

多点突变提高DhaA对芥子气的活性和热稳定性

赵渊中¹ 钟近艺^{1,2*} 郭楠^{1,2} 董志扬³ 林洁³

¹中国人民解放军防化研究院 北京 102205

²国民核生化灾害防化国家重点实验室 北京 102205

³中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

摘要 为提高烷基卤脱卤酶DhaA对芥子气的活性和热稳定性,采用Autodock软件计算DhaA突变前后与芥子气的结合情况,利用重叠延伸PCR和DNA无缝拼接结合的方法,改变DhaA活性空腔进出口通道的大小,构建包含5个位点的DhaA突变体(Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe);将DhaA及其突变体构建在pET-28a载体上后,在*Escherichia coli* BL21 (DE3)中进行表达,比较纯化后的野生型与突变体在酶学性质方面的变化情况. Autodock分子对接结果显示,突变后的DhaA与芥子气的结合能、结合效率和抑制常数均小于野生酶,突变体对芥子气的比活性提高了1.4倍,对10 mg/mL芥子气的降解率提高了近20%. 热稳定性实验发现, DhaA突变体在50 °C水浴1 h后残余酶活为76%,比野生型DhaA提高了19%. DhaA突变体的 T_m 值为56 °C,比野生型DhaA提高了6 °C. 综上表明改变DhaA活性空腔内的进出口通道可以提高DhaA的热稳定性和对芥子气的催化活性. (图11 表2 参10)

关键词 多点突变; 进出口通道; DhaA; 芥子气; 催化活性; 热稳定性

CLC X172 : Q55

Improvement in the thermostability and activity of DhaA against sulfur mustard by multipoint mutagenesis

ZHAO Yuanzhong¹, ZHONG Jinyi^{1,2*}, GUO Nan^{1,2}, DONG Zhiyang³ & LIN Jie³

¹Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China

²State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing 102205, China

³State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract In order to improve the thermostability and activity of DhaAs against sulfur mustard, we engineered DhaA thermostability and activity against sulfur mustard by modification of residues in the access tunnel. A recombinant plasmid pET28a-DhaA-Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe containing five mutant genes was constructed by overlap extension PCR and seamless cloning. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The native and mutated DhaAs were separately expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Both DhaAs were purified and characterized. The mutated DhaA showed 1.4-fold higher catalytic efficiency than the native DhaA. Moreover, the degradation rate of 10 mg/mL sulfur mustard increased by 20%. Thermostability analysis revealed that the relative activity after storing at 50 °C for 1 h was 76%, and was 19% higher than that of the native DhaA. Furthermore, melting temperature (T_m) of the mutated DhaA was 56 °C, which was 6 °C higher than that of the native DhaA. Analysis data of the molecular docking was matched with the experimental result of the mutants. Therefore, engineering the access tunnels of DhaA is a feasible strategy to improve the thermostability and activity against sulfur mustard.

Keywords multipoint mutagenesis; access tunnel; DhaA; sulfur mustard; catalytic activity; thermostability

糜烂性军用毒剂芥子气(化学成分为双-2-氯乙基硫醚^[1])一直被称为“毒剂之王”,洗消技术是快速降解处置芥子气的有效措施,目前主要有两个途径,一是基于有效氯和有效氧的硫原子氧化途径,另一个途径是通过超强碱进行卤代烷消除反应^[2].但是这两种方法研制的洗消剂都存在腐蚀性,不能用于人员和皮肤洗消.以DhaA为代表的烷基卤脱卤酶(HLDs)可以水解断裂芥子气的碳氯键,同时具有无毒无腐蚀环境友好的特点,有望用于研发新型绿色洗消剂活性

组分,替代传统化学型洗消技术^[3-5].

