



研究报告

有机磷降解酶在重组大肠杆菌中的表达及一步纯化固定化

周丽亚 欧阳亚萍 薛赛光 姜艳军*

河北工业大学化工学院 天津 300130

摘要:【背景】有机磷化合物作为一类广谱杀虫剂,因其用量大、毒性强且不易降解,在自然界中的残留已对环境造成了严重污染。【目的】有机磷降解酶(organophosphohydrolase, OpdA)可降解多种有机磷化合物,探究其被固定到 NiCo_2O_4 载体上后用于有机磷化合物的降解效果。【方法】构建含组氨酸标签(histidine tag, His-tag)的 OpdA,以 pET-28a(+)为载体, *Escherichia coli* Rosetta(DE3) 为宿主细胞,在终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导下表达 His-tagged OpdA。采用一步纯化固定化方法,实现固定化酶(OpdA@ NiCo_2O_4)的制备。【结果】采用水热处理和煅烧制备了含过渡金属离子的 NiCo_2O_4 ,利用过渡金属离子对酶分子表面组氨酸咪唑基的配位作用,实现了发酵粗酶液中 His-tagged OpdA 的一步纯化固定化,在优化条件下获得了高稳定性的 OpdA@ NiCo_2O_4 ;然后将其用于有机磷化合物的降解,在 NaBH_4 存在条件下,通过级联反应和降解条件优化,实现了有机磷化合物的高效降解。【结论】该研究不但实现了重组酶的一步分离纯化和固定化,也为有机磷化合物的降解提供了一条安全、高效、环保的新途径。

关键词: 有机磷降解酶, 重组表达, 组氨酸标签, 一步纯化固定化, 有机磷化合物

Expression of organophosphohydrolase in recombinant *Escherichia coli* and its purification and immobilization by one-step method

ZHOU Li-Ya OUYANG Ya-Ping XUE Sai-Guang JIANG Yan-Jun*

School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

Abstract: [Background] As a kind of broad-spectrum insecticides, organophosphorus compounds have caused serious environmental pollution due to their high dosage, strong toxicity and non-degradability. [Objective] To degrade the organophosphorus compounds, organophosphohydrolase (OpdA) was immobilized on NiCo_2O_4 and the properties of the catalyst in degrading organophosphorus compounds were investigated. [Methods] Specifically, histidine tag (His-tag) was introduced into OpdA to construct His-tagged OpdA, and the His-tagged OpdA was efficiently expressed in *Escherichia coli* Rosetta(DE3)

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21878068); Natural Science Foundation of Hebei Province (B2017202056); Program for Top 100 Innovative Talents in Colleges and Universities of Hebei Province (SLRC2017029); Hebei High Level Personnel of Support Program (A2016002027)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60204945; E-mail: yanjunjiang@hebut.edu.cn

Received: 06-03-2020; Accepted: 19-05-2020; Published online: 03-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21878068); 河北省自然科学基金(B2017202056); 河北省高校百名优秀创新人才项目(SLRC2017029); 河北省高层次人才保障计划(A2016002027)

*通信作者: Tel: 022-60204945; E-mail: yanjunjiang@hebut.edu.cn

收稿日期: 2020-03-06; 接受日期: 2020-05-19; 网络首发日期: 2020-06-03

using pET-28a(+) as vector under the induction of 1.0 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. The immobilized OpdA (OpdA@NiCo₂O₄) was prepared by one-step purification and immobilization method. **[Results]** NiCo₂O₄ was prepared by hydrothermal treatment and calcination. Based on the coordination between the transition metal ions on the surface of NiCo₂O₄ and the imidazole group of histidine on the surface of enzyme, one-step purification and immobilization of His-tagged OpdA were achieved. OpdA@NiCo₂O₄ with high stability was obtained under optimized conditions, and then it was applied for organophosphorus compounds degradation. The high degradation efficiency of organophosphorus compounds was realized by cascade reaction in the presence of NaBH₄ under the optimal degradation conditions. **[Conclusion]** In conclusion, one-step purification and immobilization of recombinant enzyme were achieved, and it's also proved that this study provides a safe, efficient and environmental new way for the degradation of organophosphorus compounds.

Keywords: Organophosphohydrolase, Recombinant expression, His-tag, One-step purification and immobilization, Organophosphorus compound

有机磷化合物作为一类广谱杀虫剂, 被广泛应用于农林业中, 因其用量大、毒性强且不易降解^[1-4], 在自然界中的残留已对土壤、沉积物和地下水造成了严重污染^[5-7], 因此, 为保护环境和人类健康, 必须对其进行降解。生物酶降解法因存在催化效率高、反应条件温和、无污染等优势, 已成为潜在的主要方法。有机磷降解酶(organophosphohydrolase, OpdA)因可降解多种有机磷化合物而备受关注^[5,8-9], 但游离酶在实际应用过程中存在诸多缺点, 如难分离、难回收、稳定性差, 而且从发酵液中分离纯化的过程复杂, 易变性失活。近年来, 固定化金属离子亲和色谱(immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)已成为含组氨酸标签(histidine tag, His-tag)酶的分选纯化和固定化研究中最常用的技术之一^[10-14]。该技术利用IMAC-based纳米材料中的过渡金属离子(Ni²⁺、Co²⁺、Cu²⁺等)与目标蛋白中组氨酸残基之间的亲和作用, 实现 His-tag 蛋白的一步分离纯化和固定化^[2,5,14]。但基于 IMAC 的纳米材料制备过程复杂、耗时^[15-17], 而且制备 IMAC 基的螯合剂会影响金属酶(如 OpdA)的活性^[18]。因此, 需寻找一种材料, 其制备过程既能规避金属螯合剂的使用, 而本身又含有过渡金属离子。金属氧化物如尖晶石型双金属氧化镍钴酸盐(NiCo₂O₄)含镍离子和钴离子, 其制备过程不使用金属螯合剂, 而且还具有氧化还原特性, 是目前

研究最多的生物纳米材料之一。如 Swathi 等^[19]制备了 NiCo₂O₄, 并以其为催化剂, 在 NaBH₄ 存在条件下催化 4-硝基苯酚还原为 4-氨基苯酚。4-氨基苯酚是一种重要的有机合成中间体, 广泛用于医药、照相、橡胶等领域^[20-21]。因此, 如果该 NiCo₂O₄ 既能利用自身的 Ni²⁺ 和 Co²⁺ 对酶分子表面组氨酸咪唑基的配位作用实现 His-tagged OpdA 的一步纯化固定化, 又能将有机磷化合物的降解产物 4-硝基苯酚降解为 4-氨基苯酚, 不仅能解决环境污染问题, 降解产物还具有重要的工业应用价值。

本研究以 pET-28a(+) 为表达载体, 构建含 His-tagged OpdA 的重组质粒, 并将其转化到 *Escherichia coli* Rosetta(DE3) 中进行诱导表达。为了实现 His-tagged OpdA 的一步纯化和固定化, 采用水热处理和煅烧制备 NiCo₂O₄ 微球, 利用 His-tag 对过渡金属离子的特异亲和力实现固定化酶(OpdA@NiCo₂O₄)的制备, 并将其用于有机磷化合物的级联降解。本研究以期实现重组蛋白的一步分离纯化和固定化, 并为有机磷化合物的降解提供一条安全、高效、环保的新途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

