

磷酸三酯水解酶空间结构及催化水解机理研究进展*

习海玲** 刘昌财 问县芳 赵三平

国民核生化灾害防护国家重点实验室 北京 102205

摘要 磷酸三酯水解酶 (PTH, EC 3.1.8) 能够催化水解一类人工合成、高毒的有机磷酸酯类化合物 (Organophosphate, OP), 包括有机磷农药和有机磷神经性毒剂。本文全面系统地综述了一些重要PTHs的分子结构特征和催化机制, 包括有机磷水解酶 (OPH)、甲基对硫磷水解酶 (MPH)、有机磷水解酶C2 (OPHC2)、二异丙基氟磷酸酯酶 (DFPase)、人血清对氧磷酶 (PON1) 和有机磷酸酐酶 (OPAA)。通过对以上不同类别PTHs结构与催化机制的比较与分析, 发现其一级结构、空间结构以及催化水解OP的机理存在明显的差异, 但也具相似特征, 所有PTHs均为金属依赖水解酶, 其空间结构活性腔位置均具双金属核活性中心和与底物分子结合的三个疏水性口袋, 此特征说明其共同享有PTH活性。目前, 针对PTH天然底物的研究还相对不足, 多数PTH在生物体内的作用还知之甚少。未来应结合天然底物的结构, 进行更为深入的PTH催化水解机制研究。图3 参73

关键词 有机磷水解酶; 有机磷农药; 磷酸三酯; 有机磷神经性毒剂; 催化水解机制

CLC Q556.1 : X17

Advances in research on spatial structure and catalytic mechanisms of phosphoric triester hydrolase*

XI Hailing**, LIU Changcai, WEN Xianfang & ZHAO Sanping

State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing 102205, China

Abstract Phosphoric triester hydrolases (PTHs, EC 3.1.8) have attracted much research attention due to their ability to hydrolyze and neutralize synthesized organophosphate compounds involving highly toxic organophosphate insecticides and nerve agents. Here, we systematically review the features of molecular structure and catalytic mechanism of PTHs, mainly including organophosphorus hydrolase (OPH), methyl parathion hydrolase (MPH), organophosphorus hydrolase C2 (OPHC2), diisopropyl-fluorophosphatase (DFPase), human serum paraoxonase (PON1) and organophosphorus anhydrase (OPAA). The analysis shows that these enzymes differ widely in protein sequence and three-dimensional structure, as well as in catalytic mechanism, but they also share several common features. All of the enzymes identified as PTHs are metal-dependent hydrolases that contain a hydrophobic active site with three discrete binding pockets to accommodate the substrate ester groups, which can be well explained for their identical PTH activities. So far few researches are focused on natural substrates of PTH, and the function of PTHs *in vivo* is still poorly understood. Further studies should explore the mechanism of PTH-catalyzed hydrolysis on natural substrates.

Keywords organophosphorus hydrolase; organophosphate insecticide; phosphoric triester; organophosphorus nerve agent; catalytic hydrolysis mechanism

有机磷农药的广泛使用以及有机磷神经性毒剂[塔崩 (GA)、沙林 (GB)、梭曼 (GD) 和环沙林 (GF) 和维埃克斯 (VX)]可能带来的威胁, 使寻找和鉴定能够解毒此类有机磷酸酯类化合物 (Organophosphate, OP) 的生物酶受到高度关注。1946年, Mazur在哺乳动物中首次发现能够水解含P—F键OP的生物酶^[1], 此酶可高效水解二异丙基氟磷酸酯 (Diisopropylfluorophosphate, DFP), 被命名为DFP

酶 (DFPase)^[2]。此后, 大量具水解OP的生物酶相继被鉴定和发现, 同时也造成此类酶命名上的混乱。为了解决此问题, 1992年, 生物化学和分子生物学国际联盟委员会统一将它们归为磷酸三酯水解酶 (Phosphoric triester hydrolase, PTH, EC 3.1.8), 该酶被分成两个亚类: 一是磷酸三酯酶 (Phosphotriesterase, PTE, EC 3.1.8.1) 亚类, 亦称芳二烷基磷酸酯酶 (Aryldialkylphosphatase) 亚类, 水解底物倾向于对氧磷和其它含P—O键的有机磷酸三酯类化合物, 例如有机磷水解酶 (Organophosphorus hydrolase, OPH)、甲基对硫磷水解酶 (Methyl parathion hydrolase, MPH) 和来自假产碱假单胞菌C2菌株 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C2 strains) 的有机磷水解酶C2 (OPHC2); 另一类是二异丙基氟磷酸

收稿日期 Received: 2014-11-16 接受日期 Accepted: 2015-01-06

*国民核生化灾害防护国家重点实验室基础研究项目 (SKLN-BC2013-06) 资助 Supported by the State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian (SKLNBC2013-06)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: fhxihl@163.com)

酯酶 (Diisopropyl-fluorophosphatase, DFPase, EC 3.1.8.2) 亚类, 水解底物倾向于含P—F或P—CN键的有机磷酸单酯化合物, 主要包括DFPase、人血清对氧磷酶 (Human serum paraoxonase, PON1) 和有机磷酸酐酶 (Organophosphorous acid anhydrolase, OPAA)。

PTHs晶体呈现不同的空间折叠结构, 例如OPH的“TIM桶”折叠、MPH的 β -内酰胺酶折叠、DFPase的 β -螺旋桨折叠和OPAA的“皮塔饼”折叠, 结构上的差异决定了其各自的底物特异性。然而, PTHs也有显著的相似特征, 所有PTHs均依赖二价金属阳离子与底物的相互作用而发挥活性; 底物结合位点均由3个疏水口袋构成, 且分别与底物的离去基团和另两个取代基结合。虽然OPH和MPH蛋白空间折叠结构不同, 但具相似的催化水解机制。“皮塔饼”折叠的OPAA也有类似的催化机制, 但底物结合方式与它们有明显差异。 β -螺旋桨折叠的DFPase被推定兼具水分子攻击和共价催化机制。结构与催化水解机制的阐明对PTH的应用和开发具有重要的意义, 分析比较PTH间结构与催化水解机理有助于深入和系统地理解空间结构与功能的关系。本文从序列同源性、底物特异性、分子结构特征和催化水解机制等方面对结构已被解析的所有类型PTHs进行综述, 在此基础上指出PTH的研究前景和未来值得关注的研究重点, 旨在为PTH的定向进化研究、酶法消除有机磷农药与有机磷神经性毒剂提供参考。

1 PTEs亚类空间结构及催化水解机理

1.1 有机磷水解酶(OPH)

目前, 已经从微生物和哺乳动物中发现了多种类型的OPH, 其中最重要的是从土壤假单胞杆菌 (*P. diminuta*) 和黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) 中分别分离鉴定到的Pd OPH^[3-4]和Fs OPH^[5-6]。二者具明显的PTE结构域, 均由质粒 opd 基因编码, 氨基酸序列高度一致, 达99%。

除了Pd OPH和Fs OPH外, 来自放射性农杆菌 (*Agrobacterium radiobacter* P230) 的OpdA亦是一种较为重要的OPH^[7]。OpdA由384个氨基酸组成, 分子量 (M_r) 为 35×10^3 , 与Pd OPH和Fs OPH氨基酸序列一致性超过93%^[8]。