本课题组前期克隆了DhaA基因在大肠杆菌中表达后,评价了DhaA对芥子气的酶学特性^[6].结果表明,DhaA降解芥子气最适反应温度为37 °C,最适pH为8.6, K_m 为2.2 mmol/L,对浓度低于5 mg/mL的芥子气降解率可达80%,但随着芥子气浓度继续提高,降解率显著降低,当芥子气浓度为10 mg/mL时,降解率低至49%.此外,DhaA易受温度影响而失活,失活温度为29 °C, T_m 值为50 °C.因此,要想让DhaA成为洗消活性组分,还需要通过分子改造的方式,继续提高DhaA对芥子气的降解活性和热稳定性.

收稿日期 Received: 2016-08-11 接受日期 Accepted: 2016-09-14

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

国外有关DhaA改造的报道主要集中在以1,2,3-三氯丙烷(TCP)、1,2-二溴乙烷(EDB)、1,2-二氯乙烷(DCE)和六六六等持久性难降解有机物(Persistent Organic Pollution, POPs)为底物^[7]。Jiri Damborsky等对DhaA进行定向进化,筛选出了对TCP催化活性提高3倍的突变体Cys176Tyr和提高8倍的双突变体Cys176Tyr + Tyr273Phe,突变位点均位于DhaA进出口通道上^[8]。如图1,分子动力学模拟表明,进出口通道在四步循环中起着重要的作用:(1)结合底物;(2)结合催化用的水;(3)释放卤素;(4)释放醇。该突变体缩小了进出口通道大小,避免了多余水分子进入活性中心后对碳卤键断裂的抑制作用,提高了DhaA催化TCP限速步骤的反应常数 k_2 ,从而大幅提高了对TCP的催化活性。由此推测改变进出口通道上的氨基酸残基是获得良性突变体的可能策略。

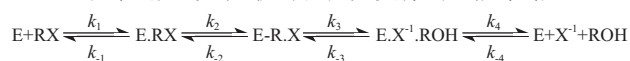


图1 DhaA的动力学过程^[4]。

Fig. 1 Kinetic mechanism of DhaA^[4]。

E: Enzyme; RX: Substrate (halogenated alkane); E·RX: Enzyme-substrate complex; E-R·X: Alkyl-enzyme intermediate; E·X⁻¹·ROH: Enzyme-product complex; X⁻¹: Halide product; ROH: Alcohol product. k_i : Kinetic constant of an individual catalytic step.

DhaA进出口通道上氨基酸分析表明, Ile135、Cys176、Val245、Leu246、Tyr273有类似于“门”的作用,起着控制通道开关的作用。Jiri Damborsky等进一步以双突变体Cys176Tyr+Tyr273Phe为出发酶,对位于进出口通道上的其它氨基酸进行点饱和突变,成功获得了多个良性突变体,其中DhaA突变体(Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe)对TCP的催化活性提高了32倍^[9]。

另有文献报道了对DhaA进出口通道区域进行定向进化,获得了多个热稳定性提高的良性突变体,分析结构发现,良性突变体同样使进出口通道缩小,增加了进出口通道的疏水作用,而疏水作用可以减少外界环境对蛋白分子的影响,增强蛋白稳定性^[10]。

迄今为止,以芥子气为底物的DhaA蛋白质工程改造未见报道。芥子气难溶于水(在水中的溶解度为0.7 g/L),这与TCP的溶解度相似,因此可考虑增加DhaA进出口通道的疏水作用,以增加突变体对芥子气的活性和热稳定性。

在以上研究思路的启发下,本研究首先尝试用Autodock软件模拟DhaA野生型和突变体(Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe)与芥子气的分子对接过程,从该突变体的空腔结构变化,芥子气与突变体的结合能变化情况来考察该突变体对芥子气的催化活性,并进一步通过重叠延伸PCR和DNA无缝拼接结合的方法,尝试将这5个突变位点一次性构建在DhaA上,考察该突变体对芥子气的酶学特性及其热稳定性,从而使芥子气的酶法洗消走向实际应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒 重组大肠杆菌表达载体pET28a-DhaA由中国科学院微生物研究所提供; *Escherichia coli* BL21 (DE3)和*E. coli* Trans-T1感受态细胞购自全式金公司。

