

# 微生物降解有机磷类毒剂的酶学研究进展\*

傅国平 崔中利 吴旭平 徐 玮 李顺鹏\*\*

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

**摘要:** 有机磷毒剂在农业生产和战争中的应用广泛, 其生物解毒受到理论和应用研究方面的重视。有机磷水解酶在有机磷毒剂的生物降解中具有重要的作用, 目前在有机磷水解酶的蛋白质晶体结构、酶促反应机制等方面的研究取得了较大的进展。文中对有机磷水解酶在酶学、高级结构、催化机制、定向进化及其应用等方面的研究进行了综述, 并对该领域今后的研究趋势进行了展望。

**关键词:** 有机磷毒剂, 有机磷水解酶, 高级结构, 催化机制, 定向进化

**中图分类号:** Q93 **文献标识:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0138-06

## ENZYMOLGY OF MICROBIAL DEGRADATION OF ORGANOPHOSPHATE CHEMICALS

FU Guo-Ping CUI Zhong-Li WU Xu-Ping XU Wei LI Shun-Peng

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** Organophosphate chemicals are widely used as agricultural pesticides and war reagents, their biodegradation is emphasized on the theoretical and practical aspects. Organophosphate hydrolases play important roles in the biodegradation of organophosphate chemicals. Great advancement was achieved recently in the determination of crystal structure and catalytic mechanisms of the hydrolase. This paper reviewed the research progresses in the enzymology, protein structure, catalytic mechanisms and application of the organophosphate hydrolase, and predicted the future research in this field.

**Key words:** Organophosphate chemicals, Organophosphate hydrolase, Protein structure, Catalytic mechanism, Rational evolution

有机磷毒剂包括有机磷类农药和有机磷类神经毒气, 前者在农业生产中大量使用, 后者则是战争或恐怖袭击中的死神。有机磷毒剂是乙酰胆碱酯酶抑制剂, 因而对人和哺乳动物、鱼类及鸟类等易产生毒害作用。目前生产和使用并引起人们对其毒理学感兴趣的有机磷杀虫剂主要是磷酸酯、硫代(逐)磷酸酯以及硫代(逐)磷酰胺酯<sup>[1]</sup>。

磷酸三酯酶是降解有机磷毒剂的重要酶类, 该酶在治疗有机磷中毒、有机磷毒物的生物去毒和有机磷毒剂原位监测等方面提供了广阔的应用前景。

## 1 对硫磷水解酶——细菌磷酸三酯酶的研究进展

在参与有机磷毒剂的转化和去毒的酶中最重要的是酯酶类中的磷酸三酯酶(phos-

\* 国家高技术发展计划(863)项目(No.2001AA246071, 2001AA214121)

江苏省自然科学基金资助项目(No.BK200171)

\*\* 联系人 Email: lsp@njau.edu.cn

收稿日期: 2003-07-01, 修回日期: 2003-09-25



*S<sub>P</sub>* 型异构体, 产生 *O*-乙基苯基硫代磷酸的 *S<sub>P</sub>* 型立体异构体 (图 1), 也就是说, 该酶的反应产生了构型的倒置<sup>[1]</sup>。

有机磷酸化合物水解的立体特异性是有机磷表现毒性作用所必要的, 因为不同的立体异构体抑制靶蛋白酶的能力可能不同。当有机磷酸化合物的水解具有立体特异性时, 有机磷中毒后所观察到的毒性效应可能是“逃脱了相应的磷酸三酯酶攻击的”立体异构体所表现出的特征作用, 因为只有这种立体异构体才能与相应的靶蛋白接触。

