

毕赤酵母高效间接表面展示系统的构建及在固定有机磷水解酶上的应用

赵梓萱^{1#}, 王淋^{1#}, 王艳丽¹, 袁慧¹, 贺妮莎¹, 张桂敏², 周玉玲^{1*}

1 湖北大学 生命科学学院, 湖北 武汉

2 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京

赵梓萱, 王淋, 王艳丽, 袁慧, 贺妮莎, 张桂敏, 周玉玲. 毕赤酵母高效间接表面展示系统的构建及在固定有机磷水解酶上的应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4014-4028.

ZHAO Zixuan, WANG Lin, WANG Yanli, YUAN Hui, HE Nisha, ZHANG Guimin, ZHOU Yuling. An efficient indirect surface display system in *Pichia pastoris*: construction and application in immobilization of organophosphorus hydrolase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 4014-4028.

摘要: 【目的】通过毕赤酵母表面展示技术, 利用 SpyCatcher/SpyTag (SpyC/SpyT)生物偶联体系固定有机磷水解酶(organophosphorus hydrolase, OPH), 以解决 OPH 在实际应用中稳定性差和重复利用率低的问题, 为有机磷农药污染的生物修复提供新方法。【方法】在毕赤酵母表面展示“诱饵蛋白” SpyCatcher (SpyC), 通过增加拷贝数和优化培养条件提高展示效率。通过酶学性质分析评估固定化 OPH 的热稳定性、pH 稳定性及重复使用性能, 并考察其对基于 SpyC/SpyT 的特异性相互作用, 将 OPH-SpyTag (OPH-SpyT)高效展示于毕赤酵母表面。甲基对硫磷、乐果和毒死蜱 3 种有机磷农药的水解效率。【结果】毕赤酵母表面展示 SpyC 的效率超过(97.0±0.40)%, 优化后湿细胞可结合绿色荧光蛋白(21.4±0.7) mg/g。成功将 OPH 展示于细胞表面, 固定化 OPH 的热稳定性和 pH 稳定性显著提高, 重复使用 5 次后仍保留 50% 以上的活力。在最适条件下, 对 100 mg/L 甲基对硫磷、乐果和毒死蜱这 3 种有机磷农药的水解率分别达到(96.5±2.7)%、(79.5±2.3)%和(82.6±2.8)%, 表明该方法对某些有机磷农药具有较高的水解效率。【结论】SpyC/SpyT 生物偶联体系的毕赤酵母表面展示技术可有效固定 OPH, 显著提升其稳定性和重复使用性能, 为有机磷农药污染的生物修复提供了高效、绿色的新途径, 也为毕赤酵母表面展示相关领域的研究提供了有力工具和方法。

关键词: SpyCatcher/SpyTag; 毕赤酵母; 间接表面展示; 有机磷水解酶

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2106000); 湖北省杰出青年基金(2023AFA071)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2106000) and the Outstanding Youth Fund of Hubei Province (2023AFA071).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-27-88663882, E-mail: zyl609@hubu.edu.cn

Received: 2025-02-21; Accepted: 2025-05-05; Published online: 2025-06-19

An efficient indirect surface display system in *Pichia pastoris*: construction and application in immobilization of organophosphorus hydrolase

ZHAO Zixuan^{1#}, WANG Lin^{1#}, WANG Yanli¹, YUAN Hui¹, HE Nisha¹, ZHANG Guimin², ZHOU Yuling^{1*}

1 School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan, Hubei, China

2 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, China

Abstract: [Objective] To develop an efficient catalyst for organophosphorus pesticide degradation by immobilizing organophosphorus hydrolase (OPH) on the surface of *Pichia pastoris* via the SpyCatcher/SpyTag (SpyC/SpyT) system, addressing the poor stability and low reusability of OPH in practical applications and providing a new method for the bioremediation of organophosphorus pesticide pollution. [Methods] The “bait protein” SpyCatcher (SpyC) was first displayed on the surface of *P. pastoris*, and the display efficiency was increased by increasing the copy number and optimizing the culture conditions. Then based on the specific interaction between SpyC and SpyT, OPH-SpyTag (OPH-SpyT) was efficiently displayed on the yeast surface. The thermal stability, pH stability, and reusability of immobilized OPH were evaluated, and the hydrolysis efficiency of immobilized OPH against methyl parathion, dimethoate, and chlorpyrifos was assessed. [Results] The display efficiency of SpyC on the *P. pastoris* surface reached over (97.0±0.4)%, with an optimized binding capacity of (21.4±0.7) mg green fluorescent protein for 1 g wet cells. OPH was successfully displayed on the cell surface via the SpyC/SpyT system. The immobilized OPH exhibited significantly enhanced thermal and pH stability, retaining more than 50% activity after five repeated uses. Under optimum conditions, the immobilized OPH showed the hydrolysis rates of (96.5±2.7)%, (79.5±2.3)%, and (82.6±2.8)% against 100 mg/L methyl parathion, dimethoate, and chlorpyrifos, respectively. This indicated that the method showed high hydrolysis efficiency for the organophosphorus pesticides. [Conclusion] The immobilization of OPH on *P. pastoris* surface via the SpyC/SpyT system effectively improves its stability and reusability, offering an efficient and environmentally friendly solution for the bioremediation of organophosphorus pesticide pollution. Meanwhile, this study provides a powerful tool and method for research in the field of *P. pastoris* surface display.

Keywords: SpyCatcher/SpyTag; *Pichia pastoris*; indirect surface display; organophosphorus hydrolase

有机磷农药 (organophosphorus compounds, OPs) 因其毒性强和杀虫谱广而被广泛用于害虫防治。在环境中有机磷农药可通过光解、水解和微生物降解等途径进行自然降解。尽管有机

磷农药具有一定的降解性, 但其降解速率和程度因环境条件、农药种类等因素而异。例如, 某些有机磷农药如甲基对硫磷、乐果和毒死蜱在特定环境条件下难以完全降解, 导致残留积

累, 进而对土壤肥力和水生态健康构成潜在威胁, 长期接触还可能引发人体各种严重疾病。有机磷水解酶(*organophosphorus hydrolase*, OPH)是一种能够高效降解有机磷化合物的酶, 因其底物谱广、催化效率高和绿色环保等优点, 被视为一种理想的生物修复手段^[1-2]。然而 OPH 与其他游离酶一样, 在实际应用中存在局限性。其稳定性相对较低, 容易受到温度、pH 值变化及盐浓度高低等因素的影响, 导致活性降低甚至丧失。此外, 有机磷水解酶的回收和再利用也是一个挑战^[3-5]。因此开发能够提高有机磷水解酶稳定性和重复利用率的固定化方法显得尤为重要, 这将使其能够应用于污水处理器或果蔬清洁器中, 配合光解等其他修复方法, 实现高效、绿色的污染治理和食品安全保障。

蛋白质的固定化方法包括吸附法、共价结合法、交联法和包埋法等^[6]。细胞表面展示是近年来发展起来的一种新的固定化技术^[7-8]。该技术通过基因工程手段将目标蛋白或酶与宿主细胞壁上的特定锚定分子结合, 从而将目标蛋白或酶展示在细胞表面。与其他固定化方法相比, 细胞表面展示技术具有诸多优势: 能够使酶或蛋白在细胞表面稳定固定, 同时保持其生物活性; 酶固定在细胞表面可以实现酶的连续使用和简便回收; 可以通过细胞分裂来扩增酶的量, 实现酶的放大生产^[8-10]。因此这种技术广泛应用于各种生物技术与生物医学领域, 例如药物筛选、生物催化剂、文库筛选、定量测定和生物传感器。

根据展示细胞的种类, 表面展示技术可划分为噬菌体展示、微生物细胞展示和动物细胞展示。在这些展示系统中, 酵母细胞具有诸多显著优势^[11]: 酵母细胞体积较大, 使其表面能够展示更多的蛋白质分子(约 10^4 – 10^6); 巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母和解脂耶氏酵母等常见酵母菌株已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认定为一般认为安全(generally regarded as safe, GRAS)的微生物, 这

