研究论文

东亚飞蝗羧酸酯酶基因的克隆和原核表达*

李 清 张学尧 张建珍 马恩波**
(山西大学应用生物学研究所 太原 030006)

摘 要 羧酸酯酶是昆虫体内重要的代谢解毒酶系,其主要功能是水解和结合内源性和外源性含有酯键的有毒物质,减缓其到达靶标部位的时间。东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen)是我国重要的农业害虫,对其羧酸酯酶基因克隆和表达有助于深入探索杀虫剂代谢毒理机制。本研究首先对羧酸酯酶基因(*CarE4*)进行了克隆,并将其插入到 pCold TF DNA Vector 中,在大肠杆菌中进行了原核表达,最后用疏水层析和离子交换层析方法对目的蛋白进行了纯化。本文成功建立了羧酸酯酶蛋白原核表达和纯化技术体系,为进一步研究东亚飞蝗羧酸酯酶的生理功能、结构特点和作用原理提供了基础资料。

关键词 羧酸酯酶, 东亚飞蝗, 克隆, 离子交换层析, 疏水层析

Cloning and prokaryotical expression of CarE gene in *Locusta migratoria manilensis*

LI Qing ZHANG Xue-Yao ZHANG Jian-Zhen MA En-Bo**
(Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acridoidea), is one of the most important pests in China. Carboxylesterase is an important metabolic detoxification enzyme in insects the main function of which is the hydrolysis of endogenous and exogenous toxic substances containing ester bonds. In this study, the carboxylesterase gene (*CarE4*) was cloned and inserted into the pCold TF DNA vector. A recombinant carboxylesterase was successfully expressed in *E. coli* and the recombinant protein purified by hydrophobic chromatography and ion exchange chromatography. The results provide a basis for further study of the physiological function, structural characteristics and function of locust carboxylesterases.

Key words carboxylesterase, *Locusta migratoria manilensis*, cloning, IEC, HIC

东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen)隶属于直翅目,蝗总科,斑翅蝗科,飞蝗属。世界范围主要分布于中国、日本、菲律宾、印度尼西亚、泰国、越南、缅甸、柬埔寨等东南亚地区,是一种重要的洲际性农业害虫。在我国主要分布在42°以南,北自河北,南到海南,西起陕西,东到渤海湾和辽宁的葫芦岛(张龙,2011)。近年来,受异常气候和农业生态环境变化的影响,东亚飞蝗发生严重,对农业生产造成威胁,因此,对蝗灾的有效控制一直是农业植保部门寻求的目标(朱恩林,1999)。

羧酸酯酶是昆虫体内三大解毒酶系之一,在有机磷杀虫剂代谢解毒中起着重要作用。羧酸酯酶能够与进入昆虫体内的有机磷杀虫剂快速结合,将杀虫剂在到达靶标作用位点之前阻隔或降解,使其无法发挥原有的杀伤效用,保护昆虫免受杀虫剂的毒害(Karunaratne *et al.*, 1993; Gopalab *et al.*, 1997),因此,昆虫羧酸酯酶在杀虫剂抗药性

*资助项目:国家自然科学基金重大国际合作与交流项目(30810103907)、国家自然科学基金面上项目(30870302,31101463)、高等学校博士学科点专项科研基金(20111401120009)、国家公益性行业科技项目(200903021)。

**通讯作者,E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

收稿日期:2011-11-09,接受日期:2011-12-04

中的作用机制受到人们的关注。已有学者对昆虫羧酸酯酶与抗药性的关系进行了研究,发现一些昆虫如桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)、库蚊 *Culex quinquefasciatus* Say 以及褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)等对有机磷杀虫剂产生抗性是由于羧酸酯酶基因的过量表达导致其活性增加(Mouches *et al.*, 1990; Vaughan and Hemingway, 1995; Devonshire, 1977; Vaughan *et al.*, 1997; Karunaratne *et al.*, 1999)。Ma 等(2004)发现东亚飞蝗对有机磷农药产生抗性,杨美玲(2008)通过生物测定和生化实验证实了东亚飞蝗黄骅田间种群对马拉硫磷的抗药性与酯酶活性增加相关。Cui 等(2011)报道少数来自于斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)、家蚕 *Bombyx mori* Linaeus、棉蚜 *Aphis gossypii* Glover、褐飞虱、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst、异色瓢虫 *Leis axyridis* (Pallas)和西方蜜蜂 *Apis mellifera* Linaeus 的羧酸酯酶基因可以在大肠杆菌中可溶性或部分可溶性表达。东亚飞蝗作为重要的农业害虫,其羧酸酯酶基因原核表达工作还未见报道。