**1.3 激活剂和抑制剂** PTE 对激活剂和抑制剂所表现的不同反应常用来区别新发现的 PTE 与前述两种 PTE。细菌 PTE 的激活剂和抑制剂总结如表 1。

表 1 细菌磷酸三酯酶的激活剂和抑制剂

酶来源菌株	激活剂	抑制剂	底物
<i>Streptomyces lividans</i>		OPT, DTT, NEM, CuSO <sub>4</sub>	Parathion
<i>Escherichia coli</i>	Mn <sup>2+</sup>	Mipafox	DFP, soman DFP, soman
<i>Halophilic</i>	Mn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	NEM, Zn <sup>2+</sup>	DFP
	Mn <sup>2+</sup>	EDTA	DFP, soman
<i>Tetrahimena thermophila</i>	Mn <sup>2+</sup>	Mipafox	Soman DFP
<i>Alteromonas sp.</i>	Mn <sup>2+</sup>		DFP
<i>Pseudomonas diminuta</i>		OPT, 2, 6-pyridinedicarboxylate, EDTA, DTT, dithioerithritol, β-mercaptoethanol	Paraoxon
		Alkynyl phosphates	Paraoxon
		Diethyl thiomethyl-phosphonate, phosphonates bearing monofluoro, difluoro, or hydroxyl substituents at the methylene position	Paraoxon
		Diethyl pyrocarbonate	Paraoxon
		Rose Bengal, methylene blue	Paraoxon

在对硫磷水解酶活性中心具有 2 个 Zn<sup>2+</sup>, 是该酶行使催化功能所必需的。这 2 个 Zn<sup>2+</sup> 可以被 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 或 Cd<sup>2+</sup> 取代, 而酶的活性不会受到大的影响。当该酶与金属螯合剂一起保温后, 酶作用受到抑制; 但如在此保温体系中加入该酶的竞争性抑制剂——酶底物类似物以后, 那么金属螯合剂的抑制作用会被减轻或消除。这些结果表明该酶是金属酶。然而高浓度的锌离子反而严重抑制酶活性<sup>[2]</sup>。Rowland 等也报道: *Flavobacterium* ATCC 27551 的 *opd* 基因在 *Streptomyces lividans* 中表达后, 重组的对硫磷水解酶活性受到 1mmol/L CuSO<sub>4</sub> 的抑制, 抑制率可达 64%。

1.4 分子结构

**1.4.1 三维结构:** *Flavobacterium* ATCC 27551 和 *Pseudomonas diminuta* MC 是在不同时间和不同地点分离得到的, 但是它们的对硫磷水解酶具有相同的氨基酸和基因序列。*opd* 基因编码具有 365 个氨基酸的对硫磷水解酶前体, 当该前体 N-末端包含 29 个氨基酸的前导序列被切除后, 它就转变成具有有机磷水解活性的成熟酶分子。Dumas 等利用昆虫表达系统表达 *Pseudomonas diminuta* MC 的对硫磷水解酶, 通过凝胶过滤、离子交换、疏水和染料基质谱首次将对硫磷水解酶提纯得到均一蛋白。当时该蛋白被认为是单聚

体、球形、分子量约 39kD。然而, Benning 等利用 X-射线晶体衍射对对硫磷水解酶的脱辅基酶蛋白分子<sup>[4]</sup>和不同金属替代的酶蛋白分子<sup>[5]</sup>的三维结构研究揭示该酶蛋白分子为同型二聚体, 每个亚单位形成一个扭曲的  $\alpha/\beta$  桶, 8 个平行的  $\beta$  折叠构成桶, 依次与 14 个  $\alpha$  螺旋侧向相连。此外, 在氨基末端还有两个反平行  $\beta$  折叠。活性位点的 6 个组氨酸残基位于  $\beta$  桶的羧基末端。离心实验证实对硫磷水解酶是一个轴向对称的二聚体, 该二聚体大小约为  $61\text{\AA} \times 86\text{\AA} \times 51\text{\AA}$ , 表面积大小为  $3,200\text{\AA}^2$ 。单体之间的主要作用力分别发生在亚单位 I 的 Ser61、Asp33 与亚单位 II 的 Phe73、Arg52 之间。

