

# 甲基对硫磷水解酶的随机突变和分子对接模拟

李亚楠 张彦博 胡美英 陈少华 胡振 易欣 林惠花

华南农业大学昆虫毒理研究室/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

**摘要** 甲基对硫磷水解酶(MPH)能高效降解甲基对硫磷,并能够降解杀螟松、乙基对硫磷和毒死蜱,但降解效率依次降低。为提高 MPH 对毒死蜱的降解活性,采用易错 PCR 的方法对 MPH 进行随机突变,筛选到 2 株突变体 A291V 和 K173R,并对其进行原核表达,结果表明 K173R 对毒死蜱的降解活性比 MPH 提高了 41.55%。通过同源建模及与毒死蜱的分子对接对酶的结构和功能进行初步分析,结果发现氨基酸残基 R72 在酶与毒死蜱的结合中起着重要作用。结合口袋和关键氨基酸的变化可最终导致 K173R 酶活性的提高。

**关键词** 甲基对硫磷水解酶; 毒死蜱; 随机突变; 易错 PCR; 同源建模; 分子对接

**中图分类号** S 481<sup>+</sup>.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0325-07

毒死蜱是一种广谱性的中等毒性杀虫剂,长期以来已广泛应用于防治棉田、稻田、牧场和蔬菜上的食叶害虫<sup>[1]</sup>。近年来,毒死蜱已成为高毒有机磷杀虫剂的替代品种,是全球应用最广泛的杀虫剂之一,在许多国家和地区的土壤、大气、雨水、地下水等环境中均能检测到其残留<sup>[2-3]</sup>。

甲基对硫磷水解酶(methyl parathion hydrolyse, MPH)是由 *mpd* 基因编码的可溶性单体蛋白<sup>[4]</sup>,属于金属  $\beta$ -内酰胺酶超家族,与其他已知的有机磷降解酶同源性较低<sup>[5]</sup>。MPH 可以高效降解甲基对硫磷,还可以降解杀螟松、乙基对硫磷和毒死蜱,但降解效率依次降低<sup>[6]</sup>。

目前,基因工程和酶工程技术的应用为农药残留的微生物降解开辟了新途径。蛋白质定向进化和随机突变技术是改良降解酶的 2 个主要策略。Schofield 等<sup>[7]</sup>采用饱和突变的方法,最终筛选出能够高效降解甲基内吸磷和马拉硫磷的有机磷水解酶突变体,但至今尚未发现专门针对毒死蜱降解酶定向进化的研究和报道。笔者采用易错 PCR 技术对甲基对硫磷水解酶进行随机突变,筛选出对毒死蜱活性提高的突变体,并对其进行同源建模和分子对接分析,旨在为规范毒死蜱的使用和寻求高效降解菌及降解酶提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试 *mpd*-T 的 DH5 $\alpha$  甘油菌菌株由笔者所在实验室构建并于 -80 °C 保存备用。

### 1.2 主要试剂

供试大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、BL21、质粒小提试剂盒购自北京天根生物科技有限公司。

DNA 凝胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶及缓冲液、限制性内切酶及缓冲液、蛋白分子质量标准购自 TaKaRa 公司; DNA 分子质量标准、*Taq* DNA Polymerase 及缓冲液、dNTPs 购自广州东盛生物公司; *pfu* DNA Polymerase 及缓冲液、琼脂糖及 SDS-PAGE 相关试剂购自上海生工公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培养基组成

LB 培养基:胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 去离子水定容至 1 000 mL, pH 7.2, 高压蒸汽灭菌后备用。抗生素 Amp: 100  $\mu$ g/mL。

### 1.4 引物和测序

引物和测序由上海英骏生物技术有限公司提供并完成。

收稿日期: 2011-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871660)和广东省博士启动基金项目(9451064201003679)

李亚楠, 硕士研究生, 研究方向: 天然源农药和农药残留降解。E-mail: rainlyn198610@163.com

通讯作者: 胡美英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然源农药和农药残留与环境保护。E-mail: humy@scau.edu.cn

## 1.5 主要仪器

RC-2C 高速低温离心机购自 Sorvall 公司; My Cyclor 梯度 PCR 仪、Pow Pac 1000 电泳仪、Gel Doc 2000 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 超净工作台购自苏州净化设备厂; H. S. G II C-4 电热恒温水浴锅购自临海市东方仪器厂; LRH-250A 生化培养箱购自广东省医疗仪器厂。

