

## 甲基对硫磷水解酶参与催化相关结构的研究

# Determination of the Catalytic Structures of Methyl Parathion Hydrolase

吴旭平, 刘卫东, 曹 慧, 李顺鹏, 崔中利\*

WU Xu-Ping, LIU Wei-Dong, CAO Hui, LI Shun-Peng and CUI Zhong-Li\*

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

Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**摘 要** 甲基对硫磷水解酶(MPH)是一种新的有机磷水解酶。将完整的甲基对硫磷水解酶基因(*mpd*)构建入 pUC19 载体,使得 *mpd* 基因以自身的启动子在 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中表达并得到了纯化。金属螯合实验发现 MPH 的活性不受金属螯合剂 1, 10-菲喹啉的影响,但用电感耦合等离子发射光谱测定其金属含量显示 MPH 是金属酶,1mol 酶中结合了 2mol 的  $Zn^{2+}$ 。为确定参与 MPH 催化活性的必需氨基酸,用化学修饰剂碳化二亚胺、二乙基焦磷酸酯、磷酸吡哆醛和丁二酮处理 MPH,然后检测其残余酶活力,结果表明天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和精氨酸残基与酶的催化活性无关,而二乙基焦磷酸酯对组氨酸侧链的化学修饰引起酶活性的大幅度的下降,其对酶活性的抑制率达到  $9.6h^{-1}$ ,说明组氨酸是酶活力所必需的基团。这些结果为进一步研究酶的结构及对酶进行分子改造提供了必要的基础数据。

**关键词** 甲基对硫磷水解酶,金属离子含量,化学修饰,必需氨基酸

中图分类号 Q556 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0998-05

**Abstract** Methyl parathion hydrolase (MPH) is a novel member of organophosphorus hydrolase. In this study, *mpd* gene was expressed in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  with its native promoter. MPH was purified to homogeneity. Results show that metal-chelating compounds cannot inhibit the enzyme activity. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry analysis showed that MPH is a zinc-containing enzyme, the Zinc to enzyme molar ratio is near 2:1. In order to investigate critical residues related to enzymatic activity of MPH, chemical modification reagents EDC, DEPC, butanedione and pyridoxal were tested. Experiment results suggested that aspartate, glutamate, arginine and lysine are not important for enzyme activity. But DEPC, which can modify histidine residue, inactivate the enzyme activity greatly, and the inactivation rate is  $9.6h^{-1}$ . This result reflects that histidine residues are essential for enzyme activity. All these results provide basic data for MPH structure and molecular evolution research.

**Key words** methyl parathion hydrolase, metal ion content, chemical modification, critical residue amino acids

Received: June 8, 2005; Accepted: July 28, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No.30300005 and 40371069) and the National Program for High Technology Research and Development (No.2004AA246070).

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84396753; E-mail: czl@njau.edu.cn

国家自然科学基金(No.30300005和40371069)和国家高技术研究与发展(No.2004AA246070)项目资助。

有机磷类毒剂对于人和动物有很大的毒性,作为杀虫剂在世界范围内仍被广泛的应用,并在战场上被用做神经性化学战毒剂。科学家对有机磷毒剂的微生物降解作了深入的研究,许多能够利用有机磷农药为底物的微生物已被分离<sup>[1-5]</sup>。其中对来源于 *Pseudomonas diminuta* GM 的有机磷水解酶(OPH)的基因克隆、酶学研究、分子结构和催化机制有了详细的报道<sup>[6-7]</sup>。同样利用体外分子进化手段扩大了该酶的底物范围,增强了该酶对包括神经毒剂在内的各种底物的利用效率<sup>[8]</sup>。本实验室从 *Plesiomonas* sp. M6 中发现了新的甲基对硫磷水解酶(MPH),对该编码酶的基因进行了克隆<sup>[5]</sup>和酶在大肠杆菌中的高效表达和重组酶性质的研究<sup>[9]</sup>。并构建了以甲基对硫磷水解酶为报告基因的启动子探针载体<sup>[10]</sup>。本文进一步报道了甲基对硫磷水解酶在金属辅基方面的一些特殊性质,并通过化学修饰方法揭示参与 MPH 活性的必需氨基酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 pUC19 购自 Novagen 公司;甲基对硫磷降解菌 *Plesiomonas* sp. M6 由本实验室分离;pMT1 (pUC19 中携带 2.2kb 含甲基对硫磷水解酶基因的片段)由本实验室构建。*Escherichia coli* BL21(DE3) 和 pET-opd 质粒由本实验室保存。有机磷水解酶(OPH)基因 *opd* 为本实验室根据 Genbank M22863 序列人工合成(TaKaRa Co Ltd 大连)。