本研究通过对表达载体和蛋白纯化条件的探索,利用 pCold TF DNA Vector 对东亚飞蝗羧酸酯酶基因成功地进行了可溶性表达,并通过离子交换层析和疏水层析相结合的方法成功地纯化了羧酸酯酶蛋白。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

供试昆虫:东亚飞蝗蝗卵购自河北沧州蝗虫饲养公司,实验室饲养 1 代,选取活力旺盛的 5 龄若虫,解剖其中肠(含胃盲囊)用作实验材料。

试剂:2 × Taq PCR MasterMix (TIANGEN 公司); Gel Extraction Kit (OMEGA 公司); Plasmid Miniprep Kit (BIOMIGA 公司); *Sac* Ⅰ-HF 和 *Hind* Ⅲ (NEB 公司); T4DNA 连接酶(Promega 公司); DH5α 感受态细胞和 BL21 (DE3) 感受态细胞(TransGen 公司);疏水层析柱材料和离子交换层析柱材料(GE 公司)。

1.2　引物

本研究所用引物采用 Primer Express 5. 0 软件设计,由上海英骏公司合成,具体见表 1。

表 1　东亚飞蝗羧酸酯酶基因的全长引物和表达引物

Table 1　Primers used for PCR amplification

引物名称 Primers	引物序列(5′-3′)Sequence(5′-3′)
CarE4 Full FW	GGATAACAATCGTAAGAAGTAGCAC
CarE4 Full RV	GCAGAATAAATTAAATGTATGACT
CarE4 Sac Ⅰ FW	AAGGAGCTCATGTCCTCCACTGGAACCGTT
CarE4 Hind Ⅲ RV	GAGAAGCTTGCAGAATAAATTAAATGTATGACTA

1.3　羧酸酯酶基因的克隆

取液氮中冻存的东亚飞蝗中肠为材料,采用 Trizol 法提取总 RNA,磁珠法纯化后以 mRNA 为模板,在逆转录酶的催化下,随机引物、oligo(dT)或基因特异性引物的引导下合成互补的 cDNA。利用生物信息学方法,在东亚飞蝗表达序列标签(ESTs)数据库中搜索羧酸酯酶基因的保守区,经序列拼接整理后得到 *CarE4* 全长序列。据此设计上下游引物,以东亚飞蝗 cDNA 文库为模板,经 PCR 得到东亚飞蝗 *CarE4* 全长序列。

1.4　羧酸酯酶基因的原核表达

1.4.1　重组质粒 pCold TF -*CarE4* 的构建　以 *CarE4* 全长序列为模板,用表达引物(*CarE4 Sac* Ⅰ FW 和 *CarE4 Hind* Ⅲ RV)进行 PCR 扩增,切胶回收。回收产物与 pCold TF DNA 载体分别用 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切进行连接。连接产物转化至感受态细胞 DH5a 中,采用菌落 PCR 方法筛选与目的片段一致的菌落,对其进行培养后进行序列测定(北京奥科生物公司),将序列无误的菌落经 LB 液体培养后提取质粒,转化至表达感受态 BL21 (DE3)中。

1.4.2　细菌培养　挑取 pCold TF -*CarE4* 表达载体单克隆菌株 BL21(DE3)接种于 0.02 L 含氨苄西林(0.1 kg/L)的 LB 培养基中,于 37 ℃ 150 r/min 条件震荡培养过夜。

1.4.3 最佳诱导时间实验 取过夜培养的 pCold TF -*CarE4* 的转化菌液 BL21(DE3)接种于 0.05 L(含 0.1 kg /L 氨苄霉素)的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 摇床振荡培养。当 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时,加 IPTG 至 0.001 mol/L 诱导表达。无 IPTG 的菌液作为对照,15 ℃培养,培养时间分别为 0 、5 、10 、15 、20 和 24 h,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.4.4 最佳诱导剂浓度实验 细菌培养方法同上,当 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时加入诱导剂 IPTG,浓度分别为 0、0.0005、0.0008 和 0.001 mol/L,15 ℃震荡培养 24 h。离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 目的蛋白纯化

1.5.1 菌体扩大培养 取过夜培养的 pCold TF-*CarE4* 转化菌液接种于 10 个 0.5 L 锥形瓶中,每个锥形瓶装有 0.1 L 的 LB 培养基,OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.001 mol/L,15 ℃震荡培养 24 h。

