

磷酸三酯酶突变体H23A的真核表达及性质表征

詹冬玲¹, 任玉雪¹, 李克剑², 闵伟红¹, 刘 洋³, 张英文¹, 刘景圣^{1,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 中油吉化集团总医院药剂科, 吉林 吉林 132022;

3. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘 要: 通过同源序列比对和晶体结构分析, 嗜热菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 磷酸三酯酶的 H23 位点高度保守, 并且位于金属离子结合位点附近。结合 Rosetta design 程序设计, 本实验将突变体 H23A 在毕赤酵母 GS115 中高效表达。通过组氨酸标签镍柱分离纯化、非变性蛋白电泳和 Western blotting 鉴定表达产物, 证明该突变体酶主要是以介于单体和二聚体之间的寡聚形式存在。初步酶学性质研究表明, 突变体酶是别构酶, V_{\max} 为 92.45 U/mg, Hill 系数 h 为 1.98; 最适温度为 70℃, 最适 pH 值为 10.0; 70℃ 的热稳定性良好, 半衰期为 5.1 h, 而且大多数二价金属离子对突变体 H23A 都有激活作用。

关键词: 磷酸三酯酶; 突变体; 真核表达; 性质

Eukaryotic Expression and Characterization of the Mutant H23A of Phosphotriesterase

ZHAN Dong-ling¹, REN Yu-xue¹, LI Ke-jian², MIN Wei-hong¹, LIU Yang³, ZHANG Ying-wen¹, LIU Jing-sheng^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Pharmacological Department, General Hospital of China National Petroleum Corporation in Jilin, Jilin 132022, China; 3. College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: Through homologous sequence alignment and crystal structure analysis, it's found that the site of histidine 23 (H23) from the phosphotriesterase (PTE)-encoding gene of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 PTE was highly conservative and was located near the metal ion binding sites. By using the Rosetta design program, the mutant H23A was overexpressed in *Pichia pastoris* GS115. Through His-tagged ni-sepharose chromatography, non-denaturing electrophoresis and western-blotting, the recombinant enzyme was identified as an intermediate form between a monomer and a dimer. The primary enzymatic properties indicated that the expressed recombinant enzyme was an allosteric enzyme with V_{\max} and hill coefficient (h) of 92.45 U/mg and 1.98, respectively. The optimal temperature and pH were 70 °C and 10.0, respectively. The recombinant PYE enzyme had a better heat tolerance with half-time of 5.1 h. Most divalent metal ions showed activating effects on the enzyme activity.

Key words: phosphotriesterase (PTE); mutant; eukaryotic expression; properties

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0250-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323051

有机磷农药是一类用于防治植物病、虫、害, 含有机磷的有机化合物, 是目前农业生产中不可缺少的一个主要成员。这类农药品种多、药效高、用途广, 并且在人、畜体内容易分解, 一般不会造成药物残留。但由于有机磷农药的连续和过量使用, 使得多数地区的土壤和水资源都被有机磷农药所污染, 严重威胁着人类的生存和健康。这使得有机磷残留成为我国食物中农药残留最突出的问题, 有机磷农药对食品的污染比 DDT 还要严重^[1]。据世界卫生组织估计, 在全球范围内, 每年大约有 300 万农药

中毒事件发生, 这将导致 22 万人死亡^[2]。有机磷农药中毒的机理, 一般认为是使胆碱酯酶的活性受到抑制, 从而导致乙酰胆碱的大量积聚, 引起器官功能发生障碍, 导致人神经过分刺激, 冲动不能休止, 最终出现神经功能紊乱, 机体痉挛、瘫痪等一系列神经中毒症状, 甚至死亡。

目前降解有机磷农药残留的方法有超声波、吸附、洗涤和辐照等物理方法, 水解、氧化分解和光化学降解等化学方法, 微生物、降解酶和工程菌等生物方法^[3]。但物理方法和化学方法由于降解效率低、二次污染严重以

收稿日期: 2013-08-05

基金项目: 吉林农业大学博士启动基金项目(201223); 国家自然科学基金项目(31070638); 吉林省自然科学基金项目(20105109)