### 1.2 试剂

*Pfu* DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物技术有限公司;dNTP、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 切胶纯化试剂盒购自 Genebase 公司;甲基对硫磷购自上海农药研究所;碳化二亚胺(carbodiimide, EDC)、二乙基焦磷酸酯(DEPC)、磷酸吡哆醛购于上海生工;丁二酮(butanedione)、羟胺(hydroxylamine)和 1, 10-菲啰啉(1, 10-phenanthroline)购于上海化学试剂公司;*N*-tris(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)、3-(*N*-吗啉代)-2-氨基乙磺酸(MOPS)、*N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N'*-(2-乙磺酸) HEPES 购自 Amresco;其它试剂均为分析纯。

### 1.3 MPH 表达载体的构建

以质粒 pMT1 为模板,用引物 22 5'-gagctcgaattcaaccccgatgttgcaagccgt-3' 和 D:5'-cgcaagcttcacatcatcacttgagggtgacgaccga-3' 扩增了带自身启动子的完整的甲基对硫磷水解酶基因,其中引物 D 中额外增加了两个终止密码子(tcata)。PCR 产物经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切,切胶回收后连接入 pUC19 载体并转化 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ,使得水解酶基因在 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中以自身的启动子带动表达。

### 1.4 MPH 的分离和纯化

将转化得到的 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  细胞接入 LB 试管中培养至对数生长期,然后接种至 1L 含 12g 蛋白胨,24g 酵母膏,12.497g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.7218g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4mL 甘油,0.006815g ZnCl<sub>2</sub> 和 50mg 氨苄青霉素,pH 7.5 的液体培养基中,37℃培

养至对数生长期,4℃,8000r/min 离心收集菌体。以下纯化步骤均在 4℃ 完成,并且所用缓冲液中均加入 0.05mmol/L ZnCl<sub>2</sub>。用 20mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.5)重悬菌体沉淀,超声波破碎约 6min 至细胞悬浮液不再粘稠,12000r/min 离心 15min,收集上清,将上清上已用 20mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.5)平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱(2.5cm × 10cm),用同样的缓冲液洗脱蛋白;合并有酶活性的收集液,用硫酸铵沉淀蛋白(80% 饱和度),通过 12000r/min 离心 30min 收集沉淀,用 1mL 20mmol/L pH 8.5,Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀,上用相同缓冲液平衡好的 Bio-gel P30 柱(1cm × 50cm),收集有酶活性的洗出液,合并洗出液,然后上用 20mmol/L pH 8.5,Tris-HCl 预先平衡好的 5mL CM-Sephadex Fast Flow 柱(Amersham Biosciences),用 0 to 1mmol/L NaCl 梯度洗脱。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和酶谱分析参照傅国平等的方法完成<sup>[9]</sup>。

### 1.5 MPH 活性测定

测活反应体系为 5mL 40mmol/L 巴比妥钠缓冲液(pH 8.8)其中含有 719 $\mu$ mol/L 甲基对硫磷。加入待测酶液后,在 25℃ 反应 5min,通过测定对硝基苯酚( $\epsilon_{410} = 16500\text{L}(\text{mol} \cdot \text{cm})$ )的生成量来计算酶活。一个酶活单位定义为每分钟生成 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚的酶量。

### 1.6 金属螯合剂对酶活性的抑制

先用 50mmol/L 的 HEPES 缓冲液(pH 8.5)透析 24h 并换透析缓冲液多次以去除纯化的 MPH 中的 ZnCl<sub>2</sub>。透析过后的 MPH 分别与 10mmol/L 的 1, 10-菲啰啉在 25℃,50mmol/L 的 HEPES 缓冲液(pH 8.5)中温浴 4h,分别于不同的时间取出部分酶液用于测 MPH 的活力,以加水的为对照。金属螯合剂对 MPH 活性抑制的二级速度常数( $k''$ )用公式  $\ln(V_t/V_0) = -k''Yt$  计算,其中  $V_t/V_0$  指在  $t$  时刻残余酶活力与初始酶活力的比值, $Y$  指金属螯合剂的浓度。

