

6-羟基-3-琥珀酰吡啶单加氧酶的纯化与结晶条件

胡传明 于浩 唐鸿志* 吴更 许平

(上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】在大肠杆菌中克隆表达尼古丁降解关键的 6-羟基-3-琥珀酰吡啶单加氧酶基因 *hspB*, 纯化重组 HspB 蛋白并进行结晶条件的初步研究。【方法】从恶臭假单胞菌 S16 基因组中 PCR 扩增 *hspB* 基因, 构建重组表达载体 pET28a-*hspB*, 并在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达, 利用亲和层析和凝胶过滤层析纯化重组蛋白。利用悬滴扩散法对 HspB 蛋白进行结晶条件筛选和优化。【结果】本文成功构建重组质粒 pET28a-*hspB* 并纯化获得达到结晶纯度的 HspB 蛋白。结晶条件初筛和优化后获得可培养 HspB 蛋白晶体的条件为 0.2 mol/L NaCl、0.1 mol/L HEPES pH 7.5、1.1 mol/L (NH₄)₂SO₄、4 °C、加晶种。【结论】HspB 蛋白纯化体系的构建和结晶条件的初步研究为从结构生物学的角度进一步研究 HspB 结构与功能的关系、定向进化提高 HspB 催化效率奠定了基础。

关键词: HspB, 重组表达, 蛋白纯化, 结晶初筛

Purification and crystallization of 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine monooxygenase

HU Chuan-Ming YU Hao TANG Hong-Zhi* WU Geng XU Ping

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] *hspB*, the gene of the key monooxygenase in nicotine degradation from *Pseudomonas putida* S16, was cloned and expressed in *Escherichia coli*; protein HspB was purified, and the crystal condition of HspB was studied. [Methods] The gene *hspB* was amplified from the genomic DNA of *Pseudomonas putida* S16. Then recombination plasmid pET28a-*hspB* was expressed in *E. coli* BL21. Ni²⁺-NTA His-Bind and gel filtration were used to purify HspB. The preliminary crystal of HspB was screened and optimized by using hanging drop diffusion method. [Results] pET28a-*hspB* plasmid was successfully constructed and the protein HspB was purified to crystalline purity. Crystal condition of HspB was obtained and the culture condition is 0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L HEPES pH 7.5, 1.1 mol/L (NH₄)₂SO₄, 4 °C, Seeding. [Conclusion] The construction of the HspB purification system and the study of preliminary crystal of HspB lay a foundation for the research of structure-function relationship and improvement of HspB catalytic efficiency by directed evolution of gene manipulation.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31230002, 31121064); 上海市青年科技启明星项目(No. 13QA1401700)

*通讯作者: Tel: 86-21-34206647; ✉: tanghongzhi@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-18; 接受日期: 2014-01-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-20

Keywords: HspB, Recombinant expression, Protein purification, Crystal screen

尼古丁(Nicotine)俗称烟碱,是存在于茄科烟草属植物中的一种吡啶类生物碱,含有一个吡啶环和一个吡咯环。众所周知,尼古丁是一种对人体和环境有害的物质^[1-6]。因此,寻找有效的途径降低烟叶和环境中的尼古丁含量,对于维护人类健康及保护生态环境具有重要意义。微生物因其种类多、繁殖快、适应性强、代谢能力强等优点,人们很快对此展开了研究。研究发现,从烟草生长的土壤中及其它有烟草存在的环境中可以分离筛选出一些降解尼古丁的微生物并确定其代谢尼古丁的途径有3种:脱甲基途径、吡咯途径和吡啶途径^[7-10]。本实验室在前期研究中,成功筛选出一株高效降解尼古丁的恶臭假单胞菌株 S16^[11],并对其降解尼古丁的途径进行了研究,确定为吡咯途径^[12-14]。