**1.4.2 活性位点:** 对硫磷水解酶的活性位点有两个  $\text{Zn}^{2+}$ , 这两个  $\text{Zn}^{2+}$  可以被  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  替代而不会使酶丧失活性<sup>[2]</sup>。研究结果都表明对硫磷水解酶的 7 个组氨酸残基中的 6 个包围着二核金属中心, 至少有 4 个组氨酸残基 (His55、57、201、230) 直接与金属离子连接。此外, 两个金属离子都与溶剂氢氧化物以及蛋白质翻译后赖氨酸残基与二氧化碳的羧化作用所形成的氨基甲酸盐的功能基团相连接。对硫磷水解酶的这种二核金属中心与脲酶和氨甲酰天冬氨酸脱水酶的活性位点的结构是一致的。对活性位点  $\text{Zn}^{2+}$  被  $^{113}\text{Cd}^{2+}$  取代的对硫磷水解酶的核磁共振研究表明, 两个  $\text{Cd}^{2+}$  与蛋白质的键合位点分别处于不同的环境中, 两个金属离子的配基由氧和氮原子共同构成<sup>[6]</sup>。2 个  $\text{Zn}^{2+}$  变为  $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$  的重建对硫磷水解酶对 31P 标记的二乙基对甲氧基苯基磷酸化合物的自旋晶格的弛豫率影响的研究结果表明, 对硫磷水解酶的底物结合位点靠近二核金属中心<sup>[31]</sup>。定点突变实验结果表明, 除了前面所提到的组氨酸外, Trp131、Lys169、Asp253、Asp301 对于酶蛋白的催化功能具有意义<sup>[7]</sup>。Trp131 位于二核金属中心的“入口”处, 将其变为 Phe 对于酶的  $K_m$  或  $V_{\max}$  没有大的影响。然而, 将其变为 Ala 使  $K_m$  值升高 6 倍。因此, 该氨基酸残基有可能参与底物结合, 决定底物解离基团的芳香环的位置。Asp253 与 His230 以氢键相连, His230 再与溶剂表面的金属离子相连。Asp253 突变为 Asn 后, 变体酶的动力学常数与原始酶相一致; 然而将 Asp253 突变为 Ala 后, 酶活性降低了 500 倍。这些结果表明 Asp253 对于 His230 咪唑侧链与二核金属中心之间合适的作用是必需的。Asp301、Lys169 直接与金属结合。Asp301 是活性位点内部金属离子的第一个配基。将 Asp301 变为 His、Asn、Ala、Cys 都将导致变体酶的活性大大降低。这说明所有能够影响金属离子配基、尤其是能够与二价离子紧密结合的氨基酸残基的变化都将严重干扰蛋白质活性位点的正常功能。将 Lys169 突变为 Ala、Glu、Arg、Met 也会使酶的催化功能大大减弱。

**1.5 催化机制** 结合了不能被水解的模拟底物的对硫磷水解酶的 X-射线衍射结构清楚地显示了酶与底物的相互作用<sup>[8]</sup>。蛋白质分子活性位点的一个或两个  $\text{Zn}^{2+}$  极化水分子, 组氨酸残基的咪唑基团捕获水分子的一个质子, 从而产生氢氧根离子。有机磷酸化合物通过磷酰基的氧与  $\beta$  金属离子 (更接近于溶剂分子的金属离子) 配合从而与活性位点的二核金属中心结合。这种作用削弱了氢氧化物与  $\beta$  金属离子的作用 (相对于未结合底物的酶, 从酶与底物复合物中氧与金属间较大的距离可以看出这种情况)。金属与氧的相互作用极化了磷氧键, 使得磷原子中心变得更具有亲电性。Asp301 去质子化有助于氢氧化物亲核攻击。当氢氧化物攻击磷原子中心时, 连接解离基团的键被削弱, 从而导致有机磷酸化合物的水解。His254 有可能帮助质子从活性位点转移到大的溶剂分子。Caldwell 等证明对硫磷水解酶的限速步骤是磷氧键的断裂。当底物解离基团的解离常数  $\text{pK}_a$  大于 7 时, 底物水解率随着  $\text{pK}_a$  的增加而降低; 而  $\text{pK}_a$  小于 7 的底物 (如对