## 1.6 引物设计

根据 *mpd* 的核苷酸序列, 利用 Primer 5.0 软件进行引物设计, 并加入双酶切位点 (*Bam*H I 和 *Eco*R I), 序列为 F: 5'-CGGGATCCATGCCCCCT-GAAGAACCCTT-3'; R: 5'-GGAATTCGCTT-GGGGTTGACGACCGAGTAGTT-3'。

## 1.7 易错 PCR 及其产物的克隆

以 *mpd*-T 质粒为模板, F/R 为引物进行 PCR, 并纯化 PCR 产物, 以此作为易错 PCR 的模板。易错 PCR 体系为: 50  $\mu$ L 体系中含 10 $\times$ PCR Buffer, 0.2 mmol/L dATP 和 dGTP, 1 mmol/L dCTP 和 dTTP, 5~7 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0~0.17 mmol/L  $Mn^{2+}$ , 上下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 0.5  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L。其中  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  的浓度可调整。Error prone PCR 循环条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 1 min, 66  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经回收纯化后与 pMD19-T 连接并转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 蓝白斑筛选和菌液 PCR 鉴定后直接送测序, 经序列分析筛选得到突变体。

## 1.8 MPH 及其突变体的重组表达

1) 原核表达载体的构建。分别以得到的突变体质粒和 *mpd*-T 质粒为模板, F/R 为引物用 pfu DNA Polymerase 进行 PCR, 50  $\mu$ L PCR 反应体系为: 突变质粒 1  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 引物各 2  $\mu$ L, 10 $\times$  pfu PCR Buffer 5  $\mu$ L, pfu DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 超纯水 37  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 45 s, 66  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 16  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经回收纯化后以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切消化 4 h, 同时酶切消化 pGEX-6p-1 质粒, 并回收酶切产物。将回收产物 (*Bam*H I / *Eco*R I) 和 pGEX (*Bam*H I / *Eco*R I) 连接, 并转化至 BL21 (DE3) 感受态。经菌液 PCR 及质粒双酶切鉴定后送样测序。

2) 诱导表达。将 MPH 的重组菌进行 IPTG 诱

导表达, IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 22  $^{\circ}$ C 分别诱导 1、2、4、6 h。经 15% SDS-PAGE 凝胶电泳后确定最佳诱导时间; 突变体以最佳诱导时间进行诱导表达。

## 1.9 粗酶液活性的测定

由于 *E. coli* BL21 (DE3) 表达系统主要在胞内表达蛋白, 所以从上述诱导条件下诱导的菌液中分离出胞内可溶性酶即粗酶液。分别取 500  $\mu$ L 预热酶加入 3 mL 预热 pH 6.5 的含 50 mg/L 毒死蜱的磷酸盐缓冲液中, 在 30  $^{\circ}$ C 水浴中反应 1 h 后, 用 0.1 mL、1 mol/L 三氯乙酸终止反应。反应结束后, 分别加入 4 mL 丙酮, 采用超声波提取法提取。将提取液转入分液漏斗中, 加入 7 mL 二氯甲烷和适量 NaCl 剧烈震荡 2 min, 静置 2 min, 使丙酮从水相中盐析出来。水相用二氯甲烷进行二次萃取。合并 2 次萃取液, 经装有无水硫酸钠的玻璃漏斗脱水滤入圆底烧瓶, 在 45  $^{\circ}$ C 恒温水浴, 经旋转蒸发仪浓缩至 1 mL, 将浓缩液用乙酸乙酯定容至 3 mL。取 2 mL 经 0.45  $\mu$ m 有机膜注射式过滤器过滤, 收集滤液, HPLC 测定毒死蜱含量<sup>[8]</sup>。每个处理 3 个重复, 同时设转入空载体的酶液处理作为对照。

毒死蜱残留量的 HPLC 测定条件: HPLC 为 PH-1100 型; 色谱柱为 C18 反相柱; 流速 1 mL/min; 柱温为常温 (25 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇: 水 = 85: 15 (体积比); 检测波长 300 nm; 进样量 10  $\mu$ L。

在上述条件下, 1 个酶的活力单位 (U) 定义为每分钟催化水解 1 mmol 毒死蜱所需要的酶量。以最高酶活力为 100%, 其他条件下的酶活力与之相比即得各自的相对酶活力。

