

卤代烷烃脱卤酶及其对芥子气的降解研究进展*

习海玲** 刘昌财 问县芳 陈立坤

国民核生化灾害防护国家重点实验室 北京 102205

摘要 芥子气(2,2'-二氯乙基硫醚, HD)是一种糜烂性毒剂, 具强烈的细胞毒作用, 能使皮肤和各种组织起泡、糜烂和坏死。近年来, 发现多种微生物酶具催化降解HD功能, 其中, 卤代烷烃脱卤酶(Haloalkane dehalogenases, HLDs)(EC3.8.1.5)能够降解HD产生无毒的硫二甘醇, 且催化水解的效果最好, 成为环境友好地消除HD关注的焦点。本文重点综述具较高水解HD活性HLDs, 包括LinB、DhaA和DmbA等的发现与进化关系、立体结构、底物特异性和催化水解特征的最新研究成果, 以及这些酶在降解HD领域当前和未来潜在的应用。分析表明这些HLDs虽然归属于同一进化亚家族, 但具不同的底物特异性; 而这些HLDs一致的催化三元体空间结构决定了它们分享类似的SN₂亲核取代催化水解HD的反应机制。此外, 针对现有HLDs在应用方面存在的如催化水解效率有待提高、稳定性差等诸多问题, 提出通过分子生物学、基因工程和固相化修饰等技术加以解决。图4 表2 参41

关键词 卤代烷烃脱卤酶; 糜烂性毒剂; 催化降解; 洗消; 晶体结构; 催化水解机制

CLC X172 : Q55

Advances in research on haloalkane dehalogenases and its sulfur mustard degradation function*

XI Hailing**, LIU Changcai, WEN Xianfang & CHEN Likun

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

Abstract Sulfur Mustard (bis-(2-chloroethyl) sulphide, HD), also known as yperite, is one of the most important blister agents. It could react with a large number of biological molecules with a strong cytotoxicity effect, resulting in blistering, erosion and necrosis of the skin and various tissues. Recently, several classes of microbial enzymes have been found to be able to degrade HD with high catalytic activity but no disadvantages of the common chemical decontamination of HD. Haloalkane dehalogenases (HLDs, EC3.8.1.5) draws great research attention for environmentally friendly decontaminating HD with only nontoxic thiodiglycol produced. In order to provide theoretical reference basis for enzymatic decontamination of HD, this paper reviews the observation and evolutionary relationship, structures, substrate specificities, catalytic properties and potential applications of these HLDs with high catalytic hydrolysis of HD. The analysis shows that these HLDs belonging to the same subfamily have different substrate specificities but similar spatial structures of the catalytic triad contributing to the common SN₂ nucleophilic substitution reaction mechanism for catalytic hydrolysis of HD. The paper also suggests that the problems on improving poor stability of HLDs and efficiency of catalytic hydrolysis of HD should be addressed by methods of molecular biology, genetic engineering and immobilized techniques.

Keywords haloalkane dehalogenases; blister agents; catalytic hydrolysis; decontamination; crystal structure; catalytic hydrolysis mechanism

芥子气(2,2'-二氯乙基硫醚), 因工业品含有杂质并具大蒜或芥子味而得名; 纯品在常温下为无色、无味的油状液体, 凝固点为14.5℃, 美军代号HD(精馏芥子气)。HD是一种糜烂性毒剂, 因能够烷基化体内的遗传物质——脱氧核糖核酸、酶或蛋白质等而具强烈的细胞毒作用, 能使皮肤和各种组织起泡、糜烂和坏死^[1-2]。1917年第一次世界大战后期德军在伊泊尔地区首次使用HD作为杀伤武器, 造成英军大

量伤亡。因其展现了强大的杀伤效应, 之后被称为“毒剂之王”。值得关注的是, 二战期间的亚洲战场(包括二战前), 日军在中国施用了包括HD在内的大量化学武器, 给中国人民带来了严重的灾难^[2]。目前, 仍有大量未被处理的日本遗留化学武器留存在我国的土地上, 时刻威胁着人民的生命和财产安全。

由于HD的高毒和致命性以及可能带来的威胁, 人们一直致力于消毒或降解HD的研究。使用苛性碱水溶液、醇钠(钾)溶液、碱醇胺溶液等, 使HD水解成硫二甘醇或分子内发生消除反应生成乙烯基硫醚; 使用过氧化氢^[3-4]、次氯酸盐、二氧化氯等氧化剂将HD氧化成相应的亚砷或砷, 虽然这些消毒剂对HD具较好的降解效果, 但它们大都本身

收稿日期 Received: 2015-04-14 接受日期 Accepted: 2015-05-20

*国民核生化灾害防护国家重点实验室基础研究项目(SKLNBC-2013-06)资助 Supported by the State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian(SKLNBC2013-06)