为它们在工业应用中提供了法律保障; 酵母细胞抗化学试剂能力和环境耐受性强。综上所述, 这些优点使得酵母展示系统在生物技术领域中占据了重要地位。其中, 毕赤酵母是除酿酒酵母之外使用最广泛的表达系统。相较于酿酒酵母, 毕赤酵母发酵密度更高、糖基化程度较低。截至目前, 已有上千种蛋白在毕赤酵母中成功表达, 有些蛋白的产量可达到每升克级水平, 并且已经实现了商业化。因此毕赤酵母菌株更适合用于生产重组蛋白。

根据锚定蛋白与靶蛋白连接方式的不同, 细胞表面展示又可分为直接表面展示和间接表面展示。尽管直接表面展示操作简便, 但其存在一定的局限性, 如空间位阻问题以及展示效率低等。Liu 等^[12]在毕赤酵母表面直接展示了磷脂酶 D, 虽然提高了该酶的稳定性和重复利用率, 但该酶的展示率相对较低, 只有约 53%, 这对其后续应用产生了一定的影响。间接展示系统通过将一个小分子配基与锚定蛋白进行融合表达, 目标蛋白与另一个配基融合表达, 利用这些配基间的高亲和力实现蛋白的表面展示, 可以避免蛋白直接锚定在细胞表面可能引起的活性损失或功能障碍。间接表面展示通常采用生物偶联系统, 如生物素与链霉亲和素(streptavidin, SA)、Colicin E7 (CL7) DNA 酶与其抑制物免疫蛋白 7 (immunity protein 7, Im7)、化脓链球菌纤连蛋白结合蛋白的 CnaB2 结构域改造而来的 SpyC/SpyT 等, 这些系统能够形成特异性相互作用, 从而将目标蛋白间接展示在细胞表面^[13-15]。2019 年, Li 等^[16]在毕赤酵母表面将 Im7 蛋白锚定, 然后利用 Im7 和 CL7 之间的超高亲和力相互作用, 将带有 CL7 融合标签的目标蛋白[荧光蛋白(sfGFP 和 mCherry)或酶(人类精氨酸酶 D)]高效展示在毕赤酵母表面。绿色荧光蛋白在毕赤酵母表面的展示量约 2.8×10^6 个/细胞, 这种间接表面展示方法效率高, 为展示生物分子提供了一个强大的平台。此外, 间接展示系统还具有良好的可扩展性, 可以通过改变

锚定蛋白的种类和数量来调节目标蛋白的展示密度和位置。Bao 等^[17]在大肠杆菌表面展示了 SpyTag 和 SnoopTag, 通过 SpyTag/SpyCatcher 和 SnoopTag/SnoopCatcher 的相互作用将 3 种融合不同配对键的几丁质降解酶固定在大肠杆菌表面, 通过“一锅法”将 α -几丁质转化为氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN), 转换率高达 79.02%, 重复使用 6 轮后仍保留 90% 的酶活性。因此间接表面展示为微生物表面工程提供了更多的可能性, 使得微生物可以被设计用于多种工业应用。

本研究通过 SpyC/SpyT 生物偶联系统构建毕赤酵母间接展示平台(*Pichia pastoris* surface anchor system, PSA), 探索其在有机磷水解酶(OPH)展示中的应用。通过优化基因拷贝数和培养条件, 以提高 OPH 在细胞表面的展示效率和稳定性, 从而为增强其催化活性和降解能力提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)分别用于 DNA 克隆和蛋白质表达。毕赤酵母菌株 GS115 和质粒 pPICZ α A 均购自 Invitrogen 公司。载体 pET28a-cGFP-SpyT 和 pHBM905BDM 均由 Du 等^[10]保存, 并用于后续实验。限制性内切酶(如 *ExTaq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶)均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa 公司)。Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化柱和 GE HiTrap 脱盐纯化柱均购自 GE HealthCare 公司; 所有化学试剂均为分析纯。引物的生物合成和 DNA 测序服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.2 毕赤酵母表面展示系统(PSA)构建

SpyC 是一种能与 SpyT 特异性结合的“诱饵蛋白”, 分子量为 10.22 kDa, 从前期构建的载体 pET28a-LSP-OmpA-SpyC-HA 中克隆而来^[10]。(G₄S)₃ 为连接肽, SED1 是毕赤酵母的表面锚定

分子(GenBank 登录号为 CP046084.1)。为了构建毕赤酵母表面展示系统(PSA), 首先将 SpyC 片段与连接肽(G₄S)₃和表面锚定分子 SED1 连接, 形成 HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 和 SpyC-(G₄S)₃-SED1 片段。这些片段被克隆到质粒 pPICZ α A 中, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 中进行测序验证。通过 *Sac* I 酶线性化处理, 将质粒电转到毕赤酵母 GS115 菌株中, 构建表面展示菌株 PSA-1: GS115-pPICZ α A-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 和 GS115-pPICZ α A-SpyC-(G₄S)₃-SED1。

以 pPICZ α A-SpyC-(G₄S)₃-SED1 (PSA-1)为基础, 采用“生物砖法”构建了多拷贝表达质粒 PSA-(2-6) (pPICZ α A-(SpyC-(G₄S)₃-SED1)₂₋₆)。“生物砖法”是一种通过模块化基因组装的方法^[18], 通过限制性内切酶的切割和连接将多个基因模块串联起来, 构建多拷贝表达质粒。首先: 利用 *Bgl* II 和 *Avr* II 限制性内切酶消化 pPICZ α A-SpyC-(G₄S)₃-SED1, 产生包含启动子、前导信号序列、目标开放阅读框[SpyC-(G₄S)₃-SED1]和终止子的表达盒。然后将表达盒克隆到经 *Avr* II 和 *Bam*HI 酶处理的 pPICZ α A 中, 得到质粒 pPICZ α A-(SpyC-(G₄S)₃-SED1)₂。通过重复该步骤, 成功构建了多拷贝表达质粒 pPICZ α A-(SpyC-(G₄S)₃-SED1)₂₋₆。所有重组质粒通过质粒大小和限制性内切酶酶切分析进行验证, 并转化至 GS115 中, 构建了表面展示菌株 GS115-pPICZ α A-(SpyC-(G₄S)₃-SED1)₂₋₆。

1.3 培养条件优化

为了提高表面展示效率, 本研究系统优化了表面展示菌株的培养条件。每天在 BMMY 培养基中添加 1% 甲醇对毕赤酵母菌株进行诱导, 培养时间为 7 d, 以确定最佳培养时间。为了探究不同甲醇浓度对毕赤酵母表面展示效果的影响, 在 BMMY 培养基中分别添加了 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的甲醇进行诱导。

1.4 目的蛋白的表达

1.4.1 eGFP-SpyT 的表达

在含有 pET28a-eGFP-SpyT 的大肠杆菌 BL21(DE3)中表达目的蛋白 eGFP-SpyT, 经 Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化后, 使用荧光酶标仪在 488 nm 处测定 eGFP 蛋白浓度与荧光强度的关系, 确定标准曲线。

1.4.2 OPH-SpyT 的表达

从载体 pHBM905BDM-OPH^[19]中克隆 *oph* 片段, 通过重叠 PCR 合成 OPH-(G₄S)₃-SpyT 片段, 并将其克隆到表达载体中, 从而构建质粒 pHBM905BDM-OPH-(G₄S)₃-SpyT。经测序验证后, 将 pHBM905BDM-OPH-(G₄S)₃-SpyT 转化毕赤酵母进行表达, 诱导表达获得目的蛋白 OPH-(G₄S)₃-SpyT, 并通过 SDS-PAGE 进行验证。参照 Shen 等^[19]的方法对 OPH 和 OPH-SpyT 的活性进行测定。

1.5 流式细胞仪检测评估展示细胞效率

取 200 μ L 毕赤酵母菌液, 3 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 用含 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PBS 溶液(pH 7.4)洗沉淀 2 次, 再用 PBS 稀释至 1×10^6 个细胞/mL。将细胞与稀释的抗 HA 标签单克隆抗体或 eGFP-SpyT 混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 15 min, 然后在室温下继续静置 30 min, 整个过程均在避光条件下进行。孵育结束后, 细胞用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 溶液(pH 7.4)洗涤 3 次, 随后用相同的缓冲液重悬, 并使用流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)进行检测(HA 的激发和发射波长分别为 492 nm 和 518 nm, eGFP 的激发和发射波长分别为 488 nm 和 509 nm), 以评估展示细胞的百分比。

