

# 甲基对硫磷水解酶基因的高效表达及酶活性分析

刘璐璐 周亚凤 张治平 刘虹 张先恩\*

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

**摘要:** 假单胞菌 WBC-3 的甲基对硫磷水解酶基因 *mph* 在大肠杆菌系统 AD494 (DE3) / pET32a (+) 中实现了高效可溶性融合表达。表达的重组酶能够有效地被亲和层析纯化。酶学性质分析表明, 重组酶对底物乙基对硫磷水解能力较野生酶相比有近 4 倍的提高, 对甲基对硫磷和杀螟松的水解活力无明显变化。以融合蛋白形式存在的重组酶在室温及 4℃ 下的贮存稳定性明显优于野生型酶。

**关键词:** 有机磷水解酶, 硫氧还蛋白, 融合表达

中图分类号: Q814.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 06-0077-06

## Heterogenous Gene Expression of Methyl Parathion Hydrolase and Analysis of the Enzyme Activity

LIU Lu-Lu ZHOU Ya-Feng ZHANG Zhi-Ping LIU Hong ZHANG Xian-En\*

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

**Abstract:** Methyl parathion hydrolase (MPH, E.C.3.1.8.1) coding gene *mph* from *Pseudomonas* sp. WBC-3, isolated and identified by our lab, was successfully expressed in *E. coli* AD494 (DE3) / pET32a (+) system as soluble fusion form at high level. The recombinant MPH showed nearly 4 ~ 5 fold higher specific activity to parathion than the enzyme from *Pseudomonas* sp. WBC-3. In addition, the thermal stability of the recombinant enzyme was improved comparing with the wild type enzyme.

**Key words:** Organophosphorus degrading enzyme, Thioredoxin, Fusion expression

微生物能够降解有机磷农药<sup>[1~3]</sup>。2001 年我们筛选出一株甲基对硫磷降解菌, 命名假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) WBC-3, 它可以彻底降解甲基对硫磷, 并以甲基对硫磷为唯一碳源和氮源生长<sup>[4]</sup>, 所分离得到的甲基对硫磷水解酶 (Methyl parathion hydrolase, MPH, E.C.3.1.8.1) 还可以降解乙基对硫磷, 杀螟松和毒死蜱。该酶对甲基对硫磷水解酶的比活性是对乙基对硫磷水解酶比活性的 15 倍<sup>[5]</sup>。对应 MPH 的基因区段已经从假单胞菌中定位, 并克隆到大肠杆菌 pUC-18 / DH5 $\alpha$ 。 *Pseudomonas* sp. WBC-3 是天然进化的产物, 产酶量有限。本实验选择 AD494 (DE3) / pET32a (+) 大肠杆菌载体系统, 成功地实现了 MPH 在异源宿主中的大量表达, 获得重组 MPH, 通过对重组酶的酶学性质分析意外地发现, 重组酶对底物 - 乙基对硫磷的催化动力学常数发生了较大变化。本文报道有关实验结果。

\* 联系人 Tel: 027-87197105, Fax: 027-87199492, E-mail: zhangxe@mail.most.gov.cn

收稿日期: 2004-02-29, 修回日期: 2004-04-22

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株, 质粒及主要试剂

*Pseudomonas* sp. WBC-3 由本实验室分离<sup>[4]</sup>, 大肠杆菌表达系统 AD494 (DE3) / pET32a (+) 由胡勤学老师提供。重组系统 AD494 (DE3) / pET32a (+) -*mph*, BL21 (DE3) / pET32a (+) -*mph*, AD494 (DE3) / pET5a-*mph*, 和 DH5 $\alpha$ /pUC18-*mph* 均由本室构建。限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司。甲基对硫磷 (纯度为 99%) 购自湖北沙隆达农药厂。乙基对硫磷 (纯度为 99%) 和杀螟松 (纯度为 99%) 购自沈阳化工研究所。蛋白浓度测定试剂盒系 PIERCE 公司产品。阳离子交换层析柱材料 CM-sepharose Fast Flow 为 Sigma 产品。金属螯合层析柱材料 Ni<sup>2+</sup>-NTA 为 Novagen 产品。TALON™ Superflow Resin 为 CLONTECH 产品。实验中所用其它化学试剂均为分析纯。PCR 引物由上海生工公司合成, DNA 测序由上海博亚生物工程公司完成。