1.1.1 底物特异性 Pd OPH和Fs OPH是目前研究最多的一种PTE, 分子量 36×10^3 , 最适pH为8-10, 最适温度约为50℃。通过亲核攻击有机磷酸三酯底物“P”原子中心的亲电子基团, 包括P—O、P—F、P—CN和P—S键来实现对底物有机磷酸三酯的水解, 是目前唯一已知可以水解VX的细菌酶类^[9]。Pd OPH和Fs OPH具广泛的水解底物谱, 能够高效水解含P—O键的有机磷酸三酯农药如对氧磷、对硫磷和内吸磷等, 有效水解DFP以及GF、GB、GD和VX在内的有机磷酸单酯类神经性毒剂。在 Co^{2+} 存在条件下, OPH水解对氧磷的速率最快 ($k_{cat} = 3\ 170\ s^{-1}$), 而水解有机磷神经性毒剂表现出相对低的催化活性, 尤其是水解VX仅为水解对氧磷活性的0.1%。OPH水解磷酸酯键的能力大小依次是P—O > P—F > P—S^[9]。虽然对含有P—S键的VX的转化数 k_{cat} 较低, 仅为 $0.3\ s^{-1}$, 但是与其它绝大多数PTE不能降解VX相比, OPH在此方面具明显的优势。

OpdA与OPH有相类似的催化水解底物谱, 最适底物均

是含P—O键的有机磷酸三酯, 然而, 其在一些底物的水解速率上存在较大差异。动力学研究表明两种酶水解对硫磷等双乙基磷酸酯的动力学常数 k_{cat} 值相当, 但是OpdA水解甲基对硫磷等双甲基磷酸酯的 k_{cat} 值显著高于OPH。此外, OpdA能够有效水解含双甲基的有机磷酸酯亚胺硫磷和倍硫磷, 而OPH几乎不能水解这两种底物^[8]。

1.1.2 分子结构特征 重组Pd OPH晶体X射线衍射结构^[10]显示Pd OPH为同二聚体蛋白 (35×10^3 /亚基), 每个亚基 (336氨基酸) 盘曲折叠形成一个 $(\alpha\beta)_8$ 桶状空间架构, 这与金属离子依赖水解酶的特征结构域“TIM桶”基序匹配^[11-14]。体外酶活实验也证明了此现象, 每一OPH蛋白分子需要1-2个金属离子才具完整水解活性。X射线晶体衍射结构证实天然OPH活性位点处存在两个 Zn^{2+} , 并直接与位于“TIM桶”中心位置的 β 片层C-末端的5个氨基酸 (H55、H57、D301、H201和H230) 配位^[11], 构成双 Zn^{2+} 金属核活性中心。除了与5个氨基酸配位, 活性中心的两个 Zn^{2+} 还与K169的羧基和溶剂中的一个水分子或氢氧根配位, 这对于酶活性中心亲核攻击底物“P”中心的亲电子基团极为重要^[15]。研究发现 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Mn^{2+} 替换 Zn^{2+} , 可保持OPH的催化活性, 由 Co^{2+} 替换 Zn^{2+} , OPH的水解活性明显增加^[15], 此特征与酰胺水解酶 (Amidohydrolase) 家族一致, 目前, OPH亦被认为是其家族成员之一。

OPH不仅能够特异性催化水解磷酸三酯、硫代磷酸三酯和硫赶磷酸三酯类有机磷农药, 亦能水解有机磷神经性毒剂; 水解底物中苯酚基是最有效的离去基团, 其次是硫醇类和卤代类基团^[8, 16-21]。OPH底物结合位点的非特异性决定了其宽的水解底物谱特征。OPH表面有3个与底物分子酯基结合的疏水性口袋^[12], 其中, 结合离去基团的疏水口袋由4个疏水性氨基酸残基W131、F132、F306和Y309构成。相应OPH突变体动力学的研究证实底物离去基团的识别主要由这些氨基酸残基决定。另外两个疏水口袋一大、一小, 分别结合底物分子的其它两个酯基。较大的疏水口袋由H254、H257、L271和M317氨基酸残基构成, 而较小的疏水口袋由G60、H06、L303和S308氨基酸残基构成。大、小疏水口袋决定了识别底物酯基侧链基团的特异性, 包括对手性磷中心的立体异构体识别^[22]。OPH水解Sp型和Rp型的立体选择性可通过调节两个大、小疏水口袋而增强、降低甚至发生转换^[23]。

OpdA和OPH的二级结构、三维结构类似, 二级结构中均含10个 β 片层, 14个 α 螺旋, 4个转角。天然状态下均为二聚体蛋白, 每个亚基盘曲折叠形成一个 $(\alpha\beta)_8$ 的“TIM桶”, 35-361氨基酸空间位置几乎完全重叠; 位于“TIM桶”中心位置 β 片层C-末端的氨基酸与两个金属离子配位构成双金属核活性中心^[24]。主要差异在于构成OPH和OpdA的大疏水性口袋的氨基酸组成不同 (H254R、H257Y和L271F), 与OPH相比, 构成OpdA大疏水性口袋的H变成更大分子Y和R, L变成更大分子F, 这加强了OpdA催化水解双甲基有机磷酸三酯的效率^[25]。OPH的突变体H254R, 水解双甲基有机磷酸三酯的活性显著提高, 但催化水解DFP和有机磷神经性毒剂的能力普遍降低^[19]。由于OpdA催化水解有机磷神经性毒剂化合物效果差, 而在降解含有较小烷基的有机磷农药方面有很大优势, 因此, 它的应用主要在水解有机磷农药相关领域。

1.1.3 催化机制 目前公认的OPH催化水解机制如图1所示^[26-27]：(a) 酶活性中心的 Zn^{2+} 离子去质子化一个水分子，产生的氢氧根与两个 Zn^{2+} 离子和D301配位，形成有活性的双金属核活性中心。(b) 对氧磷与OPH的底物结合位点结合，桥接两 Zn^{2+} 离子的氢氧根亲核进攻底物分子中带部分正电荷的磷原子，同时D301捕获氢氧根上的H质子；(c) $\beta\text{-Zn}^{2+}$ 极化底物对氧磷分子中的磷酰基氧，导致氢氧根与 $\beta\text{-Zn}^{2+}$ 的结合减弱，并远离 $\beta\text{-Zn}^{2+}$ ；对氧磷的P—O键断裂，释放对硝基酚阴离子，同时酶-产物复合物形成，并以磷酸根阴离子形式桥接两个 Zn^{2+} 阳离子；(d) 质子通过D301转移至H254并远离活性位点；产物被释放，活性位点处的氢氧根再生，重新进入催化循环。

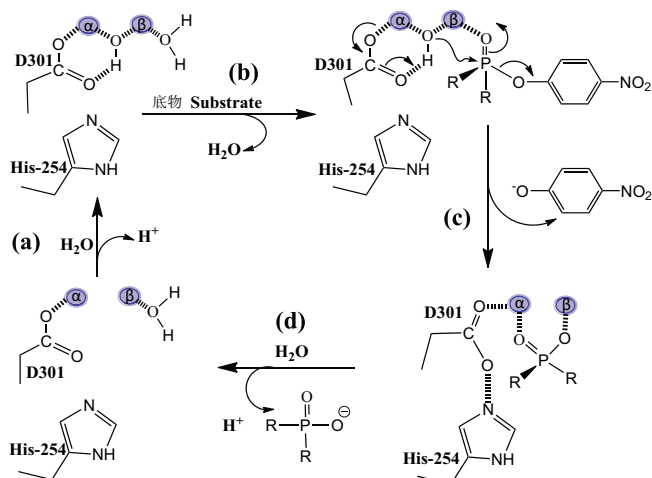


图1 OPH水解有机磷化合物(对氧磷)的反应机理^[28]。

Fig. 1 Reaction mechanism of OPH^[28]。

1.1.4 定向进化与合理设计 虽然OPH对有机磷毒剂都有催化水解活性，而且是为数不多的对VX表现出催化水解活性的生物酶之一，但是野生型OPH对VX和GD，尤其是对其毒性较高的Sp型对映异构体的活性较低^[29]。应用点突变策略合理改变活性位点，有效增加了OPH水解有机磷毒剂的活性。突变OPH的3个氨基酸(H254G、H257W和L303T)获得的突变体，不仅底物谱被拓宽，而且水解毒性更强的 $\text{S}_\text{P}\text{S}_\text{C}$ 型GD对映异构体的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 值提高了3个数量级，水解VX提高了25倍^[28, 30]。采用随机突变和定向进化的组合策略得到突变酶H257Y/L303T，其对GB、GD的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 分别是 2×10^6 和 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，比野生型OPH酶提高了15 000倍。筛选到的一个OPH突变体对外消旋VX的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 为 $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，是野生OPH的230倍，转换数 k_{cat} 为 137 s^{-1} ，是野生OPH的152倍，而且其对VX对映体的立体选择性很低^[19-21, 31]。因此，以酶的结构数据为基础，通过定向进化和合理设计能够获得具更高效水解有机磷神经性毒剂的OPH。