1.6 细胞组装蛋白能力测定

菌株诱导 1–3 d 后, 3 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 2 次, 再次 3 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。将 10 mg 酵母湿细胞与 1 mL 的 0.6 mg/mL eGFP-SpyT 溶液使用旋转混合仪孵育 30 min。在不同时间点

(0、5、10、15 和 30 min)取上清液, 使用 SDS-PAGE 和荧光测定法来确定 eGFP-SpyT 的剩余量。

1.7 有机磷水解酶的间接展示及活力测定

将表达 OPH-SpyT 的毕赤酵母培养物以 3 000 r/min 离心 5 min 后收集上清, 与表面展示 SpyC 的毕赤酵母细胞 PSA-4 在室温下混合并孵育 30 min。通过 SpyC-SpyT 相互作用, 将 OPH 间接展示在毕赤酵母细胞表面。OPH 可以将甲基对硫磷水解生成黄色的对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*NP), 在不同温度(30–70 $^{\circ}$ C)和 pH (5.0–12.0)条件下, 先将 900 μ L 的 50 mmol/L 甲基对硫磷底物预热 5 min, 取适量稀释的酶液/菌液 100 μ L 加入到体系中反应 10 min, 加入 1 mL 的 10% 三氯乙酸终止反应, 再加入 1 mL 的 10% 碳酸钠显色。用酶标仪测定在 410 nm 的 *p*NP 特定吸收峰, 根据吸光度计算其酶活力: 1 个酶活单位(U)定义为每分钟催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量, 从而定量分析 OPH 在细胞表面的展示效率^[19]。

1.8 固定化有机磷水解酶的性质表征

为了系统研究固定化有机磷水解酶(PSA-OPH)的性质, 对其最适温度、最适 pH、热稳定性、pH 稳定性及循环利用性能进行了表征。将 PSA-OPH 和 OPH 分别悬浮于 pH 9.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中, 在 30–70 $^{\circ}$ C 下进行反应, 以 5 $^{\circ}$ C 为一个温度梯度, 反应时间为 10 min。通过分光光度计在 410 nm 处测定产物 *p*NP 的生成速率, 以确定 OPH 的最适温度。将 PSA-OPH 和 OPH 分别在 70 $^{\circ}$ C 下孵育, 每 10 min 取样 1 次, 孵育时间为 60 min。将样品冷却至室温后, 加入底物甲基对硫磷测定产物 *p*NP 的生成量, 测定残余活性。通过比较不同时间点的残余活性确定 OPH 的热稳定性。

将 PSA-OPH 和 OPH 分别悬浮于不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的

缓冲液中, 在 45 °C 下进行反应, 反应时间为 10 min。通过分光光度计在 410 nm 处测定产物 *p*NP 的生成速率, 以确定 OPH 的最适 pH。将 PSA-OPH 和 OPH 分别在不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的缓冲液中孵育 24 h。在 4 °C 下进行孵育, 以减少温度对酶活性的影响。孵育结束后加入底物甲基对硫磷, 测定残余活性, 评估 OPH 在不同 pH 条件下的稳定性。

将 PSA-OPH 悬浮于 Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.0)中, 在 45 °C 和室温(25 °C)下进行反应。每次反应时间为 10 min, 通过分光光度计在 410 nm 处测定产物 *p*NP 的生成速率, 以确定 OPH 的活性。反应结束后, 3 000 r/min 离心 5 min 收集细胞沉淀, 用 Gly-NaOH 缓冲液(pH 9.0)洗涤细胞 3 次, 以去除残留底物和产物。将洗涤后的细胞重新悬浮于新鲜缓冲液中, 进行下一次反应。重复上述步骤 5 次, 记录每次反应的活性, 评估固定化 OPH 的循环利用性能。

1.9 固定化有机磷水解酶对有机磷农药降解能力评估

为了评估表面展示有机磷水解酶的实际应用能力, 本研究选择在最适条件下测定 PSA-OPH 对 100 mg/L 甲基对硫磷、乐果和毒死蜱的水解率。将 PSA-OPH 用 PBS 洗涤 3 次以去除残留的培养基成分, 然后在 1 mL 含有 100 mg/L 的甲基对硫磷反应体系中加入 1 g 的 PSA-OPH, 反应时间为 60 min。在反应过程中, 每隔一定时间取样进行检测。参照 Wang 等^[20]的方法计算对甲基对硫磷的水解率, 参照李文等^[21]的氯化钼乙酸比色法计算乐果和毒死蜱的水解率。

2 结果与分析

2.1 PSA 展示平台的构建及检测

为了开发一种能够有效展示的间接 *P. pastoris* 表面展示系统, 基于前期研究成果^[10]将

SpyC-SpyT 系统中较大的 SpyC 片段展示在毕赤酵母表面, 目标蛋白或肽链则与 SpyT 融合。将质粒线性化后, 分别转化至毕赤酵母 GS115 中, 构建了重组菌株 GS115-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 和 GS115-SpyC-(G₄S)₃-SED1。经甲醇诱导 24 h 后, 与 HA 抗体孵育, 使用流式细胞仪分析展示效率(以 10 000 个细胞作为总样本量)。含有 HA 标签的 GS115-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 菌株展示率达(84.9±0.7)%, 而对照 GS115 未检测到任何荧光(图 1A)。进一步通过荧光显微镜验证, GS115-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 细胞表面展示荧光, 而对照 GS115 未检测到任何荧光(图未展示), 结果表明 SpyC 成功展示在毕赤酵母表面, 为 SpyC-SpyT 的组装提供了基础。

为了排除 HA 标签对 SpyC-SpyT 相互作用的影响, 将诱导培养 72 h 的 GS115-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 和 GS115-SpyC-(G₄S)₃-SED1 与 0.5 mg eGFP-SpyT 在含有 1% 牛血清白蛋白的 pH 7.4 PBS 缓冲液中孵育 30 min, 随后使用流式细胞仪(以 10 000 个细胞作为总样本)进行分析。结果显示, GS115-HA-SpyC-(G₄S)₃-SED1 的组装率达(52.0±0.4)% (图 1B), 而 GS115-SpyC-(G₄S)₃-SED1 的组装率达(59.9±0.8)% (图 1C), GS115 对照组为(0.2±0.2)%, 表明 eGFP 可以通过 SpyC-SpyT 在毕赤酵母表面间接展示, 但 HA 标签对目标蛋白在毕赤酵母表面展示有一定影响。因此后续展示菌株选用 GS115-SpyC-(G₄S)₃-SED1, 即 PSA-1。

2.2 SpyC 多拷贝表达对 PSA 表面展示效率的影响

为了提高 SpyC 在毕赤酵母表面的展示量, 进而提高目标蛋白的组装量, 通过“生物砖”方法构建了多拷贝表达质粒 pPICZαA-(SpyC-(G₄S)₃-SED1)₂₋₆。重组菌株 PSA-1、PSA-2、PSA-3、PSA-4 和 PSA-6 在 1% 甲醇诱导 24 h 后收集, 并与 eGFP-SpyT 孵育, 通过流式细胞仪分析表面组装。结果显示, PSA-1、PSA-2、PSA-3、