## 1.10 MPH 及其突变体的分子模拟对接

1) 同源建模。应用 Discovery Studio 2.0 软件的 Build Homology Models 模块, 对 MPH 及其突变体的三级结构进行了同源建模。采用多序列比对程序 Blast 对 MPH 氨基酸序列在 PDB 蛋白结构数据库中进行序列相似性搜索, 从而确定同源蛋白作为模板用于 MPH 三维结构的模建。预测 10 个模型, 以不同的参数进行评价后选取得分最高的模型为模建的结果, 并对该模型进行氨基酸合理性分析。

2) MPH 及其突变体与毒死蜱的分子对接。活性位点分析: 应用 Discovery Studio 2.0 软件的 Binding Site 模块, 搜索 MPH 可能的活性位点, 位点分析过程采用 CHARMm 力场。Binding Site 模块是用来确定蛋白质的结合位点。该模块提供 2 种

方法搜寻蛋白质中可能的活性位点。一是通过蛋白质表面的几何形状分析来寻找能够与底物结合的口袋,预测可能的结合位点;二是通过对蛋白质家族进化过程中的保守氨基酸进行研究,确定这些氨基酸残基的位置,预测蛋白的活性位点。

MPH 及其突变体与毒死蜱的分子对接:在对接之前,首先使用 Discovery Studio 2.0 软件的 Prepare Ligands 产生毒死蜱的分子结构并进行能量优化。使用 CDOCKER 对接程序将蛋白与化合物对接,对接结果参数设置为对接后配体结果保存最优的前 10 种构象,这些不同的构象采用 score ligand pose 程序中的不同打分函数进行评价,并采用 consensus score 程序对其进行打分排列。对接能量、氢键结合数和一致性打分结果将共同决定 MPH 与配体的最佳对接复合物结果。

为进一步研究 MPH 与配体对接过程中起到关键作用的氨基酸,采用 Discovery Studio 2.0 软件中 Calculate Interaction Energy 程序计算毒死蜱和甲基对硫磷与活性位点中每个氨基酸的结合自由能,总能量小于-4.186 8 kJ/mol 的氨基酸残基被确定为关键氨基酸残基<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

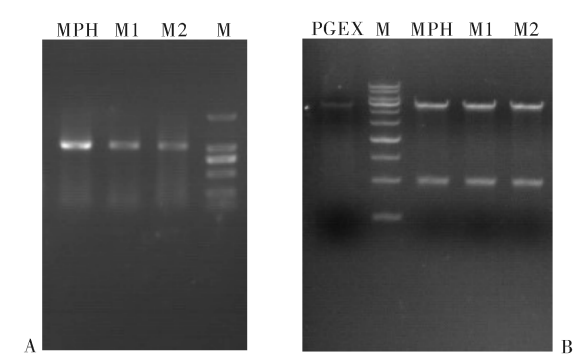
### 2.1 随机突变体的获得和原核表达

易错 PCR 产物经克隆后,从 500 多个 PCR 阳性菌落中随机挑选 100 个进行序列测定,筛选到 2 个突变体,分别为 M1(A291V)和 M2(K173R)。构建了 MPH 及突变体的原核表达菌株,菌液 PCR 及质粒双酶切鉴定结果见图 1。

MPH 重组菌株经 0.5 mmol/L IPTG 22 ℃ 分别诱导 1、2、4、6 h,以确定最佳诱导时间。SDS-PAGE 电泳结果见图 2。由图 2 可知,MPH 在上清及沉淀中均有表达,且在上清中表达量较高。由于 27 ku 的 GST 融合蛋白的存在,所特异表达的蛋白分子质量约为 61 ku。MPH 在 6 h 达到最高表达量,因此选择 6 h 作为最佳诱导时间进行后续试验。

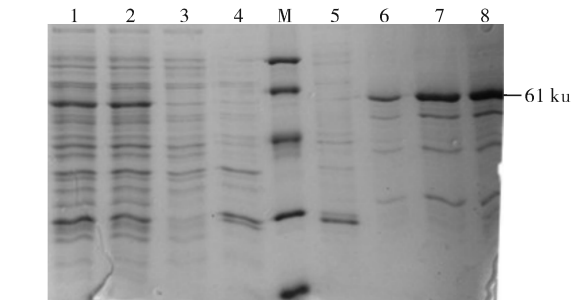
### 2.2 粗酶液对毒死蜱的降解活性

菌液经 6 h 诱导后,所制得的粗酶液的 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。粗酶液对毒死蜱降解反应 1 h 后,野生型 MPH 及突变体 M1、M2 粗酶液对毒死蜱的降解效果见表 1。以空载体为空白对照,突变体 M1 的酶活力较 MPH 下降了 35.92%,而突变体 M2 的酶活力则较 MPH 提高了 41.55%。



A. 菌液 PCR PCR products of BL21(DE3)(M;DL 2 000); B. 重组质粒双酶切 Identification of recombinant plasmid by digestion with *Bam*H I and *Eco*R I (M;1 kb ladder).