1.2 甲基对硫磷水解酶(MPH)

1.2.1 底物特异性和序列同源性 OPH的最适底物是对氧磷、对硫磷等含有两个乙基的有机磷酸三酯，也称为对氧磷酶或对硫磷酶。而甲基对硫磷水解酶(Methyl parathion hydrolase, MPH) (EC 3.1.8.1)，水解底物倾向于甲基对氧磷、甲基对硫磷等含有两个甲基的有机磷酸三酯。目前，已经在

Pseudomonas sp. WBC-3、*Pseudomonas putida*和*Plesiomonas* sp. M6细菌中发现了MPH，其可利用甲基对硫磷为唯一的C或P源生长，同时将甲基对硫磷完全水解成对硝基酚和双甲基磷酸^[32-33]。

来自*P. sp.* WBC-3的MPH(Psw MPH)由331个氨基酸残基构成，分子量约为 34×10^6 ，最适温度为 40°C ，在pH 9-12的范围内，能表现出较高的活力水平。Psw MPH与另两个MPHs具高的氨基酸序列一致性，均超过92%。均具明显的 β -内酰胺酶结构域，是金属 β -内酰胺酶亚家族成员之一^[32]，而与已知含有PTE结构域的Pd OPH和Fs OPH无序列同源性。

1.2.2 分子结构特征 2003年，中国科学院武汉病毒所的张先恩研究团队首次从*P. sp.* WBC-3菌株中分离、克隆了其编码基因，并进行了酶活性质的初步研究^[33-34]。2005年，他们测定并获得了分辨率为 $2.4 \text{ \AA}$ 的Psw MPH晶体结构^[32, 35]。Psw MPH为同二聚体蛋白，其单体折叠呈一种典型的 β -内酰胺酶折叠的 $\alpha\beta/\beta\alpha$ 三明治拓扑结构，而非OPH的TIM桶折叠。与其它金属 β -内酰胺酶亚家族享有共同配位结合金属的空间结构基序H-X-H-X-DH。和OPH类似，Psw MPH含有一个双金属核活性中心，两个金属离子(Zn^{2+} 和 Cd^{2+})相距 $3.5 \text{ \AA}$ ，金属离子之间由一个D(D255)的羧基与一个水分子以氢键形式配位连接，周围与富组氨酸区域(H234、H147、H149、H152、H302和D151)配位连接^[36]。在OPH，结合离去基团的位点是疏水的，由4个疏水性氨基酸残基W131、F132、F306和Y309构成；同样，MPH与离去基团结合的位点也被鉴定是由3个疏水性氨基酸构成，它们分别是F119、W179和F196，3个氨基酸中的任何一个突变成A都将导致相应的底物活性损失。与OPH相同，MPH的另外两个结合酯基的位点相对疏水，较大的由R72、L258和L273，而较小的由L65和L67构成^[32, 36]。

1.2.3 催化机制 虽然目前有限的晶体结构数据和突变体动力学研究，仍不能对MPH的水解机理进行详细描述，但MPH与OPH在底物结合位点和金属活性中心较高的相似度表明MPH可能与OPH具类似的催化水解底物机制。此外，两者对底物甲基对硫磷均有极高的水解活性($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[36]，MPH是除OPH外唯一高效水解甲基对硫磷的细菌酶类，此发现亦能支持OPH和MPH具相似催化水解机制这一观点。

1.3 有机磷水解酶C2(OPHC2)

在张先恩等发现Psw MPH的同时，范云六和伍宁丰等分离获得了一株高效水解甲基对硫磷的细菌^[37-38]，鉴定并命名为假产碱假单胞菌菌株C2(*Pseudomonas pseudoalcaligenes* strains C2)，具催化水解甲基对硫磷的酶被分离和鉴定，命名为OPHC2。编码OPHC2的基因全长975 bp，位于*P. pseudoalcaligenes*基因组外的质粒上。

OPHC2仅与目前已经鉴定的来自*Stenotrophomonas* sp. SMSP-1和*Pseudomonas* sp. OPHC3有高的序列一致性，均为98%^[39]；与其它能高效水解甲基对硫磷的OPH、OpdA等无同源性；与MPH的同源性相对较高，也仅为46%。为了确定OPHC2的归属类别，我们对其进行了结构域搜索，结果显示与包括MPH在内的其它金属 β -内酰胺酶亚家族成员相同，OPHC2也具明显的配位结合金属的H-X-H-X-DH空间结构基序，表明OPHC2也是该家族成员之一。进化树分析也证实

OPHC2与MPH具较近的亲缘关系,同在一个簇内,他们与内酯酶来自共同的祖先。

1.3.1 底物特异性 OPHC2能够高效催化甲基对硫磷^[40],但未见催化水解反应的动力学常数发表;直到最近,Gotthard G等较为全面地展示了OPHC2水解多种底物的催化活性^[39]。OPHC2不仅有PTE活性,还具酯酶和内酯酶活性,但这些催化活性并未显示出较高的水平。底物为磷酸三酯时,OPHC2的最适底物是甲基对硫磷和甲基对氧磷, k_{cat}/K_m 值为 $\sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,远低于OPH和MPH的 $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[39]。OPHC2的酯酶活性较低,水解最适底物的 k_{cat}/K_m 值也仅为 $\sim 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[39]。内酯酶活性相对较高,水解最适底物的 k_{cat}/K_m 值为 $\sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,表现出较高的底物专一性。

虽然OPHC2在催化各类型底物的性能上与其它PTE相比无明显优势,但具其它优异酶学性质特征,比如OPHC2具极高的热稳定性,催化甲基对硫磷的最适温度为65℃,75℃保温30 min仍保留有超过60%的酶活性;极高的pH稳定性,催化甲基对硫磷的最适pH为9,在pH为6和11时仍保留有超过70%的酶活性;此外,该酶不易受金属离子和EDTA的影响, Ni^{2+} 和 Co^{2+} 的加入还能显著增加酶的活性。

1.3.2 分子结构特征 OPHC2大多以同二聚体形式存在,单体分子量为 32×10^3 。2013年,OPHC2的晶体结构第一次被测定,虽然在168-210氨基酸残基处的电子密度缺失,但参考与其同源MPH相对应位置数据,推断OPHC2的每个亚基为典型的 β -内酰胺酶折叠的 $\alpha\beta/\beta\alpha$ 三明治拓扑结构^[39, 41]。OPHC2极强的热稳定性、酸碱稳定性、对金属离子和一些有机化学试剂的稳定性与其特有的空间结构紧密相关,OPHC2晶体结构中一些区别于MPH的特征可能是其具较强稳定性的原因。OPHC2和MPH同二聚体的两单体间界面均由疏水性区域构成,但OPHC2的疏水作用面较大;OPHC2结构表面分布有更多的盐键,使其表面呈现更高的电势;OPHC2单体内部具更广泛的相互作用,氢键和盐键的数量远高于MPH^[42];此外,已经证明分子内的二硫键(C110-C146)是其具良好热稳定性所必需的^[43],而MPH未见有此结构。

