

东亚飞蝗细胞色素 P450 基因的克隆及表达分析^{*}

陈义昆¹ 邬玉兰² 李 荔¹ 连国云² 刘志刚^{1,2**}

(1. 深圳大学生命科学学院 深圳 518060; 2. 深圳大学医学院 深圳 518060)

摘 要 本文克隆了东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 细胞色素 P450 (cytochrome P450) 基因全长, 表达重组蛋白, 并对其可溶性进行了分析。通过提取东亚飞蝗总的 RNA, 反转录成 cDNA, 设计特异性引物, PCR 克隆东亚飞蝗细胞色素 P450 基因, 将测序正确的目的片段克隆至原核表达载体 pET-28a 中, 在大肠埃希菌 *Escherichia coli* Rosetta 中用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测重组蛋白表达结果。结果表明: 东亚飞蝗细胞色素 P450 基因开放阅读框全长为 1 551 bp, 编码 516 个氨基酸, 与 GenBank 中已登录的东亚飞蝗细胞色素 P450 基因 (HM153426) 的同源性为 99%, 重组质粒 pET-28a-P450 在 *E. coli* Rosetta 中获得高效表达, 重组蛋白相对分子质量 (Mr) 约为 53 000, 主要以包涵体的形式存在。

关键词 东亚飞蝗, 细胞色素 P450, 基因克隆, 表达

Cloning, expression of cytochrome P450 from *Locusta migratoria manilensis*

CHEN Yi-Kun¹ WU Yu-Lan² LI-Li¹ LIAN Guo-Yun² LIU Zhi-Gang^{1,2**}

(1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2 School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract To clone the gene of cytochrome P450 (CYP450) from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), produce its recombinant protein. The cDNA of CYP450 was cloned using specific primers from the total RNA of *L. m. manilensis*. The cloned gene was inserted into pMD18-T vector and digested by *Bam*H I and *Hind* III. The cDNA was sequenced and subcloned into pET-28a expression vector. The cloned CYP450 cDNA gene was expressed in *Escherichia coli* Rosetta by IPTG induction. Result showed that the cloned cDNA ORF sequence contained 1 551 bp and encoded 516 amino acids. Its sequence homology with the published one (Accession no. HM153426) was 99% at nucleotide level. The CYP450 was highly expressed in *E. coli* Rosetta as a unsoluble protein mainly with the molecular weight of about Mr 53 000 under induction of IPTG.

Key words *Locusta migratoria manilensis*, cytochrome P450, gene clone, expression

东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 别名蚂蚱、蝗虫, 属直翅目 (Orthoptera)、蝗科 (Acrididae), 迁飞性杂食性害虫。该虫主要危害水稻、麦类、玉米、高粱、粟、稷、芦苇、红草等禾本科植物, 也可危害棉花、大豆、蔬菜等农作物 (占昌涛, 2009)。近十几年来, 我国通过喷洒有机磷等农药杀虫剂来防治蝗虫, 但有机磷农药的滥用导致了抗药性等一系列问题的发生 (Yang

et al., 2009), 所以研究新的防治蝗虫的方法迫在眉睫。

细胞色素酶含有一种特殊的血红蛋白, 在还原状态下可与 CO 结合在波长 450 nm 处呈现明显的吸收峰, 所有又被称为细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450), P450 作为一类亚铁血红素—硫醇盐蛋白的超家族, 参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代

^{*} 资助项目: 国家 863 计划 (006AA10Z236); 深圳市科技计划项目。

^{**} 通讯作者, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-30, 接受日期: 2012-07-23