### 1.2 *mph* 基因的 PCR 扩增及克隆

以质粒 pUC18-*mph* 为模板, 根据测序结果设计引物, 扩增两端带 *Eco*RV 和 *Xho*I 位点的 *mph* 基因编码序列, 合成的引物为 5' -GGAAGATATCATGCCCCCTGAAGAA-3' 和 5' -CACTCTCGAGTCACTTGGGGTTGAC-3'。在 50 $\mu$ L 的 PCR 反应体系中含 1  $\times$  Pyrobest DNA 聚合酶缓冲液, 0.0002 mol/L 的 dNTP, 0.0015 mol/L 的 Mg<sup>2+</sup>, 0.5  $\mu$ L 的 Pyrobest 酶 (5 U/ $\mu$ L)。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 53 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 10 min。反应结束后在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳检测结果。

### 1.3 表达载体的构建

经电泳验证 PCR 产物片段大小后, 用试剂盒 (Omega) 纯化。纯化产物用 *Eco*RV 和 *Xho*I 双酶切, 然后将 *mph* 酶切片段以正确读码框插入同样双酶切的 pET32a (+) 载体中, 经 CaCl<sub>2</sub> 转化法转化到敏感态大肠杆菌受体菌 AD494 (DE3) 中, 在含有氨苄和卡那霉素抗生素的 LB 固体平板上进行培养。随机挑选单菌落进行液体培养, 通过菌液与底物农药的反应产生黄色对硝基酚来筛选阳性克隆子。然后提取阳性克隆子 DNA, 经 PCR 和酶切验证, 将含正确质粒的菌株保存在 12 % 甘油中 (-80 $^{\circ}$ C)。BL21 (DE3) / pET32a (+) -*mph*, AD494 (DE3) / pET5a-*mph* 的构建过程与以上所述基本相同。

### 1.4 重组 MPH 的诱导表达

从氨苄和卡那霉素双抗性标记平板上挑取克隆子菌落, 转接到 5 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 以 2% 的接种量再转接到新鲜的液体培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 震荡培养至生长对数期 ( $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ ), 加入诱导物异丙基硫代- $\beta$ -半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 离心收集菌体。裂解细胞后, 以 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。

### 1.5 重组 MPH 的提取与纯化

将诱导表达后的液体培养物以 4,000 r/min 离心, 菌泥沉淀以 0.05 mol/L, pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液重悬, 加入适量溶菌酶, 孵育 30 min 后, 用超声波细胞破碎仪破碎, 超声 5 s 停 9 s, 共 1 h。细胞破碎液经 10,000 r/min 离心, 上清部分即为细胞质的可溶性蛋白的混合物, 沉淀为细胞碎片。将上清部分采用亲和层析方法进行纯化, 方法详见 pET system manual 第七版<sup>[2]</sup>。纯度以 SDS-PAGE 分析。

## 1.6 野生 MPH 的提取与纯化

离心收集培养了 48 h 的菌液, 以超声波破碎法获得粗酶液, 然后采用阳离子交换树脂 CM-sepharose Fast Flow 进行纯化<sup>[5]</sup>。

## 1.7 MPH 的活性分析

分别在分光光度计 (PE Lambda 25)、酶标仪 (Titertek Uniskan I, 405 nm) 和酶标仪 (Bio-Tek, 385 nm) 进行酶促反应动力学测定。基本反应体系含酶液若干, 0.00025 mol/L 底物 (甲基对硫磷或乙基对硫磷或杀螟松, 溶于甲醇), Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol / L, pH9.0), 室温 (25℃) 下反应。在分光光度计上测定时, 反应溶液体积为 2 mL; 在 96 孔酶标板上测定时, 反应溶液体积为 200  $\mu$ L。对硝基苯酚和 3-甲基对硝基酚分别在 405 和 385 nm 有特征吸收峰, 消光系数为 17,700  $M^{-1}cm^{-1}$  和 18,700  $M^{-1}cm^{-1}$ 。酶活单位定义为: 在室温下, 每分钟产生 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚或 3-甲基对硝基酚所需要的酶量。

## 1.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳

蛋白质电泳参照文献[6]。

## 1.9 肠激酶切割实验

将经亲和层析纯化的重组 MPH 用肠激酶 (Roche) 按标准操作切割, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳验证切割效果, 并对切割后的酶进行酶学性质分析。