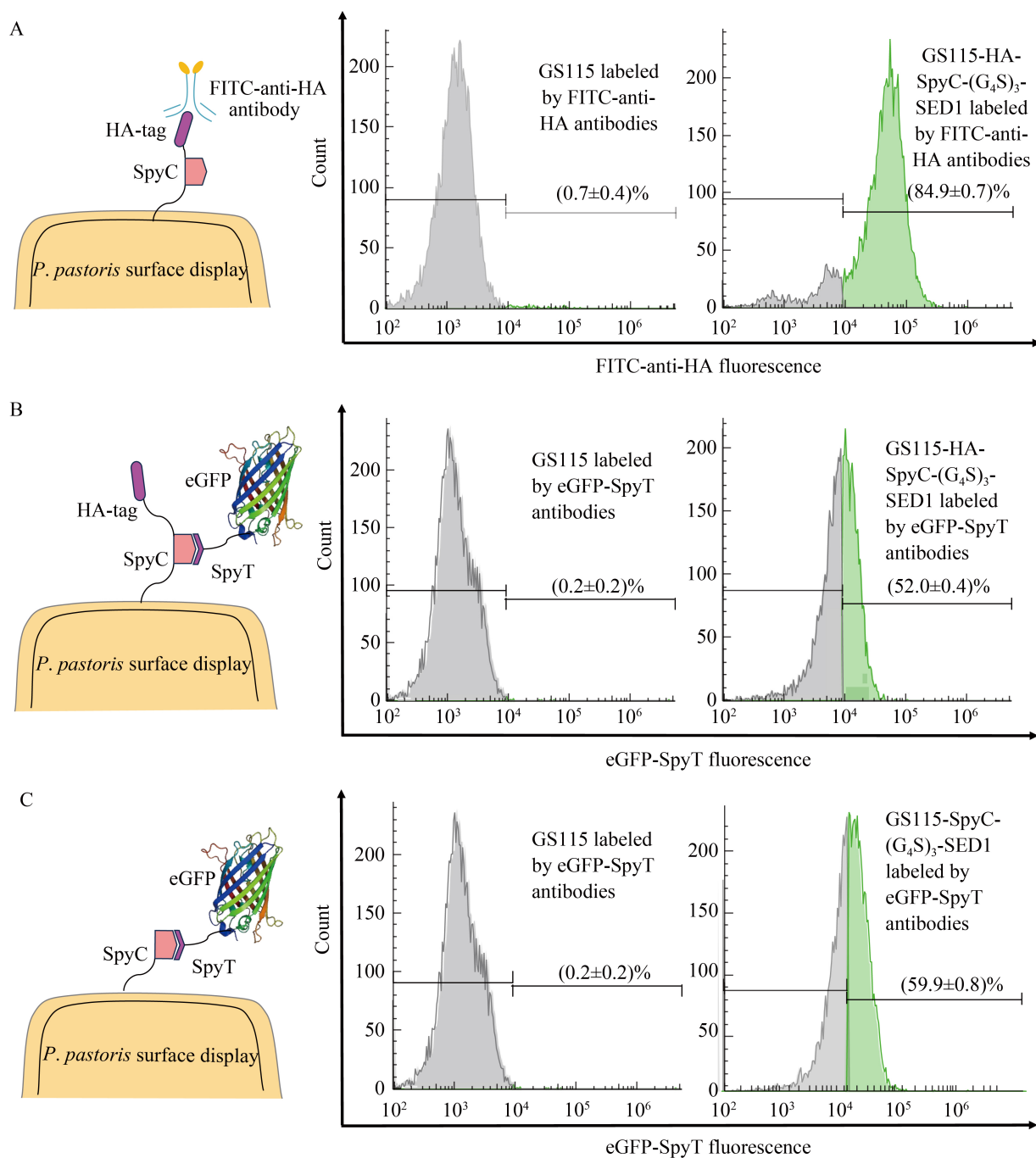


图1 流式细胞仪检测SpyC在毕赤酵母细胞表面的展示效率。A：用FITC标记的抗HA抗体检测带有HA标签的SpyC在毕赤酵母细胞表面的展示情况；B：eGFP-SpyT在PSA-1细胞上的组装检测(带HA标签)；C：eGFP-SpyT在PSA-1细胞上的组装检测(无HA标签)。GS115作为阴性对照。

Figure 1 Flow cytometry detection for the display efficiency of SpyC. A: The display of SpyC on the surface of *Pichia pastoris* cells was detected using FITC-labeled anti-HA antibodies targeting HA-tagged SpyC; B: Assembly of eGFP-SpyT on PSA-1 cells (with HA tag); C: Assembly of eGFP-SpyT on PSA-1 cells (without HA tag). GS115 was used as a negative control.

PSA-4 和 PSA-6 的组装效率分别达到了 $(33.9\pm0.8)\%$ 、 $(44.9\pm1.5)\%$ 、 $(52.4\pm2.5)\%$ 、 $(88.7\pm1.5)\%$ 和 $(79.5\pm1.8)\%$ (图 2)。因此根据实验结果, PSA-4 被选为表面展示平台。

2.3 培养条件的优化

为了提高 PSA-4 菌株的展示效率, 对培养条件进行了优化。结果显示, PSA-4 的展示率随着培养时间的延长而逐渐增加, 并在第 3 天和第 4 天达到最大值 $(97.0\pm0.4)\%$, 之后 PSA-4 的

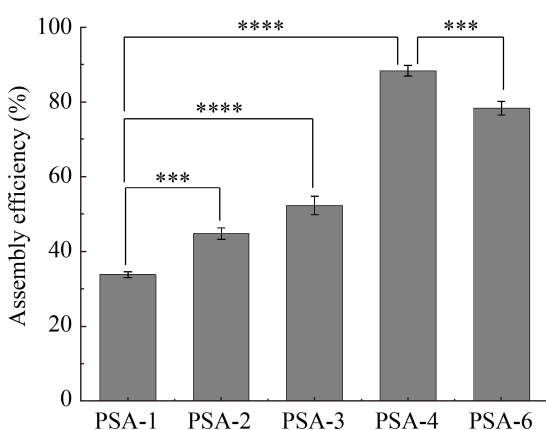


图2 不同拷贝重组菌株细胞的组装效率

Figure 2 The assembly efficiency of recombinant strains with different copy numbers. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$. ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

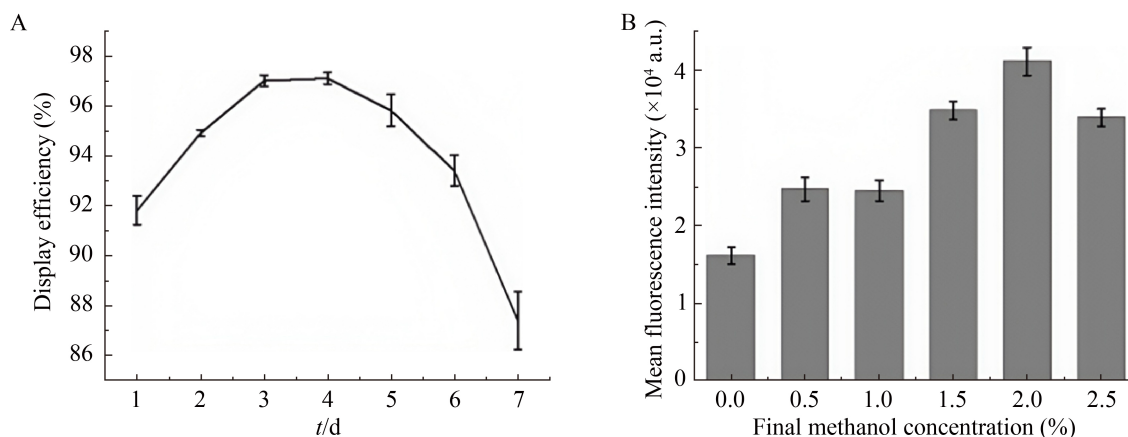


图3 PSA-4的培养条件优化。A: 诱导时间对展示率的影响; B: 甲醇对平均荧光强度的影响。

Figure 3 Optimization of culture conditions for PSA-4. A: Effect of induction time on display efficiency; B: Influence of methanol on average fluorescence intensity. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$.