### 1.7 MPH 中金属含量的测定

玻璃器皿,试管和枪头根据 Omburo 等<sup>[11]</sup>的方法处理,以防止金属离子污染。首先用无金属离子的 20mmol/L pH 8.5,Tris-HCl 缓冲液对纯化的 MPH 透析以去除 MPH 溶液中含有的 ZnCl<sub>2</sub>。以含 2mmol/L 1, 10-菲啰啉的 20mmol/L pH 8.5,Tris-HCl 缓冲液对 MPH 溶液透析,透析 24h 并换透析液多次,然后再用 20mmol/L pH 8.5,Tris-HCl 缓冲液透析去除 1, 10-菲啰啉。以不加 1, 10-菲啰啉的透析液为对照,用电感耦合等离子发射光谱法(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES)测定 MPH 中金属含量(表 2),仪器型号为 Thermo Elemental 公司的 ICP-AES IRIS Advantage。样品预处理方法参照 HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub> 消解法<sup>[12]</sup>。

### 1.8 MPH 的化学修饰

根据 Dumas 等<sup>[13]</sup>的方法用过量的化学修饰剂对纯化的 MPH 中的天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸进行了化学修饰。MPH 与修饰剂在 25℃ 下反应,分别于不同的时间取出部分反应液测酶的活性,以相同的步骤加水为对照,并以该对照测得的酶活性为 100%。修饰剂对酶活的抑制率

( $k_{obs}$ )通过公式  $\ln(V_t/V_0) = -k_{obs}t$  计算得到,其中  $V_t/V_0$  指在  $t$  时刻残余酶活力与初始酶活力的比值。

2 结果

2.1 MPH 的纯化

纯化结果见表 1。纯化后的酶蛋白经 SDS-PAGE 分析在

大约 35kD 处出现单一条带(图 1,泳道 4),与 MPH 的理论分子量 33kD 基本一致。酶谱分析表明该条带中的蛋白能够利用甲基对硫磷为底物产生相应的黄色水解带(图 1,泳道 7)。这说明通过本纯化程序既可以获得电泳纯的 MPH。

2.2 金属离子螯合剂 1, 10-菲 啉对酶活性的抑制

为研究 MPH 中是否含有金属离子,用金属离子螯合剂

表 1 MPH 的纯化

Table 1 Purification of MPH

Step	Protein /mg	Total activity /u	Special activity ( u/mg )	Fold purification	Yield/%
Sonicate	270	650	2.4	1.0	100
DEAE-Sephadex	13.1	307	23.4	9.8	47.2
Bio-Gel P30	7.2	215	29.9	12.5	33.1
CM-Sepharose	0.2	86	430	179	13.2

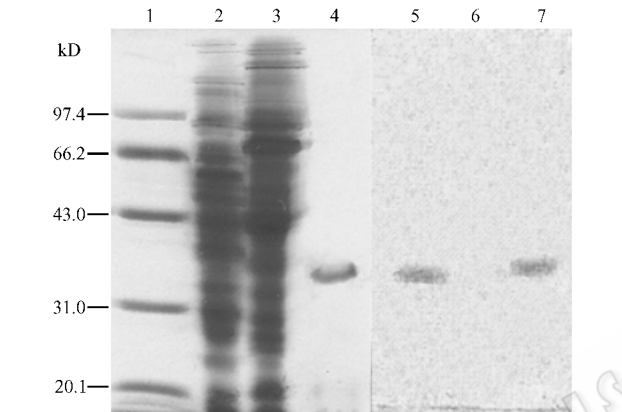


图 1 MPH 的 SDS-PAGE 和酶谱分析

Fig. 1 SDS-PAGE and zymogram analysis of MPH

The supernatant of the M6 cell fraction and purified MPH were analyzed on a 12% SDS-polyacrylamide gel. The partial gel containing lanes 5~7 was excised for the zymogram analysis and the remaining gel was stained with Coomassie bright blue R250. Lane 1, molecular mass markers; lanes 2 and 5, M6; lanes 3 and 6, *E. coli* (pUC19) [this served as the negative control]; lanes 4 and 7, MPH produced in *E. coli*.