作者简介: 詹冬玲(1977—), 女, 讲师, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学的研究。E-mail: zdlgale@126.com

*通信作者: 刘景圣(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事功能食品的研究。E-mail: liujjs1007@vip.sina.com.cn

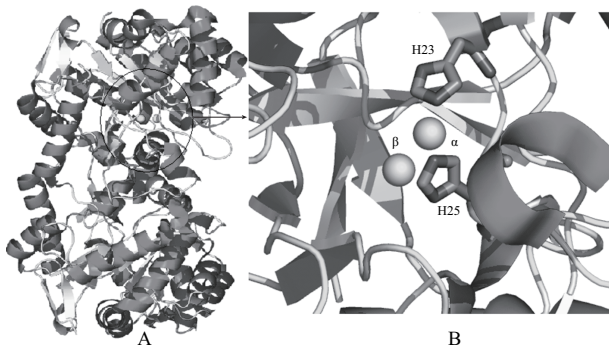
及对人体产生额外毒害等问题,都不能用来降解有机磷农药。微生物降解法中的酶降解法以其高效、稳定、成本低等优势而倍受人们青睐。有机磷农药降解酶,又称磷酸三酯酶(PTE),主要通过水解有机磷农药分子中的磷酸键而使其脱毒。因其水解产物具有比有机磷杀虫剂更强的极性,所以无法在脂肪组织中聚集,可随体液排出体外。与其他的嗜热酶在工业生产上表现出的优势一样,嗜热磷酸三酯酶具有的较高热稳定性以及可溶性使其在实际的工业应用中能够抵抗苛刻的工业生产条件,因而具有更好的应用潜力^[4-6]。

| | |
|-------|---|
| His23 | |
| GK | AEMVEIVCGFVPVQLGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGRTFREDESRVAVEAEKMKR59 |
| GSP | AKTVEIVLGPVPEQLGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGRTFREDEALRVAVEAEKMKR59 |
| GT | ARMVEIVVGPVAADQLGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGHPFRENEALCVAI EAEKMKR59 |
| GC | KKGVEIVCGFVPASELGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGPLRFEEALAEAGI EAEKMKR60 |
| HH | GMVEIVLGPLETEKLGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGGDFEKKRQGI EAEKMKR58 |
| TS | GRITVIVTGPVRPELGKTLIEHEHIFGYPGFGDVTGAPYDRQRAIEVGLDARRVA59 |
| DR | TAQTVGAAALGATLPHEHIFGYPGYAGVTLGPFDDHAAALASCTETARALLARG59 |
| BS | QITVTGELAPELGKTLIEHEHIFDYAGFGDRTLAGRSIETLIEEASRAAI MKK57 |
| | |
| GK | HGI QTVDPPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD119 |
| GSP | HGI QTVDPPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD119 |
| GT | HGI QTVDPPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD119 |
| GC | HGI QTVDPPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD120 |
| HH | QGVETVDPPTNECGRDVRLCAVSEDTGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD118 |
| TS | CGVETVDPPTNECGRDVRLCAVSEDTGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD119 |
| DR | I QTVDPPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD119 |
| BS | HGVKTVDPTNDCGRNPAFLRRVAEETGLN I CATGYYYEGGAPPMECFRRLGTAD117 |
| | |
| GK | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ179 |
| GSP | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ179 |
| GT | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ179 |
| GC | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ180 |
| HH | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ178 |
| TS | DI YDMFNAELTEGI ADTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ179 |
| DR | YEMRTEVTEGI AGTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ179 |
| BS | DI YDLKTEVTEGI AGTGI RAGVI KLASCKGRI TEYKMFRAAARAKETGAVI IHTQ177 |

GK. *Geobacillus kaustophilus* HTA426, GI:56378377; Gsp. *Geobacillus stearothermophilus*, GI:256032579, 同源性98%; GT. *Geobacillus thermodenitrificans*, GI:138895019, 同源性90%; GC. *Geobacillus caldoolysilyticus*, GI:516006891, 同源性79%; HH. *Halobacillus halophilus* DSM 2266, GI:386712830, 同源性63%; TS. *Thermaerobacter subterraneus*, GI:493959747, 同源性62%; DR. *Deinococcus radiodurans* R1, GI:15805954, 同源性60%; BS. *Bacillus smithii*, GI:489448222, 同源性58%。