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

具一定的腐蚀性,对环境有污染,不适用于精密仪器、人员皮肤、服装等的消毒^[5],对此,人们一直在探索温和、高效的消毒技术和途径。TiO₂光催化法被认为是绿色消除HD及含磷毒剂的重要方法之一^[6-7],但催化水解过程一般依赖光照;另一种重要的可选方法是生物酶法,正如OPH、OPAA和DFPase等很多种类的微生物酶具催化水解含磷毒剂相关化合物活性^[8-10],一些微生物酶也具有催化降解HD的功能。生物酶催化消毒HD有望弥补现有化学法消毒的不足,其中,研究最多且最具应用前景的是卤代烷烃脱卤酶(Haloalkane dehalogenases, HLDs)(EC3.8.1.5)。

HLDs是一种 α/β 水解酶,能够剪切 α -卤代烷烃的碳-卤键,催化水解底物转换生成相应的醇、卤素离子和质子。HLDs催化水解反应中剪切碳-卤键遵循S_N2亲核取代机制^[11-14],水分子是反应过程中的唯一辅助因子。由于HLDs相对稳定、易于操作、能够催化水解许多种类型的 α -卤代烷烃化合物,引起人们的极大关注。目前,HLDs被发现和证实是消除HD毒性效果最好的生物酶之一,与传统的化学法消毒方式相比更为安全和环境友好,主要体现在HLDs酶促水解HD不仅生成几乎无毒且生物可降解的硫二甘醇,而且反应过程中无任何有毒的中间产物生成。

HLDs的酶学特征、晶体结构和催化水解机制不断被认识与揭示。基础理论研究的进一步深入,拓展与促进了它们在环境修复治理、工业催化、生物传感器和分子映象等领域的应用^[15],一些综述对这些方面也有详尽阐述^[16]。然而,关于催化降解HD的生物酶研究进展方面未见有全面系统的描述。本文综述了与HLDs酶促降解HD相关的特征,包括晶体结构和催化水解机制,以及在洗消领域的应用,旨在为生物酶洗消HD应用领域研究提供依据。

1 卤代烷烃脱卤酶(HLDs)的发现与进化关系

1985年,Keuning等从可以有效利用1,2-二氯乙烷为碳源生长的*Xanthobacter autotrophicus* GJ10菌株中分离和克隆了第一个HLDs,命名为DhlA^[17]。此后,人们又相继发现了很多种类的HLDs,其中较为重要的事件是:1993年,Nagata及其研究团队在*Sphingomonas paucimobilis* UT26菌株中发现了LinB,该菌能够有效水解杀虫剂 γ -六氯环己烷(林丹)在环境中的降解产物1,3,4,6-四氯-1,4-环己烷^[18-19];1997年,Kulakova等在*Rhodococcus rhodochrous*中发现了可以有效水解1-氯丁烷的DhaA^[20]。以上DhlA、LinB和DhaA这3个酶已经被广泛地研究,具有较为详实的底物特异性、晶体结构等数据。随着基因组测序技术的普及,大量推定的新的HLDs基因被发现、克隆和表征。在植物菌根中发现了两个编码HLDs的基因,分别为DmlA(*Mesorhizobium loti* MAFF303099)和DbjA(*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)^[21-22];在动物病原菌*Mycobacteria*中发现了4个HLDs,一个DhmaA在*M. avium* N85^[23],3个在*M. bovis*,分别为DmbA、DmbB和DmbC^[24-25]。海洋细菌中相继发现了DrbA^[25](*Rhodopirellula baltica* SH1)、DppA^[26](*Plesiocystis pacifica* SIR-1)、DadA和DadB(*Alcanivorax dieselolei* B-5)^[16, 27];从根瘤菌*Bradyrhizobium*

elkani USDA94中分离出的HLD,命名为DbeA^[28]。在农杆菌*Agrobacterium tumefaciens* C58中也发现了一个HLD,命名为DatA^[29]。

目前,人们已经至少发现和鉴定了16种不同的具脱卤酶活性的HLDs,大部分的生化特征得到了描述和表征^[16, 27](表1)。依据它们间序列和结构的同源性,在进化上HLDs可以被继续细分为3个亚组,HLD-I、HLD-II和HLD-III(表1;图1a)。它们之间的蛋白全长序列相似度差异较大,例如LinB与同在HLD-II亚组的DhaA序列相似度为49.0%,而与HLD-I亚组的DhlA序列相似度仅为28.3%^[34]。虽然对这些HLDs在体内的功能还知之甚少,但在土壤细菌中发现的HLDs应该参与了将卤代烷烃作为碳源的生物降解途径。然而,对于其它的物种,如动物病原菌中鉴定的HLDs其在体内的功能完全未知。