图 1 MPH 及其突变体(M1,M2)原核表达载体的构建  
Fig.1 Construction of prokaryotic expression vectors of MPH and its mutants(M1,M2)

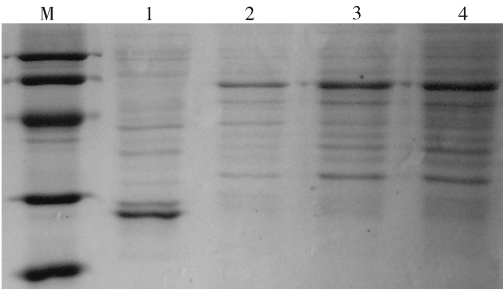


M:蛋白分子质量标准,分子质量从大到小依次为 97.2、66.4、44.3、29.0、20.1 ku; 1~3:分别为诱导 2、4、6 h 的沉淀; 4、5:分别为空载体的沉淀和上清; 6~8:分别为诱导 2、4、6 h 的上清。M:Protein molecular mass marker, the molecular mass were 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1 ku respectively; 1-3:Deposition of 2,4,6 h induction; 4,5: Supernatant and deposition of negative control respectively; 6-8: Supernatant of 2,4,6 h induction.

图 2 不同诱导时间重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant protein induced by IPTG at different times

表 1 粗酶液酶活性的测定 <sup>1)</sup>			
Table 1 Degradation activity assay of crude enzymes			
粗酶液 Crude enzymes	$\rho$ /(mg/L)	酶活力/ (10 <sup>-5</sup> U/mg) Enzyme activity	相对酶活力/% Relative enzyme activity
MPH	563.9	1.42±0.089 9 b	70.65
M1	471.0	0.91±0.094 2 c	45.27
M2	520.7	2.01±0.047 3 a	100.00

1)酶活力为 3 次重复的平均值,同列数据相同字母者表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法)。Enzyme activity is the mean of 3 replicates with standard error. Mean values followed by the same letters in the same column are not significantly different at level 0.05 (DMRT).



M:蛋白分子质量标准,分子质量从大到小依次为 97.2、66.4、44.3、29.0、20.1 ku; 1:空载体上清;2~4:分别为 M1、M2、MPH 粗酶液。M:Protein molecular mass marker, the molecular mass were 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1 ku, respectively; 1:Supernatant of negative control; 2~4:Crude enzymes of MPH, M1, M2, respectively.

图 3 重组蛋白诱导 6 h 后的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant proteins induced by IPTG after 6 h incubation

2.3 MPH 及其突变体 M1、M2 的同源建模

使用 Blast(DS Server)对 PDB 库进行搜索,寻找同源模板蛋白,编号为 1P9E<sup>[10]</sup>的 A 链与 MPH 的氨基酸序列一致性最高(94%),故可用该模板进行建模。应用 Discovery Studio 2.0 软件的 Build Homology Models 模块,以 1P9E 为模板对 MPH、M1 和 M2 的三级结构进行同源建模,从 10 个备选结构中 选择 PDF Total Energy 和 DOPE Score 评

价最优的构象用于结构评价及分子对接。MPH、M1 和 M2 的三维结构见图 4,主要由内部的  $\beta$  折叠及两侧的  $\alpha$  螺旋组成  $\alpha\beta/\beta\alpha$  结构,并且有一些  $\beta$  转角结构。

2.4 MPH 三维结构模型的可靠性分析

利用 Discovery Studio 软件中的 Profile-3D 模块对已经构建好的三维结构模型进行可靠性分析,结果见图 5。通过分析可知,除了 N 端和 C 端(肽链的两端的得分允许小于 0),绝大部分氨基酸残基的得分都大于 0,这说明大部分氨基酸残基都处于合理位置。在拉氏图中,蓝色区域内表示合理氨基酸,蓝色区域外紫色区域内表示较合理氨基酸,紫色区域外表示不合理氨基酸(图 6)。不合理氨基酸数目均少于总氨基酸的 3%,说明模型可靠。