E. coli Rosetta(DE3)购自通用生物系统(安徽)有限公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Nde* I 和质粒

pET-28a(+)购自 Thermo Fisher 科技有限公司; 蛋白质 Marker 购自 MBI 公司; 甲基对硫磷购于 Dr. Ehrenstorfer 公司; 4-硝基苯酚购自成都艾科达化学试剂有限公司; 细胞裂解液: 苯甲基磺酰氟化物 0.1 mmol/L、Tris-HCl (pH 9.0) 50 mmol/L、NaCl 150 mmol/L 和甘油 20% (体积比)。

紫外可见分光光度计和 X 射线光电子能谱仪 (XPS), Thermo Fisher 科技有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 扫描电子显微镜 (SEM), FEI 公司; X 射线衍射仪 (XRD), Bruker 公司; 物理吸附分析仪, 麦克仪器公司; 激光共聚焦显微镜 (CLSM), Leica 仪器有限公司。

LB 培养基参考刘爱霖等^[22]的方法配制。

1.2 方法

1.2.1 重组菌的构建

通过 NCBI 获得来源于 *Agrobacterium radiobacter* P230 的 *OpdA* 基因序列 (GenBank 登录号为 DD088220.1, *opdA*), 并对该序列进行密码子优化, 优化后的 DNA 序列由通用生物系统 (安徽) 有限公司直接合成后, 连接至 pET-28a(+) 载体的两个限制性酶切位点 *Xho* I 和 *Nde* I 处, 构建重组质粒 pET-28a(+)-*opdA*, 并将其转化到感受态的 *E. coli* Rosetta (DE3) 中, 构建重组菌 [*E. coli* Rosetta (DE3)/pET-28a(+)-*opdA*]。将该重组菌涂布于 LB 平板 (含硫酸卡那霉素 50 μ g/mL) 上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

挑取阳性转化子接种于 LB 液体培养基 (含硫酸卡那霉素 50 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16 h。采用质粒抽提试剂盒抽提质粒, 并用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 酶切后进行凝胶电泳。

1.2.2 粗酶液的制备

从平板上挑取单菌落于 15 mL LB 液体培养基 (含硫酸卡那霉素 50 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 下培养 10 h, 按 2% (体积比) 的接种量进行扩大培养, 当发酵液 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 于 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 12 h, 然后 15 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h, 4 $^{\circ}$ C、9 000 r/min 离心 2 min

收集菌体, 用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 9.0) 洗涤菌体, 并用细胞裂解液重悬, 冰浴下超声破碎 10 min (200 W, 工作 3 s, 间歇 7 s), 4 $^{\circ}$ C、9 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为粗酶液。采用 SDS-PAGE 电泳对粗酶液进行分析。

1.2.3 NiCo₂O₄ 的制备

通过水热处理和煅烧制备 NiCo₂O₄ 微球^[19]: 将 0.5 mmol NiCl₂·6H₂O、1 mmol CoCl₂·6H₂O 和 30 mmol 尿素加入到 40 mL 乙醇溶液 (25%, 体积比) 中, 25 $^{\circ}$ C 反应 30 min。然后将混合液转移至反应釜, 90 $^{\circ}$ C 反应 5 h, 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用去离子水和乙醇反复洗涤, 干燥, 所得固体在 350 $^{\circ}$ C 下煅烧 3 h (空气环境, 升温速率为 1 $^{\circ}$ C/min), 即得 NiCo₂O₄ 微球。

用 SEM 和 XPS 表征 NiCo₂O₄ 的形貌结构和元素组成; 利用 XRD 分析 NiCo₂O₄ 的晶态和物相; 利用物理吸附分析仪对 NiCo₂O₄ 进行氮气吸附脱附表征, 并分析 NiCo₂O₄ 的孔径分布和比表面积。

1.2.4 His-tagged OpdA 的一步纯化和固定化

在 1 mL Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 9.0) 中加入一定量的 NiCo₂O₄, 超声 (100 W) 2 min 使其均匀分散, 然后加入 1 mL 粗酶液, 25 $^{\circ}$ C 下孵育 0.5–6 h, 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用含 40 mmol/L 咪唑的缓冲液清洗 3 次, 即得固定化酶 (OpdA@NiCo₂O₄)。

利用 CLSM 和 SDS-PAGE 电泳分析 His-tagged OpdA 的固定化和特异性吸附情况。考察 NiCo₂O₄ 加入量和固定化时间对蛋白吸附量和 OpdA@NiCo₂O₄ 降解活性的影响。

1.2.5 His-tagged OpdA 的催化活性和 OpdA@NiCo₂O₄ 的降解活性测定

(1) His-tagged OpdA 的催化活性^[5]: 在粗酶液 (Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0) 中加入 5 μ L 甲基对硫磷 (乙腈为溶剂, 10 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 下反应 5 min, 然后加入 1 mL 三氯乙酸 (10%, 质量比) 和 1 mL 碳酸钠 (10%, 质量比), 过滤, 收集黄色上清液 (在碳酸钠存在下, 4-硝基苯酚呈现黄色), 在 410 nm 处测

其吸光度值。His-tagged OpdA 的催化活性定义为: 在 37 °C、pH 9.0 条件下, 每 min 催化甲基对硫磷降解生成 1 μmol 4-硝基苯酚所需的 His-tagged OpdA 的量为 1 个酶活力单位(U)。

(2) OpdA@NiCo₂O₄ 的降解活性^[21,23]: 在 1.97 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 9.0)缓冲液中加入 20 mg NaBH₄、30 μL 甲基对硫磷(乙腈为溶剂, 10 mg/mL)和 9 mg OpdA@NiCo₂O₄, 40 °C 下反应 10 min, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 得上清液。取 1 mL 上清液与 1 mL 苯酚溶液(5%, 质量比)和 1 mL NaOH 溶液(0.5%, 质量比)混合, 60 °C 下水浴反应 30 min, 测量 630 nm 处的吸光度值。OpdA@NiCo₂O₄ 的降解活性定义为: 1 min 由 1 g OpdA@NiCo₂O₄ 催化甲基对硫磷降解产生 4-氨基苯酚的量。对照组(OpdA+NiCo₂O₄)的降解活性测定方法相同。OpdA@NiCo₂O₄ 的制备及催化过程见图 1。

1.2.6 OpdA@NiCo₂O₄ 用于有机磷化合物降解条件优化和稳定性研究

(1) 降解条件优化: 在 pH 为 9.0、温度为 40 °C、NaBH₄浓度为 10 mg/mL 条件下, 考察甲基对硫磷浓度为 0.05–0.40 mg/mL 时对 OpdA@NiCo₂O₄ 降解活性的影响; 在 pH 为 9.0、温度为 40 °C、甲基对硫磷浓度为 0.15 mg/mL 条件下, 改变 NaBH₄ 浓度(5.00–25.00 mg/mL), 考察其对 OpdA@NiCo₂O₄

降解活性的影响; 考察 OpdA@NiCo₂O₄ 在 pH 为 9.0、甲基对硫磷和 NaBH₄ 浓度分别为 0.15 mg/mL 和 10.00 mg/mL 条件下, 降解温度为 20–70 °C 时的降解活性; 考察 OpdA@NiCo₂O₄ 在温度为 40 °C、甲基对硫磷和 NaBH₄ 浓度分别 0.15 mg/mL 和 10 mg/mL 条件下, 缓冲液 pH 为 5.0–11.0 时的降解活性。