# 2 结果

## 2.1 *mph* 基因在大肠杆菌中的表达

首先对 *mph* 基因在大肠杆菌中的表达条件进行了优化。当控制诱导前后培养温度为 30℃, 诱导前后各培养 4 h, IPTG 控制在 0.001 mol/L 的终浓度下, *mph* 基因在重组系统 AD494 (DE3) /pET32a-*mph* 中获得了可溶性的高效表达, 得到重组 MPH。单位体积重组菌液对甲基对硫磷的水解活力为  $17.0 \pm 2.0$  U/mL, 与野生菌液的水解活力 ( $1.9 \pm 0.85$  U/mL) 相比, 有 8~10 倍的提高。采用亲和层析方法对重组酶进行了纯化。蛋白诱导表达前后见图 1, 重组 MPH、野生 MPH 纯化前后的电泳图见图 2。

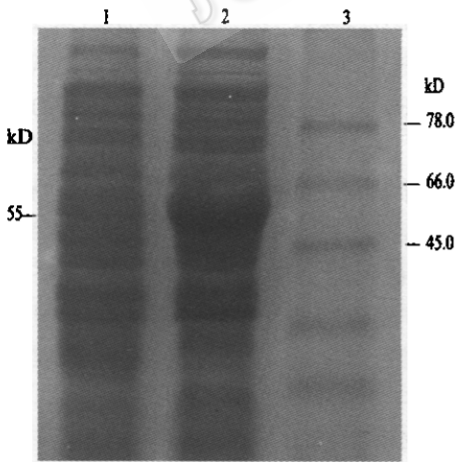


图 1 SDS-PAGE 分析重组酶的表达

1 The cell lysate of the pET32a (+) - *mph* clone without induction by IPTG, 2 The cell lysate of the pET32a (+) - *mph* induced by IPTG, 3 Protein molecular marker

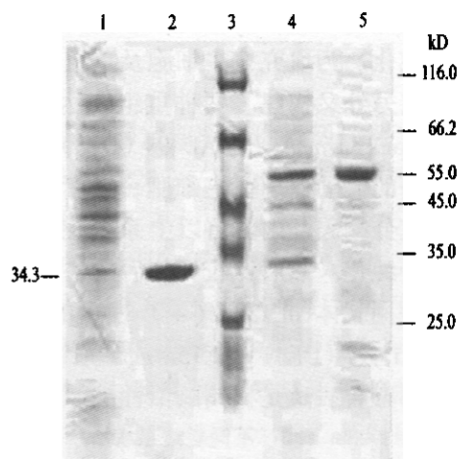


图 2 纯化后野生 MPH 与重组 MPH 的 SDS-PAGE 分析

1 The crude extract of wild MPH, 2 Purified wild MPH, 3 Protein Marker, 4 The crude extract of recombinant MPH, 5 Purified recombinant MPH

2.2 重组 MPH 的活性分析

将纯化后的重组酶对甲基对硫磷、乙基对硫磷和杀螟松 3 种有机磷底物的催化活性进行了测定,并系统比较了重组酶和野生酶对 3 种底物的催化特性(表 1)。重组酶由于 N 末端融合了硫氧还蛋白和 His<sub>6</sub> 亲和肽等组分,分子量与野生酶 34 kD 相比有所增加,达 55 kD。基于重组酶和野生酶分子量差异较大,在本文对两者进行活性比较分析时将采用 U / $\mu$ mol 为酶的比活力单位。重组酶对乙基对硫磷的水解活性要明显高于野生酶,前者是后者的 4~5 倍。重组酶和野生酶对乙基对硫磷的动力学参数测定结果表明,重组酶对乙基对硫磷水解能力的提高是对底物亲和能力及水解效率共同提高的结果(表 2)。

表 1 野生 MPH 和重组 MPH 对 3 种农药底物活力比较

底物	MPH 比活力 (U / $\mu$ mol)	
	野生酶	重组酶
Methyl parathion	13782.2 $\pm$ 373.3	16198.7 $\pm$ 442.8
Parathion	979.6 $\pm$ 102.8	4291.6 $\pm$ 360.8
Fenitrothion	5305.3 $\pm$ 236.3	8780.0 $\pm$ 295.2

表 2 野生 MPH 和重组 MPH 对乙基对硫磷的动力学参数

MPH	<i>K<sub>m</sub></i> (MM)	<i>K<sub>cat</sub></i> (min <sup>-1</sup> )	<i>K<sub>cat</sub></i> / <i>K<sub>m</sub></i> (min <sup>-1</sup> mmol/L <sup>-1</sup> )
野生酶	0.0349 $\pm$ 0.0025	670 $\pm$ 58	19208.7
重组酶	0.0197 $\pm$ 0.0028	2476 $\pm$ 324	125664.9