谢,是在所有需氧生物体中广泛存在的一类多功能氧化酶(Estabrook,1996;Scott,1999),同时也是一类由超家族基因编码的同工酶,起着与底物结合以及末端氧化酶的作用(Nelson *et al.*,1993;Wen *et al.*,2003)。在细胞中,其主要分布在线粒体和内质网的内膜上。近年来该酶一直是生物学上研究的热点,因其底物的广泛性和功能的多样性等特点而受到越来越多的重视(冷欣夫和邱星辉,2001)。在昆虫的生长发育、环境适应性及对化学杀虫剂的抗药性中,细胞色素 P450 发挥着不可或缺的作用(Scott,1999)。Ray(1967)首次报道了在昆虫体内存在细胞色素 P450 酶系,随后这类大分子引起了国内外许多研究学者的极大兴趣。在昆虫体内由于细胞色素 P450 种类较多,且含量低和不稳定性,分离出单一型的细胞色素 P450 比较难,若用传统的酶学方法和代谢方法很难对昆虫单一型的细胞色素 P450 特性进行深入细致的研究(郑明奇等,2001)。Feyereisen 等(1989)从家蝇 *Musca domestica* 体内分离出第一个昆虫细胞色素 P450 基因,之后便开始了从分子水平上对昆虫单一型细胞色素 P450 的研究。

本研究通过克隆并表达蝗虫的细胞色素 P450 基因,以期能对蝗虫抗压性以及生产治蝗新药物提供理论上的支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 东亚飞蝗由中国农业科学院植物保护研究所(北京)提供。克隆载体 pMD18-T SimpleVector、表达载体 pET-28a(+)购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),大肠埃希菌(*E. coli*)Top10 和 Rosetta 由呼吸疾病国家重点实验室深圳大学变态反应分室提供。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司,cDNA 合成试剂盒(AMV first strand cDNA synthesis kit)购于美国 Bio Basic Inc.(BBI 公司)。克隆所用的特异性引物由华大基因研究院(深圳)合成。琼脂糖凝胶回收试剂盒[Gel Extraction Kit(50) D2500-01]以及质粒提取试剂盒[Plasmid Mini Kit I(100) D6943-01]均购于美国 OMEGA 公司。*Ex-Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、*T4* DNA 连接酶以及 DL2000DNA Marker 宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 从 GenBank 上下载东亚飞蝗主要过敏原精氨酸激酶的核苷酸序列(基因登录号为 DQ513322)。利用 GeneTool 软件设计并合成特异性引物(由华大基因研究院合成),上游引物为 5'-CGCGGATCCATGGCGGTCGACT3',下游引物为 5'-CCCAAGCTTTTCAGAGGTGGACCAGGG 3',其中分别插入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点以及保护碱基。

1.2.2 东亚飞蝗总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

取一只东亚飞蝗于液氮下充分研磨,取大约 100 mg 左右研磨后的样品于 RNase Free 离心管中,按照 Qiagen 公司试剂盒说明书提取总的 RNA,采用美国 Bio Basic Inc.(BBI 公司)cDNA 合成试剂盒(AMV first strand cDNA synthesis kit),以总的 RNA 为模板反转录合成 cDNA,以合成的 cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应的条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。电泳检测 PCR 产物,并割胶回收。

1.2.3 RT-PCR 产物的克隆和测序 利用 *T4* DNA 连接酶将回收纯化的 RT-PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,将连接产物转入经 CaCl_2 处理的感受态细胞即 *E. coli* Top 10 克隆菌中,通过含氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板进行抗氨苄筛选,挑取阳性菌落(即含重组质粒)进行扩增提取质粒,并对质粒进行双酶切(*Bam*H I 和 *Hind* III)鉴定,对双酶切合理的质粒进行测序(由上海生工完成)。

1.2.4 表达载体的构建以及测序 对测序正确的 pMD18-T 质粒与原核表达载体 pET-28a(+)分别进行 *Eco*R I 和 *Xho*I 双酶切,并将获得的目的基因片段和切开的 pET-28a(+)载体进行胶回收,利用 *T4* DNA 连接酶将回收产物相互连接,构建重组表达载体。将重组质粒转入 *E. coli* Top 10 中,通过含卡纳青霉素(KaNa)的 LB 平板进行抗卡纳筛选,提取阳性质粒,进行双酶切鉴定,并对阳性克隆菌进行测序鉴定。