与MPH相类似,OPHC2具一个特征的双金属核活性中心,位于三明治结构中心 β 片层间的孔洞内。 α 位的金属离子位置较深在结构内部,与H294、H144、D143和D247发生配位。 β 位的金属离子位置较浅暴露在三明治结构外部,与3个组氨酸残基(H226、H139和H141)和一个水分子发生配位。两个金属离子分别通过与另一个水分子发生配位而连接。OPHC2的底物结合位点主要由一些疏水性氨基酸残基构成,进一步分成3个亚位点,F111、M188和W172氨基酸残基构成离去基团口袋,L250、L61、F263和L265构成较大的侧链酯基口袋,而较小的侧链酯基口袋由V55和L67两个氨基酸残基构成。这些结果主要是基于现有的Psw MPH对应结构推定的,缺少定向进化和动力学研究实验数据的支持。

1.3.3 催化机制 关于OPHC2催化水解底物的机制,未有详细的研究报道,Gotthard G等基于OPHC2和MPH在活性位点的相似性,推测其具有与MPH类似的催化水解有机磷酸三酯底物的机制^[39]。然而,OPHC2还有内酯酶和酯酶活性,显示出多种水解活性,机制上也可能是有区别的。

2 DFPases亚类空间结构及催化水解机理

2.1 二异丙基氟磷酸酯酶(DFPase)

2.1.1 底物特异性 DFPase是发现最早的具水解有机磷毒剂活性的酶类^[1]。自然界中许多生物体内均含有该酶,他们作用于有机磷酸酯的P—F或P—CN键,不仅能水解DFP,而且能水解GD、GB、GF和GA等有机磷神经性毒剂,但不能水解VX和对氧磷。依据物种分布和生化性质,可将DFPase细分为Mazur型和鱿鱼型(Squid-type)^[2, 44-45]。Mazur型DFPase分子量 40×10^3 - 96×10^3 ,广泛分布于哺乳动物体内,这类酶水解GD的速度是水解DFP速度的5-50倍,有 Mn^{2+} 激活现象,需 Mg^{2+} 作为辅基。鱿鱼型DFPase分子量 35×10^3 - 40×10^3 ,主要分布于鱿鱼神经节及肝胰腺组织中,酶促反应需要 Ca^{2+} 作为辅基, Mn^{2+} 的加入不能增加其酶促反应速率,最易水解含P—F键的DFP,以及GB、GD和GF,其次是含氰基的GA^[46-47]。由于鱿鱼型DFPase具优异的水解有机磷神经性毒剂性能、相对广的水解底物谱和在常温下较好的稳定性,使其适用于有机磷神经性毒剂的消毒^[48]。

2.1.2 分子结构特征 自2001年,先后获得了分辨率为1.8 Å (PDB-code, 1E1A)和0.85 Å (PDB-code, 1PJX)的鱿鱼型DFPase晶体结构^[49-51]。鱿鱼型DFPase由314个氨基酸残基组成,天然酶具两个钙离子,是一种钙离子依赖水解酶,呈现6个 β 片层的 β -螺旋浆折叠结构。每个 β 片层由4个褶皱的 β -片层构成,其中,每个 β 片层的第一个 β -片层中至少有1个氨基酸残基是酶分子的活性位点,而两个钙离子位于 β -螺旋浆结构中央充满水的孔洞内。第一个 Ca^{2+} 位于孔洞中心偏上位置,埋藏在内部不易暴露且与酶分子高度亲合,为结构钙离子,对于维系酶分子的空间架构具重要作用。它主要与酶分子D232侧链的1个氧原子、L273和H274的骨架氧原子以及3个水分子发生配位连接。第二个 Ca^{2+} 位于孔洞中心位置,与酶分子亲合力低容易暴露,是酶分子活性位点的重要组成部分,对于鱿鱼型DFPase行使催化水解功能至关重要^[52],主要体现在:移除活性位点结合的 Ca^{2+} ,酶将错误折叠而失去催化活性。此催化型 Ca^{2+} 除了与E21、N120、N175和D229侧链氧原子配位连接外,还与3个水分子配位连接。其中2个水分子位于 Ca^{2+} 下部充满水孔洞的终端,另一个位于酶活性位点 Ca^{2+} 的上部^[53]。

DFPase活性位点含有1个疏水裂口和位于裂口底部中心催化型的 Ca^{2+} 。裂口呈线性,一边由W244、T195、F173和M148氨基酸残基排列而成,另一边由Y144、M90、I72和E37排列形成^[54]。R146和H287残基彼此相对,填充在裂口的中心间隙。DFPase定点突变水解手性神经性毒剂的研究证实,这些氨基酸残基对于DFPase的底物特异性尤为重要^[55-56]。例如,野生型DFPase易于催化水解GF的 R_p 对映异构体,催化效率是水解 S_p 对映异构体的50倍,通过置换活性位点处的氨基酸残基突变体E37A/Y144A/R146A/T195M,水解GF对映异构体的倾向性发生改变,水解 S_p 的效率是 R_p 对映异构体的5倍^[55]。

2.1.3 催化机制 DFPase详细的催化水解机制并未完全清楚,一些地方还存有争议。2014年,Wymore T等在研究DFPase催化水解DFP和GB时提出了两个不同的水解机制(图2)^[57]。第一个机理是D229作为亲核试剂:(1)底物DFP磷酸基氧与 Ca^{2+} 配位结合,D229亲核攻击磷原子,形成磷酸化酶-

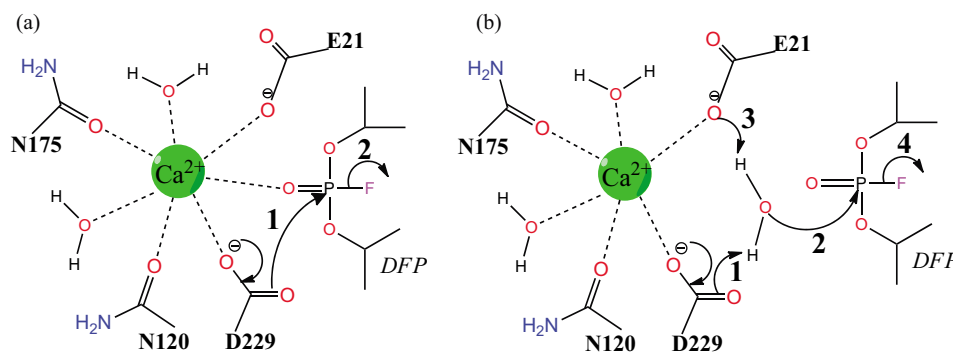


图2 鲑鱼DFP酶水解有机磷化合物 (DFP) 的机理^[57].

Fig. 2 Reaction mechanism of DFPase^[57].