2.5 MPH、M1、M2 与毒死蜱的模拟对接

应用 Discovery Studio 2.0 软件的 Binding Site 模块,搜索可能的活性位点,位点分析过程采用 CHARMm 力场。在 3 个模型中,结合位点 1 均位于一个较大的疏水性空穴中,而其他位点则偏离此空穴。考虑到此疏水空穴适合配体的结合,因此选取结合位点 1 作为最佳活性位点用于下面的模拟对接。采用 CDOCKER 模块分别进行 MPH、M1 和 M2 与毒死蜱的分子对接,对接结果见图 7。

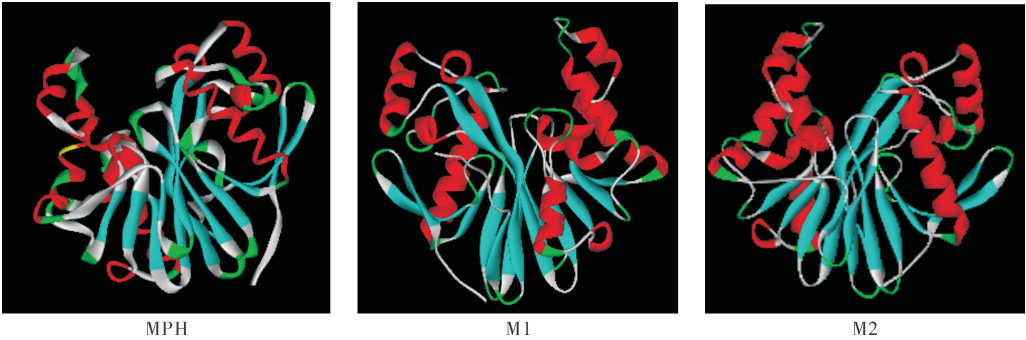


图 4 MPH、M1 和 M2 的三维结构模型

Fig.4 Three-dimensional structure modeling of MPH,M1 and M2

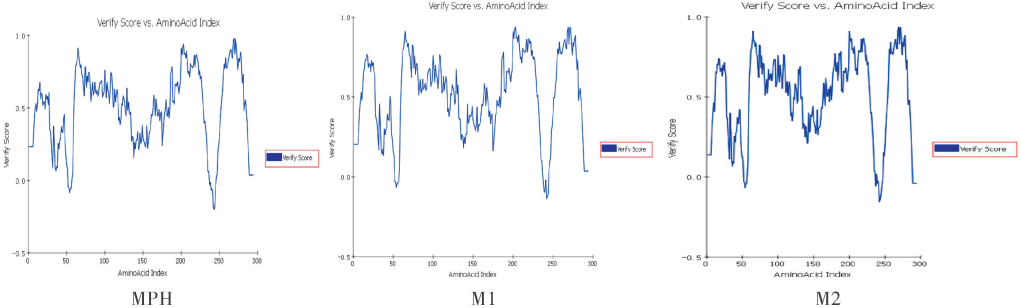


图 5 MPH、M1 和 M2 三维模型的 Profile-3D 分析

Fig.5 Profile-3D analysis on three-dimensional model of MPH,M1 and M2



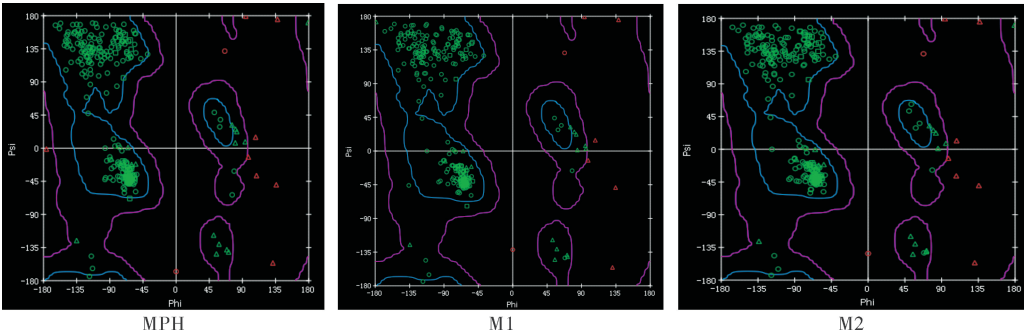


图 6 MPH、M1 和 M2 三维模型的拉氏图分析

Fig. 6 The Ramachandran plots of MPH, M1 and M2

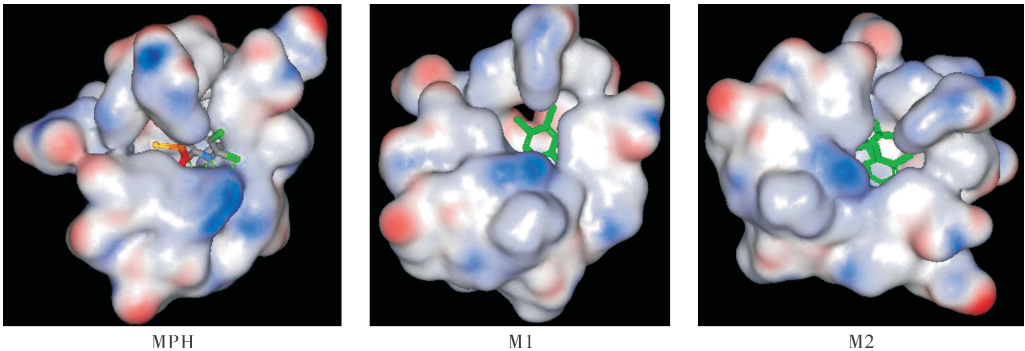


图 7 MPH、M1 和 M2 与毒死蜱的结合图

Fig. 7 Docking model of chlorpyrifos with MPH, M1 and M2

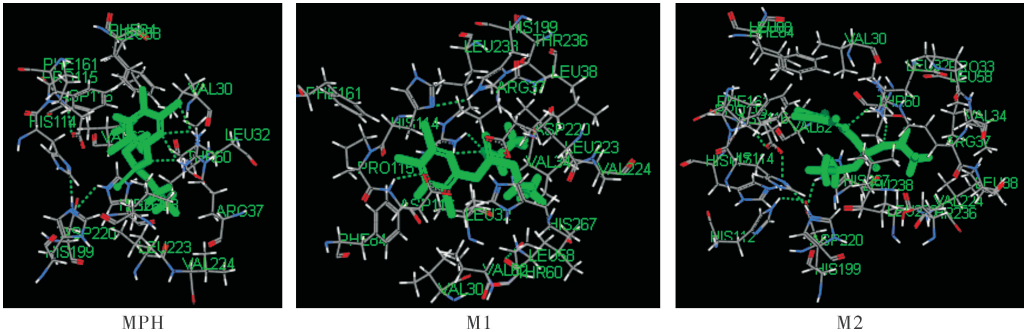