展示率逐渐下降(图 3A)。通过调整甲醇诱导浓度来优化表面展示效率。在 3 个平行实验中, 补充了 6 种不同浓度的甲醇: 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5%, 诱导 3 d。由于展示效率接近 100%, 无法进行进一步评估, 因此改用平均荧光强度来确定最佳甲醇浓度。如图 3B 所示, 在 2.0% 甲醇浓度诱导下, PSA-4 的平均荧光强度达到最高。因此选择 3 d 培养时间和 2.0% 甲醇浓度作为最佳培养条件。

2.4 间接展示能力的测量

为了测量 PSA-4 细胞的蛋白载荷能力, 2.0% 甲醇诱导 3 d 后的 PSA-4 细胞(10 mg, 湿重)与 1 mL 的 0.6 mg/mL 的 eGFP-SpyT 溶液在旋转条件下孵育 30 min。在不同时间点(0、5、10、15 和 30 min)取上清液, 使用 SDS-PAGE 和荧光测定法来确定 eGFP-SpyT 的剩余量。如图 4 所示, 蛋白带随着时间的推移逐渐减弱, 并且在 15 min 后不再变化, 表明 eGFP-SpyT 通过 SpyC-SpyT 在 15 min 内迅速组装到 PSA-4 细胞表面, 并达到饱和, 这与之前很多报道的结果一致^[10,22-23]。根据残留在上清中的 eGFP-SpyT 浓度计算结合在细胞表面的蛋白浓度, 表明 PSA-4 细胞的平均载荷能力为 (21.4 ± 0.7) mg eGFP-SpyT/g 细胞(湿重)(图 4B)。

2.5 间接表面展示 OPH 的构建及酶的性质分析

2.5.1 间接表面展示 OPH 的酶活分析

为了将 OPH 组装在毕赤酵母细胞表面, 将 SpyT 标签融合到 OPH 的 C 末端, 并在毕赤酵母中重新表达。通过 SDS-PAGE 和活力测定分

析, 结果表明融合标签对 OPH 的表达和活力无影响(图 5)。按照上述方法将 OPH-SpyT 与 PSA-4 细胞孵育 30 min 后, 根据结合绿色荧光蛋白与 PSA-4 结合的方法计算了组装在酵母表面的 OPH 量。计算结果表明, 结合在酵母表面的有机磷水解酶的量 18.8 mg/g 湿重细胞。进一步

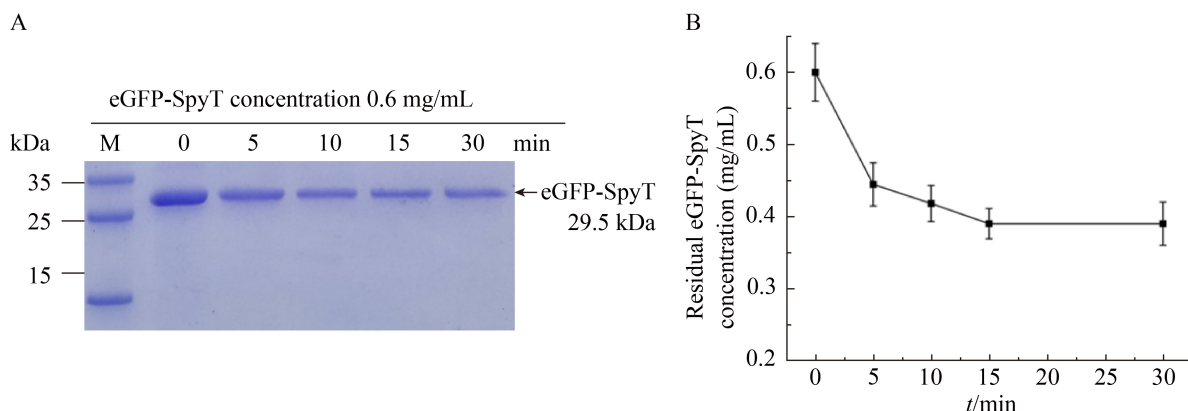


图4 PSA-4细胞蛋白载荷能力的测量。A: 用SDS-PAGE测定上清液中eGFP-SpyT的剩余量。M: 蛋白marker。B: 通过荧光测定法测定上清液中eGFP-SpyT的剩余量。

Figure 4 Measurement of protein loading capacity of PSA-4 cells. A: The remaining amount of eGFP-SpyT in the supernatant was determined using SDS-PAGE. M: Protein marker. B: Quantitative analysis of the remaining amount of eGFP-SpyT in the supernatant using fluorescence measurement. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$.

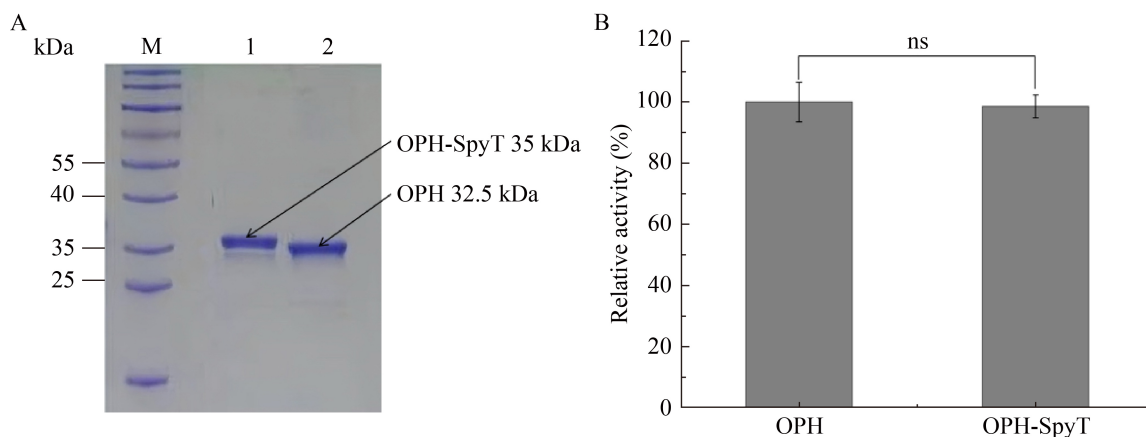


图5 OPH和OPH-SpyT的SDS-PAGE及酶活分析。A: OPH和OPH-SpyT发酵上清的SDS-PAGE分析。M: 蛋白marker; 1: OPH-SpyT发酵上清; 2: OPH发酵上清。B: OPH和OPH-SpyT相对酶活力测定, OPH设为100%。

Figure 5 SDS-PAGE and enzyme activity analysis of OPH and OPH-SpyT. A: SDS-PAGE analysis of fermentation supernatants of OPH and OPH-SpyT. M: Protein marker; 1: OPH-SpyT supernatant; 2: OPH supernatant. B: Relative enzyme activity assays of OPH and OPH-SpyT, with OPH set at 100%. Data are given as mean $\pm$ SD, $n=3$. ns: No significant difference.

将间接表面展示菌株和参照(不加 OPH-SpyT 的 PSA-4)在 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min 后加入底物, 测定酶活。为了确保酶活测定的可靠性, 所有实验均进行了 3 次独立的重复。通过绘制标准曲线确定了酶浓度与吸光度之间的线性关系 ($R^2=0.995$)。固定化 OPH 的比酶活为 (22.56 ± 1.23) U/mg, 而游离 OPH 的比酶活为 (15.42 ± 0.89) U/mg。通过独立样本 t 检验分析, 固定化 OPH 的酶活显著高于游离 OPH ($t=4.32$, $df=4$, $P=0.012$), 表明固定化技术显著提高了

OPH 的酶活。

2.5.2 固定化 OPH 最适温度和 pH 的测定

如图 6A、6B 所示, 固定化酶(PSA-OPH)在 45 °C 时显示出最佳温度活性, 并随着温度的升高活性略有下降, 在 70 °C 时仍保持超过 60% 的残余活性, 而游离酶(OPH)的最适温度为 50 °C, 在 60 °C 时活性仅剩 25%。在热稳定性分析实验中, PSA-OPH 和 OPH 在 70 °C 条件下孵育 60 min, 其间定期测定其残余酶活性。结果显示, 游离 OPH 的酶活性随时间迅速下降, 60 min 后其残余