(2) OpdA@NiCo₂O₄ 的稳定性研究: 将 OpdA@NiCo₂O₄ 分别分散于 pH 4.0 和 12.0 缓冲液中, 孵育一定时间后取样, 测定其降解活性; 将 OpdA@NiCo₂O₄ 分散于 Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)中, 分别在 50 °C 和 65 °C 下孵育一定时间, 测定其降解活性; 将 OpdA@NiCo₂O₄ 分散于 0.05% 的 SDS 溶液中, 定时取样, 测定其降解活性; 将 OpdA@NiCo₂O₄ 溶液储藏于 4 °C 条件下, 定期取样, 测定其降解活性。对照组(OpdA+NiCo₂O₄)采用同样的方法处理一定时间(OpdA 和 NiCo₂O₄ 分开孵育或储藏), 测定其降解活性。

(3) OpdA@NiCo₂O₄ 的重复使用性: 将 OpdA@NiCo₂O₄ (9 mg)、NaBH₄ (20 mg)和甲基对硫磷(30 μL , 10 mg/mL)加入到 Tris-HCl 缓冲溶液(1.97 mL, 50 mmol/L, pH 9.0)中, 40 °C 反应 10 min, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 分别收集上清液和沉淀, 上清液用于测定 4-氨基苯酚的含量(方法同 1.2.5), 沉淀反复洗涤后投入下一轮反应。

1.2.7 OpdA@NiCo₂O₄ 用于实际样品检测

(1) 光学检测: 在含 OpdA@NiCo₂O₄ 的 Tris-HCl 缓冲液中加入甲基对硫磷(0–100 μL), 37 °C 孵育 30 min, 然后加入三氯乙酸和 Na₂CO₃ 溶液(方法同 1.2.5), 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 反应液置于分光光度计中于 410 nm 下进行检测, 测定甲基对硫磷的检测范围。

(2) 实际样品中甲基对硫磷的降解: 将新鲜的樱桃、蓝莓和杨梅洗净晾干后, 分别喷洒甲基对硫磷(0.38 μmol), 30 min 后, 将 3 种样品分别置于 25 mL 自来水、含商用水果清洗盐(10 mg)的水溶

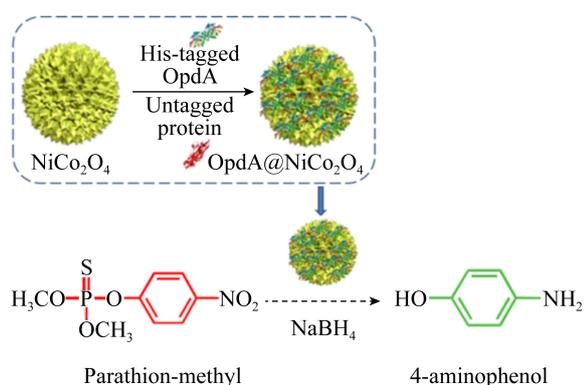


图 1 OpdA@NiCo₂O₄ 的制备及催化过程
Figure 1 Preparation and catalytic process of OpdA@NiCo₂O₄

液和含 OpdA@NiCo₂O₄ (10 mg)的水溶液中, 于 25 °C 放置 30 min, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用于检测 4-硝基苯酚的量。

2 结果与分析

2.1 His-tagged OpdA 的表达

重组质粒 pET-28a(+)-*opdA* 进行双酶切验证, 结果显示质粒条带和基因条带都与理论值大小相符, 说明重组质粒构建成功。重组菌经 IPTG 诱导后得到的粗酶液通过 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2A 所示。在 38 kD 左右处出现明显的蛋白条带(箭头处), 因 His-tagged OpdA 中携带有 His-tag (约 2–3 kD)^[24-25], 因此其分子量略大于原酶分子 OpdA (35 kD)。

为考察 IPTG 诱导 His-tagged OpdA 表达的效果, 以 His-tagged OpdA 为催化剂催化甲基对硫磷的降解。如图 2B 所示, 重组菌经 IPTG 诱导的粗酶液与甲基对硫磷反应后的溶液为黄色, 说明甲基对硫磷已被降解为 4-硝基苯酚, 此结果进一步说明重组菌经 IPTG 诱导后, His-tagged OpdA 获得成功表达, 其催化活性为 322 U/g-蛋白。

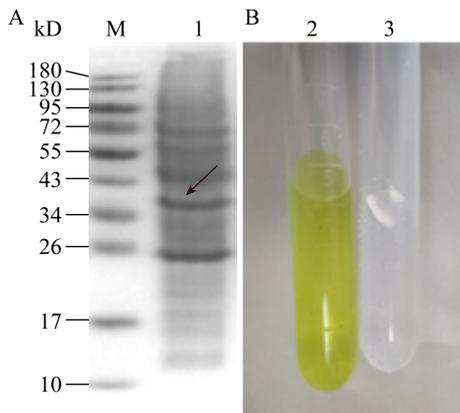


图 2 His-tagged OpdA 的 SDS-PAGE 分析(A)和催化甲基对硫磷的降解(B)

Figure 2 SDS-PAGE analysis of His-tagged OpdA (A) and degradation of parathion-methyl (B)

注: M: 蛋白质 Marker; 1 和 2: IPTG 诱导后的粗酶液及其用于催化甲基对硫磷降解的反应液; 3: 未经诱导的粗酶液用于催化甲基对硫磷降解的反应液。

Note: M: Protein Marker; 1 and 2: IPTG induction; 3: No induction.

2.2 NiCo₂O₄ 表征

如图 3A 所示, 由 NiCo₂O₄ 的 SEM 图可以看出, NiCo₂O₄ 微球形貌均一, 直径为 4–5 μm, 表面结构类似海胆状。由图 3B 可知, NiCo₂O₄ 呈现出介孔结构所具备的 IV 型吸附脱附等温线, 介孔大小集中在 2.0–12.0 nm, 由 BET 和 BJH 结果分析可知, 其比表面积为 50.356 m²/g、孔体积为 0.204 6 cm³/g, 可为 His-tagged OpdA 提供大量的附着位点, 有利于酶的固定化及底物产物的传质。

通过 XPS 表征分析 NiCo₂O₄ 的元素组成。如图 4 所示, NiCo₂O₄ 含有 Ni、Co 两种过渡金属离子。图 4A 为 Ni 的分峰图谱(分峰软件为 XPSpeak), Ni³⁺ 的特征峰分别在 855.76 eV 和 873.99 eV, Ni²⁺