表1 在微生物中发现的HLDs

Table 1 Haloalkane dehalogenases observed in microbes

亚家族 Subfamily	HLDs	物种 Organism	结构 Structure available	参考文献 Reference
HLD-I	DhlA	<i>Xantobacter autotrophicus</i>	Yes	[17]
	DhmaA	<i>Mycobacterium avium</i>	No	[23]
	DmbB	<i>Mycobacterium bovis</i>	No	[24]
	DppA	<i>Plesiocystis pacifica</i>	No	[30]
	LinB	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Yes ^[31]	[19]
	DhaA	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Yes ^[32]	[20]
HLD-II	DbjA	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Yes ^[33]	[34]
	DmlA	<i>Mesorhizobium loti</i>	No	[34]
	DmbA	<i>Mycobacterium bovis</i>	Yes ^[35]	[24]
	DatA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	No	[29]
	DmsA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	No	U.D.
	DbeA	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	Yes ^[28]	[28]
	DadA	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	No	[27]
	DadB	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	No	[27]
HLD-III	DmbC	<i>Mycobacterium bovis</i>	No	[25]
	DrbA	<i>Rhodopirellula baltica</i>	No	[25]

U.D.: 未出版数据。

U.D.: unpublished data.

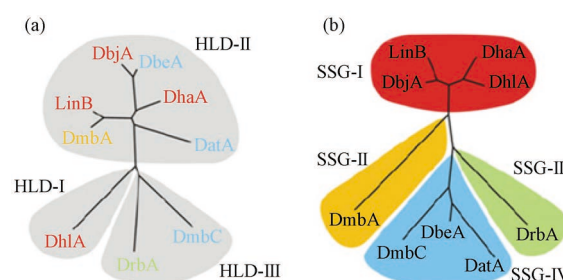


图1 HLDs的进化和底物特异性关系比较^[36]。(a) HLDs的进化分析,进化关系显示HLDs被分为明显的3个亚组,分别是HLD-I、HLD-II和HLD-III; (b) 依据水解底物倾向性HLDs的聚类分析图,分析显示HLDs按底物特异性可以分为4个亚组,分别是SSG-I、SSG-II、SSG-III和SSG-IV。

Fig. 1 Comparison of evolutionary and substrate specificity relationships of nine wild-type HLDs^[36]. (a) The phylogenetic tree shows that the HLDs are subdivided into three subfamilies: HLD-I, HLD-II and HLD-III; (b) The dendrogram indicates that the HLDs can be classified into four substrate specificity groups: SSG-I, SSG-II, SSG-III and SSG-IV.

2 酶学特征与空间结构

2.1 底物特异性和催化活性

HLDs具广泛的水解底物谱,能够催化水解具sp³杂化轨道碳原子的 α -单卤代(主要为氯、溴和碘代)化合物,总计100多种底物^[36].对 α 碳原子上的多卤代化合物、以及氟和芳香基化合物不起作用^[15, 36].最近的一项研究将HLDs分为4个底物特异性组SSG-I - IV^[36](图1b),SSG-I主要有DbjA、DhaA、DhlA和LinB,他们对 α -氯代化合物具更高的活性;SSG-IV倾向于水解 α -溴和碘代化合物,包括DatA、DbeA和DmbC. SSG-II和III每组仅含一个成员,分别是DmbA和DrbA,他们各自代表所在亚组的底物倾向性. SSG-II的DmbA倾向水解1,3-二碘丙烷、1,2-二溴乙烷和1-溴-2-氯乙烷,而SSG-III组的DrbA对1-溴丁烷具较高的特异性和水解活性.除了各亚组间具明显的底物特异性外,还有一些底物是“通用性”的,所有HLDs普遍对1-溴丁烷、1-碘丙烷、1-碘丁烷、1,2-二溴乙烷和4-溴丁基具较高的水解活性,而催化水解1,2-二氯丙烷等活性普遍较低.应用主成分法对野生型HLDs的底物活性分析显示,活性从大到小依次为LinB ~ DbjA > DhlA ~ DhaA ~ DbeA ~ DmbA > DatA ~ DmbC ~ DrbA.不难看出,进化意义上的HLDs亚家族与基于底物活性划分的亚组有明显的差异(图1),表明具较近亲缘关系的HLDs,他们的底物活性不一定相似^[36].

目前,文献报道的关于HLDs催化水解HD活性的动力学数据较少,研究显示野生型的HLDs中,仅LinB、DhaA和DmbA对HD具较高的水解活性^[31](表2).他们的 k_{cat}/K_m (M⁻¹s⁻¹)值相当,数量级都为10³,虽然仅为高效水解(数量级>10⁶)值的一半,但这些可以通过定点突变和直接进化等手段获得具高效水解HD活性的突变体的方法来解决.然而,HLDs在水解 α -溴代底物普遍展现出高的动力学速率 k_{cat}/K_m (M⁻¹s⁻¹)值在10⁴-10⁵之间^[36].