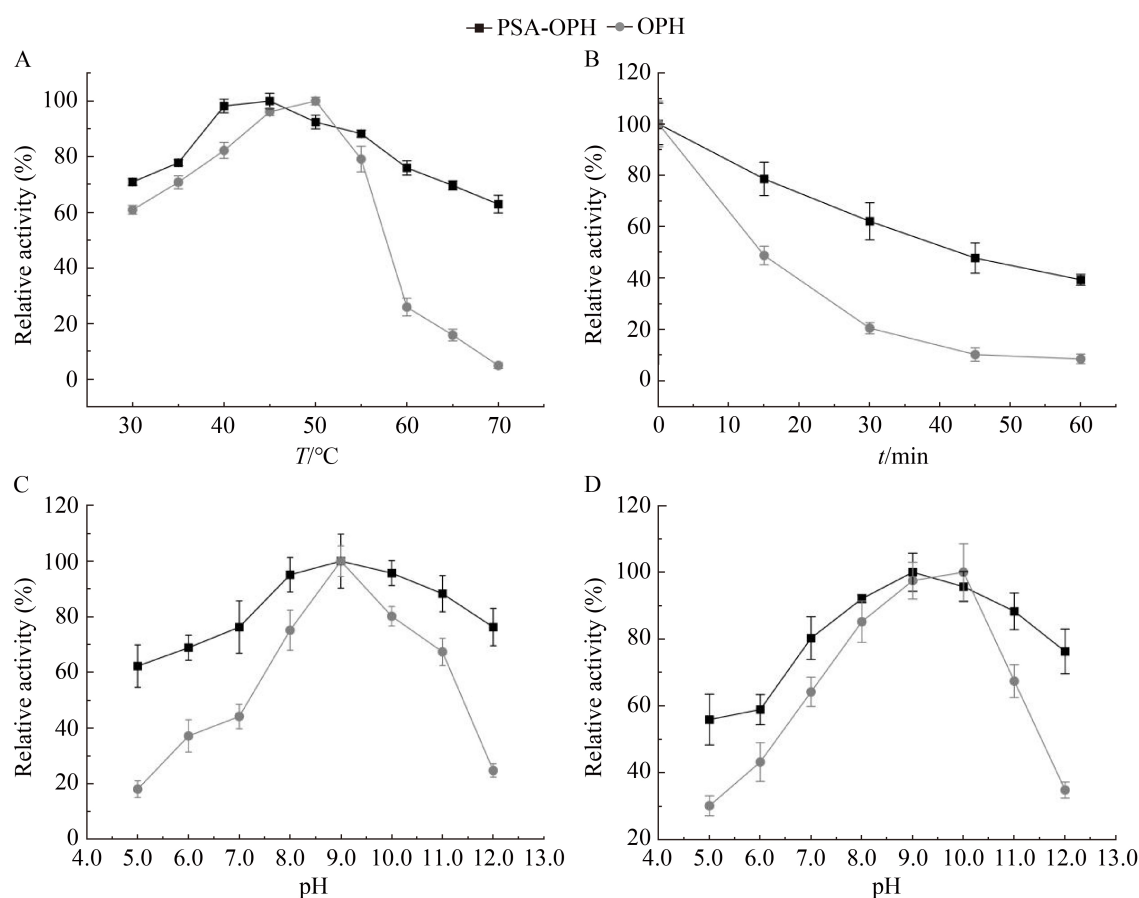


图6 PSA-OPH和OPH酶学性质的测定。 A: PSA-OPH和OPH最适温度测定; B: PSA-OPH和OPH在 70 °C 条件下热稳定性的测定; C: PSA-OPH和OPH最适pH测定; D: 不同pH值下 4 °C 孵育 24 h 后 PSA-OPH 和 OPH 的 pH 稳定性的测定。

Figure 6 Determination of enzymatic properties of PSA-OPH and OPH. A: The optimal temperature for PSA-OPH and OPH; B: Measurement of the thermal stability of PSA-OPH and OPH at 70 °C; C: The optimal pH for PSA-OPH and OPH; D: Measurement of the pH stability of PSA-OPH and OPH after incubation at 4 °C for 24 h at different pH values. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$.

活性降至 10% 以下, 而 PSA-OPH 的酶活性下降速率较慢, 60 min 后仍保留超过 40% 的活性。

PSA-OPH 和 OPH 的最适 pH 值在 45 °C 下进行测定。如图 6 C 所示, 与 OPH 一样, PSA-OPH 在 pH 9.0 时显示出最高的催化活性。然而, 在低于 5.0 和高于 10.0 的极端环境下, PSA-OPH 的活性高于 OPH。随后在不同 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0) 下 4 °C 孵育 24 h, 测定其 pH 稳定性, 结果表明 PSA-OPH 在所有测试的 pH 值下催化活性保持在 50% 以上, 而 OPH 在 pH 5.0 时仅保留了少量的活性(图 6D)。这些结果表明, PSA 系统的酶固定化提高了 OPH 的耐酸和耐碱能力。

2.5.3 固定化酶的循环利用

在 pH 9.0 条件下, PSA-OPH 在 45 °C 和室温(25 °C)条件下测定其循环利用情况。结果如图 7 所示, PSA-OPH 的活性在 5 个使用周期后仍保持在 50% 以上。在洗涤过程中, 总有部分细胞丢失, 这可能导致部分活力的丧失。为了验证这一猜测, 进一步测定了细胞的密度, 发现每次洗涤后细胞有 5% 左右的损失。这表明细胞损失是酶活下降的一个重要因素。在多轮使用过程中, 构象改变也可能是引起活力下降的主

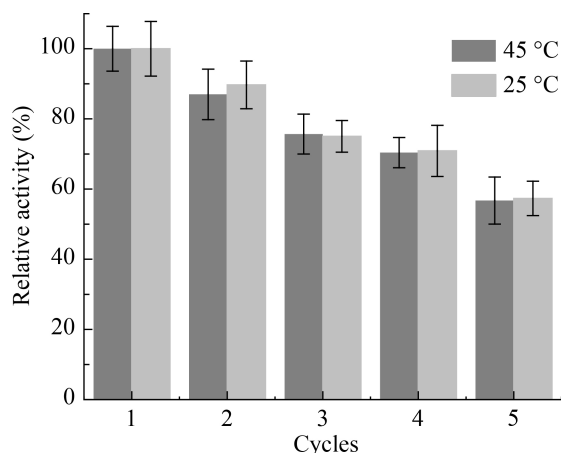


图7 固定化酶的循环使用次数

Figure 7 Reusability of immobilized enzyme (PSA-OPH) over multiple cycles. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$.

要因素之一。

2.6 固定化有机磷水解酶水解率的测定

为了评估 PSA-OPH 的实际应用能力, 在最适条件下测定了 PSA-OPH 对 100 mg/L 甲基对硫磷、乐果和毒死蜱 3 种有机磷农药的水解率。如图 8 结果显示, 该固定化有机磷水解酶对甲基对硫磷、乐果和毒死蜱的水解率分别为 (96.5 $\pm$ 2.7)%、(79.5 $\pm$ 2.3)% 和 (82.6 $\pm$ 2.8)%, 表明固定化的有机磷水解酶具有较高的水解活性。

3 讨论与结论

有机磷农药的广泛应用给环境和人类健康带来了严峻挑战, 而有机磷水解酶(OPH)作为一种绿色环保的生物修复手段, 在处理有机磷农药污染方面展现出了巨大的潜力和应用价值。在一些实际应用中, 若需重复利用 OPH 这类游离酶, 便会遭遇稳定性不佳以及重复利用率低下的困境, 这些问题亟待解决。本研究通过构建毕赤酵母间接展示平台成功实现了有机磷水解酶在细胞表面的高密度展示, 为提高 OPH 的稳定性和重复利用率提供了一种新方法。

间接表面展示技术通常采用生物偶联系统, 如 SA/AV、Im7/CL7、SpyC/SpyT 等, 这些系统

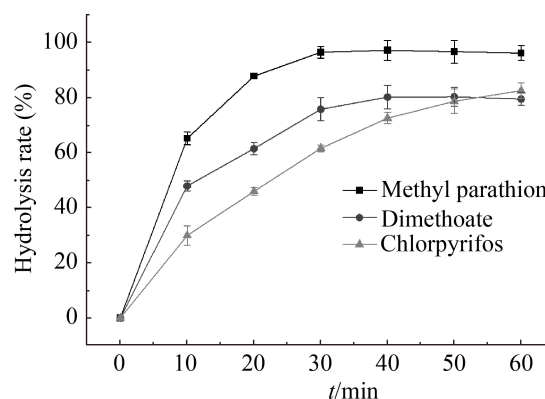


图8 固定化有机磷水解酶在 60 min 内对不同农药水解率的影响

Figure 8 The impact of PSA-OPH on the hydrolysis rate of different pesticides within 60 minutes. Data are given as means $\pm$ SD, $n=3$.