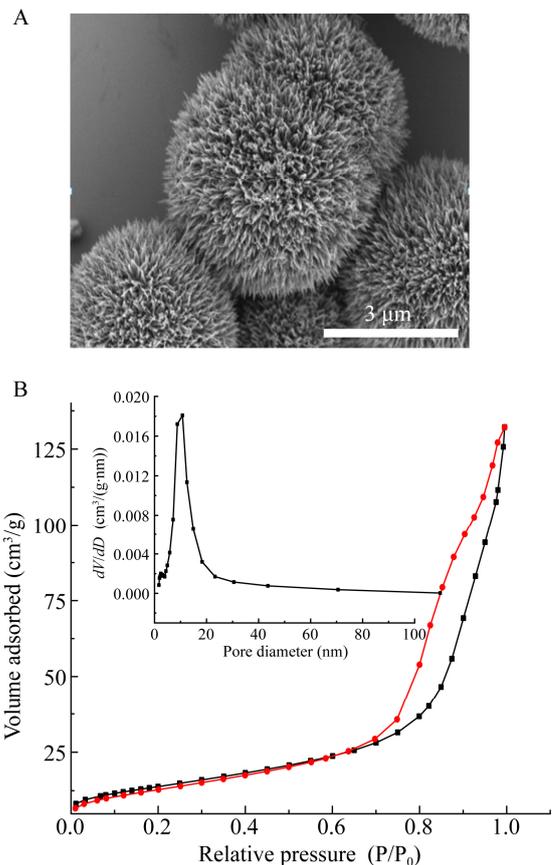


图 3 NiCo₂O₄ 的扫描电镜图(A)和 N₂ 吸附脱附曲线(内插图为孔径分布) (B)

Figure 3 SEM image (A), N₂ adsorption/desorption isotherm and pore size distribution curve (inset) (B) of NiCo₂O₄

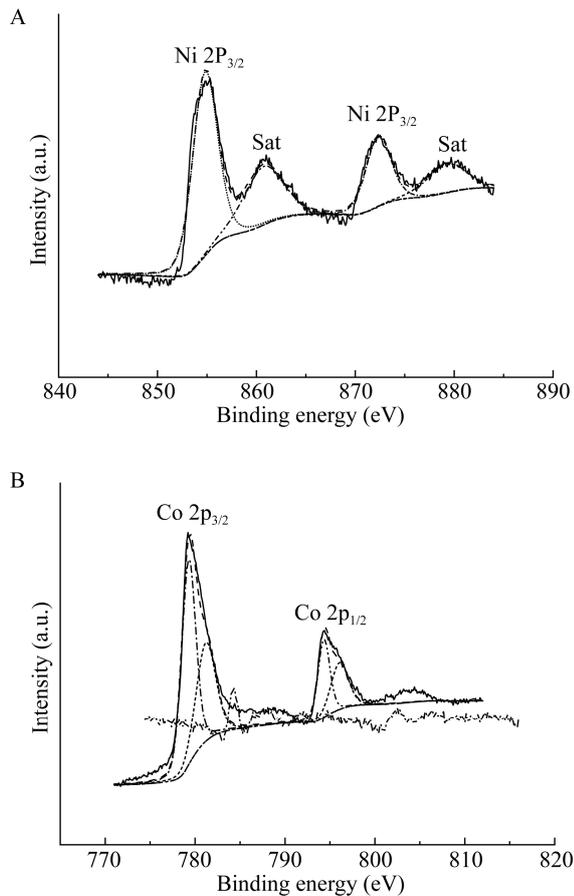


图 4 Ni (A)和 Co (B)高分辨率分峰图谱
Figure 4 High-resolution XPS spectra of Ni (A) and Co (B)

的特征峰在 854.02 eV 和 871.87 eV。图 4B 表示 Co 的分峰图谱, Co^{3+} 和 Co^{2+} 的特征峰分别在 779.2 eV 和 794.42 eV 及 780.87 eV 和 796.11 eV, 这些 Ni、Co 离子的存在有利于和 His-tagged OpdA 进行特异性吸附, 为 His-tagged OpdA 的特异性结合提供大量吸附位点。

图 5A 为 NiCo_2O_4 和 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 的 XRD 表征, NiCo_2O_4 在 2θ 为 18.9° 、 31.1° 、 36.7° 、 44.6° 、 55.4° 、 59.1° 和 64.9° 处出现了明显的衍射峰, 这与 NiCo_2O_4 的标准图谱 (JCPDF No. 20-0781) 峰相吻合, 说明 NiCo_2O_4 晶型完整。 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 的 XRD 图谱和 NiCo_2O_4 一致, 证明 OpdA 的固定化没有改变 NiCo_2O_4 的晶型结构。为考察 His-tagged OpdA 的固定化情况, 用异硫氰酸荧光素对其进行标记, 结果如图 5B 所示, 激光共聚焦显微镜显示 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 呈现绿色的荧光, 证明 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 被成功制备。图 5C 为 NiCo_2O_4 对 His-tagged OpdA 特异性吸附的 SDS-PAGE 分析, 对比粗酶液, $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 经 400 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱后的上清液中仅存在单一条带(箭头所示), 其位置和 His-tagged OpdA 条带位置相同, 说明 His-tagged OpdA 能够特异性

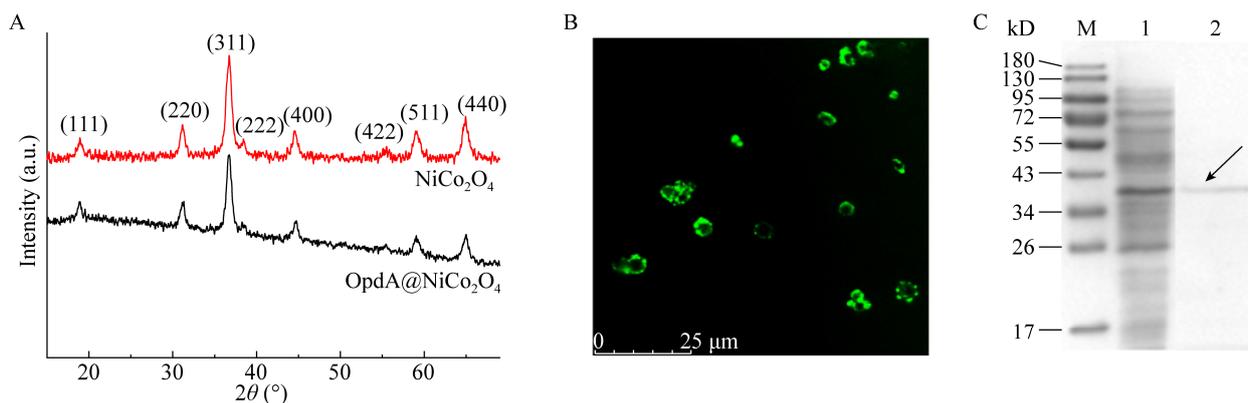


图 5 NiCo_2O_4 和 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 的 XRD 图谱(A)、 $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 的激光共聚焦显微镜图(B)和 NiCo_2O_4 对 His-tagged OpdA 选择性吸附 SDS-PAGE 分析(C)
Figure 5 XRD diagram of NiCo_2O_4 and $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ (A), laser confocal microscope picture of $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ (B), and SDS-PAGE analysis of His-tagged OpdA adsorbed selectively on NiCo_2O_4 (C)

注: M: 蛋白质 Marker; 1: 粗酶液; 2: $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ 经 400 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱后的上清液。

Note: M: Protein Marker; 1: Crude enzyme solution; 2: Supernatant obtained from $\text{OpdA}@\text{NiCo}_2\text{O}_4$ washed by 400 mmol/L imidazole buffer.