1.2.5 重组蛋白在 *E. coli* Rosetta 中的表达 将重组表达载体转化到 *E. coli* Rosetta 中,转化成功后挑取抗 KaNa 阳性菌落于 20 mL LB 液体培养基中,37℃、1 800 r/min 过夜培养。次日将上述培养

液倒入 1 L 灭菌的新鲜的 LB 液体培养基中,再加入 1 mL 卡纳青霉素进行二活,培养一段时间后,测菌液的 OD 值,600 nm 波长下菌液 OD 值为 0.6 时,取 1 mL 菌液作为诱导前的对照,然后加入 1 mL IPTG 进行诱导 4 h,诱导后也取 1 mL 菌液作为诱导后的对照,分别将诱导前、诱导后菌液进行离心,弃上清,并分别用 1 mL 去离子水清洗,离心弃上清,再用 80 μ L 纯净水重悬菌体。

将上述诱导后的 1 L 菌液离心,弃上清,沉淀用 1 $\times$ PBS 溶解,溶解后超声破碎,超声 20 min 左右离心,再将沉淀和上清分装。沉淀先用 1 mL 去离子水清洗,离心弃上清,再用 80 μ L 去离子水重悬,然后将诱导前、诱导后、上清和沉淀 80 μ L 分别加入 20 μ L Loading Buffer,再用 SDS-PAGE 检测其表达情况以及表达产物的可溶性。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

经 RT-PCR 扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示,在 1 550 bp 左右有一条亮带,大小与理论值(1 551 bp)相符。

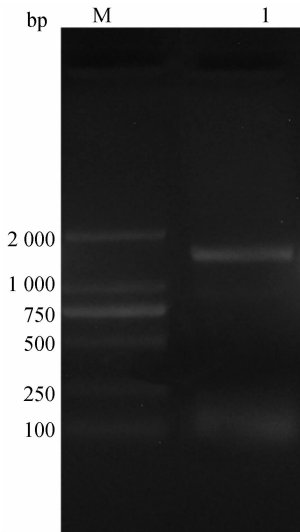


图 1 东亚飞蝗细胞色素 P450 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 RT-PCR products of cytochrome P450 of *Locusta migratoria manilensis*
M. DNA (DL2000) 标志物;1. 目的基因。
M. DNA marker (DL2000) ; 1. target genes.

2.2 克隆载体的构建

重组克隆载体 pMD18-T-CYP450 经 *Bam*H I

和 *Hind* III 双酶切,目的条带与 RT-PCR 结果一致 (图 2),且测序结果与 GenBank 上基因序列一致。

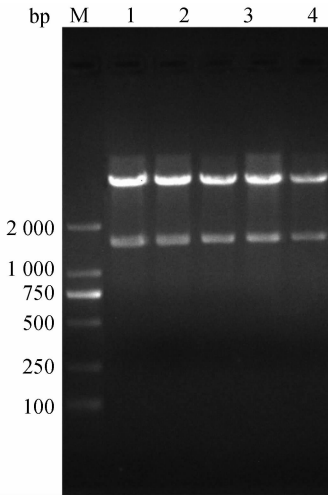


图 2 东亚飞蝗细胞色素 P450 克隆载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定
Fig.2 Restriction analysis for pMD18-T-AK with *Bam*H I and *Hind* III of *Locusta migratoria manilensis*
M. DNA (DL2000) 标志物;1 ~ 5. 克隆载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后。
M. DNA marker (DL2000) ; 1-5. pMD18-T-CYP450/*Bam*H I + *Hind* III.