能够形成特异性相互作用,从而将目标蛋白间接展示在细胞表面^[13-15]。为了实现 OPH 的间接展示,本研究在毕赤酵母表面利用 SpyC/SpyT 系统构建了一个间接表面展示平台,将大分子 SpyC 作为“诱饵蛋白”展示在毕赤酵母表面。研究结果显示, SpyC 成功展示在毕赤酵母表面。SpyC 在细胞表面的展示量直接影响目标蛋白的展示量。Du 等^[10]采用基因串联的方法提高大肠杆菌表面 SpyC 展示量,发现当 SpyC 的串联数为 3 时间接展示量最大,可组装 53 mg eGFP-SpyT/g 湿细胞。为了提高 SpyC 的展示量,本研究利用“生物砖”法构建了多拷贝载体。随着 SpyC 拷贝数的增加,细胞表面的展示量也随之增加,在 4 拷贝表达菌株(PSA-4)中 SpyC 的展示量达到最大值。这一变化趋势与基因表达的一般规律相符,拷贝数的增加能够有效提升目标蛋白的展示量。然而,当基因拷贝数过多时,细胞需要将更多的资源用于维持这些基因的表达,而细胞的生长代谢可能会受到限制^[24-25]。因此细胞会通过某种机制来平衡基因表达和细胞生长之间的关系,使得基因表达量在某一拷贝数时达到一个相对平衡的峰值^[26]。这与以往采用多拷贝方法提高酶的表达式的研究现象一致^[18,27-29]。例如,He 等^[27]在体外构建多拷贝表达载体提高溶菌酶在毕赤酵母中的表达,当基因拷贝数达到 6 时溶菌酶的活力达到最大。本研究通过培养条件优化,PSA-4 的组装量最终可达 (21.4±0.7) mg eGFP-SpyT/g 湿细胞。这一结果比 Du 等^[10]报道的大肠杆菌表面展示量低 60% 左右,可能是由于大肠杆菌的个体较小,比表面积相对较大所致。然而,与已报道的毕赤酵母等真核细胞展示系统相比,该系统展现出显著优势。例如,Li 等^[16]利用 CL7/Im7 系统在毕赤酵母表面构建了间接展示系统,该系统 1 g 干细胞才能结合 17.8 mg 的 CL7-sfGFP。

间接表面展示这类固定化技术在提高酶的稳定性和重复利用性方面具有重要意义。本研究中,固定化后的 OPH 在酶的性质上表现出显

著提升。固定化 OPH 的最适温度为 45 °C,虽然比游离酶降低了 5 °C,但在高温条件下(70 °C)仍能保持 60% 的活性,而游离酶在该温度下完全失去活性。这表明固定化 OPH 在高温环境下的稳定性显著提高,能够更好地适应复杂的工业应用条件。此外,固定化 OPH 在不同 pH 值下的稳定性也显著优于游离酶,即使在 pH 5.0 的极端条件下固定化 OPH 仍能保持 60% 以上的活性,而游离酶仅保留 15.9% 的活性。这些结果与其他报道的固定化酶结果一致。Wang 等^[20]用解脂耶氏酵母直接展示甲基对硫磷水解酶(methyl parathion hydrolase, MPH),其热稳定性和 pH 稳定性都有一定提高。Liu 等^[12]在毕赤酵母表面展示的磷脂酶 D,相较于游离酶,其热稳定性和 pH 稳定性也有明显提升。究其原因,固定化技术通过将酶限制在特定的载体上,为酶分子提供了保护性微环境,限制了其在高温或极端 pH 条件下的构象变化,从而提高了酶的稳定性。此外,固定化酶的重复利用性也是衡量其应用价值的重要指标。本研究中,固定化 OPH 在 45 °C 和室温(25 °C)条件下进行了循环利用测试。结果显示,固定化 OPH 在 5 个使用周期后仍保持 50% 以上的活性。虽然在洗涤过程中细胞的丢失和构象变化导致部分活性的丧失,但整体结果表明固定化 OPH 具有良好的重复利用性。类似的趋势也见于其他固定化酶的研究中。例如,2021 年 Ye 等^[11]在可逆可溶性的 Eudragit L-100 上固定 3 种酶(纤维素酶、葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶),提高了这些酶的 pH 稳定性和热稳定性,重复使用 6 次共固定化酶的活性保持在 52.38%。这表明固定化技术在提高酶的实用性和经济可行性方面具有显著优势。

本研究构建的 PSA-OPH 在水解率测试中表现出较高的催化效率,其比酶活达 (22.56±1.23) U/mg。吴慧^[13]研究 OPH 在毕赤酵母表面上直接展示时展示效率只有 57%,比酶活为 13.66 U/mg,而通过 Im7/CL7 系统在毕赤酵母间接展示的 OPH,展示效率虽然有 70%,

但比酶活仅为 6.51 U/mg。本研究构建的间接展示系统显著提高了展示效率,使得毕赤酵母细胞具有更高的 OPH 活性。此外,水解实验的结果表明,表面展示的 OPH 对甲基对硫磷、乐果、毒死蜱这 3 种有机磷农药都有水解效果,在 60 min 内水解效率分别达到 $(96.5 \pm 2.7)\%$ 、 $(79.5 \pm 2.3)\%$ 和 $(82.6 \pm 2.8)\%$ 。其中,乐果和毒死蜱的水解率相对较低,这可能是由于其化学结构相对复杂,存在额外的官能团或立体化学障碍,从而影响了 OPH 对它们的识别和水解效率^[30-31]。与报道的其他有机磷水解酶相比,本研究的固定化有机磷水解酶展现出一定的优势。在相同条件下,Wang 等^[20]通过解脂耶氏酵母直接展示的甲基对硫磷水解酶(MPH)对甲基对硫磷的水解效率为 90.8%,低于本研究的结果。Wang 等^[32]筛选出的产 MPH 的 MEW06 菌株对 50 mg/L 的乐果水解 5 d 后,水解率为 79.8%,而本研究的固定化有机磷水解酶仅在 60 min 内对 100 mg/L 乐果的水解率即可达 $(79.5 \pm 2.3)\%$ 。同样地,2024 年景凌云等^[33]研究发现固定的漆酶和光酶协同,在 24 min 内对 20 mg/L 的毒死蜱降解率为 74%,而本研究的固定化有机磷水解酶在 60 min 内对 100 mg/L 毒死蜱的水解率可达 $(82.6 \pm 2.8)\%$ 。综上所述,本研究的固定化有机磷水解酶在水解效率和反应时间方面均表现出明显优势。

本研究通过构建毕赤酵母间接展示平台,解决了有机磷水解酶在实际应用中稳定性差和难以回收的问题,为有机磷农药污染的生物修复提供了一种高效且绿色的解决方案。这一成果不仅为 OPH 的工业化应用奠定了基础,还为其他酶类的细胞表面展示技术提供了重要的参考。