1.1.2 试剂盒 DNA凝胶回收试剂盒,质粒DNA小量提取

试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 工具酶 Fast Pfu聚合酶购自全式金公司; Exnase MultiS购自诺唯赞生物科技有限公司。

1.1.4 试剂 改良型Bradford蛋白质浓度测定试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 卡那霉素(Kanamycin)购自北京鼎国; DNA分子质量标准购自北京三博远志生物技术公司。HD(纯度≥99%)由防化研究院提供。其他化学试剂均为分析纯;

1.1.5 培养基 LB培养基(1 L): 5 g酵母粉, 10 g蛋白胨, 10 g氯化钠, 加蒸馏水补足1 L; LB 固体培养基: 在LB液体培养基中加入1.5%的琼脂粉。

1.2 分子对接试验

1.2.1 受体分子的准备 在PDB数据库中分别下载DhaA野生型和DhaA突变体(Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe)的蛋白结构(分别为1CQW和4FW6), 用Chimera删除蛋白结构上多余的氨基酸和小分子, 作为受体分子。

1.2.2 配体分子的准备 用Chem3D计算HD的最低能量, 作为配体分子。

1.2.3 分子对接过程 在对接前, 先用Autogrid程序对配体和受体进行格点计算, 相关参数设置如下: 格子大小选长宽高均为40的立方体, 格子的间隔为0.5 Å, 配基上的可旋转单键、非极性氢及其相关连的碳原子性质由AutoTools工具分配。

在此基础上, 用Autodock 4.0程序分别对配体和受体进行分子对接计算, 对接的相关参数设置如下: ga pop size 300、ga num evals 250 000、ga num generations 27 000、ga run 100, 搜索算法选用Lamarckian Genetic Algorithm。

1.3 DhaA突变体构建过程

1.3.1 多点突变 采用重叠延伸PCR和DNA无缝拼接结合的方法进行DhaA突变体构建。首先使用primer 5.0软件设计引物, 设计引物时加入突变位点, 引物序列如表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Oligonucleotides used as primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
1	AAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGTCTGAAATCGG
2	CCAGGTCGGGAACGACGGATGAACCTCAT
3	ATCCGTCGGTTCGCCACCTGGGATGAATGG
4	ACGGACGACGTATTTTGGCAGTGCCTTC
5	CTGCCAAAATACGTCGTCCTCCACTGACC
6	GCGGGATGATAAAACCTGGGGTGCCCCAAAC
7	CCAGGTTTATCATCCCGCGGCTGAAGCC
8	TTCCTGGAGGAAGTGCAGACACAGGGCCGAT
9	TGGTCTGCACTTCTCCAGGAAGACAATCCG
10	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTACAGGGCAGGCA

DhaA的多点突变步骤如图2:(1)以pET28a-DhaA为模板, 分别以引物1和2、引物3和4、引物5和6、引物7和8、引物9和10进行PCR扩增, PCR扩增反应体系和程序参考《分子克隆实验指南》^[12], 扩增包含突变位点的5个片段, 分别记为①、②、③、④、⑤。(2)以片段②、③为模板, 引物3和6进行重叠延伸PCR, 得到组合片段②③; 以片段④、⑤为模板, 引物7和10进行重叠延伸PCR, 得到组合片段④⑤; 以片段②③、④⑤为模板, 引物3和10进行重叠延伸PCR, 得到组合片段②③④⑤。