2.3 序列分析及其同源性分析

克隆得到的东亚飞细胞色素 P450 基因由 1 551 个碱基组成,包含终止密码子。推导其编码 516 个氨基酸 (图 3)。在 GenBank 中的登录号为 HM153426。测序所得序列通过 NCBI 中的 BLAST 进行序列比对,同时推导其相对应的氨基酸序列,将所得的克隆推导出的氨基酸序列与数据库中已知的细胞色素 P450 基因的氨基酸序列进行比对,分析其同源性。结果表明:克隆的东亚飞蝗细胞色素 P450 基因与数据库中已知的东亚飞蝗细胞色素 P450 基因 (HM153426) 的同源性为 99% (图 3)。

2.4 表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组表达载体 pET-28a-CYP450,酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳,电泳结果表明,切出的目的条带大小在 1 550 bp 左右,与理论值 1 551 bp 相符,将阳性菌及其质粒进行测序,结果表明与 GenBank 上基因序列一致 (图 4)。

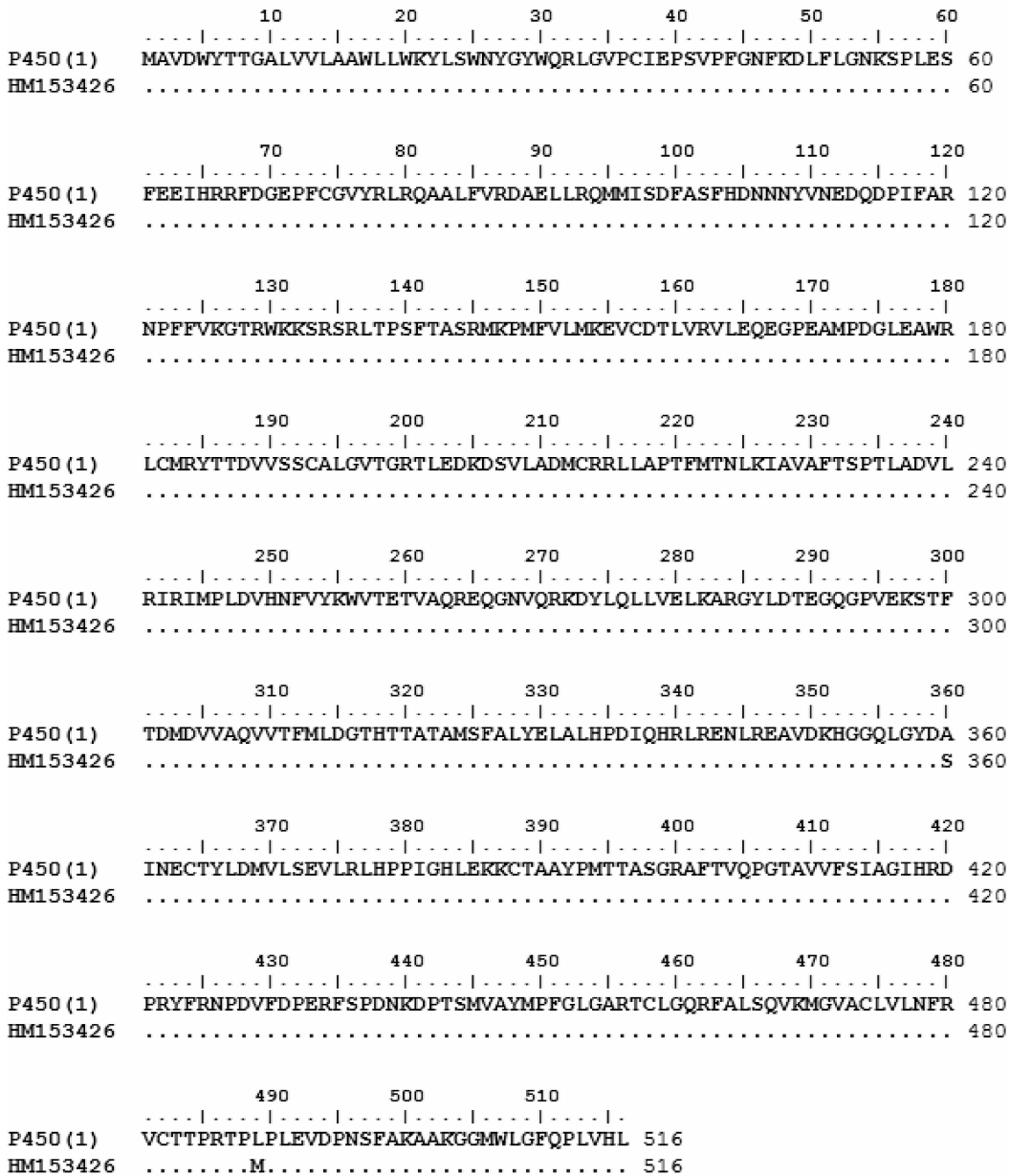


图3 东亚飞蝗细胞色素 P450 同源性分析

Fig.3 Homology analysis of cytochrome P450 of *Locusta migratoria manilensis*

2.5 重组细胞色素 P450 蛋白 (recombinanted cytochrome P450, rCYP450) 的诱导表达

含有重组子的表达菌在终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 后,超声破碎,分别对诱导前、诱导 4 h 后、超声上清、超声沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示:目的蛋白在超声沉淀中表达,以包涵体的形式存在(图 5)。

3 讨论