1.5.2 菌体预处理 收集菌体,8 000 r/min 4℃离心 10 min,倒去上清,用离子交换层析过程中的 Binding buffer(0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.5)重新悬浮菌体,用超声波细胞破碎仪破碎菌体,14 000 r/min 4℃离心 30 min, 取上清。

1.5.3 离子交换层析 用 Binding buffer(0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.5)平衡离子交换柱,菌体上清过柱,用含不同 NaCl 浓度梯度的 Binding buffer 逐级洗脱,收集各浓度梯度组分,进行 SDS-PAGE 检测。

1.5.4 疏水层析 用 Binding buffer(3.0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$,0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.5)平衡疏水柱,调节 0.05 mol/L NaCl 洗脱组分的硫酸铵浓度至 3.0 mol/L 后上柱,然后用含不同 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度梯度的 Wash buffer 洗脱,收集各浓度梯度组分,进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 羧酸酯酶基因的克隆及序列分析

用所设计的全长引物,以东亚飞蝗 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳,以 250 bp DNA Ladder 为参照,在 1 500 bp 的位置附近得到一条与预期大小一致的扩增片段,DNA 测序后表明序列正确无误,判断该特异性 DNA 条带即为目标羧酸酯酶基因(图 1)。图 2 为 cDNA 序列和推导的氨基酸序列,其中标方框的为底物结合位点,标圆圈的为催化三联体。

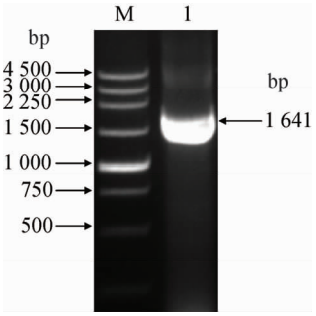


图 1 东亚飞蝗羧酸酯酶基因 *CarE4* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR product of *CarE4* from *Locusta migratoria manilensis*

M:250 bp DNA 分子量标准;1:*CarE4* 的 PCR 扩增产物。

M:250 bp DNA Ladder; 1:PCR product of *CarE4*.

2.2 表达载体的验证

提取 pCold TF -*CarE4* 质粒后进行 PCR 鉴定,PCR 产物大小为 1 641 bp,大小与预期一致,测序结果表明插入序列正确无误(图 3)。

2.3 最佳诱导时间

经过超声波破碎使菌体细胞破碎后,经 SDS-PAGE 电泳。结果显示:在 0、5、10、15、20 和 24 h 诱导表达的菌液上清中,诱导 24 h 时目的条带表达量高,结果如图 4 所示,CarE4 蛋白分子量为 59.3 ku,载体序列编码的蛋白分子量为 47.5 ku,目的蛋白的分子量约为 106.8 ku。

2.4 最佳诱导剂浓度

采用不同浓度的 IPTG(0、0.0005、0.0008 和 0.001 mol/L)15 ℃进行诱导表达,结果如图 5 所示,当 IPTG 浓度为 0.001 mol/L 时,菌液上清中目的蛋白表达量高。

2.5 目的蛋白的纯化

经多次优化表达条件后,用离子交换层析法对目的蛋白进行初步纯化,SDS-PAGE 结果显示,在 0.05 mol/L NaCl 条件下,有大量目的蛋白存在。再用疏水层析法对目的蛋白再次进行纯化,SDS-PAGE 结果显示,在 2.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的条件下,得到纯品目的蛋白,纯化结果如图 6 所