2.3 酶活性改变的原因分析

为探讨重组 MPH 对乙基对硫磷水解活性提高的原因,我们设计了 3 个实验。首先是对表达载体上的 *mph* 基因进行测序,结果未发现任何核酸序列的改变。也即酶蛋白的一级结构没有发生任何变化。第 2 个实验是研究融合表达对酶活性的影响。AD494 (DE3) / pET32a (+) 表达系统所表达的重组 MPH,其 N 端融合了硫氧还蛋白和 His<sub>6</sub> 亲和肽等组分。其中与硫氧还蛋白的融合,可防止表达产物形成包涵体,增加融合蛋白的可溶部分;与 His<sub>6</sub> 亲和肽融合的作用是,便于利用它通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂对重组蛋白进行纯化。为研究宿主细胞及重组 MPH 的 N 末端融合部分是否影响重组酶底物特异性,我们另外又构建了两种重组表达系统:BL21 (DE3) / pET32a (+) -*mph* 和 AD494 (DE3) / pET5a-*mph*。与 AD494 (DE3) / pET32a (+) -*mph* 相比,前者为相同的表达载体和不同的大肠杆菌宿主细胞,后者为相同的大肠杆菌宿主细胞,但表达载体上无其它融合成分编码基因。将以上系统在同样的条件下表达,并分别采用亲和层析和离子交换进行纯化。然后比较纯化后的各重组酶对乙基对硫磷的催化活性,结果见表 3。其中,凡是用载体 pET32a (+) 表达的 MPH 对乙基对硫磷的催化活性都明显高于野生酶,而 AD494 (DE3) / pET5a-*mph* 系统表达的 MPH 对乙基对硫磷的催化活性低于野生酶,说明融合表达是提高酶活性的原因。

表 3 不同表达系统所产生的 MPH 对乙基对硫磷的催化活性比较

表达系统	酶的比活力 (U / $\mu$ mol)
Wild type	979.6 $\pm$ 102.8
AD494 (DE3) / pET5a- <i>mph</i>	134.9 $\pm$ 14.8
BL21 (DE3) / pET32a (+) - <i>mph</i>	2976.4 $\pm$ 52.29
AD494 (DE3) / pET32a (+) - <i>mph</i>	4291.6 $\pm$ 360.8

第 3 个实验为肠激酶切割实验。如前所述, AD494 (DE3) / pET32a (+) 表达系统表达的重组 MPH 的 N 端融合了硫氧还蛋白和 His<sub>6</sub> 亲和肽等组分, 其基因连锁见图 3。在外源基因嵌合部位含有肠激酶切割位点。经肠激酶切割, 可去除 N 末端融合组分, 获得与野生酶分子量基本一致的酶蛋白。

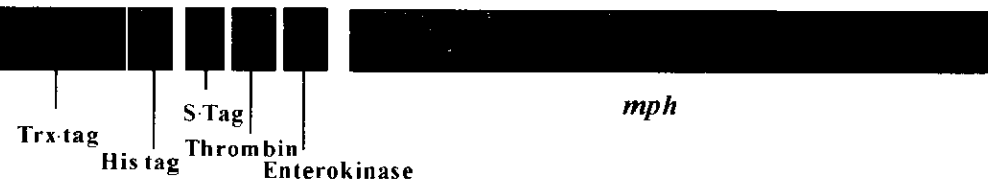


图 3 肠激酶在融合表达载体中的位置

我们选择在室温条件下进行肠激酶切割实验, 并置未加肠激酶的重组酶于室温作为对照组。加入肠激酶后, 定时取样进行电泳分析, 经过 48 h 肠激酶作用, 重组酶可被彻底切开。分别测定酶切混合物和对照组的甲基对硫磷和乙基对硫磷的活性, 结果见表 4。切割前重组酶的分子量约为 55 kD, 切割后的分子量约为 34 kD。两组酶液对甲基对硫磷和乙基对硫磷的水解活性较切割前都有所降低, 但对两底物的水解活性比例与切割前基本相同。说明重组酶对乙基对硫磷的高水解活性并没有因为去掉融合部分的蛋白而消失。

表 4 重组酶经肠激酶切割前后的酶活力

底物	MPH 比活力 (U / $\mu$ mol)		
	消化前	消化后	对照*
Methyl parathion	16296.5 $\pm$ 308.0	6949.6 $\pm$ 142.8	11742.5 $\pm$ 456.5
Parathion	4317.5 $\pm$ 478.5	2002.6 $\pm$ 132.6	3118.5 $\pm$ 181.5
Methyl parathion: Parathion	3.8:1	3.5:1	3.8:1