五价中间产物；(2) P—F键断裂释放出来，同时产生一个四价磷酸化酶中间产物；(3) 一个水分子攻击D229羧基氧，酶-产物中间体水解；(4) D229的一个氧原子转移到产物中，DFPase重新生成(图2a)。第二个机理是活化的水分子作为亲核试剂：(1) D229从水分子中转移一个质子；(2) 活化的水分子亲核攻击底物DFP的磷原子；(3) 水分子中的另一个质子转移到E21，同时水分子的氧与磷原子成键；(4) P—F键断裂释放到溶剂中(图2b)。

2.2 人血清对氧磷酶(PON1)

人血清对氧磷酶(Human serum paraoxonase, PON1)是人体内能够水解有机磷神经性毒剂的主要酶类之一，血清中PON1的含量水平对于保护人类免受毒剂损害方面起到十分重要的作用^[58-59]。

2.2.1 底物特异性 PON1是一种内酯酶，较DFPase具更广的水解底物谱，能水解 γ -和 δ -内酯，各种芳香酯以及有机磷酸酯^[60]。已知PON1能够水解GB、GD、GF、GA和VX等有机磷神经性毒剂，以及一些有机磷农药，如对氧磷、毒死蜱氧磷和敌匹硫磷^[61-64]。但PON1具较弱的对氧磷活性，其被称为“对氧磷酶(PON1)”也纯属历史原因。

2.2.2 分子结构特征 PON1呈现6个浆片的 β -螺旋浆折叠结构，每个浆片由4个 β -片层构成^[59]。螺旋浆中心腔内含有2个钙离子(PDB-code, 1V04)，其中一个用于维系结构，另一个起催化作用。催化钙离子位于活性腔中心偏上位置，除与N224、N270、N168、D269和E53氨基酸残基的氧原子相互作用，还可能与1个水分子和底物分子的氧作用。结构钙离子位于活性腔中心，将其去除直接导致PON1变性^[65]。2个钙离子的亲合力差异较大，结构钙离子与酶分子有更强的亲合性。PON1与DFPase无明显的序列相似度(E score>3.6)，但其晶体结构极其相似，均具6个浆片的 β -螺旋浆结构并且在活性腔内都含有两个钙离子。

DFPase与PON1空间结构存在明显不同^[36]。PON1的螺旋浆结构上方有2个额外的疏水 α 螺旋(H-2和-3)，在体内不仅起到PON1连接在高密度脂蛋白锚的作用，而且盖在活性位点上方，这种 α 螺旋“帽子”结构的出现使PON1的活性位点较DFPase更加封闭^[59]。PON1底物结合位点可分成3个亚位点^[55, 59, 62]：一侧的大口袋呈延展的腔洞状，由Y71、H115、H134、S137、S166、D183、H184和K192氨基酸残基构成；另一侧的小口袋由L69、L240、H285、I291、I332、V346和F347氨

基酸残基构成；中间为结合离去基团口袋，由S193、M196、F222、F292和F293构成。这些残基中的K192、S193和M196又形成 α 螺旋H-2，F292和F293形成 α 螺旋H-3，而DFPase无此结构。此外，PON1最重要的特征之一是能够催化多种类型的反应^[60]。突变体酶的动力学分析揭示了在不同催化类型的反应中构成活性位点的氨基酸残基的贡献不尽相同。H115和H134对于PON1的内酯酶活性极其重要，H115W的PTE活性远高于野生型^[66-67]。替换离去基团口袋的F292将会显著减少内酯酶和PTE活性，而对于其酯酶的活性几乎无影响。大口袋的活性位点残基L69、H115和H184，离去基团口袋的F222和F292，小口袋的H285和V346对于PON1的PTE活性十分重要^[60]。PON1活性位点的定向进化已经显著提高了其水解神经性毒剂GD、GF和VX的活性^[62-63]。水解GF最毒的对映体Sp效率提高了2个数量级， k_{cat}/K_m 值达到 $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[63]。

2.2.3 催化机制 PON1具多种水解酶活性，主要有内酯酶、酯酶和PTE活性。研究发现其内酯酶和酯酶活性分子机理与PTE活性不同^[36]。内酯酶和酯酶活性分子机理，PON1的H115和H134活化水分子或氢氧根，然后由氢氧根亲核攻击底物的亲电试剂，最终将底物水解^[59]。PTE活性，催化水解有机磷酸三酯底物的分子机制与DFPase极为类似。例如DFPase水解有机磷酸三酯底物时，与催化 Ca^{2+} 配位的D229是亲核试剂^[54]；PON1与催化 Ca^{2+} 配位的亲核试剂是D269^[47]。此外，它们的活性位点也都有很好的对应。(1)底物有机磷酸三酯的磷酸基氧与PON1的催化 Ca^{2+} 配位结合，D269亲核攻击磷原子，形成磷酸化酶-五价中间产物；(2) P—F键断裂释放出来，同时产生一个四面磷酸化酶中间产物；(3) 一个水分子攻击D269羧基氧，酶-产物中间体水解；(4) D269的一个氧原子转移到产物中，PON1重新生成。

2.2.4 定向进化与合理设计 通过定向突变提高PON1对有机磷化合物的活性，增强其对相对神经毒剂及其高毒异构体的立体选择性是近几年研究的焦点，研究表明PON1的突变体V346A对DFP和GD的降解速率比野生型PON1分别提高了4倍和9倍，L69V对DFP的活性比野生型PON1提高了100倍，V346A和L69V对毒性更强的环沙林异构体的降解速率比野生型PON1提高了约10倍^[62]。PON1突变体H115W/Y71A和H115W/F347W不仅保持了对VX的催化效率，而且增强了水解对氧磷的能力。H115W/Y71A水解对氧磷的能力是H115W的4倍。H115W/F347W对外消旋体GB的 K_m 比野生型PON1和

H115W小,亲和能力和催化能力提高. H115W/F347W更能水解Sp型GA对映异构体^[68].

2.3 有机磷酸酐酶(OPAA)

OPAA最初从美国犹他州温泉的一个嗜盐交替单胞菌菌株(*Alteromonas* sp. strain JD6.5)中分离和纯化出来,之后在*A. undina*和*A. haloplanktis*中亦发现了OPAA,三者的同源性较高,具相似的催化活性和底物特异性^[27]. 由于其对有机磷神经性毒剂具高的催化水解活性,因而受到广泛关注. 虽然OPAA与OPH均具水解有机磷毒剂活性,但其无任何序列同源性. 交替单胞菌的OPAA与大肠杆菌X-脯氨酸二肽酶(X-Pro二肽酶)(EC 3.4.13.9)有高的氨基酸序列相似度(49%),与大肠杆菌氨肽酶P(Aminopeptidase P, AMPP)具31%的序列相似度^[9]. 序列分析显示OPAA具有较为明显的Peptidase_M24脯氨酸二肽酶蛋白结构域. 进一步的底物活性研究也证实了这点,交替单胞菌属的OPAA不仅具PTE活性,而且全部具水解二肽Leu-Pro的活性,部分具水解二肽Gly-Pro的活性^[9]. 与OPAA类似,脯氨酸二肽酶能水解G类毒剂,并且均能水解C-末端是脯氨酸的二肽(X-Pro),而不具水解N-末端为脯氨酸的二肽(Pro-X)活性^[36]. 因此,依据氨基酸序列相似度和生化特性,交替单胞菌的OPAA应属于脯氨酸二肽酶家族.

2.3.1 底物特异性 交替单胞菌属间的OPAA在结构和功能上相似,分子量在 50×10^3 - 60×10^3 之间,最适pH值范围为7.5-8.5,最适温度在40-55℃之间,需依赖 Mn^{2+} 达到酶的最高活性^[27]. 其中,来自*Alteromonas* sp. strain JD6.5的OPAA(*Asp* OPAA)研究最多,*Asp* OPAA由517个氨基酸组成,分子量为 58×10^3 ,最适pH值为8.5,最适温度为50℃. *Asp* OPAA作为脯氨酸二肽酶,在体内的作用尚不完全清楚,推定可能是水解类胶原蛋白分解产生的含脯氨酸二肽^[69]. *Asp* OPAA对含F基的有机磷酸单酯催化水解活性比对其的天然底物X-Pro高5倍^[70]. 已报道的最适底物是神经性毒剂GD,对GD的 k_{cat} 高达 $3\ 145\ s^{-1}$,此外,*Asp* OPAA能高效水解DFP、GF和GB,对GA和对氧磷转换数较低 k_{cat} 分别为85和 $124\ s^{-1}$,对VX的转换数为零^[70]. 比较*Asp* OPAA和OPH水解G类有机磷神经性毒剂的酶促反应动力学参数显示*Asp* OPAA普遍比OPH具高的 k_{cat} 值,表明OPAA在水解G类神经性毒剂的能力上普遍比OPH表现出更高的活性和特异性,然而,在水解P—S键的VX和P—O键的有机磷农药对氧磷活性上,OPAA远不及OPH.