结合在 NiCo_2O_4 上, 而且其可通过高浓度的咪唑洗脱液从 $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 上洗脱, 进一步说明 NiCo_2O_4 可用于含 His-tag 的蛋白的分离纯化和定向固定化。

2.3 固定化和降解条件优化

基于 NiCo_2O_4 的 Ni 离子和 Co 离子可与组氨酸的咪唑基形成配位作用, 使粗酶液中的 His-tagged OpdA 特异性定向固定到 NiCo_2O_4 上, 因 NiCo_2O_4 与 His-tagged OpdA 的比例及固定化时间可影响 His-tagged OpdA 的固定化效果, 因此对其进行考察。由图 6A 所示, 随 NiCo_2O_4 与粗酶液中总蛋白比例的增加, 蛋白负载量呈下降趋势, 而 $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 的降解活性呈现先增大后减小的趋势, 其最大降解活性为 $3.11 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$, 此时 NiCo_2O_4 与粗酶液中总蛋白的比例为 4:1。由图 6B 可知, 随孵育时间延长, 蛋白负载量先增加后趋于平衡, 在孵育 3 h 时吸附达到平衡, 此时蛋白负载量为 $35.70 \text{ mg/g-NiCo}_2\text{O}_4$ 。

由图 7A-D 可知, 在甲基对硫磷浓度为 0.15 mg/mL 、 NaBH_4 浓度为 10 mg/mL 、反应温度为 40°C 和 pH 为 9.0 条件下, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 的降解活性最大。

2.4 $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 稳定性

$\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 的 pH 稳定性如图 8A 所示,

在 pH 4.0 条件下浸泡 3 h 后, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 能保持其初始降解活性的 16.44%, 而 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$ 活性几乎全部丧失; 在 pH 为 12.0 时, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 能保持其初始降解活性的 69.09%, 而 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$ 仅为 31.27%。结果说明相对于 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 有更高的 pH 稳定性, 这是由于 His-tag 和 NiCo_2O_4 之间的特异亲和作用及 NiCo_2O_4 的介孔结构, 使 His-tagged OpdA 被固定到海胆状的 NiCo_2O_4 表面和介孔内部, 由于限域作用导致 His-tagged OpdA 被束缚, 使其在极端 pH 条件下保持构象稳定, 提高了 OpdA 的稳定性。

如图 8B 所示, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 在 50°C 条件下浸泡 3 h 后, 其降解活性仍可保持初始降解活性的 54.08%, 而 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$ 仅为初始降解活性的 21.33%; 65°C 条件下, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 和 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$ 分别剩余初始降解活性的 15.14% 和 5.61%。这些结果表明, $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 较 $\text{OpdA}+NiCo_2O_4$ 对热诱导引起的构象改变有更好的抵抗能力。因为 His-tagged OpdA 被固定化后, 增强了酶分子的结构刚性, 空间构象更稳定, 保护了 His-tagged OpdA 的特定位点, 抑制了高温下酶蛋白的解折叠^[14], 因此 $\text{OpdA}@NiCo_2O_4$ 抵抗热变性的能力有所提高。

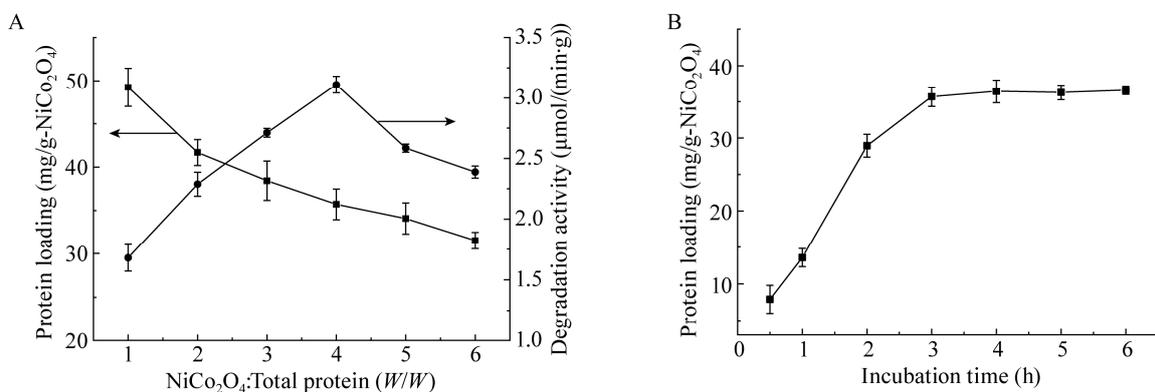


图 6 NiCo_2O_4 与总蛋白比影响(A)和吸附时间影响(B)

Figure 6 Effect of the ratio of NiCo_2O_4 to total protein (A) and adsorption time (B)

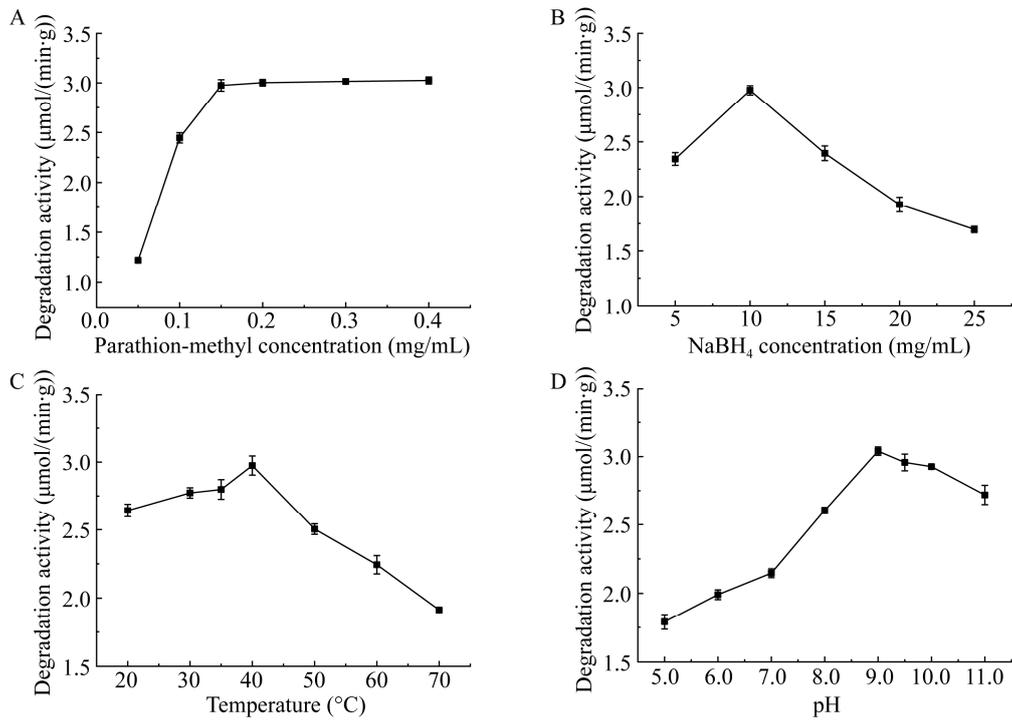


图 7 甲基对硫磷浓度(A)、NaBH₄浓度(B)、反应温度(C)和 pH (D)对 OpdA@NiCo₂O₄ 降解活性影响
 Figure 7 Effect of parathion-methyl concentration (A), NaBH₄ concentration (B), reaction temperature (C) and pH (D) on degradation activity of OpdA@NiCo₂O₄