在 S16 的尼古丁降解途径中存在一个关键蛋白 6-羟基吡啶羟化酶(HspB),该酶催化 6-Hydroxy-3-succinoyl-pyridine (简称 HSP)到 2,5-Dihydroxy-pyridine (简称DHP),反应需要辅基 FAD 和 NADH 的参与^[15]。但是目前尚无 HspB 重组蛋白纯化和结构生物学方面的研究。本研究构建了 pET28a-*hspB* 重组质粒并表达纯化了 HspB 蛋白,同时进行了结晶条件的初筛和优化,获得了可培养 HspB 晶体的条件。为从结构生物学的角度研究 HspB 结构与功能的关系、定向进化提高 HspB 催化效率奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种:质粒 pET28a、恶臭假单胞菌株 S16、*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂:KOD 酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶(*Nco* I/*Xho* I)购自 NEB 公司。GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒制备试剂盒购自上海捷瑞公司。LB 肉汤是 OXOID 公司产品,引物由上海生物生工有限公

司合成,测序由上海美吉生物有限公司完成。实验所用结晶试剂盒为 Hampton 公司产品。其他常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器:PCR 仪(EDC 810)购自东胜国际贸易有限公司。 Ni^{2+} -NTA 填充柱料购自 Qiagen 公司,蛋白电泳仪、核酸电泳仪和凝胶成像仪均是天能生物有限公司产品,ÄKTAprime Plus 购自 GE 公司, Labscale 超滤系统购自美国 Millipore 公司,紫外可见分光光度计 UV 2550 购自日本 Shimadzu 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计、PCR 扩增与目的片段回收:引物设计(表 1)。以恶臭假单胞菌株 S16 基因组为模板,进行 PCR 扩增。反应体系:KOD-Neo-plus DNA 聚合酶(1.0 U/ μL) 1.0 μL , 10 \times KOD plus buffer 5.0 μL , dNTPs mixture (2 mmol/L each) 3 μL , 模板 2 μL , 前后引物(10 nmol/L)各 1.0 μL , ddH₂O 补加至 50 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min ;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s ,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s ,68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min ,30 个循环 ;68 $^{\circ}\text{C}$ 10 min ;4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.2.2 重组质粒 pET28a-*hspB* 的构建:将 PCR 产物和 pET28a 质粒分别用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切。将纯化的 DNA 片段与线性化的 pET28a 载体连接,热激转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆。PCR 鉴定后提取质粒,酶切并测序。鉴定正确的重组质粒命名为 pET28a-*hspB*。

1.2.3 HspB 蛋白的诱导表达:将 pET28a-*hspB* 质粒热激转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,抗性平板中筛选阳性菌落。挑取数个单菌落接种于 3 mL 液体 LB 培养基中,加入终浓度为 50 mg/L 卡那霉素,220 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。至 OD_{600} 为 0.8 时,取 500 μL 菌液加入 2 μL 浓度为 200 mmol/L 的 IPTG,诱导目的蛋白的表达;另取 500 μL 菌液不加诱导物 IPTG,作为阴性对照。同样条件继续培养 3 h,12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 min 收集菌体。通过 SDS-PAGE 确定表达目的蛋白的阳性菌株。取阳性菌株扩大培养至 500 mL LB 培养基中,220 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌液 OD_{600} 为 0.8,加入终浓度为

表 1 实验所用引物
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
5' <i>hspB1</i> -393-F	AT <u>ACCATGGT</u> GAGCATGAAACAGCGCGTAA	<i>Nco</i> I
3' <i>hspB1</i> -393-R	GTGCTCGAGAAAGGTTCCATAGTCTCTGGAA	<i>Xho</i> I

注: 下划线为酶切位点.

Note: Restriction sites are underlined.