2.3.2 分子结构特征 随着*Asp* OPAA晶体X射线衍射结构被测定,其空间立体结构和催化特性证实了OPAA是一种X脯氨酸二肽酶^[71]. 具活性的天然酶为两个二聚体组成的同四聚体蛋白,每个二聚体构成酶活性的一个功能单位. OPAA的每个亚基由两个结构域构成,一个较小的N-末端域(氨基酸残基第1-160)和一个较大的C-末端域(氨基酸残基第161-440). 两个结构域含有的 β 折叠片层数量相近,但它们的拓扑结构和形状有明显差异. N-末端域的6个 β 折叠片层,有一部分是平行的,另一部分反向平行;而C-末端域的全部5个 β 折叠片层均为反向平行. N-末端域的 β 片层扭曲, C-末端域的 β 片层呈明显弯曲状,恰似一个“皮塔饼”. 两个结构域的 α 螺旋不同, N-末端域含两对 α 螺旋,一对在 β 片层的侧面,另一对两者间通过一个 β 折叠片层相连. C-末端域呈“皮塔饼”折叠

状,具7个 α 螺旋,数量是N-末端域的近2倍,较长的4个分布在C-末端域的两个凸面位置,其余3个较短的成簇分布在C-末端域的最外层位置. C-末端域将双金属活性中心固定在 β 折叠片层高度弯曲凹面上的椭圆形孔洞内^[71].

OPAA具双 Mn^{2+} 金属核活性中心位点,金属A、B两位点相距3.3 Å,位于C-末端域 β 折叠片层中心凹面的孔洞内. A金属位点的 Mn^{2+} 在外靠近溶剂侧,与H336和E381氨基酸残基配位连接, B金属位点的 Mn^{2+} 埋于内部, D244的羧基基与其双配位连接,两金属之间通过D255和E420羧基的氧双配位桥接联系在一起. 具双金属核活性位点结构的酶,通常由一分子水或氢氧根桥接两个金属离子,然而, OPAA晶体结构中金属间并未发现水分子或氢氧根,而是发现了两金属桥接一个来自产物的氧. 为方便起见,此处描述为“氢氧根”. 上面提及的与OPAA具较近亲缘关系的大肠杆菌AMPP,它不仅具与OPAA一致的双 Mn^{2+} 金属核活性中心位点,而且在晶体结构中清晰地鉴定到桥接的氢氧根^[36].

与OPH类似, OPAA的底物结合位点也由3个较为疏水的口袋或亚位点构成,分别是小口袋、大口袋和离去基团口袋^[36]. 小口袋由位于一侧的氨基酸残基Y212、V342、H343和来自二聚体另一亚基N-末端域的D45'构成;大口袋由位于一侧的氨基酸残基L225、H226、H332、R418和来自二聚体另一亚基N-末端域的W89'构成;与其它PTE相比, OPAA的离去基团较小,主要由F292和L366两个氨基酸残基组成. 除了参与构成小口袋外, H343还与底物的磷酸基氧形成氢键,帮助定位底物便于催化反应进行^[71].

2.3.3 催化机制 尽管AMPP催化水解有机磷酸三酯活性比OPAA至少低一个数量级,但它们具相似的活性位点和较为一致的双金属活性中心. 因此,普遍认为OPAA和AMPP在水解有机磷酸三酯底物时可能采用机同机制^[71-72]. 2006年, Huang等对AMPP催化水解有机磷酸三酯底物反应进行了全面系统研究,揭示出详细的催化机理过程^[73]. 依据AMPP催化机理结合OPAA的晶体结构,推定的OPAA水解机制过程与OPH相似,但一些地方也有显著差异(图3). 质谱分析反

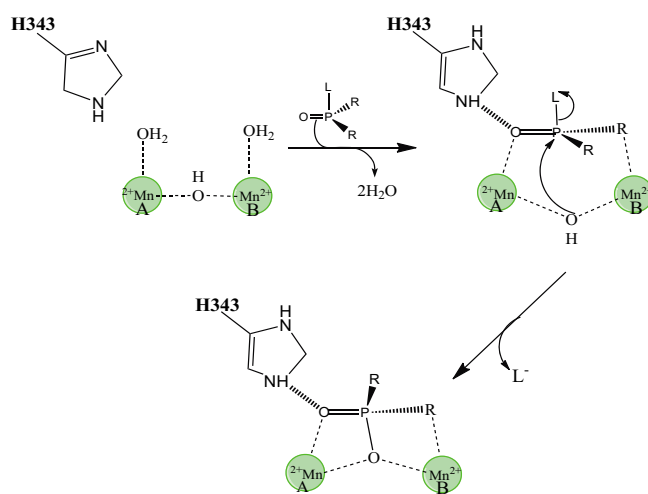


图3 推定的OPAA水解有机磷酸三酯催化机制. R: 酯或甲基; L: 离去基团, 氟或对硝基苯氧基.

Fig. 3 Proposed catalytic mechanism for OPAA cleavage of PTH. L: leaving group, which can be fluoride or p-nitrophenol; R: an ester or methyl group.

应产物证实两者亲核攻击的目标都是底物的“磷中心”；两者的亲核攻击均是由桥接金属离子的氢氧根进行，而非由共价中间产物。最显著差异为初始底物结合方式，OPAA晶体结构数据显示，底物的磷酸基氧与OPAA的A金属位点上的 Mn^{2+} 配位连接，结合到小口袋侧链酯基上的氧也与B金属位点上的 Mn^{2+} 配位连接（图3）。此金属离子与底物的双配位连接方式，无需其中的一个金属离子的分离，氢氧根就能亲核攻击底物的“磷中心”。离去基团（L⁻）解离，磷酸基产物以三配位的方式与活性位点连接。产物的此种三配位连接方式不曾在OPH见到，但在OPAA和AMPP与底物的催化反应中均发现此连接方式^[71]。

B金属位点上的 Mn^{2+} 与底物侧链酯基上氧的配位连接对OPAA催化水解对映体活性起十分重要的作用^[69, 72]。侧链是甲基的有机磷对映体化合物，B金属位点上的 Mn^{2+} 与其无配位相互作用，OPAA催化水解此化合物的两种对映体动力学常数 k_{cat} 无明显差异；OPAA催化水解侧链是甲氧基的有机磷对映体化合物，B金属位点上的 Mn^{2+} 与其能够配位相互作用，水解此化合物的两种对映体动力学常数 k_{cat} 差异显著。

3 结论与展望

与有机磷农药和有机磷神经性毒剂相关的OP种类繁多，应用广泛且具较高的毒性，对环境对人类健康存在较大影响和潜在危害，因此具催化水解此类化合物活性的PTH逐渐得到了关注。各种类型PTH的空间结构逐渐被鉴定和解析，催化水解OP的机制也不断被揭示。虽然PTH间的一级结构和空间结构在整体上具明显差异，但PTE（EC 3.1.8.1）和DFPase（EC 3.1.8.2）两种亚类均展现PTH（EC 3.1.8）活性，即催化水解OP的活性，仅是在水解有机磷酸三酯和单酯的倾向性存在不同。从空间结构和水解机理上，其疏水性底物结合位点和金属核活性中心结构间的相似与差异特征，可解释这种现象。此外，PTH水解底物OP均为人工合成，并非是PTH的天然底物。很多含有PTH的物种在其生存环境中几乎不可能接触OP，但却具水解OP的活性，这无疑带来疑问。PTH各自的天然底物都有哪些，在生物体内扮演何种角色？这些问题尚有待进一步阐明，并且相关研究对进一步深入研究PTH的空间结构与功能的关系具有重要意义。