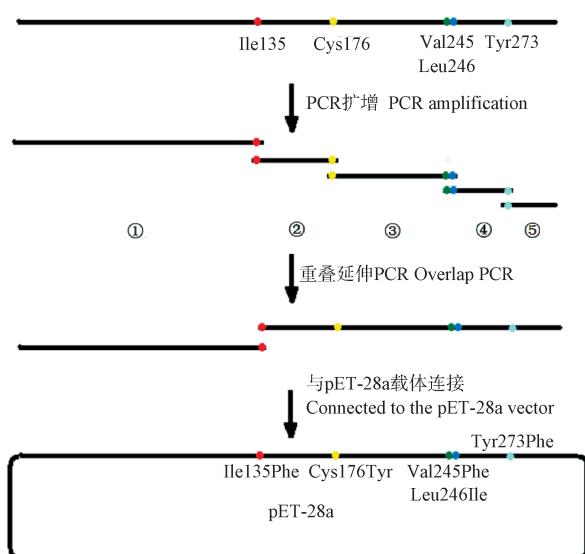


图2 构建DhaA突变体的步骤。

Fig. 2 Steps to construct mutated DhaA.

每步完成后将PCR产物进行琼脂糖凝胶鉴定,并用凝胶回收试剂盒回收目的条带。

1.3.2 重组载体的构建 使用Exnase MultiS进行DNA的无缝拼接,将片段①、片段②③④⑤与同样经过PCR扩增含有重叠区域的pET-28a进行三片段拼接,构建重组质粒。反应体系和操作步骤参考Exnase MultiS使用说明书。

1.3.3 转化及测序验证 拼接完成后将重组质粒转入克隆菌株*E. coli* Trans-T1中,涂板后挑取单克隆,对单克隆培养并提取质粒进行菌落PCR验证后,送北京擎科新业生物技术有限公司测序。测序无误后将重组质粒再转入表达菌株*E. coli* BL21 (DE3)中,−80 °C保菌。

1.4 DhaA突变体的诱导表达和纯化

1.4.1 DhaA突变体的诱导表达 将保存于−80 °C的菌液按1%接菌量接种于含终浓度50 μg/mL kana的LB培养液中,37 °C 200 r/min过夜培养。之后分装到含50 μg/mL kana的LB培养液摇瓶中,装液量为五分之一,37 °C 200 r/min振荡培养至菌体OD₆₀₀值达到0.6-0.8,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,16 °C诱导过夜。将菌液转移到离心管中,4 °C 6 000 r/min离心10 min后倒掉上清,使用Buffer A重悬细胞,将细胞重悬液放入冰浴中用超声波细胞破碎仪破碎菌体(参数为超声频率20 kHz,50个循环,工作时间5 s,间隙时间5 s),破碎后菌液变得清澈,4 °C 10 000 r/min再离心10 min取上清,得到目的蛋白的粗酶液。

1.4.2 粗酶液的纯化 使用快速蛋白液相色谱(FPLC)纯化目的蛋白,所有试剂和样品在纯化前须先过0.22 μm滤膜,实验中HisTrap HP亲和和层析所用的Buffer如下: Buffer A为20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑, pH 7.5; Buffer B为20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑, pH 7.5。纯化完成后将收集的蛋白用HisTrap Desalting脱盐至Buffer C (50 mmol/L Gly-NaOH, pH 8.6)中,样品纯化后,使用SDS-PAGE电泳检测目的蛋白。测定蛋白浓度用Bradford方法,酶液放到4 °C保存。

1.5 DhaA突变体的酶学性质测定

1.5.1 DhaA突变体对芥子气的比活力 使用氯离子电极比较DhaA野生型和DhaA突变体对芥子气的活性。反应体系总体积为5 mL,缓冲液为0.1 mol/L HEPES,用NaOH调至pH 7.5,加入终浓度1%的Brij35与10%的丙三醇,0.2 mg/mL蛋白酶,2 mg/mL的芥子气。45 °C反应10 min,在线监测氯离子随时间的变化情况,以10 min芥子气自然水解的氯离子浓度为对照,计算酶的比活力(nmol min^{−1} mg^{−1})。

1.5.2 DhaA突变体对芥子气的降解率 使用Agilent 7890A气相色谱比较DhaA野生型和DhaA突变体对不同浓度芥子气的降解率。反应体系总体积为1 mL,芥子气初始浓度分别为2、4、6、8、10 mg/mL,其余反应成分同2.5.1。反应30 min后,加入2 mL二氯甲烷萃取,使用Agilent 7890A气相色谱进行分析。分析条件为: FID检测器,检测器温度280 °C,进样量1 μL,柱流量1.5 mL/min,升温程序40 °C保持1 min,30 °C/min升温至200 °C,保持2 min,30 °C/min升温至280 °C保持1 min。