图1 磷酸三酯酶的同源序列比对

Fig.1 A portion of the multiple sequence alignment of PTE of GK with other homologous proteins



A. 嗜热菌GK的晶体结构; B. 金属离子结合位点。Zn阳离子标注为α和β。

图2 磷酸三酯酶突变位点His(H)23的局部立体结构

Fig.2 Stereoscopic view of His(H)23 mutation

由图1可知,嗜热菌*G. kaustophilus* HTA426磷酸三酯酶的H23位点在磷酸三酯酶家族中高度保守,并且从

晶体结构图2可以看出,H23位点位于金属离子结合位点附近,因此选择H23位点作为研究对象。基于蛋白质折叠的原理,提高现有蛋白质的稳定性,本实验采用Rosetta design程序做定点突变设计^[7],最后得到嗜热菌*G. kaustophilus* HTA426磷酸三酯酶H23A这个突变体,将此突变体基因在酵母GS115中进行诱导表达,并对其酶学性质进行初步的研究,旨在为新型的有机磷水解酶的工业生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜热菌*Geobacillus kaustophilus* HTA426 德国菌种保藏中心;酵母GS115及质粒pPICZα 吉林农业大学食品科学实验室。

引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,测序是由华大基因研究中心完成;DNA提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 日本TaKaRa公司;细菌基因组提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *G. kaustophilus* HTA426基因组DNA的提取

根据细菌基因组提取试剂盒中的操作方法进行嗜热菌*G. kaustophilus* HTA426基因组DNA的提取。通过0.8g/100mL琼脂糖凝胶电泳凝胶对*G. kaustophilus* HTA426基因组DNA的纯度和浓度进行检测。将剩余的基因组DNA放入-20℃保存,待用。

1.2.2 磷酸三酯酶和突变体基因的扩增

根据*G. kaustophilus* HTA426的基因组核酸序列设计上游、下游引物(表1),其中加粗部分分别代表EcoR I和Xba I的酶切位点和磷酸三酯酶H23A的突变位点。以*G. kaustophilus* HTA426基因组DNA作为模板,通过上下游引物对PTE基因进行PCR扩增,回收PCR产物并进行测序验证,再以磷酸三酯酶基因为模板,进行突变体H23A基因的扩增,反应体系及方法参照文献[8]。其PCR产物通过1.5g/100mL的琼脂糖凝胶电泳检测并测序,剩余目的基因片段保存至-20℃。

表1 磷酸三酯酶及突变体的引物序列

Table 1 The primer sequences of phosphotriesterase and its mutant

| 引物名称 | 引物序列 |
|----------|-------------------------------|
| 上游引物 | 5'-CGGAATTCATGGCGGAGATGGTA-3' |
| 下游引物 | 5'-ATCTAGATAACCGGATTGCCGAT-3' |
| H23A上游引物 | 5'-GGAAATGCTCGCGCATGAGCG-3' |
| H23A下游引物 | 5'-CGCTCATCGCCGAGCATTTCCTC-3' |

1.2.3 突变体H23A表达质粒的构建

将突变体H23A的PCR产物进行1.5g/100mL的核酸

凝胶电泳检测。电泳结束后采用DNA胶回收试剂盒进行PCR产物的回收,进行序列分析。将已知碱基序列的目的基因和质粒pPICZαA分别进行EcoRI和Xba I双酶切,然后将两种产物进行连接。连接反应在16℃过夜进行。