1, 10-菲啉处理 MPH,同时选用 OPH 酶作为对照处理(图 2)。观察螯合剂对酶活性的影响。结果显示螯合剂对 MPH 酶的活性基本无抑制作用(图 2A)。处理 40min 后活性仍保留 85% 以上。10mmol/L, 10-菲啉在 25℃, 50mmol/L HEPES pH 8.5 缓冲液中对 8μmol/L MPH 酶活性的抑制速率  $k''$  仅为 0.005L/(mol·s)。而相同条件下 OPH 酶的活性经过 5min 处理即基本丧失(图 2B)。

2.3 MPH 中金属含量的测定

MPH 及经 2mmol/L, 10-菲啉处理后的金属含量和酶活力分析见表 2。通过 ICP-AES 测定发现 1mol 未经络合剂处理的 MPH 中结合了 2.1mol 的  $Zn^{2+}$ ,而经络合剂处理的酶中含 2.3mol  $Zn^{2+}$ ,表明 1 个 MPH 酶分子中含有两个  $Zn$  离子。此结果与 OPH 类似,但显然二种金属离子对络合剂的反应不同,MPH 中的  $Zn^{2+}$  不能被络合剂去除。

2.4 MPH 的化学修饰

化学试剂对 MPH 的抑制作用见表 3。EDC,丁二酮和磷酸吡哆醛对 MPH 的活性没有抑制作用。而 MPH 的活性可以

被 12mmol/L DEPC 很快抑制,但 1mmol/L 中和的羟胺能够迅速恢复 MPH 的活力至 60% 左右(图 3)。当 10.4μmol/L MPH 用 12mmol/L DEPC 处理 30min 后(小于 20% 残余酶活性),该酶溶液在 245nm 处的吸光值由未处理前的 0.158 升高到处理后的 0.484,表明组氨酸残基被 DEPC 修饰<sup>[14]</sup>。

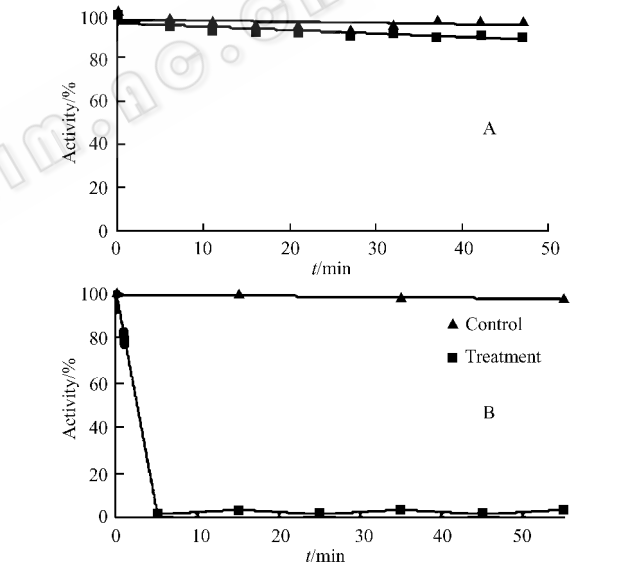


图 2 1, 10-菲啉对 MPH 和 OPH 的抑制试验

Fig. 2 The inactivation tests of MPH and OPH with

1, 10-phenanthroline

A: the inactivation of MPH by 10mmol/L, 1, 10-phenanthroline. Result showed that 1, 10-phenanthroline nearly has no inhibition effect on MPH in 50min. B: the inactivation of OPH by 10mmol/L, 1, 10-phenanthroline. Result showed that 1, 10-phenanthroline nearly completely inhibited the activity of MPH in 50min. In figure A and B, both control samples to which only water was added showed little enzymatic change.

表 2 MPH 中的金属含量分析

Table 2 Metal analysis of MPH

Treated with Metal chelator	Sp act ( u/mg )	Zn( II ) /μmol	Ni( II ) /μmol	Cd( II ) /μmol	Enzyme /μmol
None	120	0.27	0.03	0	0.129
1, 10-phenanthroline	123	0.31	0.05	0	0.135

表 3 MPH 的化学修饰

Table 3 Effect of chemical modification reagents on MPH

Targeted residues	Reagent	Conditions	Inactivation rate/h <sup>-1</sup>
Aspartate or glutamate	6mmol/L EDC	pH 9.0 <sup>a</sup>	< 0.09
Arginine	100mmol/L butanedione	pH 9.0 <sup>b</sup>	< 0.02
Lysine	100mmol/L pyridoxal	pH 9.0 <sup>a</sup>	< 0.02
Histidine	12mmol/L DEPC	pH 7.0 <sup>c</sup>	9.6

<sup>a</sup> 20mmol/L TAPS buffer. <sup>b</sup> 100mmol/L borate buffer. <sup>c</sup> 20mmol/L MOPS buffer.