1.5.3 DhaA突变体的最适作用温度 在30-60 °C (间隔5 °C)条件下,测定酶活力,以确定最适反应温度。

1.5.4 DhaA突变体的最适pH 在最适温度下, pH值范围为5-10的反应缓冲液(其中pH值5.0-7.0用100 mmol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, pH值7.0-9.0用100 mmol/L的Tris-HCl缓冲液, pH值9.0-10.0用100 mmol/L的NaHCO₃-NaOH缓冲液),确定最适pH。

1.5.5 DhaA突变体的热稳定性 将DhaA野生型和DhaA突变体酶液分别置于30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C水浴中保温1h后,再置于冰上5 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液,检测剩余酶活。用圆二色谱(CD)测定0.3 mg/mL浓度下DhaA野生型和DhaA突变体在程序升温条件下290 nm到320 nm的吸收光,并将结果拟合得出T_m。

1.5.6 DhaA突变体的动力学参数测定 在芥子气浓度分别为2、4、6、8、10、12 mmol/L, pH值为8.5, 40 °C条件下,测定DhaA突变体酶促反应的初速度v,以底物浓度和初速度做双倒数曲线,计算DhaA突变体酶促反应的米氏常数K_m值和最大反应速度V_{max}值。

2 结果与分析

2.1 分子对接情况

Autodock软件模拟DhaA野生型与突变体对芥子气的分子对接情况如表2所示,突变体对芥子气的结合能、结合效率和抑制常数均小于野生型,推测DhaA突变体能够提高对芥子气的催化活性。

2.2 DhaA突变体的构建情况

使用PCR扩增目的基因中包含突变位点的5个片段,基因验证图如图3所示。之后进行重叠延伸PCR,基因验证图如图4A,做无缝拼接前的三片段基因验证图如图4B所示。

表2 Autodock模拟结果

Table 2 The autodock simulation results

结合参数 Binding constant	DhaA野生型 DhaA wild type	DhaA突变体 Mutated DhaA	变化值 Variation
结合能 Binding energy	−3.92	−4.37	0.45
配体效率 Ligand efficiency	−0.56	−0.62	0.06
抑制常数 Inhibition constant (c/mmol L ^{−1})	1.33	0.62	0.71

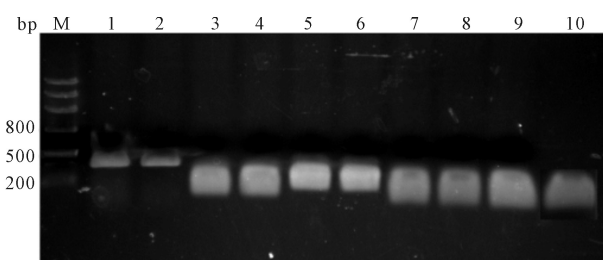


图3 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳分析。

Fig. 3 Electrophoresis analysis of PCR products of DhaA.

M: DNA marker; Lane 1-2: fragment of ①; Lane 3-4: fragment of ②; Lane 5-6: fragment of ③; Lane 7-8: fragment of ④; Lane 9-10: fragment of ⑤.