1.2.4 酵母转化

将GS115菌液以体积分数1%的比例接种于5mL YPD液体培养基中,30℃过夜培养。然后按体积分数0.5%接种于500mL YPD液体培养基中,30℃逐级放大培养,当OD_{600nm}值介于1.6~1.8之间时,离心取沉淀菌体,用400mL预冷的无菌水悬浮菌体。再次离心后将菌体重悬于15mL预冷的山梨醇(1mol/L)溶液中。最后离心后将菌体重悬于1mL预冷的山梨醇(1mol/L)溶液中,置于冰上,即感受态GS115。将携带突变体H23A基因的重载体pPICZαA-H 23A用SacI酶切,线性化的重组质粒pPICZαA-H23A通过电击池电击进入GS115细胞内,迅速加入1mL预冷的山梨醇溶液到电击池内,充分混匀后将液体转到EP管内,30℃静止培养3~4h。将菌液涂布于含抗生素Zeocin(100μg/mL)的YPDS固体培养基上,30℃静止培养2~4d。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达及纯化^[8-9]

将1%重组酵母接种于250mL的BMGY培养基(1g/100mL酵母粉、2g/100mL蛋白胨、1.34g/100mL酵母氮碱、4×10⁻⁵g/100mL生物素、1%甘油、100mmol/L磷酸缓冲液pH6.0)中,在30℃、200r/min条件下培养60h;菌体以4000r/min离心沉淀5min,转移入100mL的BMMY培养基(1g/100mL酵母粉、2g/100mL蛋白胨、1.34g/100mL酵母氮碱、4×10⁻⁵g/100mL生物素、100mmol/L磷酸缓冲液pH6.0,0.5%甲醇),以上述条件继续培养72h,在此期间,每隔24h添加1mL甲醇,对其诱导表达并每隔12h测定其活性。培养结束后离心培养液,取上清液,然后经镍柱纯化,收集蛋白峰,测定酶活力。

1.2.6 磷酸三酯酶鉴定及酶活力测定

纯化后得到的突变体酶液通过SDS-PAGE和Western blotting实验进行分析。方法参见文献[10-11]。以甲基对氧磷(methyl-paraoxon)为底物,通过分光光度法对磷酸三酯酶活力进行测定。通过测定水解产物对硝基酚在405nm波长处的光密度值(OD_{405nm})变化,反应体系为2mL,缓冲体系为20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0),甲基对氧磷的终浓度为0.1mmol/L,加入适量的突变体酶液,在70℃反应20min,利用分光光度计检测单位时间内的光密度值,空白对照为反应体系中不加酶。1U定义为每20min催化水解1μmol底物所需要的酶量。酶的比活力计算公式如下。

$$\text{酶活力}/(\text{U}/\text{mg}) = \frac{\Delta \text{OD}_{405\text{nm}} \times V_1}{t \times \varepsilon \times \rho \times V_2}$$

式中: V_1 为反应体系体积,取2mL; ε 为消光系数(0.016L/μmol); t 为反应时间/min; V_2 为加酶量/mL; ρ 为酶液质量浓度/(mg/mL)。

重组酶动力学检测以甲基对氧磷为底物,在70℃、20mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0),0~400μmol/L底物浓度范围内检测酶活力。每次做3个平行实验。以Hill方程

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K' + [S]^b}$$

进行非线性拟合。

1.2.7 最适pH值及温度的测定

在30~90℃温度范围内对突变体H23A进行磷酸三酯酶活力测定,观察温度与酶活力之间的相关性,从而得出最适温度。在最适温度条件下,在pH4~12范围内对突变体H23A进行磷酸三酯酶活力测定^[8],观察pH值与酶活力之间的相关性,从而得出最适pH值。

1.2.8 热稳定性测定

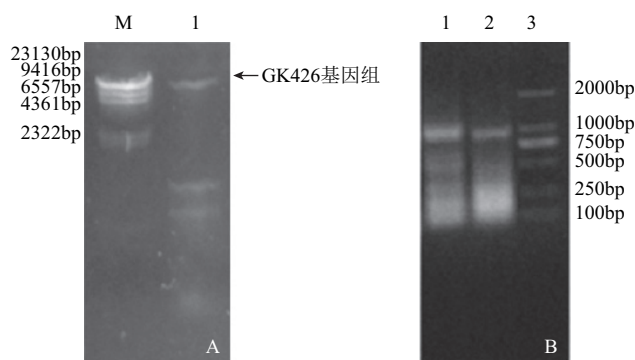
将纯化的突变体H23A酶液置于70℃水浴中,用石蜡油封顶,每间隔1h取1次突变体酶液进行活力测定。每次做3个平行实验。