在日益严重的环境胁迫背景下，结合国内外PTH研究现状，未来应继续加强PTH的空间结构及催化水解机理研究，并且在此基础上深入进行空间结构与催化功能关系的研究。值得进一步关注的研究内容和方向有：（1）探索和揭示PTH催化生物体内天然底物的催化机制，分析比较PTH与OP和天然底物之间的相互作用，继续深入阐明结构与功能之间的关系。（2）一些有机磷农药和有机磷神经性毒剂相关的化合物具有手性中心，且对映体间的神经毒性差异显著。PTH催化底物具明显的立体选择性，而往往一部分PTH仅对毒性相对弱的对映体具较强的水解活性，未来应加强探索PTH催化水解对映体间的机制研究。（3）酶法消除与有机磷农药和有机磷神经性毒剂相关的化合物不仅经济，而且具催化效率高、作用条件温和、无腐蚀、环境友好等特点，具广泛的应用前景。以PTH的空间结构与功能研究为基础，点突变方法修改

编码酶的基因从而定向改造酶活性腔结构，在不影响酶稳定性的情况下达到提高现有PTH水解有机磷毒剂的活性，尤其是水解VX的活性。通过平这些PTH基因的定向进化与合理设计研究，获得稳定性强、催化水解有机磷农药和有机磷神经性毒剂活性更高的PTH，也是理论机制研究的终极目标。

参考文献 [References]

- 1 Mazur A. An enzyme in animal tissue capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates [J]. *J Biol Chem*, 1946, **164**: 271-289
- 2 Mounter LA, Dien LTH, Chanutin A. The distribution of dialkylfluorophosphatases in the tissues of various species [J]. *J Biol Chem*, 1955, **215**: 691-697
- 3 Dave KI, Miller CE, Wild JR. Characterization of organophosphorus hydrolases and the genetic manipulation of the phosphotriesterase from *pseudomonas-diminuta* [J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**: 55-68
- 4 Hoskin FC, Walker JE, Dettbarn WD, Wild JR. Hydrolysis of tetriso by an enzyme derived from *Pseudomonas diminuta* as a model for the detoxication of *O*-ethyl *S*-(2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothiolate (VX) [J]. *Prog Biochem Pharmacol*, 1995, **49**: 711-715
- 5 Pogell BM, Rowland SS, Steinmann KE, Speedie MK, Hoskin FC. Genetic and biochemical evidence for the lack of significant hydrolysis of soman by a *Flavobacterium* parathion hydrolase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 610-611
- 6 Somara S, Siddavattam D. Plasmid mediated organophosphate pesticide degradation by *Flavobacterium balustinum* [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **36**: 627-631
- 7 Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG. Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3371-3376
- 8 Yang H, Carr PD, McLoughlin SY, Liu JW, Horne I, Qiu X, Jeffries CMJ, Russell RJ, Oakeshott JG, Ollis DL. Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution [J]. *Protein Eng*, 2003, **16**: 135-145
- 9 Theriot CM, Grunden AM. Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**: 35-43
- 10 Benning MM, Shim H, Raushel FM, Holden HM. High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* [J]. *Biochem*, 2001, **40**: 2712-2722
- 11 Benning MM, Kuo JM, Raushel FM, Holden HM. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 1995, **34**: 7973-7978
- 12 Vanhooke JL, Benning MM, Raushel FM, Holden HM. Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate [J]. *Biochemistry*, 1996, **35**: 6020-6025
- 13 Kim J, Tsai PC, Chen S-L, Himo F, Almo SC, Raushel FM. Structure of diethyl phosphate bound to the binuclear metal center of phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 2008, **47**: 9497-9504
- 14 Jackson C, Kim HK, Carr PD, Liu JW, Ollis DL. The structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta -Proteins Proteomics*, 2005, **1752**: 56-64

- 15 Omburo GA, Kuo JM, Mullins LS, Raushel FM. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 13278-13283
- 16 Caldwell SR, Newcomb JR, Schlecht KA, Raushel FM. Limits of diffusion in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* [J]. *Biochemistry*, 1991, **30**: 7438-7444
- 17 Nowlan C, Li Y, Hermann JC, Evans T, Carpenter J, Ghanem E, Shoichet BK, Raushel FM. Resolution of chiral phosphate, phosphonate, and phosphinate esters by an enantioselective enzyme library [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 15892-15902
- 18 Lai K, Stolowich NJ, Wild JR. Characterization of P-S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **318**: 59-64
- 19 Cho CMH, Mulchandani A, Chen W. Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4681-4685
- 20 Cho CMH, Mulchandani A, Chen W. Functional analysis of organophosphorus hydrolase variants with high degradation activity towards organophosphate pesticides [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2006, **19**: 99-105
- 21 Schofield DA, DiNovo AA. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S [J]. *J Appl Microb*, 2010, **109**: 548-557
- 22 Chen-Goodspeed M, Sogorb MA, Wu FY, Hong SB, Raushel FM. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**: 1325-1331
- 23 Chen-Goodspeed M, Sogorb MA, Wu FY, Raushel FM. Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**: 1332-1339
- 24 Horne I, Qiu XH, Ollis DL, Russell RJ, Oakeshott JG. Functional effects of amino acid substitutions within the large binding pocket of the phosphotriesterase OpdA from *Agrobacterium* sp. P230 [J]. *FEMS Microb Lett*, 2006, **259**: 187-194
- 25 Ely F, Hadler KS, Gahan LR, Guddat LW, Ollis DL, Schenk G. The organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* displays mechanistic flexibility for catalysis [J]. *Biochem J*, 2010, **432**: 565-573
- 26 Aubert SD, Li Y, Raushel FM. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 2004, **43**: 5707-5715
- 27 Raushel FM. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5**: 288-295
- 28 Tsai PC, Bigley A, Yingchun Li, Ghanem E, C. Linn Cadieux, Shane A. Kasten, Tony E. Reeves, Douglas M. Cerasoli, Raushel FM. Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 2010, **49**: 7978-7987
- 29 Hong SB, Raushel FM. Stereochemical constraints on the substrate specificity of phosphotriesterase [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**: 1159-1165
- 30 Tsai PC, Fox N, Bigley AN, Harvey SP, Barondeau DP, Raushel FM. Enzymes for the homeland defense: optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents [J]. *Biochemistry*, 2012, **51**: 6463-6475
- 31 Bigley AN, Xu C, Henderson TJ, Harvey SP, Raushel FM. Enzymatic Neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**: 10426-10432
- 32 Dong YJ, Bartlam M, Sun L, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, Rao ZH, Zhang XE. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3 [J]. *J Mol Biol*, 2005, **353**: 655-663
- 33 陈亚丽, 张先恩, 刘虹, 王银善, 夏祥明. 甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBC-3 的筛选及其降解性能的研究[J]. 微生物学报, 2002, **42**: 490-497 [Chen YL, Zhang XE, Liu H, Wang YS, Xia XM. Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2002, **42**: 490-497]
- 34 楚晓娜, 张先恩, 陈亚丽, 刘虹, 宋冬林. 假单胞菌WBC-3甲基对硫磷水解酶性质的初步研究[J]. 微生物学报, 2003, **43**: 453-459 [Chu XN, Zhang XE, Chen YL, Liu H, Song DL. Study on the properties of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3 [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **43**: 453-459]
- 35 Sun L, Dong YJ, Zhou YF, Yang MJ, Zhang CG, Rao ZH, Zhang XE. Crystallization and preliminary X-ray studies of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3 [J]. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 2004, **60**: 954-956
- 36 Bigley AN, Raushel FM. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases [J]. *Biochim Biophys Acta -Proteins Proteomics*, 2013, **1834**: 443-453
- 37 Ningfeng W, Minjie D, Guoyi L, Xiaoyu C, Bin Y, Yunliu F. Cloning and expression of *ophc2*, a new organophosphorus hydrolase gene [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, **49**: 1245-1249
- 38 邓敏捷, 伍宁丰, 梁果义, 初晓宇, 姚斌, 范云六. 一种新的有机磷降解酶基因 $ophc2$ 的克隆与表达[J]. 科学通报 2004, **49**: 1068-1072 [Deng MJ, Wu NF, Liang GY, Chu XY, Yao B, Fan YL. Cloning and expression of *ophc2*, a new organophosphorus hydrolase gene [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, **49**: 1245-1249]
- 39 Gotthard G, Hiblot J, Gonzalez D, Elias M, Chabriere E. Structural and enzymatic characterization of the phosphotriesterase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**: e77995
- 40 Chu XY, Wu NF, Deng MJ, Tian J, Yao B, Fan YL. Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: purification and characterization [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, **49**: 9-14
- 41 Gotthard G, Hiblot J, Gonzalez D, Chabriere E, Elias M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the organophosphorus hydrolase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [J]. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2013, **69**: 73-76
- 42 Luo XJ, Kong XD, Zhao J, Chen Q, Zhou J, Xu JH. Switching a newly discovered lactonase into an efficient and thermostable phosphotriesterase by simple double mutations His250Ile/Ile263Trp [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, **111**: 1920-1930.
- 43 Chu XY, Tian J, Wu NF, Fan YL. An intramolecular disulfide bond is required for the thermostability of methyl parathion hydrolase, OPHC2 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **88**: 125-131
- 44 问芸芳, 习海玲, 陈立坤, 管臣, 罗伟清. 有机磷神经毒剂降解酶研究进展 [J]. 广州化工. 2010, **38**: 66-69 [Wen XF, Xi HL, Chen LK, Guan C, Luo WQ. Advances on organophosphorus nerve agents degradation [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2010, **38**: 66-69]
- 45 Richardt A, Blum M-M. Decontamination of warfare agents: enzymatic methods for the removal of B/C weapons [M]. Darmstadt: John Wiley & Sons, 2008
- 46 Hartleib J, Ruterjans H. High-yield expression, purification, and