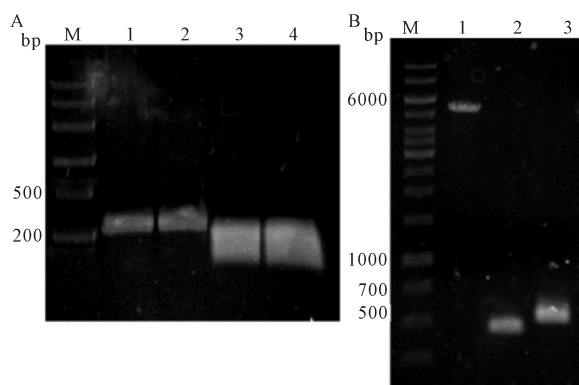


图4 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳分析。(A) M孔道: DNA分子质量标准; 1-2孔道: 片段②③; 3-4孔道: 片段④⑤; (B) M孔道: DNA分子质量标准; 1孔道: 片段pET28a; 2孔道: 片段①; 3孔道: 片段②③④⑤。

无缝拼接构建的重组质粒进行测序验证, 测序结果表明5个位点均已成功突变。

2.3 DhaA突变体的表达和纯化

样品表达纯化后的SDS-PAGE电泳分析结果见图5。发现在 36×10^3 处的条带与我们基因预测所得的分子量一致。测得突变体表达产生的可溶性蛋白占到总蛋白含量的80%以上, 表明可溶性表达良好。用超滤离心管浓缩纯化后的蛋白, 并

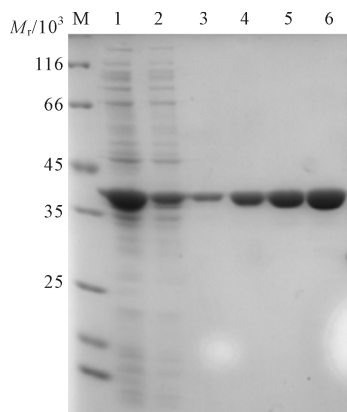


图5 DhaA突变体表达和纯化的SDS-PAGE。

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of mutant DhaA.

M: protein marker; Lane 1-2: Crude cell extract; Lane 3-6: After His-tag purification.

用改良型Bradford蛋白质浓度测定试剂盒测得DhaA突变体的浓度为10 mg/mL。

2.4 DhaA突变体的酶学性质

2.4.1 DhaA突变体对芥子气得比活力 如图6所示, 在线监测10 min内反应体系中氯离子浓度变化, 可看出DhaA突变体在单位时间内产生氯离子的量明显高于DhaA野生型。计算酶的比活力得突变体对芥子气的比活性由 $860 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 提高到 $1205 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, 提高了1.4倍。

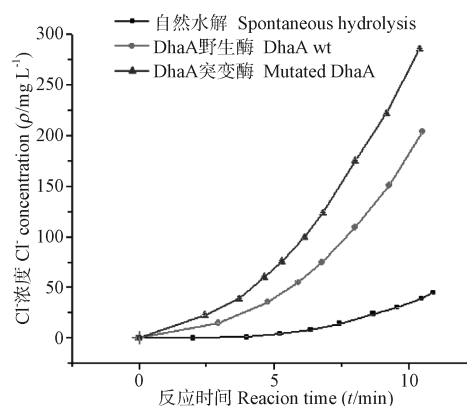


图6 DhaA野生型和DhaA突变体对芥子气的催化活性比较。

Fig. 6 Comparison of the catalytic activity between the native and mutated DhaA.

2.4.2 DhaA突变体对不同浓度芥子气的降解率 试验结果显示, 与DhaA野生型比较, DhaA突变体对不同浓度的芥子气降解率均有提高。对于高浓度芥子气的降解率有更为明显的提高, 对10 mg/mL芥子气的降解率从47%提高到63%, 提高了近20% (图7)。

2.4.3 DhaA突变体的最适作用温度 如图8所示, 在pH 8.6的Gly-NaOH缓冲体系中, 随着温度的上升, 突变体对芥子气的活性也越来越高, 在40 °C时到达最高, 为其最适反应温度, 当温度上升到50 °C以后, 酶活显著下降。

2.4.4 DhaA突变体的最适pH 如图9所示, 在最适反应温度下, 突变体的最适反应pH为8.5左右。而当pH > 9时, 酶活迅速下降。

2.4.5 DhaA突变体的热稳定性 实验结果表明, DhaA突变体在50 °C下水浴1 h后残余酶活为76%, 比野生型DhaA提高19%, 如图10。计算结果表明 DhaA突变体的 T_m 值为56 °C比野生型DhaA提高6 °C, 这说明DhaA突变体的热稳定性高于野生型DhaA。