1.2.9 金属离子对突变体H23A的影响

在反应体系中添加不同浓度的金属离子,分别是0.2、0.5、1.0、2.0mmol/L的Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺8种金属离子,加入金属离子后,于室温静置1h,混匀后进行酶活力检测,每次做3个平行实验。

2 结果与分析

2.1 磷酸三酯酶突变体H23A重组菌的构建



A. *G. kaustophilus* HTA426基因组DNA的提取; B. 磷酸三酯酶野生型及突变体H23A基因的PCR扩增;图A中, M. HindIII Marker; 1. GK基因组;图B中, 1. 野生型PTE; 2. 突变体H23A; 3. DL2000 Marker。

图3 突变体H23A基因的提取及PCR扩增

Fig.3 Extraction and PCR amplification of mutant H23A gene

由图3A可知,将嗜热菌*G. kaustophilus* HTA426基因组作为模板,通过设定的引物进行PCR法扩增,得到磷酸三酯酶目的基因,纯化PCR产物作为H23A突变体PCR反应的模板,从而得到突变体H23A基因(图3B),即1000bp左右的目的基因。

将纯化后的突变体H23A基因连接到pPICZαA表达载体,进一步获取磷酸三酯酶突变体H23A的重组表达质粒pPICZαA-H23A(图4A)。将突变体重组质粒转化到毕赤酵母GS115细胞中,进行30℃培养过夜。以酵母菌液为模板,再次进行PCR扩增鉴定。将得到的目的基因片段送去测序,测序结果证实H23A突变体重组质粒已转入真核表达宿主细胞中。

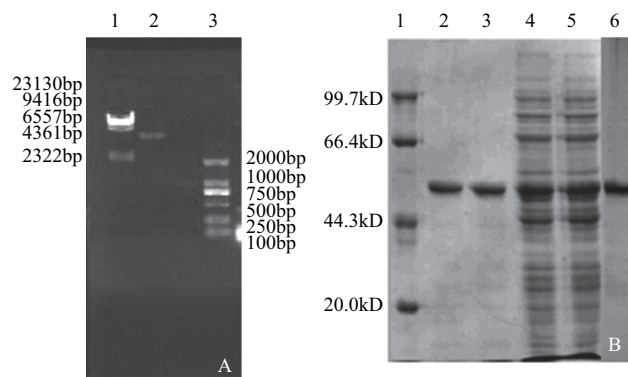


图4 突变体H23A的分离纯化
A. 突变体H23A重组质粒的鉴定; B. 野生型和突变体H23A的10g/100mL非变性蛋白电泳和免疫印迹; 图A中, 1. HindIII Marker; 2. 经SacI消化后的H23A重组质粒; 3. DL2000 Marker; 图B中, 1. 高分子质量蛋白标记物; 2. Ni柱纯化后的野生型酶液; 3. Ni柱纯化后的突变体酶液; 4. 野生型粗酶液; 5. 突变体粗酶液; 6. 突变体H23A免疫印迹。

图4 突变体H23A的分离纯化
Fig.4 Separation and purification of mutant H23A

2.2 突变体H23A重组蛋白的表达与纯化

突变体H23A在毕赤酵母中高效表达,经过分离纯化后纯酶含量为171mg/L。本实验磷酸三酯酶分子质量经http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html预测为39941.51D。如图4B所示,突变体H23A重组蛋白经过镍柱分离纯化后,非变性电泳结果显示得到分子质量约为50kD的蛋白。这基本与Merone等^[5]的实验结果相符,即来自古菌*Sulfolobus solfataricus*的磷酸三酯酶在溶液中还有一种介于单体和二聚体之间的活性形式存在(50kD, 单体35kD)。这可能是因为在溶液中单体和二聚体之间存在动态平衡。实验的Western blotting(图4B)免疫印迹结果与之相符,说明突变体H23A在溶液是以介于单体和二聚体之间的形式存在。但Elena等^[12]的研究表明,磷酸三酯酶以寡聚体形式存在,但在溶液中的主要形式是二聚体。