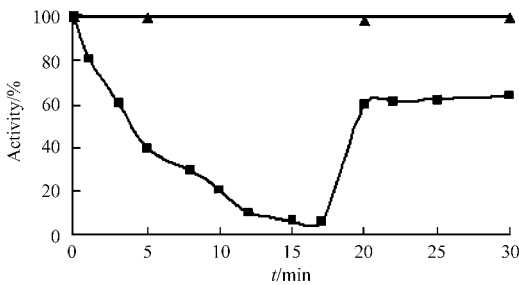


图 3 DEPC 对 MPH 的抑制

Fig. 3 Inactivation of MPH with DEPC

The inactivation of MPH with 12mmol/L DEPC ( square ) was reversed immediately after addition of 1mmol/L neutralized hydroxylamine. A second MPH sample to which only water was added( triangle ) showed little enzymatic activity change.

3 讨论

有机磷水解酶( OPH )在有机磷类毒剂的解毒中具有重要的作用 ,从 1980 年代起就以乙基对硫磷为靶标进行了有机磷水解酶的微生物降解研究 ,并获得了多种降解性微生物和相关的 水解酶基因<sup>[1-5,15]</sup> ,目前为止研究最多的是来源于 *Flavobacterium* sp. ATCC27551 的 OPH<sub>1</sub>。我们在研究甲基对硫磷降解的过程中克隆到了甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*<sup>[5]</sup>。甲基对硫磷和乙基对硫磷在化学结构相似 ,但令人惊奇的是甲基对硫磷水解酶( MPH )和有机磷水解酶( OPH )在核酸和蛋白水平上的同源性都很低 ,分别仅有 41% 和 19%。OPH 是一个含有 Zn 离子的同源二聚体金属酶 ,酶与 Zn 的摩尔比为 1:2<sup>[16]</sup>。来源与 *Plesiomonas* sp.和 *Pseudomonas* sp. WBC-3 的 MPH 具有很高的核酸和蛋白水平的同源性 ,我们及 Surf<sup>[22]</sup>等的研究显示与 OPH 一样 ,MPH 也是含 Zn 的金属酶而且 1mol MPH 中结合了 2mol 的 Zn<sup>2+</sup>。Zn 在 OPH 的催化反应过程中具有重要的作用 ,2mmol/L 1, 10-菲啰啉对 OPH 的抑制速率可达到 5.31L ( mol·s )<sup>[17]</sup> ,并且 OPH 中结合的金属离子随着酶活的下降迅速减少<sup>[18]</sup>。然而在 MPH 中 Zn<sup>2+</sup> 对 1, 10-菲啰啉的反应性是不同的 ,螯合剂在实验条件下无法除去酶中的金属离子 ,表明二者金属离子的结合方式可能是不同的 ,但 Zn 是否参与了催化过程还有待进一步研究。

某些化学试剂可以特异性地修饰酶分子中的特定基团 ,利用这种性质可以研究参与酶催化活性的氨基酸残基。水溶性的碳化二亚胺( EDC )可以专一性的对蛋白质中的自由羧基进行修饰 ,丁二酮可以与精氨酸的胍基进行反应 ,从而修饰精氨酸 ,磷酸吡哆醛则可以专一性的修饰赖氨酸 ,反应生成的席夫碱可通过硼氢化钠还原固定而测定 ,而 DEPC 是

一种专一的组氨酸修饰试剂 ,可以使咪唑环上的一个氮羧乙基化 ,在碱性条件下又可脱去修饰基团恢复活性。本研究根据这些反应特性 ,利用化学修饰法对 MPH 的催化机理作了初步的研究。化学修饰剂中只有 DEPC 对 MPH 活性有明显的抑制作用( 表 3 ) ,表明 Asp ,Arg ,Lys 不参与催化反应。DEPC 除可修饰组氨酸外 ,同样能够修饰赖氨酸和酪氨酸 ,但 DEPC 对赖氨酸的修饰是不能被羟胺恢复<sup>[19]</sup> ,而若酪氨酸被修饰则该蛋白溶液在 275-280nm 的吸光值将降低<sup>[20]</sup> ,实验结果表明该蛋白溶液经 DEPC 处理后 ,在 276nm 处的吸光值由对照的 0.155 上升到 0.254。所以 DEPC 对 MPH 活性的抑制作用 ,是因为 DEPC 对组氨酸的修饰 ,表明组氨酸是酶活性必需的氨基酸 ,这个结果与 OPH 酶类似<sup>[13]</sup> ,MPH 中有 8 个组氨酸 ,具体是那几个组氨酸还需要通过定点突变来进行确定。