2.4.6 DhaA突变体的动力学参数测定 测定不同浓度芥子气下DhaA突变体酶促反应初速度, 以底物浓度和初速度根据双倒数作图法进行DhaA突变体动力学分析, 如图11所示, 得到DhaA突变体酶促反应的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 分别为1.68 mmol/L和683 $\mu\text{mol/L/min}$, DhaA突变体的 K_m 值比野生型的 K_m 值小0.52 mmol/L。

3 结论

构建的DhaA突变体 (Ile135Phe + Cys176Tyr + Val245Phe + Leu246Ile + Tyr273Phe) 对芥子气的活性和热稳定性均有提高, 表明增加DhaA进出口通道的疏水作用是提高DhaA对芥子气活性和热稳定性的有效策略。下一步我们期望使用CAVER或RAMD等分子动力学软件模拟底物进出过程, 了解

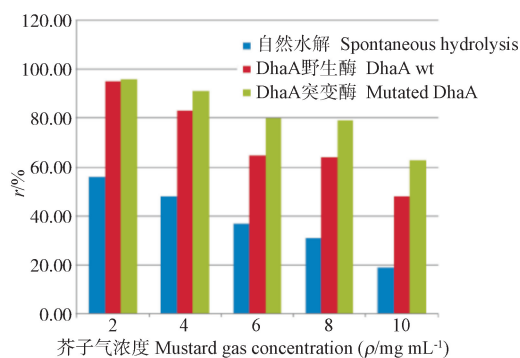


图7 DhaA野生型和DhaA突变体对不同浓度芥子气的降解率比较。

Fig. 7 Comparison of the degradation rate of sulfur mustard of different concentrations between the native and mutated DhaA.

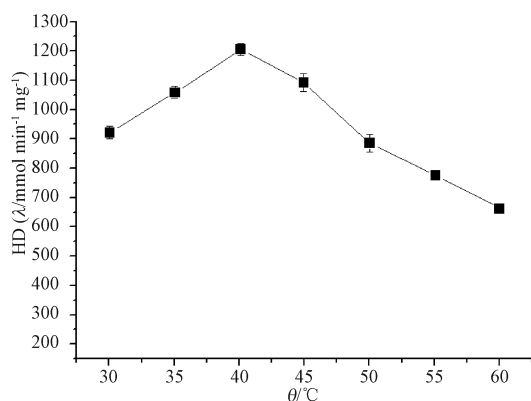


图8 DhaA突变体的最适作用温度。

Fig. 8 Optimum temperature of mutated DhaA.

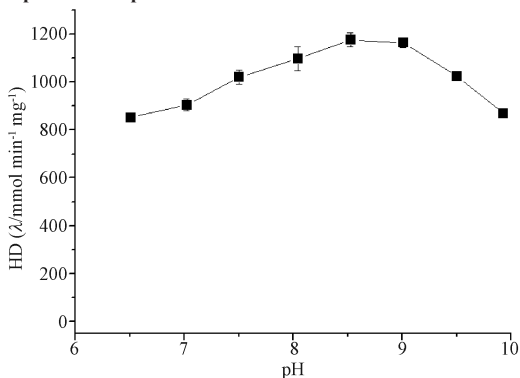


图9 DhaA突变体的最适pH。

Fig. 9 Optimum pH of mutated DhaA.