2.3 野生型和突变体H23A的动力学曲线

以甲基对氧磷为底物,在0~400μmol/L范围内,通过分光光度计进行酶活力测定。通过Origin75软件,野生型和突变体H23A动力学数据进行动力学曲线拟合,结果如图5所示。动力学曲线拟合符合Hill方程,即
$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K' + [S]^h}$$
磷酸三酯酶是典型的别构酶。对野生型PTE而言, Hill系数 h 为1.82, V_{\max} 为71.25U/mg,具有明

显的正协同效应;突变体H23A的 V_{\max} 是92.45U/mg, h 为1.98。突变体H23A的正协同性略有提高,所以活力提高了0.3倍。

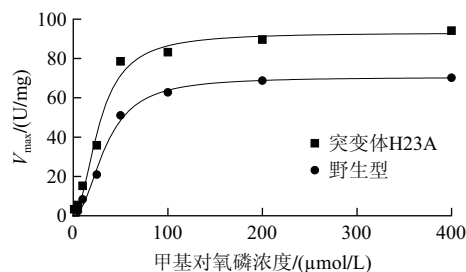


图5 野生型和突变体的动力学曲线
Fig.5 Kinetic curves of wild type and mutant H23A with methyl-paraoxon as substrate

2.4 最适温度与pH值

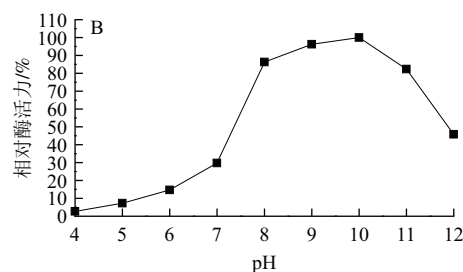
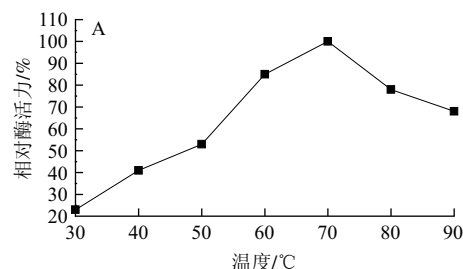


图6 突变体H23A的最适温度(A)和pH值(B)
Fig.6 Optimal temperature (A) and pH (B) for mutant H23A

一种有机磷水解酶可以降解许多有机磷农药(底物),但大多数底物的结构都是相似的,只有其取代基不同而已^[13-14]。由图6可知,突变体H23A的最适温度是70℃,是一个典型的嗜热酶,目前研究比较透彻的是来源于嗜热菌*Pseudomonas diminuta*的磷酸三酯酶(pdPTE),其最适温度为60℃^[15-18]。在50~90℃温度范围内,H23A酶的相对酶活力都保持在50%以上;而低于50℃时,相对酶活力都低于50%,这与野生型磷酸三酯酶的最适温度一致(数据未显示),可能是因为突变位点H23位于金属离子的结合位点,并未影响到寡聚体亚基间的聚合,从而最适温度未发生改变。

在70℃进行最适pH值检测, pH值范围是4~12。由

图6可知, 突变体H23A的最适pH值是10.0, 这个数值高于pdPTE(最适pH值为9)^[19]。但是在pH8.0、9.0和11.0时, 相对酶活力均保持在80%以上, 这说明突变体是一个典型的碱性磷酸三酯酶。虽然其最适pH值与野生型(数据未显示)一致, 但是野生型在pH8.0和11.0时, 相对酶活力都低于80%, 只有pH9.0时相对活力高于80%。H23A的pH值稳定性明显优于pdPTE, 后者在pH值低于6时完全失活, 在pH7.5时只有50%的活力。这说明突变体H23A影响了酶活性中心的微环境, 从而使高活性的pH值范围增大。