OPH 通过分子进化获得了能够水解沙林等神经毒剂的变体<sup>[21]</sup> ,在国防中具有潜在的重大应用价值。本研究为 MPH 的分子改造扩展其底物范围提供了重要的基础数据。

REFERENCES( 参考文献 )

[ 1 ] Mulbry WW , Karns JS , Kearney PC *et al.* Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl Environ Microbiol* ,1986 ,**51**( 5 ) : 926 – 930

[ 2 ] Mulbry WW , Karns JS. Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. *Appl Environ Microbiol* ,1989 ,**55**( 2 ) : 289 – 293

[ 3 ] Chaudhry GR , Ali AN , Wheeler WB. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* ,1988 ,**54**( 2 ) : 288 – 293

[ 4 ] Yang H , Carr PD , McLoughlin SY *et al.* Evolution of an organophosphate-degrading enzyme : a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng* ,2003 ,**16**( 2 ) : 135 – 145

[ 5 ] Zhongli C , Shunpeng L , Guoping F. Isolation of methyl prarhion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol* ,2001 ,**67**( 10 ) : 4922 – 4925

[ 6 ] Omburo GM , Mullins LS , Raushel FM. Structural characterization of the divalent cation sites of Bacterial phosphotriesterase by <sup>113</sup> Cd NMR spectroscopy. *Biochemistry* ,1993 ,**32**( 35 ) : 9148 – 9155

[ 7 ] Kuo JM , Raushel FM. Identification of the histidine ligands to the binuclear metal center of phosphotriesterase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* ,1994 ,**33**( 4 ) : 4265 – 4272

[ 8 ] Richard DR , Irina K , Ashok M *et al.* Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnology* ,1997 ,**15**( 10 ) : 984 – 987

- [ 9 ] Fu G , Cui Z , Huang T *et al.* Expression , purification , and characterization of a novel methyl parathion hydrolase. *Protein Expres Purif* 2004 , **36** ( 2 ) :170 – 176
- [ 10 ] Cui ZL , Zhang XZ , Zhang ZH *et al.* Construction and application of a promoter-trapping vector with methyl parathion hydrolase gene *mpd* as the reporter. *Biotechnol Lett* 2004 , **26** ( 14 ) :1115 – 1118
- [ 11 ] George AO , Jane MK , Leisha SM *et al.* Characterization of the zinc binding site of Bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem* ,1992 , **267** ( 19 ) :13278 – 13283
- [ 12 ] Wang YN( 王永宁 ) , Shi YP( 石玉平 ) , Li JD( 李继东 ) . Determination of Pb and Cd in spirulina by ICP-MS. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* ( 分析实验室 ) 2004 , **23** ( 5 ) :68 – 70
- [ 13 ] Dumas DP , Raushel FM. Chemical and kinetic evidence for an essential histidine in the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* . *J Biol Chem* ,1990 , **265** ( 35 ) :21498 – 21503
- [ 14 ] Miles EW. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol* ,1977 , **47** :431 – 442
- [ 15 ] Sun L , Dong Y , Zhou Y *et al.* Crystallization and preliminary X-ray studies of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004 , **60** ( Pt 5 ) :954 – 956
- [ 16 ] Benning MM , Kuo JM , Raushel FM *et al.* Three-Dimensional Structure of the Binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* ,1995 , **34** ( 25 ) :7973 – 7978
- [ 17 ] Dumas DP , Caldwell SR , Wild JR *et al.* Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* . *J Biol Chem* ,1989 , **264** ( 33 ) :19659 – 19665
- [ 18 ] Lai K , Dave KI , Wild JR *et al.* Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. *J Biol Chem* ,1994 , **269** ( 24 ) :16579 – 16584
- [ 19 ] Melchior WB , Fahrney D. Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with alpha-chymotrypsin , pepsin , and pancreatic ribonuclease at pH 4. *Biochemistry* ,1970 , **9** ( 2 ) :251 – 258
- [ 20 ] Burstein Y , Walsh KA , Neurath H. Evidence of an essential histidine residue in thermolysin. *Biochemistry* ,1974 , **13** ( 1 ) :205 – 210
- [ 21 ] Li WS , Lum KT , Chen-Goodspee M *et al.* Stereoselective detoxification of chiral sarin and Soman analogues by phosphotriesterase. *Bioorg Med Chem* 2001 , **9** ( 8 ) :2083 – 2091
- [ 22 ] Sun L , Dong YJ , Zhou YF *et al.* Crystallization and preliminary X-ray studies of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3. *Acta Crystallographica Section D-Biological crystallography* , 2004 , **60** :954 – 956