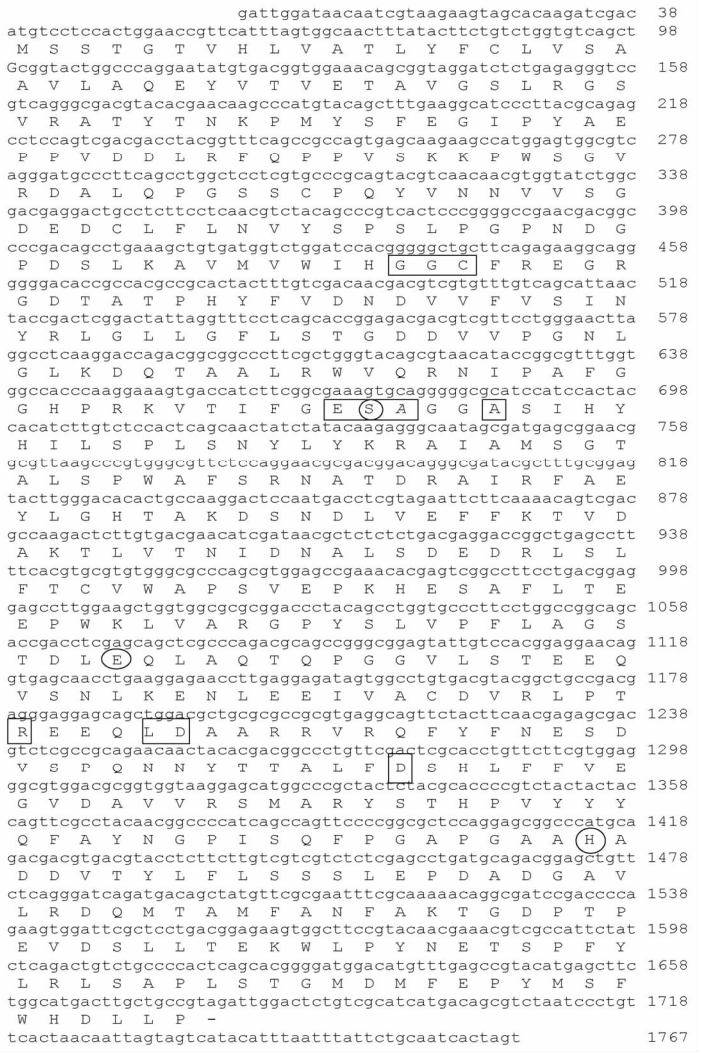


图 2　东亚飞蝗羧酸酯酶基因(*CarE4*)的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2　cDNA sequence and amino acid sequence of *CarE4*

方框标记的是底物结合位点;圆形标记的是催化三联体。

Marked boxes for the substrate binding sites; marked circles for the catalytic triad.

示。

3　讨论

羧酸酯酶是多功能家族酶,普遍存在于动物、植物、昆虫和微生物中,并在异生物质(药物、杀虫剂、致癌物等)的解毒、信息素的降解、神经的发生和调控中扮演着重要角色(Yu *et al.*, 2009)。羧酸酯酶水解包含羧酸酯、酰胺和硫酯等官能团的化学物质,在药物代谢和杀虫剂解毒方面发挥着重要的作用(Yang *et al.*, 2009)。因此,羧酸酯酶基因的原核表达和蛋白纯化对于明确其生物化学特性及其与抗药性的关系具有重要意义。

目前关于羧酸酯酶基因的原核表达工作主要集中于斜纹夜蛾、家蚕、棉蚜、褐飞虱、赤拟谷盗、异色瓢虫和西方蜜蜂等昆虫(Cui *et al.*, 2011),飞蝗作为重要的农业害虫,其羧酸酯酶基因原核表达工作还未见报道。本文在成功克隆东亚飞蝗 *CarE4* 基因的基础上,对该基因进行了原核表达,研究过程中曾尝试 pET28a、pQE30、pMAL-C2X 和 pGEX-6P-1 等载体系统以及 BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS 和 Rosetta-gami B 等表达宿主系统,但均未获得可溶性表达,即形成了包涵体。包涵体是由部分变性的中间体聚合而成,它与待表达基因的来源、重组蛋白的结构、蛋白表达系统的特

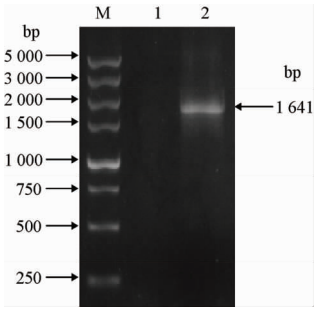


图 3 pCold TF-*CarE4* PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR identification of pCold TF -*CarE4*

M:DL 5000 DNA 分子量标准;1:pCold TF 的 PCR 扩增产物;2:pCold TF -*CarE4* 的 PCR 扩增产物。

M:DL 5000 DNA Ladder; 1:PCR product of pCold TF; 2:PCR product of pCold TF -*CarE4*.