作者贡献声明

赵梓萱:完善实验并进行数据分析与结果验证,撰写论文初稿并参与论文修改;王淋:提出并完善研究概念,负责实验的具体实施

与优化,进行数据分析与结果验证;王艳丽:负责数据的现场收集与记录,协助实验设备的调试与维护,参与实验流程的优化;袁慧:负责数据的整理与初步分析,协助实验过程中的技术问题解决,参与实验数据的监管;贺妮莎:提供研究设计的整体指导,协助确定研究方向与技术路线;张桂敏:提供技术支持,协助解决实验过程中的技术难题,参与数据分析方法的讨论,提供研究资源;周玉玲:主导研究的整体规划与管理,提供关键技术支持,负责论文的最终审核与定稿,监督管理研究项目。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 李丹,岳方伟.食品中农药残留检测与质量控制措施研究[J].中国食品工业,2024(10):83-85.
LI Dan, YUE Fangwei. Research on pesticide residue detection and quality control measures in food[J]. China Food Industry, 2024(10): 83-85 (in Chinese).
- [2] 马钊,李猛.构建全细胞生物传感器测定农田土壤中有有机磷农药甲基对硫磷含量[J].生物工程学报,2023,39(7):2706-2718.
MA Z, LI M. Development of a whole-cell biosensor for detecting organophosphorus pesticide methyl parathion in the farmland soil[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2706-2718 (in Chinese).
- [3] 顾恰敏,李芬润,刘敏.有机磷水解酶的固定化技术研究进展[J].现代盐化工,2022,49(5):15-17.
GU QM, LI FR, LIU M. Research progress of immobilization technology of organophosphorus hydrolase[J]. Modern Salt and Chemical Industry, 2022, 49(5): 15-17 (in Chinese).
- [4] CHEN JX, GUO ZT, XIN Y, GU ZH, ZHANG L, GUO X. Effective remediation and decontamination of organophosphorus compounds using enzymes: from rational design to potential applications[J]. Science of the Total Environment, 2023, 867: 161510.
- [5] ZHAO SM, XU W, ZHANG WL, WU H, GUANG CE, MU WM. Overview of a bioremediation tool: organophosphorus hydrolase and its significant application in the food, environmental, and therapy fields[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(21): 8241-8253.
- [6] 潘虹,陆天炆,王晓军,洪一楠.酶固定化技术的最新研究进展[J].西安工程大学学报,2024,38(1):83-91.

- PAN H, LU TW, WANG XJ, HONG YN. Recent advances in enzyme immobilization technology[J]. Journal of Xi'an Polytechnic University, 2024, 38(1): 83-91 (in Chinese).
- [7] WANG YL, MIRON RJ, ZHANG XX, ZENG H, ZHANG YF. Nanocages and cell-membrane display technology as smart biomaterials[J]. Periodontology 2000, 2024, 94(1): 180-191.
- [8] ZHANG CM, CHEN HY, ZHU YP, ZHANG Y, LI X, WANG F. *Saccharomyces cerevisiae* cell surface display technology: strategies for improvement and applications[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1056804.
- [9] YANG JM, HUANG K, XU XM, MIAO YL, LIN Y, HAN SY. Cell surface display of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 544058.
- [10] DU C, ZHOU YL, LIU L, WANG MX, JIANG SJ, ZHANG YF, ZHANG GM. Bacterial surface-assembled chitinosome for dismantling chitin into *N*-acetyl glucosamine[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2023, 11(30): 11239-11247.
- [11] YE MQ, YE YQ, DU ZJ, CHEN GJ. Cell-surface engineering of yeasts for whole-cell biocatalysts[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(6): 1003-1019.
- [12] LIU YH, HUANG L, FU Y, ZHENG D, MA JY, LI YZ, XU ZH, LU FP. A novel process for phosphatidylserine production using a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst with overexpression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in a purely aqueous system[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 535-542.
- [13] 吴慧. 有机磷水解酶在毕赤酵母表面展示研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2021.
- WU H. Study on surface display of organophosphorus hydrolase on *Pichia pastoris*[D]. Wuhan: Hubei University, 2021 (in Chinese).
- [14] NGUYEN TK, UENO T. Engineering of protein assemblies within cells[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 51: 1-8.
- [15] Van BLOOIS E, WINTER RT, KOLMAR H, FRAAIJE MW. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(2): 79-86.
- [16] LI ST, QIAO J, LIN SY, LIU Y, MA LX. A highly efficient indirect *P. pastoris* surface display method based on the CL7/Im7 ultra-high-affinity system[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1483.
- [17] BAO JJ, LIU N, ZHU LY, XU Q, HUANG H, JIANG L. Programming a biofilm-mediated multienzyme-assembly-cascade system for the biocatalytic production of glucosamine from chitin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(30): 8061-8068.
- [18] HE HH, ZHAI C, MEI M, RAO Y, LIU Y, WANG F, MA LX, JIANG ZB, ZHANG GM, YI L. Functional expression of porcine interferon- α using a combinational strategy in *Pichia pastoris* GS115[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 122: 55-63.
- [19] SHEN W, SHU M, MA LX, NI H, YAN H. High level expression of organophosphorus hydrolase in *Pichia pastoris* by multicopy *ophcM* assembly[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 119: 110-116.
- [20] WANG XX, CHI Z, RU SG, CHI ZM. Genetic surface-display of methyl parathion hydrolase on *Yarrowia lipolytica* for removal of methyl parathion in water[J]. Biodegradation, 2012, 23(5): 763-774.
- [21] 李文, 孙明, 孙红, 毛博慧, 李民赞. 基于比色光谱的氧乐果和毒死蜱农药残留快速检测[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(4): 135-142.
- LI W, SUN M, SUN H, MAO BH, LI MZ. Fast detection of omethoate and chlorpyrifos pesticide residues based on colorimetric spectroscopy[J]. Journal of China Agricultural University, 2017, 22(4): 135-142 (in Chinese).
- [22] ZAKERI B, FIERER JO, CELIK E, CHITTOCK EC, SCHWARZ-LINEK U, MOY VT, HOWARTH M. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(12): E690-E697.
- [23] KAJIWARA K, AOKI W, KOIKE N, UEDA M. Development of a yeast cell surface display method using the SpyTag/SpyCatcher system[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 11059.
- [24] ROUCHES MV, XU YS, CORTES LBG, LAMBERT G. A plasmid system with tunable copy number[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3908.
- [25] WANG XL, LU LY, LIU QY, LI JY, WANG T, WANG J, SUN XX, SHEN XL, YUAN QP. Integration site library for efficient construction of plasmid-free microbial cell factories in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(44): 24687-24696.
- [26] ZHU JW, CHU P, FU XF. Unbalanced response to growth variations reshapes the cell fate decision landscape[J]. Nature Chemical Biology, 2023, 19(9): 1097-1104.
- [27] HE HH, WU SJ, MEI M, NING JL, LI CY, MA LX, ZHANG GM, YI L. A combinational strategy for effective heterologous production of functional human lysozyme in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 118.
- [28] DU C, ZHAO X, SONG W, HE NS, JIANG SJ, ZHOU YL, ZHANG GM. Combined strategies to improve the expression of acidic mammalian chitinase in *Pichia pastoris* for the production of N,N'-diacetylchitobiose[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 167: 107907.
- [29] YANG H, ZHAI C, YU XH, LI ZZ, TANG W, LIU YY, MA XJ, ZHONG X, LI GL, WU D, MA LX. High-level expression of proteinase K from *Tritirachium album* Limber in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 122: 38-44.
- [30] 王娜, 刘莉莉, 孙凯峰, 段舜山. 有机磷农药的构效关系及其对浮游生物的毒性效应[J]. 生态环境学报, 2012, 21(1): 118-123.
- WANG N, LIU LL, SUN KF, DUAN SS. Analysis of

- structure-activity relationship and toxicity of organophosphorus pesticide to plankton[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(1): 118-123 (in Chinese).
- [31] LIANG JJ, DONG ZT, XU N, CHEN T, LIANG J, XIA MZ, WANG FH. A comprehensive review of multifunctional nanozymes for degradation and detection of organophosphorus pesticides in the environment[J]. *Toxics*, 2024, 12(12): 926.
- [32] WANG YP, LIU C, WAN J, SUN XW, MA W, NI H. Molecular cloning and characterization of a methyl parathion hydrolase from an organophosphorus-degrading bacterium, *Serratia marcescens* MEW06[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(24). DOI: 10.1093/femsle/fny279.
- [33] 景凌云, 张泽强, 刘莎莎, 赵玉璐, 李鑫勇, 胡叶强, 郝鹏波, 孙志丽, 杨辉, 郑银琴. TiO₂/g-C₃N₄ 高效固定漆酶光酶协同催化降解毒死蜱[J]. *环境工程技术学报*, 2024, 14(6): 1847-1856.
- JING LY, ZHANG ZQ, LIU SS, ZHAO YL, LI XY, HU YQ, HAO PB, SUN ZL, YANG H, ZHENG YQ. Effective immobilization of laccase on TiO₂/g-C₃N₄ for enhanced chlorpyrifos degradation via photo-enzyme synergistic catalysis[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2024, 14(6): 1847-1856 (in Chinese).