表2 自发水解与HLDs(EC 3.8.1.5) 催化水解HD的动力学速率^[37]

Table 2 Kinetics of spontaneous and enzymatic hydrolysis of sulfur mustard by haloalkane dehalogenases (EC 3.8.1.5) measured at 37 °C and pH 7.5

水解方式 Hydrolysis mode	物种来源 Organism	HLDs	转换速率 Rate of conversion k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
自发水解 Spontaneous hydrolysis	—	—	0.0046/s
酶促水解 Enzymatic hydrolysis	日本的少动鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingobium japonicum</i> UT26	LinB	6.9×10^3
	玫瑰红红球菌 <i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 13064	DhaA	6.0×10^3
	牛分歧杆菌 <i>Mycobacterium bovis</i> 5033/66	DmbA	5.7×10^3

由于HD为非手性化合物,HLDs对底物HD的水解,不涉及立体选择性.HLDs对底物的立体选择性主要体现在具手性的 α -卤代化合物上.最初对DhaA和DhlA的研究显示,他们对所选择的手性底物仅具弱的立体选择性^[38].然而,接下来的研究证明DhaA、LinB和DbjA对一些 α -溴代酯和 β -溴代烷具极强的立体选择性^[33].总体来说,HLDs倾向于水解R型溴

代化合物.

2.2 晶体结构

LinB、DhlA和DhaA等HLDs的晶体结构数据相继被测定^[32, 39-40].HLDs属于 α/β 折叠水解酶亚家族,其300左右个氨基酸残基盘曲折叠形成了两个明显的结构域(图2).较大的域也称为主域,由8个保守的 β 折叠片层(β 1-8)和6个 α -螺旋(α 1-3和 α 9-11)构成,除了 β 2以外,所有的折叠片层彼此间都是正向平行的, β 3-8间由5个 α -螺旋彼此间隔相联(图2).较小的域由5个 α -螺旋(α 4-8)和一些无规则卷曲构成,插入在 β 6折叠片与 α 9螺旋之间,此结构柔性较大,但大多情况下折叠形状恰似帽子,也被称为可变帽子域(图2).HLDs亚组I与II/III间的帽子域结构具明显的差异,帽子域除了起到保护催化残基免受环境影响的作用外,还参与底物的结合.活性位点位于保守的主域与可变帽子域联接界面深处的疏水性空腔内^[41].虽然,HLDs三个亚组间的催化活性具较大的差异,但他们的活性位点都拥有一个高度保守的催化三元体:一个亲核氨基酸Asp,位于 β 5后的无规则卷曲环上;一个酸性氨基酸残基,通常为Asp或Glu位于 β 7后的无规则卷曲环上;一个保守的组氨酸残基,位于 β 8后的无规则卷曲环上.底物卤素结合位点位于活性腔内,与催化三元体相邻.此外,有一个氧阴离子洞也出现在活性腔内,在催化反应生成中间产物过渡态时被产生,并通过与两个骨架NH-形成氢键而保持稳定,其中一个NH-总是由亲核Asp的下一个氨基酸残基提供,在LinB此氨基酸残基是与亲核Asp108紧邻的Trp109^[31].

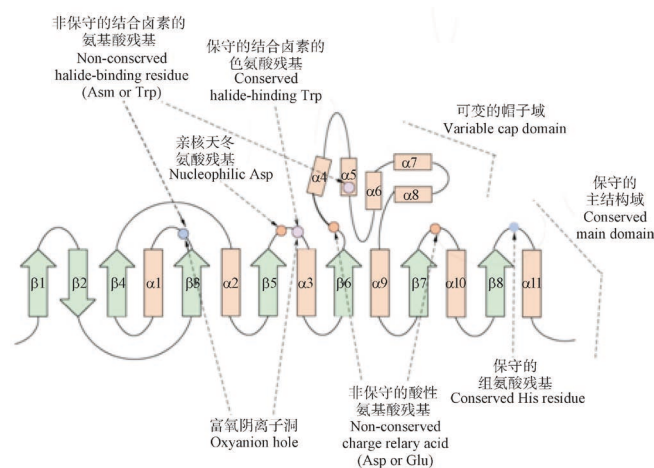


图2 HLDs的二级拓扑结构.

Fig. 2 Topology of haloalkane dehalogenases.

不同分辨率下的LinB及其与底物结合的晶体结构提供了更为详实的HLDs分子结构特征数据,图3展示了LinB的晶体结构、活性位点及其与底物1,2-二氯丙烷(1,2-DCP)的结合^[31].LinB的分子量(M_r)为33.1 × 10³,催化三元体由Asp108、Glu132和His272三个氨基酸残基构成. Asn38和Trp109构成LinB的底物卤素结合位点,其中Trp109还起到稳定离去基团的作用.因也与催化反应直接相关,这两个氨基酸残基与催化三元体一起形成所谓的催化五元体(图3b).

