13.
21. Schafer, U. K. and H. Kaltwasser. 1994. Urease from *Staphylococcus saprophyticus*: purification, characterization and comparison to *Staphylococcus xylosum* urease. *Arch. Microbiol.* **161**, 393-399.
22. Schierholz, J. M. and J. Beuth. 2001. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J. Hosp. Infect.* **49**, 87-93.
23. Tacconelli, E., M. Tumbarello, M. Pittiruti, F. Leone, M. B. Lucia, R. Cauda and L. Ortona. 1997. Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 203-209.
24. Vuong, C. and M. Otto. 2002. *Staphylococcus epidermidis*

- infections. *Microbes. Infect.* **4**, 481-489.
25. Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**, 971-974.
26. Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin and Y. M. Wen. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577-1593.