\* 对照为在室温下放置 48h 的未加肠激酶的重组酶

2.4 酶贮存稳定性分析

将重组酶和野生酶分别放在 4℃ 冰箱内及室温保存, 定期取出进行活性测定。在低蛋白浓度条件下 (重组酶: 0.265  $\mu$ g/ $\mu$ L; 野生型酶: 0.228  $\mu$ g/ $\mu$ L), 与新鲜纯化后的酶相比, 重组酶在 4℃ 下存放 20 d 后, 其甲基对硫磷和乙基对硫磷水解活力分别保留 86.3% 和 77.5%。野生型酶对两种底物的水解活力仅分别剩下 4.2% 和 7.7%。65 d 时重组酶的甲基对硫磷和乙基对硫磷水解活力分别还有 22.8% 和 15.0%, 而野生型 MPH 酶活已经完全丧失。室温存放 24 h 后, 重组酶对甲基对硫磷的残余催化活力为 74.9%, 对乙基对硫磷的剩余活力为 77.9%。而野生酶对甲基对硫磷和乙基对硫磷的剩余活力仅为 0.9% 和 4.9%。72 h 后, 重组酶保留 4.9% 的甲基对硫磷及 8% 的乙基对硫磷催化活力, 野生型酶已经完全失活。

3 讨论

表达载体系统中 pET32a (+) 载体上融合有硫氧还蛋白基因, 菌株 AD494 (DE3) 为硫氧还蛋白还原酶缺陷型。该系统的这两个特点促进外源蛋白以可溶的形式表达。

研究表明,在大肠杆菌系统中,*mph* 基因不仅获得了高效表达,而且重组酶的乙基对硫磷水解效率较野生酶有很大提高。

为研究宿主细胞及重组 MPH 的 N 末端融合部分是否为重组酶底物特异性改变的主要原因,我们又构建了两种重组表达系统:BL21 (DE3) /pET32a (+) -*mph*, AD494 (DE3) /pET5a-*mph*, 比较纯化后的各重组酶对乙基对硫磷的催化活性。结果发现,重组酶的底物特异性的改变不依赖于菌株。而凡是使用 pET32a (+) 载体表达的融合蛋白对乙基对硫磷的活力相对于野生酶都有不同程度的提高。因此,很可能是载体 pET32a (+) 中 N 末端融合的组分造成了重组 MPH 对乙基对硫磷活性提高。如图 3 所示,AD494 (DE3) /pET32a (+) -*mph* 系统表达的融合酶端含有数种成分:肠激酶位点, S-tag, 凝血酶 (Thrombin), His-tag 和硫氧还蛋白 (Trx-tag)。硫氧还蛋白最有可能对目的蛋白结构及功能产生影响。据文献报道硫氧还蛋白在融合表达系统中可以发挥类似分子伴侣的作用,协助正处于折叠中间态的目的蛋白正确折叠<sup>[7]</sup>。在发挥了协助的作用之后,硫氧还蛋白离开目的蛋白,并使蛋白质功能空间结构得以保留。实验中使用肠激酶切除重组酶 N 端融合成分后,酶切混合物仍然保持了高的乙基对硫磷水解能力,这表明融合组分并没有直接参与 MPH 构成重组酶发挥高水解活力的一部分,而很可能在蛋白折叠成熟过程中发挥了分子伴侣的作用。在本研究中,重组 MPH 酶活性变化,是否具体为硫氧还蛋白的作用,尚待实验证实。

融合表达对 MPH 的活性和底物催化能力以及稳定性有显著影响,这有利于该酶的进一步研究和应用。例如,我们正在尝试用重组 MPH 作为生物传感器的分子识别元件,用来快速测定有机磷农药,有关实验结果正在整理中。

## 参考文献

- [1] Munneke D M, Hsieh D P. Appl Environ Microbiol, 1976, **31** (1): 63 ~ 69.
- [2] Cook A M, Daughton C G, Alexander M. Appl Environ Microbiol, 1978, **36** (5): 668 ~ 672.
- [3] Munneke D M. Biotechnol Bioeng, 1979, **21** (12): 2247 ~ 2261.
- [4] 陈雅丽, 张先恩, 刘虹, 等. 微生物学报, 2002, **42** (4): 490 ~ 497.
- [5] 楚晓娜, 张先恩, 陈雅丽, 等. 微生物学报 2003, **43** (4): 453 ~ 459.
- [6] Schagger H, von Jagow G. Anal Biochem, 1987, **166** (2): 368 ~ 379.
- [7] LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, et al. Biotechnology (N Y), 1993, **11** (2): 187 ~ 193.