图 8 MPH、M1 和 M2 的活性位点与毒死蜱的结合模式图(图中虚线表示形成的氢键)

Fig. 8 Binding mode of chlorpyrifos with the binding site of MPH, M1 and M2

(The hydrogen bonds were represented by dotted lines)

通过对接发现,毒死蜱均能够进入 MPH、M1 和 M2 的疏水区结合口袋,且 F119、W179 和 F196 共同构成了疏水区的入口。M2 由于 173 位的 Lys 突变为 Arg,使得毒死蜱分子能够完全进入结合口袋而与之发生相互作用。有机小分子和蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、氢键作用力和范德华力等。由于化合物分子在活性位点当中的结合构象的不同,从而使得它们形成相互作用的活性位点周围的氨基酸残基以及相互作用强弱均不同(图 8)。由图 8 可知,氢键是它们与毒死蜱相

互作用的一种重要方式,疏水作用力及其他静电作用也影响着酶与毒死蜱的结合。MPH、M1 和 M2 的 R72 均与毒死蜱形成氢键,是与毒死蜱作用的最为关键的氨基酸。虽然 MPH 与毒死蜱形成 4 个氢键,而 M2 只形成 2 个氢键,但经计算,M2 的 R72 与毒死蜱的相互作用能为 $-42.830\text{ kJ/mol}$ ,高于 MPH ( $-40.059\text{ kJ/mol}$ )和 M1( $-22.667\text{ kJ/mol}$ )。此外,与 MPH 和 M1 不同,M2 的组氨酸富集区的 H147 和 H152 也直接参与了与毒死蜱的相互作用。由于上述各种明显的变化,结合其他氨基酸残基作用强弱