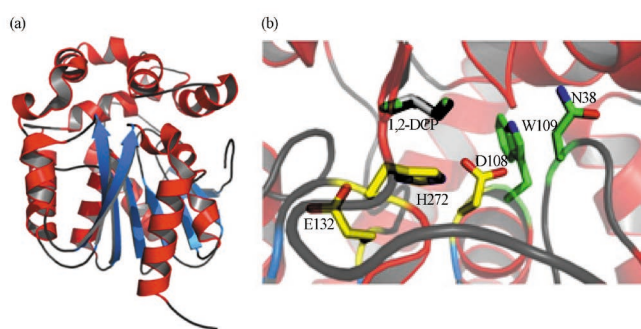


图3 LinB的晶体结构^[31] (PDB 1MJ5) 和含底物的活性位点展示。(a) 晶体结构, α -螺旋用红色显示, β -折叠片层用蓝色显示, 灰色代表无规则卷曲结构; (b) 含底物的活性位点展示, 黄色指示催化三元体氨基酸残基, 包括D108、H272和E132, 绿色指代卤素结合位点的两个氨基酸残基, 分别为W109和N38。

Fig. 3 Crystal structure of LinB and its active site with substrate. (a) α -helices are in red; β -sheets are in blue; loops are in grey, generated from pdb file 1MJ5. (b) In yellow is the catalytic triad with the nucleophilic aspartate (D108), the histidine (H272), which activates a water molecule and its assisting glutamate (E132). The halide-binding tryptophan (W109) and asparagine (N38) are displayed in green.

2.3 催化水解机制

所有类型的HLDs, 其亲核Asp在物种间是高度保守的, 催化底物反应均由此Asp的羧基亲核进攻底物碳卤键的碳原子形成一个共价中间产物来实现的, 整个过程遵循 S_N2 亲核取代反应机理。图4显示了DhlA、DhaA和LinB三个HLDs与底物反应的过程^[41], 下面仅以LinB为例来描述整个催化反应机制过程。(1) Asp108的羧基亲核进攻底物碳卤键的碳原子, 生成含酯键的烷基-酶LinB共价中间产物;(2) His272活化一分子水, 活化的水分子水解刚形成的共价中间体的酯键;(3) 水解产物和卤离子紧接着被释放;实验证实反应过

程中His272活化水分子还需要Glu132的参与, Glu132的羧基与His272的咪唑环以氢键配位相连, 能够确保H272有正确的取向和稳定的电势。此外, LinB的底物卤素结合位点的两个氨基酸残基Asn38和Trp109, 在催化反应过程中起到卤素原子的活化以及解离后卤离子的稳定作用。从立体化学角度来看, 由HLDs催化水解底物的反应, 总是亲核进攻与碳中心相连卤负离子的背面, 水解生成的产物与原来的构型相反, 与 S_N2 亲核取代反应出现的典型构型翻转现象相一致。

HD在水溶液中也会自发水解, 虽然最终产物是无毒的硫二甘醇, 但水解过程中会产生毒性较强的正硫离子中间体, 也是引起HD在体内中毒的主要原因。然而, LinB在水解HD过程中, 整个酶促水解HD反应发生在LinB结构内部疏水的活性腔内并与外界隔离, HD与酶的共价中间体和碳卤键的断裂同时发生, 中间体被水解成无毒的硫二甘醇后, 才被释放出来。整个过程无有毒中间体产生, 因而会起到较好的消毒或解毒效果。

2.4 稳定性

一般来说, 温度对HLDs活性影响较大, 35-50 $^{\circ}\text{C}$, 活性与温度呈正相关, 但超过50 $^{\circ}\text{C}$, HLDs的活性将急剧下降。其中只有从冷适应 *Psychrobacter cryohalolentis* K5菌株中分离出来的一个HLDs, DpcA在25 $^{\circ}\text{C}$ 展现出最高的水解活性。此外, pH对HLDs活性影响也较大, 最适pH值为8-10, 过酸或过碱都不利于酶的活性。有意义的是, HLDs普遍展现出抗有机溶剂的能力, 但个体间存在较大的差异, 如DhjA能够在20%浓度的有机溶剂条件下, 保持相对稳定的活性, 而LinB、DhaA分别在5%和10%浓度条件下活性就开始出现明显降低。