0.2 mmol/L 的 IPTG, 180 r/min、16 °C 诱导 20 h。4 200 r/min、4 °C 离心 25 min 收集菌体, 将所收集的菌体按照湿重 1 g 菌体最终定容到 10 mL Ni 柱平衡液(25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑)的比例重悬, 加入 Lysozyme (溶菌酶)、Leupeptin (亮抑酶肽)、Aprotinin (抑肽酶)至终浓度均为 100 mg/L 和终浓度为 250 mg/L PMSF (苯甲基磺酰氟)。4 °C 旋转混合 30 min。

1.2.4 镍柱亲和层析: 菌液于冰上超声破碎(工作 3 s, 间歇 5 s, 保护温度 16 °C, 共 20 min), 16 000 r/min、4 °C 离心 30 min 收集上清液。用 0.45 μm 的过滤膜将上清液缓慢抽滤到 Ni²⁺-NTA His-Bind 层析柱。用洗涤缓冲液(25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)充分除去非特异性结合的杂蛋白。依次加 5 mL 洗脱缓冲液(25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 50、80、200、500 mmol/L 咪唑), 洗脱目的蛋白。12% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.5 Superdex 200 柱层析: 预先用分子筛层析平衡缓冲液(25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT)平衡 Superdex200 凝胶层析柱(流速 0.5 mL/min, 压强上限 1×10³ Pa)至电导曲线平直。将收集的 Ni 柱亲和层析洗脱液注入上样环中。用一个柱体积(约 22 mL)的平衡缓冲液洗脱并收集洗脱液。结合紫外吸收峰和 SDS-PAGE 检测, 分析纯化效果。5 000 r/min、4 °C 离心浓缩蛋白溶液, 考马斯亮兰法(Bradford 法)测定蛋白浓度至 12 g/L, 液氮速冻, -80 °C 保存, 以备点晶。

1.2.6 HspB 酶活测定方法: HspB 催化反应需要

NADH 的参与, NADH 在 340 nm 下有特定吸收峰 [NADH, ε=6 220/(mol·cm)]。通过紫外可见分光光度计 UV 2550 测定 NADH 的吸收峰可以对 HspB 的活性进行检测。反应体系是 1.0 mmol/L HSP, 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 25 °C。通过向体系中加入 HspB 催化反应的进行。1 Kat 酶活力单位定义为在 1 s 中氧化 1 mol NADH 所需要的酶量^[15]。

1.2.7 结晶条件的初筛: 蛋白冰上解冻后, 14 000 r/min、4 °C 离心 5 min 后点晶。本实验主要采取的是悬滴扩散法^[16]进行结晶初筛。初筛时主要尝试了 Crystal Screen 1 和 2、Index、PEG Rx、Salt Rx、PEG/Ion 试剂盒^[17]。选用 48 孔结晶板, 下槽中的结晶试剂为 80 μL。在硅化后的盖玻片上依次滴加 1 μL 的结晶试剂和 1 μL 蛋白溶液, 再将盖玻片反扣覆盖在池孔上并用凡士林密封空隙。14 °C 静置培养。定期在显微镜下观察晶体生长情况。

1.2.8 结晶条件的优化: 以初筛生长晶体的条件为基础对结晶条件做进一步优化工作, 主要包括 pH、沉淀剂和盐离子浓度的改变, 温度的优化以及添加剂尝试^[18-21]。沉淀剂的浓度设置了 1.0-2.0 mol/L 的 11 个梯度; 盐离子浓度设置了 0-1.0 mol/L 的 11 个梯度; pH 优化用的是 Sodium HEPES Kit (pH 6.8-8.2)和 HEPES Buffer Kit (pH 6.8-8.2)试剂盒。设计正交实验对 pH、沉淀剂和盐离子浓度进行优化, 确定最优生长条件。人工配置此条件的结晶试剂, 每管 80 μL 分装入 EP 管中, 再分别加入 9 μL 的添加剂(本实验室所用的添加剂共计 96 种), 充分混匀后进行晶体的培养。进一步确定晶体的最

优生长条件后,对晶体的培养温度进行优化,主要尝试了4、8、28 °C。最后也尝试了 Seeding 结晶法^[22],以期获得体积增大的晶体。

2 结果与分析

2.1 pET28a-*hspB* 表达载体的构建与鉴定

经 PCR 扩增后,扩增产物由琼脂糖凝胶电泳鉴定,在1 000–1 500 bp 处可见一条与预期大小(1 179 bp)相符的条带(图 1A)。抽提 pET28a-*hspB* 重组质粒进行酶切鉴定,结果呈现出与预期结果(5 320 bp 和 1 179 bp)相符的两条带(图 1B)。送测序,经比对,序列 100%正确。