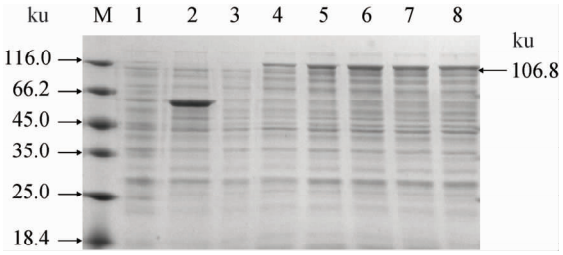


图 4 诱导时间对蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of induction time on the protein expression

M:蛋白质分子量标准;1:pCold TF/BL21(DE3)未经诱导的电泳结果;2:pCold TF/BL21(DE3)加入 0.001 mol/L IPTG 诱导的电泳结果;3~8:pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3)分别经过 0、5、10、15、20 和 24 h 诱导的上清的电泳结果。

M:protein molecular weight; 1:culture of pCold TF/BL21(DE3) without IPTG; 2:culture of pCold TF/BL21(DE3) with 0.001 mol/L IPTG; 3-8: supernatant of pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3) after induced by 0, 5, 10, 15, 20 and 24 h.

点以及表达环境等参数密切相关。任何影响蛋白折叠中间体稳定的因素,如启动子、伴侣蛋白、翻译后修饰、pH 值、离子强度、胞质还原性和温度等都可能影响重组蛋白的可溶性。

为了提高重组蛋白的可溶性,本研究采用新型表达载体 pCold TF DNA Vector,这种载体在 His-tag 序列和多克隆位点之间插入了 Trigger Factor(TF)基因。Trigger Factor 是一种原核的核糖体结合伴侣蛋白,能够促进新生肽链的共翻译折叠。它可与目的蛋白进行融合表达,提高目的

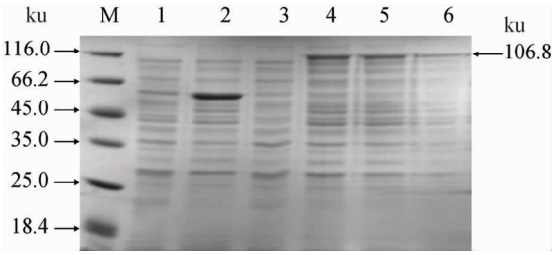


图 5 IPTG 浓度对蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of IPTG concentration on the protein expression

M:蛋白质分子量标准;1:pCold TF/BL21(DE3)未经诱导的电泳结果;2:pCold TF/BL21(DE3)加入 0.001 mol/L IPTG 诱导的电泳结果;3~6:pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3)分别加入 0、0.001、0.0008 和 0.0005 mol/L IPTG 诱导的上清的电泳结果。

M:protein molecular weight; 1:culture of pCold TF/BL21(DE3) without IPTG; 2:culture of pCold TF/BL21(DE3) with 0.0008 mol/L IPTG; 3-6: supernatant of pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3) with 0 mol/L, 0.001, 0.0008 and 0.0005 mol/L IPTG.

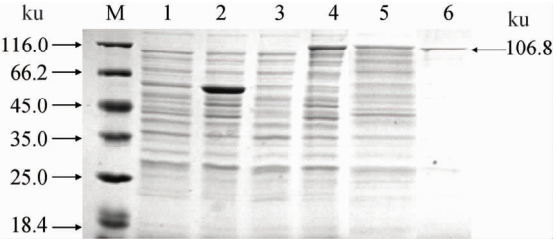


图 6 目的蛋白纯化结果

Fig. 6 The purification result of target protein

M:蛋白质分子量标准;1:pCold TF/BL21(DE3)未经诱导的电泳结果;2:pCold TF/BL21(DE3)加入 0.0008 mol/L IPTG 诱导的电泳结果;3:经过超声波破碎以后全菌的电泳结果;4:pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3)加入 0.001 mol/L IPTG 诱导后的电泳结果;5:经过离子交换层析纯化后的蛋白电泳结果;6:经过疏水层析纯化后的蛋白电泳结果。

M:protein molecular weight; 1:culture of pCold TF/BL21(DE3) without IPTG; 2:culture of pCold TF/BL21(DE3) with 0.0008 mol/L IPTG; 3:the whole-cell after sonication; 4: supernatant of pCold TF-*CarE4*/BL21(DE3) with 0.001 mol/L IPTG; 5: protein after Q-Sepharose Fast Flow; 6:protein after Phenyl-Sepharose Fast Flow.