- characterization of the recombinant diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2001, **21**: 210-219
- 47 Blum M-M, Timperley CM, Williams GR, Thiermann H, Worek F. Inhibitory potency against human acetylcholinesterase and enzymatic hydrolysis of Fluorogenic nerve agent mimics by human paraoxonase 1 and squid diisopropyl fluorophosphatase [J]. *Biochem*, 2008, **47**: 5216-5224
 - 48 Prokop Z, Opluštil F, DeFrank J, Damborský J. Enzymes fight chemical weapons [J]. *Biotech J*, 2006, **1**: 1370-1380
 - 49 Koepke J, Scharff EI, Lucke C, Ruterjans H, Fritzsche G. Statistical analysis of crystallographic data obtained from squid ganglion DFPase at 0.85 angstrom resolution [J]. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 2003, **59**: 1744-1754
 - 50 Scharff EI, Lucke C, Fritzsche G, Koepke J, Hartleib J, Dierl S, Ruterjans H. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of DFPase from *Loligo vulgaris* [J]. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 2001, **57**: 148-149
 - 51 Scharff EI, Koepke J, Fritzsche G, Lucke C, Ruterjans H. Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* [J]. *Structure*, 2001, **9**: 493-502
 - 52 Hartleib J, Geschwindner S, Scharff EI, Ruterjans H. Role of calcium ions in the structure and function of the di-isopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* [J]. *Biochem J*, 2001, **353**: 579-589
 - 53 Blum M-M, Mustyakimov M, Rueterjans H, Kehe K, Schoenborn BP, Langan P, Chen JCH. Rapid determination of hydrogen positions and protonation states of diisopropyl fluorophosphatase by joint neutron and X-ray diffraction refinement [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**: 713-718
 - 54 Blum M-M, Loehr F, Richardt A, Rueterjans H, Chen JCH. Binding of a designed substrate analogue to diisopropyl fluorophosphatase: Implications for the phosphotriesterase mechanism [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 12750-12757
 - 55 Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, Khanal A, McAndrew CW, Bahnson BJ, Lenz DE, Cerasoli DM. Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model [J]. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*, 2004, **1702**: 67-77
 - 56 Katsemi V, Lucke C, Koepke J, Lohr F, Maurer S, Fritzsche G, Ruterjans H. Mutational and structural studies of the diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* shed new light on the catalytic mechanism of the enzyme [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**: 9022-9033
 - 57 Wymore T, Field MJ, Langan P, Smith JC, Parks JM. Hydrolysis of DFP and the nerve agent (S)-sarin by DFPase proceeds along two different reaction pathways: implications for engineering bioscavengers [J]. *J Phys Chem B*, 2014, **118**: 4479-4489
 - 58 Cowan J, Sinton CM, Varley AW, Wians FH, Haley RW, Munford RS. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, **173**: 1-6
 - 59 Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Tokar L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes [J]. *Nat Struct Biol*, 2004, **11**: 412-419
 - 60 Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**: 6371-6382
 - 61 Josse D, Xie WH, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**: 2816-2825
 - 62 Amitai G, Gaidukov L, Adani R, Yishay S, Yacov G, Kushnir M, Teitlboim S, Lindenbaum M, Bel P, Khersonsky O, Tawfik DS, Meshulam H. Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase [J]. *Febs J*, 2006, **273**: 1906-1919
 - 63 Gupta RD, Goldsmith M, Ashani Y, Simo Y, Mullokandov G, Bar H, Ben-David M, Leader H, Margalit R, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**: 120-125
 - 64 Valiyaveetil M, Alamneh Y, Biggernann L, Soojhawon I, Doctor BP, Nambiar MP. Efficient hydrolysis of the chemical warfare nerve agent tabun by recombinant and purified human and rabbit serum paraoxonase 1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **403**: 97-102
 - 65 Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases - Structural stability and enzymatic activity [J]. *Drug Metab Disposition*, 1998, **26**: 653-660
 - 66 Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 7649-7656
 - 67 Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 7657-7665
 - 68 Kirby SD, Norris JR, Smith JR, Bahnson BJ, Cerasoli DM. Human paraoxonase double mutants hydrolyze V and G class organophosphorus nerve agents [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, **203**: 181-185
 - 69 Hill CM, Li WS, Cheng TC, DeFrank JJ, Raushel FM. Stereochemical specificity of organophosphorus acid anhydrolase toward p-nitrophenyl analogs of soman and sarin [J]. *Bioorg Chem*, 2001, **29**: 27-35
 - 70 Cheng TC, Liu L, Wang B, Wu J, DeFrank JJ, Anderson DM, Rastogi VK, Hamilton AB. Nucleotide sequence of a gene encoding an organophosphorus nerve agent degrading enzyme from *Alteromonas haloplanktis* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, **18**: 49-55
 - 71 Vyas NK, Nickitenko A, Rastogi VK, Shah SS, Quiocho FA. Structural insights into the dual activities of the nerve agent degrading organophosphate anhydrolase/prolidase [J]. *Biochemistry*, 2010, **49**: 547-559
 - 72 Hill CM, Wu FY, Cheng TC, DeFrank JJ, Raushel FM. Substrate and stereochemical specificity of the organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas* sp JD6.5 toward p-nitrophenyl phosphotriesters [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, **10**: 1285-1288
 - 73 Huang LF, Su BS, Jao SC, Liu KT, Li WS. Aminopeptidase P mediated detoxification of organophosphonate analogues of sarin: mechanistic and stereochemical study at the phosphorus atom of the substrate [J]. *Chembiochem*, 2006, **7**: 506-514