的不同,影响了酶与毒死蜱的结合与催化反应,使得 M2 对毒死蜱的降解活性更高。MPH、M1 和 M2 与毒死蜱相互作用的关键氨基酸见表 2。

表 2 MPH、M1 和 M2 与毒死蜱相互作用的关键氨基酸  
Table 2 Key amino acids interacted with chlorpyrifos of MPH, M1 and M2

酶 Enzymes	关键氨基酸 Key amino acids
MPH	V65、L67、R72、T95、V97、 F119、H234、L258、L273、H302
M1	L67、R72、T95、V97、F119、H149、 D151、H234、L258、V259、L273
M2	R72、V97、F119、H149、D151、 H152、D255、L258、L273

3 讨 论

酶分子定向进化(directed evolution)属于蛋白质的非理性设计,是在体外模拟蛋白质分子的自然进化过程,利用分子生物学手段在分子水平创造分子的多样性,结合灵敏的筛选技术,迅速得到理想的突变体。该策略已在农药降解酶上得到广泛应用。一方面,通过定向进化可以改变降解酶的底物特异性。Disioudi 等<sup>[11]</sup>对有机磷水解酶 OPH 进行了点突变,得到 H254R、H257L 和 H254R/ H257L 3 个突变体,使金属活性位点由 4 个变为 2 个,酶的底物特异性发生了改变。突变酶对磷氧键型有机磷保留了相当一部分酶活性,磷硫键型有机磷的底物特异性增加到野生酶的 2~30 倍,而磷氟键型有机磷的底物的特异性基本上都是减少。另一方面,定向进化还能使降解酶的活性得到提高。Hawwa 等<sup>[12]</sup>通过对来自耐辐射球菌的有机磷水解酶 Dr-OPH 进行定向进化,并结合晶体结构分析,最终得到的突变酶对乙基对氧磷和甲基对氧磷的催化活性分别提高了 126 倍和 322 倍,其专一性常数分别提高了 557 倍和 183 倍。此外,通过定向进化还可以提高降解酶的稳定性,初步了解酶结构与功能的关系<sup>[13]</sup>。

为了使甲基对硫磷水解酶(MPH)得到更好的应用,人们对 MPH 的定向进化进行了一定的探索。刘璐璐<sup>[6]</sup>构建了 MPH 的异源重组表达系统,并用 epPCR 的方法对重组酶进行定向进化,但未发现对甲基对硫磷水解活性明显提高的突变体,认为融合蛋白已经处于最佳的水解构象,可进化潜力很小。冷艳<sup>[14]</sup>采用 *E. coli* BL21(DE3)/PET20b(+)-mph 重组系统,经过一轮易错 PCR,筛选得到 2 株具有高活力的突变株 A7(R41H)和 E6(R49P/G117D),

其对底物甲基对硫磷 MP 催化活性分别是野生型的约 2 倍和 3 倍。由于 MPH 对毒死蜱的降解活性低于甲基对硫磷,因此,本试验采用毒死蜱作底物,经过一轮易错 PCR,筛选到 1 株突变株 K173R,使其对毒死蜱的活性提高了 41.55%。今后的研究,可在已有突变体的基础上进行多轮突变,以积累有益突变,得到降解活性更高的突变株。

分子模拟技术根据理论和已知的氨基酸序列等信息用计算机进行预测,实现生物技术与计算机技术的完美结合,在结构与功能关系分析、分子设计和酶分子定向进化等过程中得到了广泛开发与应用。任珍珍等<sup>[15]</sup>通过分子对接确定突变位点,研究了半胱氨酸(Cys32)对小菜蛾化学感受蛋白 1(PlxyCSP1)结合特性的影响。近年来,分子模拟技术在农药降解酶的定向进化上也备受关注。Chu 等<sup>[13]</sup>经同源建模及定点突变,发现了 C110~C146 之间形成的二硫键对来自 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C2-1 (CGMCC1150)的甲基对硫磷水解酶 OPHC2 的热稳定性具有重要意义。Tian 等<sup>[16]</sup>则通过对来自 *Ochrobactrum* sp. M231 的甲基对硫磷水解酶(Ochr-MPH)的建模分析,选择了靠近第 186~193 个氨基酸残基的 2 个甘氨酸突变为脯氨酸,最终得到热稳定性提高的突变株 G194P。本试验对 MPH 及其突变体进行了同源建模,得到了合理可靠的三维结构模型,并以此与毒死蜱进行分子对接。通过模拟对接,发现 R72 在酶与毒死蜱的结合中发挥着关键作用。F119、W179 和 F196 处于结合口袋的入口处,这与 Dong 等<sup>[10]</sup>得到的 MPH 晶体结构的结果相同,进一步说明分子模拟的可靠性。