氧磷)几乎以同样的速率被水解,水解速率受到反应产物扩散速度的限制。

**1.6 定向进化与合理设计** 对硫磷水解酶的定向进化为酶的人工改造提供了一个成功的范例。为了充分发挥对硫磷水解酶的催化潜能,针对不同底物对活性位点进行合理改造和修饰,可以使酶的催化能力大大加强。主要的化学战争毒剂(沙林、索曼和 VX)都是毒性差异较大的各个对应异构体的外消旋混合物。如索曼的 SpSc 对映异构体与乙酰胆碱酯酶的反应速度是 RpRc 的 1,000 多倍。对硫磷水解酶对底物的立体选择性限制了该酶的应用范围。与酶立体特异性有关的蛋白质结构的研究揭示了决定酶水解特性的底物结合亚位点特定区域的情况。定点修饰使得酶与底物结合亚位点的大小和形状发生了改变。因此,氨基酸的微小变化有可能使酶的底物特异性发生较大的改变<sup>[9,10]</sup>,使野生型酶的立体选择性区域得到加强、松弛或颠倒。野生型对硫磷水解酶催化乙基苯基对硝基苯基磷酸化合物水解时,Sp 型对映异构体的水解速率是 Rp 型对映异构体水解速率的 21 倍;如果这种差别是由于底物上大的苯基更适合于大的底物结合亚位点,而使乙基位于小的结合亚位点,那么,为了增强这种立体选择性,可以增加亚位点周围侧链的大小而使小的结合亚位点消失;在所有被试图改变的残基中,Gly60 转变为 Ala 效果最明显;变体酶 Gly60A 立体选择性增加了 11,000 倍<sup>[9]</sup>。为了实现有机磷酸三酯外消旋混合物的去污染,两种对映异构体被同时水解是最佳选择,这可以通过改变立体选择性达到。对硫磷水解酶中将 Phe132、Ser308、Ile106 转变为 Gly 和(或者)Ala<sup>[9,10]</sup>后,变体酶 I106G / F132G / S308G 对乙基苯基对硝基苯基磷酸化合物 Sp 型与 Rp 型对映异构体的立体选择性从 21:1 降为 1:1.3,这种立体选择性的松弛是由于增加了原先水解较慢的 Rp 型对映异构体的水解速率,而不是将 Sp 型对映异构体的水解速率降低到 Rp 型对映异构体的水平<sup>[10]</sup>。颠倒立体选择性最困难,Rp 型对映异构体的水解速率需要提高,而原先水解较快的 Sp 型对映异构体的水解速率必须降低。为了满足此要求,必须增大小的底物结合亚位点,同时缩小原本较大的底物结合亚位点。变体酶 I106G / F132G / H257Y / S308G 对乙基苯基对硝基苯基磷酸化合物 Sp:Rp 立体选择性变为 1:460。有趣的是从立体选择性 11,000:1(变体 Gly60A)变为 1:460(变体 I106G / F132G / H257Y / S308G)只需要改变 5 个氨基酸,但这其中的变化超过  $10^6$  倍<sup>[10]</sup>。构建对硫磷水解酶变体可用于化学战争剂的去毒。野生型对硫磷水解酶对于沙林毒性较小的 Rp 型对映异构体的水解速率是 Sp 型的 10 倍,然而变体 I106A / F132A / H257Y 对毒性更大的沙林 Sp 型对映异构体的水解速率是 Rp 型的 30 倍<sup>[11]</sup>。

**1.7 应用研究** 来源于 *Pseudomonas diminuta* MG 的磷酸三酯酶能够水解多种有机磷杀虫剂,有可能利用这种 PTE 治疗有机磷中毒。Broomfield 预先给动物静脉注射纯化的对硫磷水解酶(0.1mg/kg 体重),再给这些动物 34.4 $\mu$ g/kg 体重的索曼,该剂量是对照组动物的致死剂量的 2 倍多,结果未发现索曼对这些动物的影响。Caldwell 和 Raushel 将对硫磷水解酶固定于琼脂糖和尼龙用以有机磷杀虫剂去毒。尽管将该酶固定化后,水解效率较低,但固定化酶的动力学参数与溶液状态的酶相似。为了避免繁琐的多步酶纯化过程、减低成本,Richins 等利用融合表达获得有有机磷水解酶活性的融合蛋白(CBD-OPH)(OPH 指磷酸三酯酶。CBD 为内切纤维素酶和外切纤维素酶上的纤维素结合区),达到了一步纯化和固定该酶的目的。利用固定化的 CBD-OPH 不仅可以实现有机磷毒物的去毒,而且还有可能用以制造保护性的织物、清洁用海绵等。昆虫由于缺乏 PTE,因此对有机磷毒物非常敏感。在昆虫中表达 PTE 可以提高了昆虫对有机磷毒物的