2.5 热稳定性

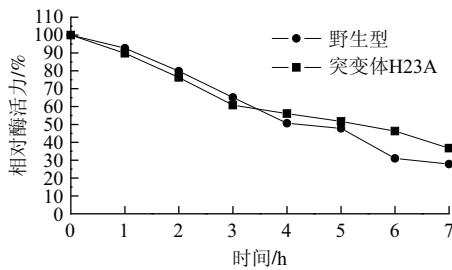


图7 野生型和突变体H23A的热稳定性

Fig.7 Thermostability curves of wild type and mutant H23A

图7为70℃、pH10.0条件下野生型和突变体H23A的相对酶活力与时间变化的关系, 在70℃, 野生型的半衰期为4h, 突变体H23A的半衰期为5.1h, 这充分体现了嗜热磷酸三酯酶在高温下的良好热稳定性。这与大多数来源于高温菌的酶热稳定性良好相一致^[20-23], 例外是pdPTE热稳定性在35~60℃逐渐消失, 在60℃的条件下完全失活^[24-25]。突变体H23A的稳定性提高可能是在溶液中空间结构比野生型更紧凑些, 对热抗性好, 不易引起蛋白质变性, 因而半衰期时间延长, 这为新型高温酶的筛选奠定基础。

2.6 金属离子对突变体H23A的影响

表2 金属离子对突变体H23A酶活力的影响
Table 2 Effects of metal ions on the activity of mutant H23A

| 金属离子 | 相对酶活力/% | | | |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0.2mmol/L | 0.5mmol/L | 1.0mmol/L | 2.0mmol/L |
| CaCl ₂ | 201.37±1.91 | 189.28±1.54 | 159.71±0.98 | 98.54±1.01 |
| ZnSO ₄ | 135.84±0.94 | 174.13±1.31 | 193.21±1.27 | 253.94±1.89 |
| CuSO ₄ | 77.83±0.84 | 121.15±1.24 | 151.21±1.31 | 183.14±1.71 |
| BaCl ₂ | 47.24±0.97 | 78.21±0.83 | 91.29±1.04 | 178.63±2.08 |
| CoCl ₂ | 99.87±0.91 | 149.31±1.41 | 179.13±1.52 | 221.77±2.09 |
| MnSO ₄ | 97.54±1.02 | 113.81±0.76 | 143.41±1.38 | 167.47±1.47 |
| MgCl ₂ | 234.81±1.98 | 209.51±1.84 | 108.52±1.05 | 68.31±0.99 |
| NiSO ₄ | 119.27±0.71 | 109.21±1.37 | 94.58±1.19 | 59.61±1.11 |

磷酸三酯酶是金属酶, 其活性中心有二价金属离子的结合位点, 因而其活性受金属离子的影响。本研究探讨了部分二价金属离子对突变体H23A酶活的影响, 其变化趋势基本与野生型相符(数据未显示), 结果见表2。随着离子浓

度的增加, Zn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ba²⁺和Mn²⁺对突变体H23A的激活作用也随之增强; 但对Ca²⁺、Mg²⁺和Ni²⁺而言, 在低离子强度(0.2mmol/L)时, 对突变体H23A的酶活力有明显的激活作用, 随着离子强度的增加, 对酶的作用由激活转变成抑制作用。但所有的二价金属离子在某一浓度条件下都对酶有激活作用, 这与Omburo等^[17]的研究结果基本相符, 即二价金属离子对磷酸三酯酶有激活作用。

3 结 论

本研究将来源于嗜热菌*Geobacillus kaustophilus* HTA426的突变体H23A磷酸三酯酶成功在毕赤酵母GS115中高效表达, 并由非变性蛋白电泳和Western blotting得到验证。突变体H23A的最适温度是70℃, 最适pH值为10.0, 半衰期是5.1h。大多数二价金属离子对H23A的酶活力都呈现激活作用。这为开发新型嗜热酶及酶的极端环境应用提供参考。

参考文献:

[1] MERONE L, MANDRICH L, PORZIO E, et al. Improving the promiscuous nerve agent hydrolase activity of a thermostable archaeal lactonase[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(23): 9204-9212.