2.2 HspB 蛋白的表达与纯化

小规模表达检测显示,在相对分子质量约 43 kD 处出现一条明显的特异条带,与预期的 HspB-His6 重组蛋白理论大小数值相符,而对照组无特异条带(图 2A)。菌体超声破碎后,离心收集上清,通过 Ni²⁺-NTA His-Bind 亲和纯化,经 SDS-PAGE 显示,在预期位置有目的蛋白条带(图 2B)。Superdex200 柱层析紫外吸收峰单一(图 2C),经 SDS-PAGE 检测,纯化的蛋白为单一条带(图 2D),达到晶体初筛所要求的纯度。

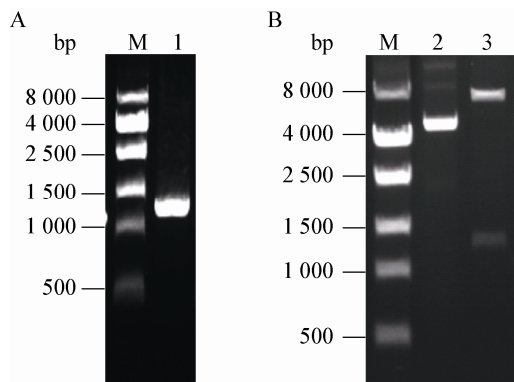


图 1 pET28a-*hspB* 表达载体构建

Figure 1 Construction of pET28a-*hspB* plasmid

注:A: *hspB* 基因的 PCR 扩增;B:重组质粒双酶切电泳图。M: DNA marker DL2000; 1: *hspB* 片段; 2: pET28a-*hspB* 质粒; 3: *Nco* I/*Xho* I 酶切 pET28a-*hspB* 产物。

Note: A: Electrophoresis results of PCR amplification of *hspB* fragment; B: Restriction analysis of recombinant plasmid. M: 1 kb-II DNA marker; 1: *hspB* fragments; 2: pET28a-*hspB* plasmid; 3: pET28a-*hspB* digested by *Nco* I/*Xho* I.