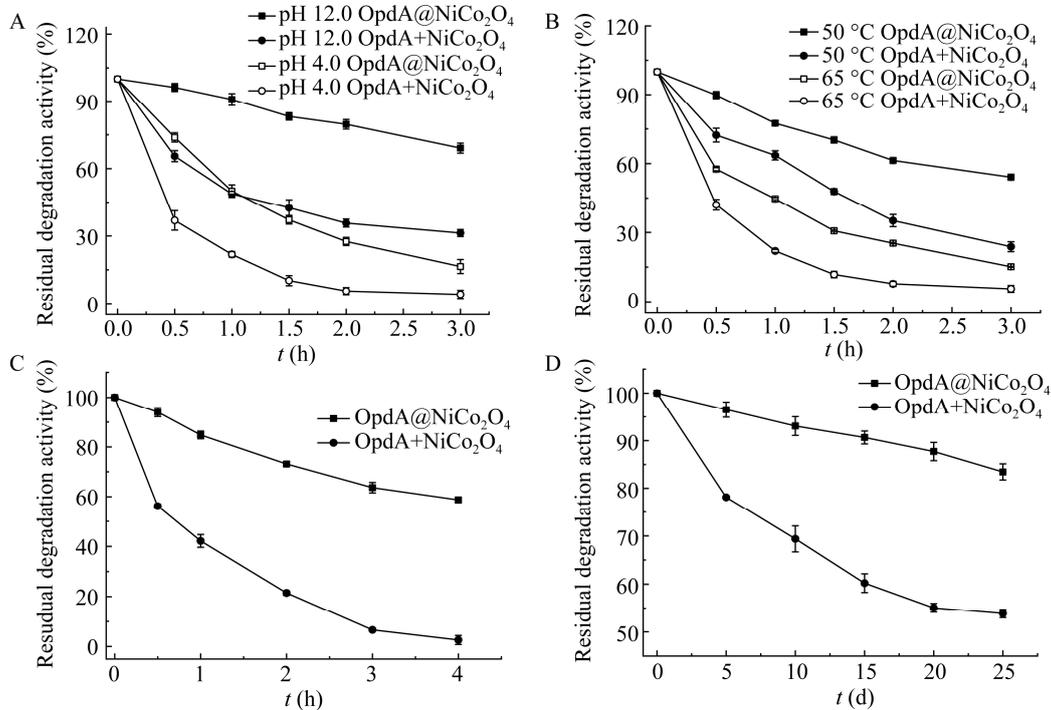


图 8 OpdA@NiCo₂O₄ 和 OpdA+NiCo₂O₄ 的 pH 稳定性(A)、热稳定性(B)、SDS 溶液耐受性(C)和储藏稳定性(D)
 Figure 8 pH stability (A), thermal stability (B), SDS tolerance (C) and storage stability (D) of OpdA@NiCo₂O₄ and OpdA+NiCo₂O₄

SDS 是洗涤剂中最常用的表面活性剂, OpdA+NiCo₂O₄和 OpdA@NiCo₂O₄在 0.05% SDS 中的稳定性如图 8C 所示。随浸泡时间的延长, 两种形式的催化剂其降解活性均逐渐降低, 浸泡 4 h 后, OpdA@NiCo₂O₄ 可保持其初始降解活性的 58.73%, 而 OpdA+NiCo₂O₄ 几乎全部失活, 说明在 SDS 中游离 His-tagged OpdA 的降解活性更易下降甚至变性失活。其原因是 SDS 的脂肪族侧链能与 His-tagged OpdA 蛋白内部的非极性基团相互作用, 导致蛋白的 α -螺旋结构改变, 三级结构遭到破坏, 酶分子稳定性降低^[26-27]。His-tagged OpdA 被固定化后, NiCo₂O₄ 的存在有效阻止了酶分子空间结构的改变, 提高了其在 SDS 中的耐受性。

OpdA@NiCo₂O₄ 和 OpdA+NiCo₂O₄ 的储藏稳定性如图 8D 所示, OpdA@NiCo₂O₄ 在 4 °C 储藏 25 d 后仍可保持其初始降解活性的 83.45%, 而 OpdA+NiCo₂O₄ 仅为 53.85%, OpdA@NiCo₂O₄ 储藏稳定性明显优于 OpdA+NiCo₂O₄。这一结果进一步说明酶分子被固定化后, NiCo₂O₄ 与酶分子之间的作用力阻止了酶分子构象的改变, 酶分子的稳定性增加^[14]。

2.5 OpdA@NiCo₂O₄ 的重复使用性

OpdA@NiCo₂O₄ 的重复使用性如图 9A 所示, 重复使用 7 次后, 仍可保持初始降解活性的 50.32%, 这一结果虽说明 OpdA@NiCo₂O₄ 有良好的重复使用性, 但降解活性仍下降了大约 50%。为了分析降解活性降低的原因, 考察了 His-tagged OpdA 的泄露、OpdA@NiCo₂O₄ 在 NaBH₄ 中的稳定性、NiCo₂O₄ 的重复使用性等对 OpdA@NiCo₂O₄ 降解活性的影响。

OpdA@NiCo₂O₄ 用于甲基对硫磷的降解, 反应结束后, 测定上清液中蛋白质的含量, 实验发现上清液中几乎无 His-tagged OpdA 存在, 说明 His-tagged OpdA 的泄露可被忽略; 图 9B 为 OpdA@NiCo₂O₄ 浸泡于含 NaBH₄ (10 mg/mL) 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 80 min 后离心洗涤, 在无 NaBH₄ 存在的条件下用于催化甲基对硫磷的降

解, 由图 9B 可知, OpdA@NiCo₂O₄ 的活性降低了 12%, 说明 OpdA@NiCo₂O₄ 长时间浸泡于 NaBH₄ 中降低了 His-tagged OpdA 的催化活性; NiCo₂O₄ 用于催化 4-硝基苯酚的还原, 由图 9C 可知, 重复使用 7 次后, NiCo₂O₄ 的活性降低了 16.84%。此