3 HLDs催化降解HD的应用进展

生物酶水解HD已经开始从概念向成果应用转化。由于

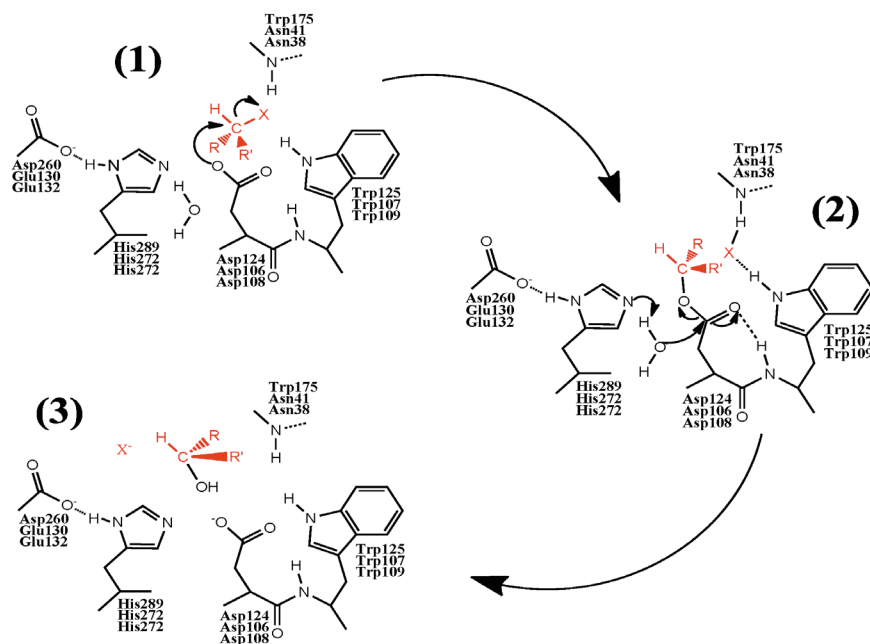


图4 卤代烷脱卤素酶DhlA、DhaA和LinB推定的反应机理。

Fig. 4 Proposed catalytic mechanism for DhlA, DhaA and LinB of HLDs.

LinB、DhaA和DmbA等HLDs对HD具较高的水解活性^[31], 酶促水解HD过程无任何有毒的中间产物生成, 美国最先应用这些生物酶对HD的消毒进行了应用和探索. 由美国埃基伍德化生中心将其研制的具催化水解HD活性的卤代烷烃脱卤酶LinB、DhaA和DmbA等授权转让给Enantis公司生产, 该公司将LinB或其突变体基因在毕赤酵母和大肠杆菌中表达进行规模化生产. 目前, 该公司仅少量销售LinB几种卤代烷烃脱卤酶的冻干粉, 酶制剂成品一直在研制和生产中. 然而, HD在水中溶解度极低, 限制了该产品对HD的水解效果. 为了克服此缺点, Enantis公司在最新开发出的“Yperzyme Kit”(芥子气酶试剂盒)产品中, 除了包括LinB和/或其突变体酶主要活性成分外, 还加入了一些辅助组份, 如缓冲剂、去污剂以及一些易与水混溶的有机溶剂, 使HLDs催化降解HD效率获得了提高. 可以看出, HLDs在降解HD领域的开发与应用技术仍处于起步和探索阶段, 它们的稳定性和催化水解HD的效率等实际问题亟待解决.

4 结论与展望

生物酶降解HD具作用条件温和、无腐蚀、环境友好等特点, 符合绿色消毒发展方向, 从而受到军事消毒领域的重视. 虽然目前HLDs被认为是最具应用前景的催化降解HD的生物酶之一, 但在应用过程中仍存在催化降解效率低、稳定性不高等诸多问题. 掌握和解析现有酶的结构、功能和催化机理, 可为未来更好地利用酶技术实现化学毒剂的消毒提供理论依据.

如何获得高效、稳定、大量而廉价的生物酶消毒剂, 是酶法消毒技术研究的难点, 直到上世纪末本世纪初, 随着基因工程、分子生物学和生物信息学的发展, 生物酶消毒技术才进入快速发展阶段. 生物酶稳定性差、操作条件窄等问题都有望通过这些技术得到解决. 将来, 生物酶在消毒方面可发挥重要作用, 如将其制成酶颗粒, 与水混合, 可用于装备表面消毒, 或用于净化染毒水和染毒空气; 也可将生物酶与防护材料结合制成防护消毒织物, 用于装备表面、人员的防护; 还可将生物酶与助剂复配做成皮肤消毒膏等.

针对生物酶在应用方面存在的问题, 我们认为, 今后研究工作应立足于: (1) 通过多途径、不同方法分离和筛选具有高效降解HD特性菌株, 构建高效降解HD微生物的种子库, 继续寻找新的或改良的这些生物酶; (2) 根据酶分子结构, 点突变方法修改编码酶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生物酶水解HD活性, 以及拓宽其降解底物谱目标; (3) 利用基因工程技术构建多种编码目标基因的酵母重组工程菌株, 生产这些共表达的生物酶产品, 弥补单一酶类降解HD活性差的不足; (4) 将具高效降解化学毒剂的生物酶, 固相化至适宜的载体材料上, 以提高酶的利用效率和稳定性, 使其用途更加广泛.