耐受性。通过重组杆状病毒转染粘虫幼虫, *Pseudomonas diminuta* MG 的 PTE 得到表达, 从而导致对氧磷对粘虫的半致死剂量提高了 280 倍。Mulchandani 等利用对硫磷水解酶开发生物传感器, 可在农田、河流、湖泊中不连续地、实时地原位监测有机磷杀虫剂。此外, 一系列针对不同底物、提高催化活性的对硫磷水解酶突变体已经构建成功<sup>[10]</sup>, 因此, 有可能把该酶的应用拓展到通过酶对外消旋混合物的鉴定来合成手性有机磷杀虫剂<sup>[47]</sup>、以及采用安全的方法以实现兵工厂的去毒。

## 2 微生物降解甲基对硫磷的酶学研究状况

甲基对硫磷的化学结构与对硫磷非常相似, 但是目前新发现的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 与对硫磷水解酶基因 *opd* 完全不同。因此, 有必要进一步深入研究甲基对硫磷水解酶, 揭示微生物降解有机磷杀虫剂的生理生化机制。关于微生物降解甲基对硫磷的报道还比较少, 相关的酶学研究仅局限于以粗酶液为研究对象。Chaudhry 等分离到一株 *Pseudomonas* sp., 该菌具有甲基对硫磷水解酶活性, 粗酶液水解甲基对硫磷的最适 pH 为 7.5 ~ 9.5, 最适温度为 35℃ ~ 40℃, 不受重金属、EDTA、NaN<sub>3</sub> 的抑制。斑点杂交结果表明该菌 DNA 与 *Flavobacterium* ATCC 27551 的 *opd* 基因具有同源区段, 说明该酶与甲基对硫磷水解酶具有一定的同源性。

崔中利<sup>[40]</sup>等从甲基对硫磷降解菌 *Plesiomonas* sp. M6 的基因文库中克隆得到甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*, GenBank 检索结果表明 *mpd* 是一个完全不同于对硫磷水解酶基因 *opd* 的新基因。该基因不含编码半胱氨酸或胱氨酸的密码子, 因此, 它所编码的酶不含二硫键。

## 3 小结

目前, 尽管关于 *Pseudomonas diminuta* MG 的对硫磷水解酶的研究已经非常深入, 但是该酶的天然底物 (natural substrate) 尚未确定, 生理功能也不清楚。甲基对硫磷的化学结构与对硫磷非常相似, 但是为什么甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 与对硫磷水解酶基因 *opd* 完全不同? 甲基对硫磷水解酶与对硫磷水解酶的差异有多大? 深入研究这些问题可以进一步加深对微生物降解有机磷杀虫剂这类环境异生物质的生理生化机制的认识。

## 参 考 文 献

- [1] Lewis V E, Donarski W J, Wild J R, et al. Biochemistry, 1988, 27: 1591 ~ 1597.
- [2] Omburo G A, Kuo J M, Mullins L S, et al. J Biol Chem, 1992, 267: 13278 ~ 13283.
- [3] Hong S B, Raushel F M. Biochemistry, 1996, 35: 10904 ~ 10912.
- [4] Benning M M, Kuo J M, Raushel F M, et al. Biochemistry, 1994, 33: 15001 ~ 15007.
- [5] Benning M M, Shin H, Raushel F M, et al. Biochemistry, 2001, 40: 2712 ~ 2722.
- [6] Banzon J A, Kuo J M, Miles B W, et al. Biochemistry, 1995, 34: 743 ~ 749.
- [7] Kuo J M, Chae M Y, Raushel F M. Biochemistry, 1997, 36: 1982 ~ 1988.
- [8] Benning M M, Hong S B, Raushel F M, et al. J Biol Chem, 2000, 275: 30556 ~ 30560.
- [9] Chen-Goodspeed M, Sogorb M A, Wu F, et al. Biochemistry, 2001, 40: 1325 ~ 1331.
- [10] Wu F, Chen-Goodspeed M, Sogorb M A, et al. Biochemistry, 2001, 40: 1332 ~ 1339.
- [11] Li W S, Lum K T, Chen-Goodspeed M, et al. Bioorg Med Chem, 2001, 9: 2083 ~ 2091.
- [12] Chen-Goodspeed M, Sogorb M A, Wu F, et al. Biochemistry, 2001, 40: 1332 ~ 1339.
- [13] Wu F, Li W S, Chen-Goodspeed M, et al. J Am Chem Soc, 2000, 122: 10206 ~ 10207.
- [14] Cui zhongli, Li shunpeng, Fu guoping. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4922 ~ 4925.