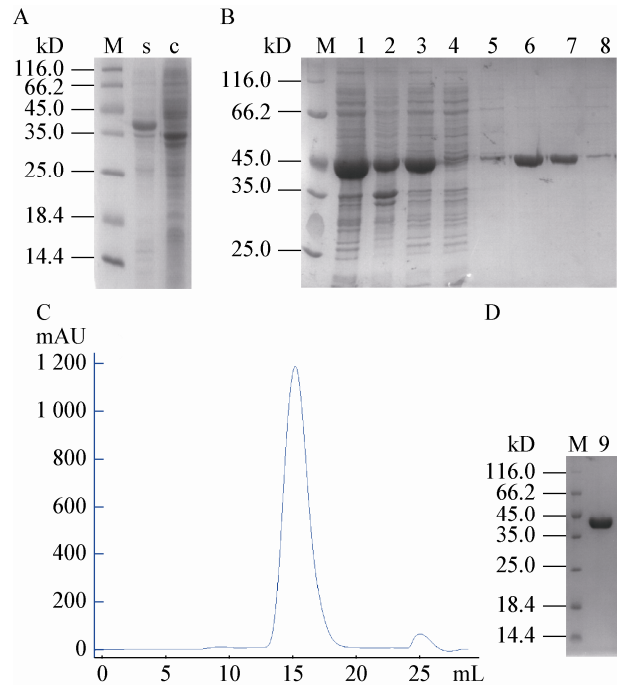


图 2 HspB 蛋白纯化

Figure 2 Purification of HspB protein

注:A: HspB 蛋白小规模表达检测;B: HspB 蛋白 Ni 柱纯化电泳图;C: HspB 蛋白 Superdex200 柱层析图像;D: Superdex200 柱层析纯化 HspB 电泳图。M: 标准蛋白 Marker; s: IPTG 诱导;c: 不加 IPTG 诱导;1: 全细胞裂解液;2: 离心后的沉淀;3: pET28a-*hspB* 诱导超声波裂解后的上清;4: Ni 柱平衡液洗涤;5: 50 mmol/L 咪唑洗脱;6: 80 mmol/L 咪唑洗脱;7: 200 mmol/L 咪唑洗脱;8: 500 mmol/L 咪唑洗脱;9: Superdex200 柱层析纯化后的 HspB 蛋白。

Note: A: Expression detection of HspB protein in small-scale; B: Ni²⁺ affinity chromatography of HspB protein; C: Spectrum of HspB protein by molecule sieve chromatography on Superdex200 column; D: Identification of purified HspB protein on Superdex200 column by SDS-PAGE. M: Standard protein marker; s: Induced by IPTG; c: Without IPTG; 1: WC; 2: Precipitate; 3: Supernatant of induced pET28a-*hspB* after sonication; 4: Wash by Ni²⁺ column balance fluid; 5: Elution by 50 mmol/L imidazole; 6: Elution by 80 mmol/L imidazole; 7: Elution by 200 mmol/L imidazole; 8: Elution by 500 mmol/L imidazole; 9: Purified HspB protein.

2.3 HspB 酶活测定结果

酶活测定结果显示,在对照组中(不加酶或底物),NADH 的吸光度值基本保持不变,而实验组中的 NADH 吸光度值下降(图 3),证明纯化获得的 HspB 有活性。进一步计算获得 HspB 的比活力(Specific Activity)为 227 nkat/mg,与前期从野生型菌株

中纯化获得的 HspB 比活力(212 nkat/mg)^[15]基本一致。

2.4 HspB 蛋白结晶条件初筛

经过大量的初筛条件筛选后, 在 Crystal Screen 2 试剂盒的第 32 种条件下有晶体生长, 条件为 0.1 mol/L NaCl、0.1 mol/L HEPES pH 7.5、1.6 mol/L (NH₄)₂SO₄、14 °C。晶体呈麦穗状, 细小且为孪晶(图 4A), 不适合 X-射线衍射数据收集, 需要做进一步的优化工作。

2.5 HspB 蛋白结晶条件优化

以 Crystal Screen 2 试剂盒的第 32 种条件为基础对结晶条件做进一步优化工作, 确定的最优生长条件是 0.2 mol/L NaCl、pH 7.5 的 0.1 mol/L HEPES、1.1 mol/L (NH₄)₂SO₄、4 °C、无添加剂、Seeding, 最终得到了在形状和大小上都有所改善的晶体。优化后的晶体呈长棍状, 多为单晶, 孪晶现象也稍有改善(图 4B)。

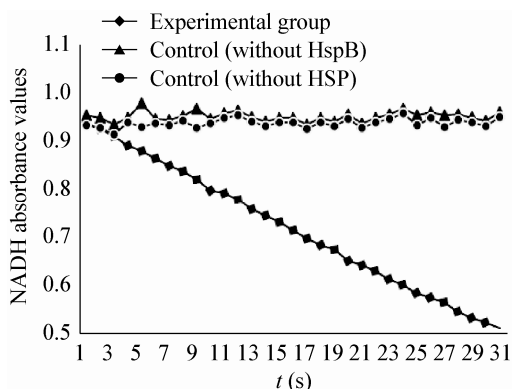


图 3 HspB 蛋白酶活测定

Figure 3 Enzymatic assay of recombinant HspB protein

注: ◆: 实验组, 反应体系是 1.0 mmol/L HSP, 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 μg HspB, 25 °C; ▲: 对照组(不加酶), 反应体系是 1.0 mmol/L HSP, 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25 °C; ●: 对照组(不加底物), 反应体系是 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 μg HspB, 25 °C。

Note: ◆: Experimental group, the assay mixture is composed of 1.0 mmol/L HSP, 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 μg HspB, 25 °C; ▲: Control (without HspB), the assay mixture is composed of 1.0 mmol/L HSP, 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25 °C; ●: Control (without HSP), the assay mixture is composed of 0.25 mmol/L NADH, 10 μmol/L FAD, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 μg HspB, 25 °C.