参考文献 [References]

1 Borak J, Sidell FR. Agents of chemical warfare: sulfur mustard [J]. *Ann*

Emerg Med, 1992, **21**: 303-308

- 2 Reiter G, Mueller S, Koller M, Thiermann H, Worek Bundeswehr F. *In vitro* toxicokinetic studies of cyclosarin: Molecular mechanisms of elimination [J]. *Toxicol Lett*, 2014, **227**: 1-11
- 3 习海玲, 赵三平, 周文. 基于过氧化物的消毒技术研究进展[J]. 环境科学, 2013, **34**: 1645-1652 [Xi HL, Zhao SP, Zhou W. Advances in peroxide-based decontaminating technologies [J]. *Environ Sci*, 2013, **34**: 1645-1652]
- 4 赵三平, 习海玲, 左言军, 王琦. Na₂MoO₄催化H₂O₂氧化芥子气模拟剂苯甲硫醚的动力学与产物[J]. 分子催化, 2015, **29** (1): 45-51 [Zhao SP, Xi HL, Zuo YJ, Wang X. Oxidation kinetics and products of methyl phenyl sulfide, a sulfur mustard simulant by sodium molybdate catalyzed hydrogen peroxide solution. *J Mol Catal (China)*, 2015, **29** (1): 45-51]
- 5 习海玲, 孔令策. 国外人员应急洗消技术现状与发展趋势[C]//中国化学会. 公共安全中的化学问题研究进展(第二卷). 北京: 中国人民公安大学出版社, 2011 [Xi HL, Kong LC. Research status and development trend of emergency decontamination technology for personnel [C]// Chinese Chemical Society. Research Progress on Chemical Problems in Public Safety (2nd volumes). Beijing: Chinese People's Public Security University Press, 2011]
- 6 Han ST, Li J, Xi HL, Xu DN, Zuo YJ, Zhang JH. Photocatalytic decomposition of acephate in irradiated TiO₂ suspensions [J]. *J Hazard Mater*, 2009, **163**: 1165-1172
- 7 Han ST, Zhang GY, Xi HL, Xu DN, Fu XZ, Wang XX. Sulfated TiO₂ decontaminate 2-CEES and DMMP in vapor phase [J]. *Catal Lett*, 2008, **122**: 106-110
- 8 习海玲, 刘昌财, 问县芳, 赵三平. 磷酸三酯水解酶空间结构及催化水解机理研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (1): 1-23 [Xi HL, Liu CC, Wen XF, Zhao SP. Advance on three-dimensional spatial structure and catalytic mechanisms for phosphoric triester hydrolase [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (1): 1-23]
- 9 问县芳, 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]
- 10 问县芳, 袁永泽, 习海玲, 钟近艺, 陈立坤, 王攀, 肖文精, 刘德立. 一种新型有机磷降解酶的二异丙基氟磷酸酯水解特性研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2013, **1**: 53-56 [Wen XF, Yuan YZ, Xi HL, Zhong JY, Chen LK, Wang P, Xiao WJ, Liu DL. Characteristics of a novel organophosphorus pesticide-degrading enzyme on diisopropyl fluorophosphates. *J Huazhong Norm Univ (Nat Sci)*, 2013, **1**: 53-56]
- 11 Franken SM, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes [J]. *EMBO J*, 1991, **10**: 1297-1302
- 12 Dijkstra BBW. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase [J]. *Nature*, 1993, **363**: 693-698.
- 13 Pries F, Kingma J, Pentenga M, van Pouderooyen G, Jeronimus-Stratingh CM, Bruins AP, Janssen DB. Site-directed mutagenesis and oxygen isotope incorporation studies of the nucleophilic aspartate of haloalkane dehalogenase [J]. *Biochemistry*, 1994, **33**: 1242-1247
- 14 Verschuieren KH, Seljee F, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase [J]. *Nature*, 1993, **363**: 693-698
- 15 Koudelakova T, Bidmanova S, Dvorak P, Pavelka A, Chaloupkova R, Prokop Z, Damborsky J. Haloalkane dehalogenases: biotechnological