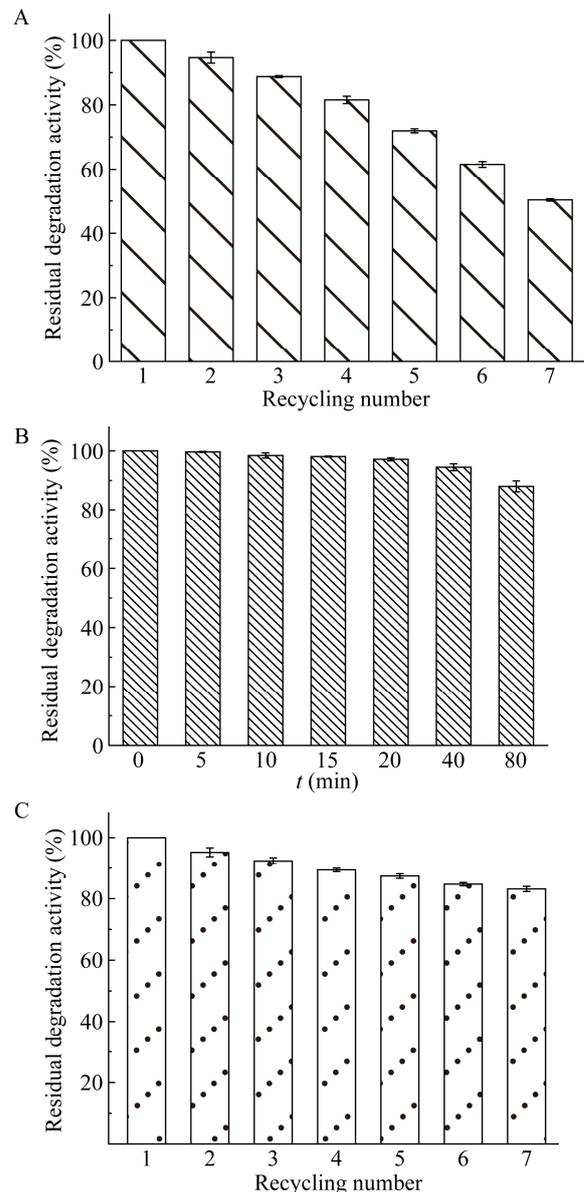


图 9 OpdA@NiCo₂O₄ 的重复使用性(A)、NaBH₄ 对 OpdA@NiCo₂O₄ 活性的影响(B)和 NiCo₂O₄ 的重复使用性(C)

Figure 9 Reusability of OpdA@NiCo₂O₄ (A), effect of NaBH₄ on OpdA@NiCo₂O₄ activity (B) and reusability of NiCo₂O₄ (C)

外, $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 在回收洗涤过程中回收不彻底, 导致其用量逐渐减少^[28]。

2.6 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 用于检测实际样品

2.6.1 光学检测

$\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 在无 NaBH_4 条件下催化甲基对硫磷生成 4-硝基苯酚, 后者在 410 nm 处有特征吸收光谱(图 10A), 因此, $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 可用于甲基对硫磷降解效果的检测。由图 10B 可知, 甲基对硫磷的浓度范围为 10–100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其与吸光度值呈良好的线性关系, 经计算 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 对甲基对硫磷的检测限为 0.43 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.6.2 实际样品的降解

将喷洒过甲基对硫磷的樱桃、蓝莓和杨梅分别浸泡于含有 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 的水溶液、含商用

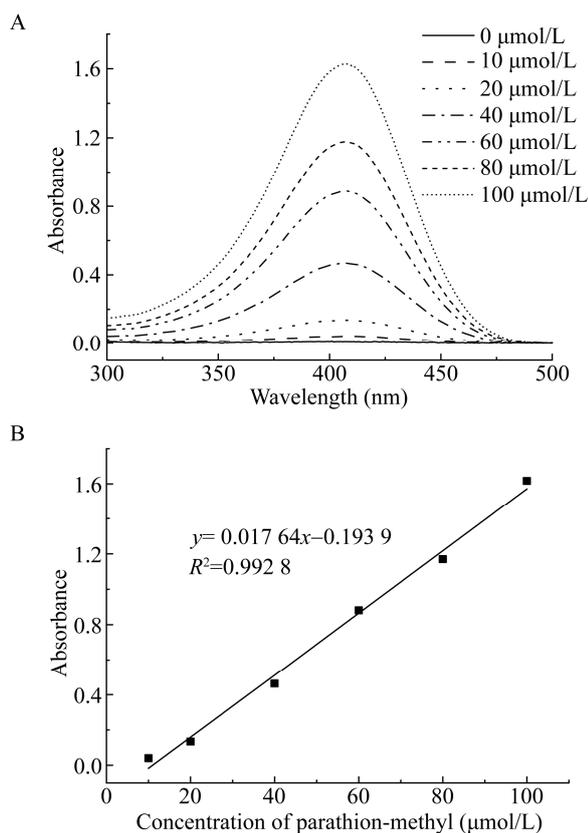


图 10 4-硝基苯酚的紫外可见吸收光谱(A)和吸光度与甲基对硫磷浓度的关系图(B)

Figure 10 UV-Vis absorption spectrum of 4-nitrophenol (A) and relationship between absorbance and parathion-methyl concentration (B)

水果清洗盐的水溶液和自来水中, 分析 3 种形式对甲基对硫磷的去除效果, 结果显示只有含 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 的实验组溶液颜色变黄, 说明产生了 4-硝基苯酚。如图 11 所示, 含有 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 的实验组对甲基对硫磷的去除效果明显高于其他两组, 说明 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 可用于实际样品中甲基对硫磷的降解。

3 讨论与结论

有机磷化合物因其杀虫效率高、防治范围广、价格低廉等特点, 被广泛应用于杀虫剂、杀真菌剂和农药中, 以保护农作物免受害虫侵害并提高粮食产量。然而, 由于其广泛且不合理的使用, 导致环境中的残留量严重超标, 对土壤、水环境和人类健康造成极大威胁。

本文采用 OpdA 催化有机磷化合物的降解, 但游离酶存在对环境敏感、易失活、难于重复使用等固有缺点, 限制了其应用范围, 而将其进行固定化可以克服以上缺点。鉴于此, 本文首先构建了 His-tagged OpdA , 利用 His-tag 与过渡金属离子发生特异性亲和吸附作用, 实现了 His-tagged OpdA 的固定化。具体研究过程是从基因库中找到来源于 *Agrobacterium radiobacter* P230 的 OpdA 的

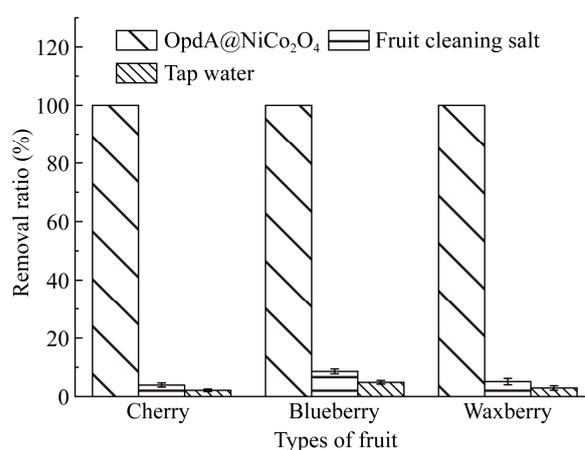


图 11 $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$ 、商用水果清洗盐和自来水对甲基对硫磷的去除

Figure 11 Removal of parathion-methyl by $\text{OpdA@NiCo}_2\text{O}_4$, commercial fruit cleaning salt and tap water

基因序列, 以 pET-28a(+)为表达载体, 成功构建了重组质粒 pET-28a(+)-*opdA*。鉴于 *E. coli* 遗传背景清晰、生长周期短和易于大规模培养的特点, 以其为表达宿主, 将重组表达质粒 pET-28a(+)-*opdA* 转入到 *E. coli* Rosetta(DE3)中, 制备了重组菌, 在 IPTG 诱导下, His-tagged OpdA 获得了高效表达; 为了实现 His-tagged OpdA 的一步纯化固定化, 制备了 NiCo₂O₄ 微球, 利用 His-tag 与 NiCo₂O₄ 微球中的 Ni 离子和 Co 离子的特异性亲和吸附作用, 制备了固定化酶(OpdA@NiCo₂O₄), 该固定化酶较游离酶有更好的稳定性和重复使用性; 鉴于 His-tagged OpdA 对有机磷化合物的降解和 NiCo₂O₄ 固有的氧化还原性质, 以 OpdA@NiCo₂O₄ 为催化剂, 通过级联反应, 甲基对硫磷被降解为 4-氨基苯酚, 当甲基对硫磷的浓度范围为 10–100 μmol/L 时, 其与吸光度值呈良好的线性关系, 检测限为 0.43 μmol/L; 将该固定化酶用于被甲基对硫磷污染的水果中, OpdA@NiCo₂O₄ 相对于自来水和商用水果清洗盐有更好的去除效果。本研究尝试将无机纳米材料作为生物酶的载体和纯化基质, 实现了有机-无机材料的组装和级联催化过程, 对于生物酶在环境修复中的实用化提供了一条有效的思路。