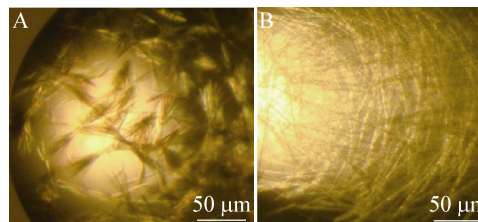


图 4 HspB 晶体(A)初筛得到的 HspB 晶体(B)结晶条件优化后得到的 HspB 晶体

Figure 4 Crystal of HspB (A) Crystal of HspB screened by Crystal kits (B) Crystal of HspB by optimizing

注: 图中标尺长度为 50 μm; A: 培养条件是 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 1.6 mol/L (NH₄)₂SO₄, 14 °C; B: 培养条件是 0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L HEPES pH 7.5, 1.1 mol/L (NH₄)₂SO₄, 4 °C, seeding.

Note: Scale length is 50 μm; A: Culture condition is 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 1.6 mol/L (NH₄)₂SO₄, 14 °C; B: Culture condition is 0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 1.1 mol/L (NH₄)₂SO₄, 4 °C, seeding.

3 讨论

结晶条件的初筛和优化需要大量纯度和浓度都较高的蛋白。前期实验是从野生型菌株(S16)中纯化 HspB。蛋白表达量低, 需要培养大量的菌体, 耗时耗材; 纯化的过程复杂, 操作难度大。本研究成功构建 pET28a-hspB 表达载体, 可以直接用金属螯合层析柱对蛋白进行纯化。此法操作简便, 所得蛋白纯度高、耗时短, 对蛋白活性影响较小。这使得对 HspB 进行结晶条件初筛和优化成为了可能。在蛋白纯化过程中发现, HspB 蛋白条带下有很多杂带, 杂带的存在可能对晶体的生长产生不利的影响。通过 Mono Q 阴离子交换层析, 仍没有去除杂带。分析可能是 HspB 自身发生降解而产生的条带, 通过增加缓冲液体系中 DTT 的浓度, 并且在纯化过程中不断向缓冲体系中补加 DTT; 尽量缩短纯化的时间; 纯化的全程在 4 °C 冷室完成, 最终使降解问题得到明显的改善, 成功纯化出达到结晶纯度的 HspB 蛋白, 见图 2。异源表达的蛋白经常会出现降解现象, HspB 蛋白的表达纯化可能对此类蛋白的异源纯化体系的构建有一定的参考价值。

通过以 Crystal Screen 2 试剂盒的第 32 种条件为基础的结晶条件优化工作, 确定了最优生长条件

是 0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L pH 7.5 HEPES, 1.1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 °C、无添加剂、Seeding, 该晶体在形状和大小上都有所改善, 但优化后晶体细小, 不适合在上海光源做 X-射线衍射。通过蛋白的折叠倾向性预测发现, HspB 蛋白在 C 端有超过 30 个氨基酸是非折叠区域, 而非折叠区域的存在可能对蛋白晶体的生长有不利影响, 因此尝试了一系列截短, 但是截短后的重组蛋白都形成了包涵体(数据未显示)。有研究证明, 底物的存在可能有利于晶体生长, 所以下一步也可以尝试底物共结晶法^[23], 对晶体做进一步的优化。组氨酸标签的存在对晶体的生长可能也有影响, 下一步也可以考虑切除组氨酸标签后再进行晶体的培养。在后期的晶体培养中可优先考虑在已经获得的条件下进行晶体的培养, 这可以大大缩短时间, 并提高晶体生长的可能性。