底物进出口通道对芥子气催化过程中反应动力学常数的影响。

参考文献 [References]

- 1 赵国辉, 寿伟椿. 军用毒剂化学[M]. 北京: 中国人民解放军防化学院, 1985 [Zhao GH, Shou WC. Military Chemical Agent [M]. Beijing: Anti Chemical Command and Engineering Institute of the Chinese People Liberation Army, 1985]
- 2 Oudejans L, Wyrzykowska-Ceradini B, Williams C, Tabor D, Martinez J. Impact of environmental conditions on the enzymatic decontamination of a material surface contaminated with chemical warfare agent simulants [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2013, **52**: 10072-10079
- 3 Prokop Z, Oplustil F, DeFrank J, Damborsky J. Enzymes fight chemical weapons [J]. *Biotechnol J*, 2006, **1**: 1370-1380
- 4 Prokop Z, Damborsky J, Oplustil F, Jesenska A, Nagata Y. Method of

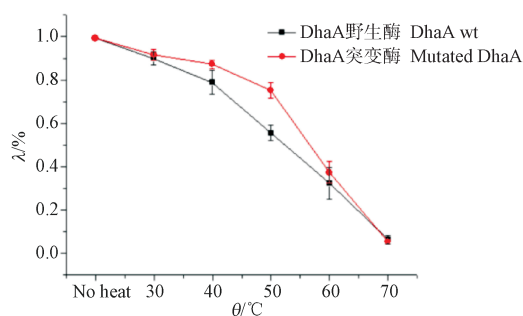


图10 DhaA野生型和DhaA突变体热稳定性比较。

Fig. 10 Comparison of the thermostability between the native and mutated DhaA.

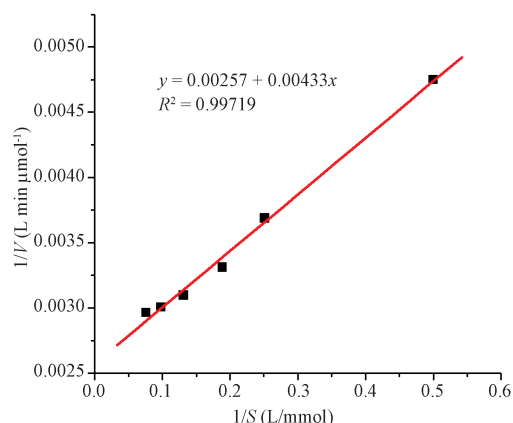


图11 DhaA突变体降解芥子气酶促反应双倒数曲线。

Fig. 11 The Lineweaver-Burk double reciprocal plot of mutated DhaA during sulfur mustard degradation.

V: Reaction velocity, S: Substrate concentration.

detoxification of yperite by using haloalkane dehalogenases [P]. *US 7,888,103 B2*, 2011

- 5 习海玲, 刘昌财, 问县芳, 陈立坤. 卤代烷烃脱卤酶及其对芥子气的降解研究进展[J]. *应用与环境生物学报* 2015, **21** (5): 842-847 [Xi HL, Liu CC, Wen XF, Chen LK. Advances in research on haloalkane dehalogenases and its sulfur mustard degradation function [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (5): 842-847]
- 6 Guo N, Liu JQ, Dong ZY, Zhong JY, Kong LC. Study on catalytic hydrolysis of sulfur mustard by the haloalkane dehalogenases [J]. *Environ Chem*, 2015, **7**: 57-65
- 7 Belkin S. Biodegradation of haloalkanes [J]. *Biodegradation*, 1992, **3**: 299-313
- 8 Klvana M, Pavlova M, Koudelakova T, Chaloupkova R, Dvorak P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kuta-Smatanova I, Dohnalek J, Kulhanek P, Wade RC, Damborsky J. Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations [J]. *J Mol Biol*, 2009, **392**: 1339-1356
- 9 Pavlova M, Klvana M, Prokop Z, Chaloupkova R, Banas P, Otyepka M, Wade RC, Tsuda M, Nagata Y, Damborsky J. Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, **5**: 727-733
- 10 Koudelakova T, Chaloupkova R, Brezovsky J, Prokop Z, Sebestova E, Hesseler M, Khabiri M, Plevaka M, Kulik D, Kuta-Smatanova I, Rezacova P, Ettrich R, Bornscheuer UT, Damborsky J. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel [J]. *Angew Chem*, 2013, **52**: 1959-63