与降解菌相比,农药降解酶因具有较好的生态安全性而拥有更广阔的应用空间。随着新技术手段的不断涌现,对农药降解酶的改造必定会得到更理想的效果。酶分子的定向进化,一方面可以提高酶的稳定性、底物特异性和酶活力等,从而增加其应用前景;另一方面针对活性位点的突变,对研究酶的作用机理具有一定的指导意义,因此,通过突变技术对酶分子进行定向改造,将是研究农药残留降解的有效途径。

参 考 文 献

[1] SINGH B K, WALKER A, MORGAN J A W, et al. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium [J]. Appl Environ Microbiol,

- 2003,69(9):5198-5206.
- [2] SINGH B K, WALKER A, MORGAN J A W, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(8): 4855-4863.
- [3] COUPE R H, MANNING M A, FOREMAN W T, et al. Occurrence of pesticides in rain and air in urban and agricultural areas of Mississippi, April-September 1995 [J]. Sci Total Environ, 2000, 248: 227-240.
- [4] 楚晓娜, 张先恩, 陈亚丽, 等. 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(4): 453-459.
- [5] FU G P, CUI Z L, HUANG T T, et al. Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase [J]. Protein Express Purif, 2004, 36(2): 170-176.
- [6] 刘璐璐. 甲基对硫磷水解酶的研究[D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒研究所, 2003.
- [7] SCHOFIELD D A, DINOVO A A. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(2): 548-557.
- [8] 李本昌. 农药残留量实用检测方法手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [9] ZHENG Q C, LI Z S, XIAO J F, et al. Homology modeling and PAPS ligand (cofactor) binding study of bovine phenol sulfotransferase [J]. J Mol Model, 2005, 11(2): 97-104.
- [10] DONG Y J, BARTLAM M, SUN L, et al. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3 [J]. J Mol Biol, 2005, 353(3): 655-663.
- [11] DISONDI B, GRIMSLEY J K, LAI K H, et al. Modification of near active site residues in organophosphorus hydrolase reduces metal stoichiometry and alters substrate specificity [J]. Biochemistry, 1999, 38(10): 2866-2872.
- [12] HAWWA R, LARSEN S D, RATIA K, et al. Structure-based and random mutagenesis approaches increase the organophosphate-degrading activity of a phosphotriesterase homologue from *Deinococcus radiodurans* [J]. J Mol Biol, 2009, 393(1): 36-57.
- [13] CHU X Y, TIAN J, WU N F, et al. An intramolecular disulfide bond is required for the thermostability of methyl parathion hydrolase, OPHC2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(3): 125-131.
- [14] 冷艳. 甲基对硫磷水解酶高活筛选及荧光纳米分子生物传感器的研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2010.
- [15] 任珍珍, 刘晶晶, 柳晓磊, 等. 重叠延伸 PCR 法构建小菜蛾化学感受蛋白 1 基因突变体研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(1): 119-125.
- [16] TIAN J, WANG P, GAO S, et al. Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation [J]. FEBS J, 2010, 277(3): 4901-4908.

## Random mutation and molecular docking simulation of methyl parathion hydrolyse

LI Ya-nan ZHANG Yan-bo HU Mei-ying CHEN Shao-hua HU Zhen YI Xin LIN Hui-hua

Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China

**Abstract** Methyl parathion hydrolyse (MPH) could degrade methyl parathion efficiently, as well as fenitrothion, ethyl parathion and chlorpyrifos, with the degradation efficiency decreasing systematically. In order to improve the degradation activity of MPH on chlorpyrifos, random mutation was carried out by error-prone PCR. Two mutants A291V and K173R were screened and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The degradation activity of K173R on chlorpyrifos increased 41.55% as compared to MPH. Besides, homology modeling and molecular docking were used for preliminary analysis of the relationship between the enzymes' structure and function. The results showed that the residue R72 played an important role in combination with chlorpyrifos, and changes occurring in the binding pocket and key amino acids eventually led to the increased degradation efficiency of K173R.

**Key words** methyl parathion hydrolyse; chlorpyrifos; random mutation; error-prone PCR; homology modeling; molecular docking