利用结构生物学的方法研究蛋白结构和功能的关系, 在此基础上对尼古丁降解途径中的酶进行定向进化等基因操作, 或可以大幅度地提高催化效率或可以改变其底物催化特异性。这不仅对于尼古丁代谢途径的研究具有重要的意义, 同时还可能有固定化以及工业化应用的前景, 从而充分发挥微生物降解尼古丁的应用价值, 更大程度地降低尼古丁的含量, 为人们身体健康和环境保护做出贡献。本研究对尼古丁降解途径中的关键酶(HspB)进行了晶体学的初步研究, 并得到了可培养 HspB 晶体的条件。这为 HspB 晶体的进一步优化, 并最终解析其三维空间结构, 从而揭示其结构与功能关系奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Schievelbein H. Smoking and preventive medicine[J]. *Offentl Gesundheitswes*, 1982, 44(11): 712-717.
- [2] Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91(14): 1194-1210.
- [3] Hecht SS, Hochalter JB, Villalta PW, et al. 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97(23): 12493-12497.
- [4] Peele DM, Riddick MG, Edwards ME, et al. Formation of tobacco specific nitrosamines in flue-cured tobacco[J]. *Recent Advances in Tobacco Science*, 1999, 27: 3-12.
- [5] Campain JA. Nicotine: Potentially a Multifunctional Carcinogen?[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 79(1): 1-3.

- [6] Novotny TE, Zhao F. Consumption and production waste: another externality of tobacco use[J]. *Tobacco Control*, 1999, 8(1): 75-80.
- [7] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms[J]. *Waste Management & Research*, 1997, 15(4): 349-358.
- [8] Wada E, Yamasaki K. Mechanism of microbial degradation of nicotine[J]. *Science*, 1953, 117(3033): 152-153.
- [9] Chen CM, Li XM, Yang JK, et al. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(3): 226-231.
- [10] Eberhardt HJ, Hans-Jochen E. The biological degradation of nicotine by nicotinophilic microorganism[J]. *Beitrag Zur Tabakforschung International*, 1995, 16(3): 119-129.
- [11] Wang SN, Xu P, Tang HZ, et al. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(19): 1493-1496.
- [12] Wang SN, Liu Z, Tang HZ, et al. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16[J]. *Microbiology*, 2007, 153(5): 1556-1565.
- [13] Wang SN, Xu P, Tang HZ, et al. 'Green' route to 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine from (S)-nicotine of tobacco waste by whole cells of a *Pseudomonas* sp.[J]. *Environmental Science Technology*, 2005, 39: 6877-6880.
- [14] Tang HZ, Wang LJ, Wang WW, et al. Systematic unraveling of the unsolved pathway of nicotine degradation in *Pseudomonas*[J]. *Public Library of Science Genetics*, 2013, 9(10): e1003923.
- [15] Tang HZ, Yao YX, Zhang DK, et al. A novel NADH-dependent and FAD-containing hydroxylase is crucial for nicotine degradation by *Pseudomonas putida*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 39179-39187.
- [16] Chayen NE, Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 147-153.
- [17] Gilliland GL. Biological macromolecule crystallization database[J]. *Methods in Enzymology*, 1997, 277: 546-556.
- [18] Kantardjieff KA, Rupp B. Protein isoelectric point as a predictor for increased crystallization screening efficiency[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(14): 2162-2168.
- [19] Zhu DW, Garneau A, Mazumdar M, et al. Attempts to rationalize protein crystallization using relative crystallizability[J]. *Journal of Structural Biology*, 2006, 154(3): 297-302.
- [20] McPherson A, Nguyen C, Larson SB, et al. Development of an alternative approach to protein crystallization[J]. *Journal of Structural Functional Genomics*, 2007, 8(4): 193-198.
- [21] Cudney R, Patel S, Weisgraber K, et al. Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth[J]. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1994, 50(Pt 4): 414-423.
- [22] Bergfors T. Seeds to crystals[J]. *Journal of Structural Biology*, 2003, 142(1): 66-76.
- [23] Schartman RR. On the thermodynamics of cocrystal formation[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 365(1/2): 77-80.