蛋白的可溶性。通过 TF 的可溶性标记功能和分子伴侣作用,可以使一些难以表达的基因获得更高概率的可溶性表达。研究结果表明该表达载体在提高东亚飞蝗 CarE4 蛋白表达量和可溶性方面具有较好的效果。

本研究在对目的基因进行原核表达过程中发现低温培养起着关键性作用,低温能降低蛋白质合成的速率,改变多肽折叠的动力学,从而导致正确折叠的蛋白增加(Donovan *et al.*,1996),这也是 pCold TF DNA Vector 的优点之一。结果表明 *CarE4* 基因的最适诱导温度为 15℃,在此温度下蛋白可以大量可溶性表达。

在可溶性表达的基础上,本研究对重组 CarE4 蛋白进行了一系列纯化工作,先后尝试了 NTA-Ni 亲和层析、Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Phenyl-Sepharose Fast Flow 疏水层析 3 种纯化方法。研究中发现重组 CarE4 蛋白无法与 NTA-Ni 柱材料有效结合,这可能是由于重组 CarE4 蛋白质折叠不正确,将 N 端的 His-tag 包裹在分子内部,His-tag 无法与 Ni 离子结合所致。而利用离子交换层析和疏水层析相结合的方法可得到羧酸酯酶蛋白纯品,并摸索出重组 CarE4 蛋白的最佳纯化条件,即在离子交换层析过程中收集 0.05 mol/L NaCl 浓度下的组分,再经疏水层析,用 2.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 洗脱即可得到纯品目的蛋白。然而纯化得到的重组蛋白没有酶活性,这可能是由于在大肠杆菌表达系统中缺少必要的蛋白修饰系统和适宜的重组蛋白折叠微环境所致。在核糖体结合伴侣蛋白(TF 因子)的协助和冷诱导条件下,虽能获得可溶性重组羧酸酯酶,但重组蛋白还不具有羧酸酯酶的正确结构,因此没有生物学功能。尽管如此,本研究纯化获得大量的可溶性重组羧酸酯酶蛋白,为下一步多克隆抗体制备、Western blot 和免疫组化工作奠定了基础。

综上所述,本研究通过新型表达载体 pCold TF DNA Vector 成功地对东亚飞蝗羧酸酯酶基因(*CarE4*)进行了原核表达,继而先后采用离子交换层析和疏水层析的方法对目的蛋白进行了成功纯化,为进一步研究东亚飞蝗羧酸酯酶的生理功能、组织分布、结构特点、作用原理以及分子生物学相关资料提供了基础资料。

参考文献(References)

Devonshire AL, 1977. The properties of a carboxylesterase from the peachpotatoaphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.*, 167(3):675—683.

Donovan RS, Robinson CW, Glick BR, 1996. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign protein under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.*,16(3):145—154.

Cui F, Lin Z, Wang HS, Liu SL, Chang HJ, Reeck G, Qiao CL, Raymond M, Kang L, 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, (41)1:1—8.

Gopalan N, Bhattacharya BK, Prakash Shri, Rao KM 1997. Characterization of carboxylesterases from malathion—resistant *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) mosquitos. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 108(2):99—108.

Karunaratne SH, Jayawardena KG, Hemingway J, Ketterman AJ, 1993. The function of esterase in insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Sri Lanka. *Biochem. Soc. Trans.*, 21(4):482S.

Karunaratne SHPP, Small GJ, Hemingway J, 1999. Characterization of the elevated esterase-associated insecticide resistance mechanism in *Nilaparvata lugens* and other planthopper species. *Int. J. Pest Manage.*, 45(3): 225—230.

Ma EB, He YP, Zhu KY, 2004. Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 78:67—77.

Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, Beyssat-Amaouty V, Hyrien O, de Saint Vincent BR, Georghiouii GP, Pasteur N, 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *PANS*, 87(7):2574—2578.

Yu QY, Lu C, Li WL, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10:553.

Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J, 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.*, 325(Pt2):359—365.

Vaughan A, Hemingway J, 1995. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1)(A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene

worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Biol. Chem.*, 270(28):17044—17049.

Yang DF, Pearce RE, Wang XL, Gaedigk R, Wan YJY, Yan BF, 2009. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochem. Pharmacol.*, 77(2):238—247.

杨美玲,2008. 东亚飞蝗对有机磷杀虫剂的抗性及其机理研究. 博士学位论文. 太原:山西大学.

张龙,2011. 国内外蝗害治理技术现状与展望. 应用昆虫学报,48(4):804—810.

朱恩林,1999. 中国东亚飞蝗发生与治理. 北京:中国农业出版社. 3—558.