REFERENCES

- [1] Bai YP, Luo XJ, Zhao YL, et al. Efficient degradation of malathion in the presence of detergents using an engineered organophosphorus hydrolase highly expressed by *Pichia pastoris* without methanol induction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(41): 9094-9100
- [2] Xue SG, Li JJ, Zhou LY, et al. Simple purification and immobilization of His-tagged organophosphohydrolase from cell culture supernatant by metal organic frameworks for degradation of organophosphorus pesticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(49): 13518-13525
- [3] Fu GP, Cui ZL, Wu XP, et al. Enzymology of microbial degradation of organophosphate chemicals[J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 138-143 (in Chinese)
傅国平, 崔中利, 吴旭平, 等. 微生物降解有机磷类毒剂的酶学研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 138-143
- [4] Bai YP, Cheng H, Xu JH. Recent advances in discovery, engineering and applications of organophosphorus hydrolases[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(8): 1168-1179 (in Chinese)
白云鹏, 程欢, 许建和. 有机磷水解酶的挖掘、改造及应用[J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1168-1179
- [5] Zhou LY, Li JJ, Gao J, et al. Facile oriented immobilization and purification of His-tagged organophosphohydrolase on virus-like mesoporous silica nanoparticles for organophosphate bioremediation[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(10): 13588-13598
- [6] Su FH, Tabañag IDF, Wu CY, et al. Decorating outer membrane vesicles with organophosphorus hydrolase and cellulose binding domain for organophosphate pesticide degradation[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 308: 1-7
- [7] Zhou LY, Zhang XN, Ma L, et al. Acetylcholinesterase/chitosan-transition metal carbides nanocomposites-based biosensor for the organophosphate pesticides detection[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 128: 243-249
- [8] Ely F, Hadler KS, Mitić N, et al. Electronic and geometric structures of the organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA)[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2011, 16(5): 777-787
- [9] Dawson RM, Pantelidis S, Rose HR, et al. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 157(2/3): 308-314
- [10] Zou XY, Li K, Zhao YB, et al. Ferroferric oxide/L-cysteine magnetic nanospheres for capturing histidine-tagged proteins[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(38): 5108-5113
- [11] Zhou Y, Yuan SF, Liu Q, et al. Synchronized purification and immobilization of His-tagged β-glucosidase via Fe₃O₄/PMG core/shell magnetic nanoparticles[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41741
- [12] Sahu SK, Chakrabarty A, Bhattacharya D, et al. Single step surface modification of highly stable magnetic nanoparticles for purification of His-tag proteins[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2011, 13(6): 2475-2484
- [13] Cao JL, Zhang XH, He XW, et al. Facile synthesis of a Ni(II)-immobilized core-shell magnetic nanocomposite as an efficient affinity adsorbent for the depletion of abundant proteins from bovine blood[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(30): 3625-3632
- [14] Cao GX, Gao J, Zhou LY, et al. Fabrication of Ni²⁺-nitrilotriacetic acid functionalized magnetic mesoporous silica nanoflowers for one pot purification and immobilization of His-tagged ω-transaminase[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 128: 116-125
- [15] Wang Y, Wang GC, Xiao Y, et al. Yolk-shell nanostructured Fe₃O₄@NiSiO₃ for selective affinity and magnetic separation of His-tagged proteins[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(21): 19092-19099

- [16] Fang WJ, Chen XL, Zheng NF. Superparamagnetic core-shell polymer particles for efficient purification of his-tagged proteins[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(39): 8624-8630
- [17] Zheng JN, Lin ZA, Lin G, et al. Preparation of magnetic metal-organic framework nanocomposites for highly specific separation of histidine-rich proteins[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(10): 2185-2191
- [18] Peschke T, Skoupi M, Burgahn T, et al. Self-immobilizing fusion enzymes for compartmentalized biocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(11): 7866-7872
- [19] Swathi T, Buvanewari G. Application of NiCo₂O₄ as a catalyst in the conversion of p-nitrophenol to p-aminophenol[J]. *Materials Letters*, 2008, 62(23): 3900-3902
- [20] Xu B, Li XJ, Chen ZM, et al. Pd@MIL-100(Fe) composite nanoparticles as efficient catalyst for reduction of 2/3/4-nitrophenol: synergistic effect between Pd and MIL-100(Fe)[J]. *Microporous & Mesoporous Materials*, 2018, 255: 1-6
- [21] Li HB, Ma L, Zhou LY, et al. An integrated nanocatalyst combining enzymatic and metal-organic framework catalysts for cascade degradation of organophosphate nerve agents[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(76): 10754-10757
- [22] Liu AL, Wu ZG, Jiang X, et al. Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing bacterium *Microbacterium* sp. BD6[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 95-105 (in Chinese)
刘爱霖, 吴志国, 江鑫, 等. Cr(VI)还原菌 *Microbacterium* sp. BD6 的分离鉴定及还原特性[J]. *微生物学报*, 2020, 60(1): 95-105
- [23] Wei SP, Qin GH, Zhang LJ, et al. Spectrophotometric determination of para-aminophenol in the solution of the electrolytic reduction of nitrobenzene[J]. *Technology & Development of Chemical Industry*, 2002, 31(3): 32-33 (in Chinese)
韦少平, 覃国红, 张丽娟, 等. 分光光度法测定硝基苯电还原液中的对氨基苯酚[J]. *化工技术与开发*, 2002, 31(3): 32-33
- [24] Jackson CJ, Carr PD, Kim HK, et al. Anomalous scattering analysis of *Agrobacterium radiobacter* phosphotriesterase: the prominent role of iron in the heterobinuclear active site[J]. *Biochemical Journal*, 2006, 397(3): 501-508
- [25] Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, et al. Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium isolate*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3371-3376
- [26] Liu JL. Effect of the interaction between surfactant and BLC on the enzymatic activity and its conformations[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2017 (in Chinese)
刘君玲. 表面活性剂与过氧化氢酶相互作用对酶活性和构象的影响[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2017
- [27] Yang WJ. Studies on interaction between protein and surfactant[D]. Beijing: Master's Thesis of Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 1996 (in Chinese)
杨为进. 蛋白质与表面活性剂相互作用研究[D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所硕士学位论文, 1996
- [28] He J, Sun SS, Zhou Z, et al. Thermostable enzyme-immobilized magnetic responsive Ni-based metal-organic framework nanorods as recyclable biocatalysts for efficient biosynthesis of S-adenosylmethionine[J]. *Dalton Transactions*, 2019, 48(6): 2077-2085