- applications [J]. *Biotechnol J*, 2013, **8**: 32-45
- 16 李安章, 邵宗泽. 微生物卤代烷烃脱卤酶研究进展[J]. 微生物学报, 2015, **55**: 381-388 [Li AZ, Shao ZZ. Research progress of microbial haloalkane dehalogenase - a review [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2015, **55**: 381-388]
- 17 Keuning S, Janssen DB, Witholt B. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [J]. *J Bacteriol*, 1985, **163**: 635-639
- 18 Nagata Y, Miyauchi K, Damborsky J, Manova K, Ansorgova A, Takagi M. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3707-3710
- 19 Nagata Y, Nariya T, Ohtomo R, Fukuda M, Yano K, Takagi M. Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis* [J]. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 6403-6410
- 20 Kulakova AN, Larkin MJ, Kulakov LA. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 [J]. *Microbiol*, 1997, **143**: 109-115
- 21 Sato Y, Natsume R, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y, Senda T. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a haloalkane dehalogenase, DbjA, from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 [J]. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2007, **63**: 294-296
- 22 Pavlova M, Klvana M, Jesenska A, Prokop Z, Konecna H, Sato T, Tsuda M, Nagata Y, Damborsky J. The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: reaction mechanism and molecular evolution [J]. *J Struct Biol*, 2007, **157**: 384-392
- 23 Jesenska A, Bartos M, Czernekova V, Rychlik I, Pavlik I, Damborsky J. Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene dhmA from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3724-3730
- 24 Meyer T, Burow M, Bauer M, Papenbrock J. Arabidopsis sulfurtransferases: investigation of their function during senescence and in cyanide detoxification [J]. *Planta*, 2003, **217**: 1-10
- 25 Jesenska A, Monincova M, Koudelakova T, Hasan K, Chaloupkova R, Prokop Z, Geerlof A, Damborsky J. Biochemical characterization of haloalkane dehalogenases DrbA and DmbC, representatives of a novel subfamily [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**: 5157-5160
- 26 Bogdanovic X, Hesseler M, Palm GJ, Bornscheuer UT, Hinrichs W. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the putative haloalkane dehalogenase DppA from *Plesiocystis pacifica* SIR-I [J]. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2010, **66**: 828-830
- 27 Li A, Shao Z. Biochemical characterization of a haloalkane dehalogenase DadB from *Alcanivorax dieselolei* B-5 [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**: e89144
- 28 Prudnikova T, Mozga T, Rezacova P, Chaloupkova R, Sato Y, Nagata Y, Brynda J, Kutý M, Damborsky J, Smananova IK. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel haloalkane dehalogenase DbeA from *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 [J]. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2009, **65**: 353-356
- 29 Hasan K, Fortova A, Koudelakova T, Chaloupkova R, Ishitsuka M, Nagata Y, Damborsky J, Prokop Z. Biochemical characteristics of the novel haloalkane dehalogenase DatA, isolated from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**: 1881-1884
- 30 Hesseler M, Bogdanovic X, Hidalgo A, Berenguer J, Palm GJ, Hinrichs W, Bornscheuer UT. Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**: 1049-1060
- 31 Oakley AJ, Prokop Z, Bohac M, Kmunicek J, Jedlicka T, Monincova M, Kuta-Smatanova I, Nagata Y, Damborsky J, Wilce MCJ. Exploring the structure and activity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: evidence for product- and water-mediated inhibition [J]. *Biochemistry*, 2002, **41**: 4847-4855
- 32 Newman J, Peat TS, Richard R, Kan L, Swanson PE, Affholter JA, Holmes IH, Schindler JF, Unkefer CJ, Terwilliger TC. Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme [J]. *Biochem*, 1999, **38**: 16105-16114
- 33 Prokop Z, Sato Y, Brezovsky J, Mozga T, Chaloupkova R, Koudelakova T, Jerabek P, Stepankova V, Natsume R, van Leeuwen JGE, Janssen DB, Florian J, Nagata Y, Senda T, Damborsky J. Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**: 6111-6115
- 34 Zhang X, Wang H, Yang C, Du D, Lin Y. Preparation, characterization of Fe₃O₄ at TiO₂ magnetic nanoparticles and their application for immunoassay of biomarker of exposure to organophosphorus pesticides [J]. *Biosensors Bioelectron*, 2013, **41**: 669-674
- 35 Mazumdar PA, Hulecki JC, Cherney MM, Garen CR, James MNG. X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* haloalkane dehalogenase Rv2579 [J]. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics*, 2008, **1784**: 351-362
- 36 Koudelakova T, Chovancova E, Brezovsky J, Monincova M, Fortova A, Jarkovsky J, Damborsky J. Substrate specificity of haloalkane dehalogenases [J]. *Biochem J*, 2011, **435**: 345-354
- 37 Prokop Z, Opluštil F, DeFrank J, Damborský J. Enzymes fight chemical weapons [J]. *Biotech J*, 2006, **1**: 1370-1380
- 38 Pieters RJ, Spelberg JHL, Kellogg RM, Janssen DB. The enantioselectivity of haloalkane dehalogenases [J]. *Tetrahedron Lett*, 2001, **42**: 469-471
- 39 Black RM, Clarke RJ, Read RW, Reid MT. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products [J]. *J Chromatogr A*, 1994, **662**: 301-321
- 40 Verschuere KH, Franken SM, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. Refined X-ray structures of haloalkane dehalogenase at pH 6.2 and pH 8.2 and implications for the reaction mechanism [J]. *J Mol Biol*, 1993, **232**: 856-872
- 41 Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8**: 150-159