[2] AUBERT S D, LI Y, RAUSHEL F M. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(19): 5707-5715.

[3] 裴亮, 张体彬, 赵楠, 等. 有机磷农药降解方法及应用研究新进展[J]. *环境工程*, 2011(增刊1): 273-277.

[4] CLAIRE V, GREGORY J Z. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1):1-43.

[5] MERONE L, MANDRICH L, ROSSI M, et al. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties[J]. *Extremophiles*, 2005, 9(4): 297-305.

[6] HORNE I, SUTHERLAND T D, OAKESHOTT J G, et al. Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilii* C11[J]. *Microbiology*, 2002, 148(9): 2687-2695.

[7] SIMONS K T, BONNEAU R, RUCZINSKI I, et al. Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA[J]. *Proteins*, 1999(Suppl 3): 171-176.

[8] 詹冬玲, 白挨玺, 白鹤, 等. 嗜热菌*Pyrococcus horikoshii* OT3蛋白酶基因的原核表达、纯化和性质表征[J]. *吉林大学学报: 理学版*, 2010, 48(6): 1065-1069.

[9] 康伟, 王智, 詹冬玲, 等. 黑曲霉NRRL3135菌株植酸酶基因在毕赤酵母GS115系统中的表达[J]. *吉林农业大学学报*, 2011, 30(3): 25-28.

[10] HALIO S B, BLUMENTALS I I, SHORT S A, et al. Sequence, expression in *Escherichia coli*, and analysis of the gene encoding a novel intracellular protease (PfpI) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (9): 2605-2612.

[11] HALIO S B, BAUER M W, MUKUND S, et al. Purification and characterization of two functional forms of intracellular protease PfpI from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. *Applied*

- and Environmental Microbiology, 1997, 63(1): 289-295.
- [12] ELENA P, LUIGIA M, LUIGI M, et al. A new phosphotriesterase from *Sulfolobus acidocaldarius* and its comparison with the homologue from *Sulfolobus solfataricus*[J]. Biochimie, 2007, 89(5): 625-636.
- [13] RAUSHEL F M, HOLDEN H M. Phosphotriesterase: an enzyme in search of its natural substrate[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 2000, 74: 51-93.
- [14] BENNING M M, HONG S B, RAUSHEL F M, et al. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(39): 30556-30560.
- [15] BENNING M M, KUO J M, RAUSHEL F M, et al. Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents[J]. Biochemistry, 1994, 33(50): 15001-15007.
- [16] BENNING M M, KUO J M, RAUSHEL F M, et al. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase[J]. Biochemistry, 1995, 34(25): 7973-7978.
- [17] OMBURO G A, KUO J M, MULLINS L S, et al. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(19): 13278-13283.
- [18] DUMAS D P, CALDWELL S R, WILD J R, et al. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*[J]. Journal Biological Chemistry, 1989, 264(33): 19659-19665.
- [19] ROCHU D, VIGUIE N, RENAULT F, et al. Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence[J]. Biochemical Journal, 2004, 380(Pt3): 627-633.
- [20] ROCHU D, BEAUFET N, RENAULT F, et al. The wild type bacterial $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ -phosphotriesterase shows a middle-range thermostability[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594(2): 207-218.
- [21] LASA I, BERENGUER J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential[J]. Microbiologia, 1993, 9(2): 77-89.
- [22] FUJIWARA S. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(6): 518-525.
- [23] HAWWA R, AIKENS J, TURNER R J, et al. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 488: 109-120.
- [24] BLOOM J D, LABTHAVIKUL S T, OTEY C R, et al. Protein stability promotes evolvability[J]. Proceedings of National Academy of Sciences, 2006, 103(15): 5869-5874.
- [25] MUTHAIAH U, GOVINDASARNY M. Metallo- β -lactarnase and phosphotriesterase activities of some zinc(II) complexes[J]. Inorganica Chimica Acta, 2011, 372: 353-361.