使用化学杀虫剂来防治害虫的历史可以追溯到古希腊的罗马时代,古希腊人就曾用硫磺作为熏蒸剂来杀虫,古罗马的学者也曾提倡用砷作为杀虫剂,并提到过用橄榄油来处理豆科植物的种子可以防治害虫。化学杀虫剂因其高效速效等优点,且使用方便,经济效益高,可大规模的工业化生产,运输方便,也可长期保存,在防治农林业害

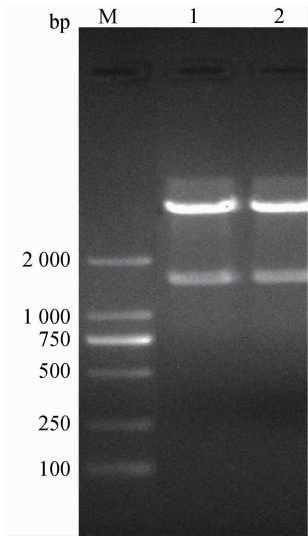


图 4 东亚飞蝗细胞色素 P450 表达载体经 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

Fig. 4 Restriction analysis for pET-28a-CYP450 with *BamH* I and *Hind* III of *Locusta migratoria manilensis*

M. DNA (DL2000) 标志物; 1, 2. 重组表达载体经 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切后。

M. DNA marker (DL2000); 1-2. pET-28a -CYP450/ *BamH* I 和 *Hind* III.

虫以及病媒昆虫上起了功不可没的作用,诚然,使用了半个多世纪的化学杀虫剂在卫生害虫及农林业害虫防治中立下了不可磨灭的功劳,但化学杀虫剂的连续大规模及大范围的使用,也暴露了一些问题,使得害虫对杀虫剂易产生抗药性,同时对害虫的选育也起到了一定的作用,因此引起了人们的广泛关注(苏寿泯和叶炳辉,1996;张昕,2002)。但是由于化学防治应用对象广谱,且能够迅速有效地控制害虫种群,因此目前乃至今后在相当长的时期内仍是病媒昆虫及农林害虫控制的有力杀伤性武器,也是综合治理系统中的主要方法之一(张昕,2002)。尽管人们试图通过制剂加工,改善使用方法以及发展害虫综合治理体系去解决这些问题,但仍然有许多令人不能满意的地方,这就使得人们对害虫抗药性机理的研究以及新型杀虫剂的开发迫在眉睫。

昆虫对于不同化学杀虫剂的抗药性机理不尽相同,其中包括表皮穿透速率降低、虫体对杀虫剂解毒代谢作用增强、对杀虫剂暴露的减少及靶标部位敏感性降低等(翟启慧,1995;杨凡,2008)。

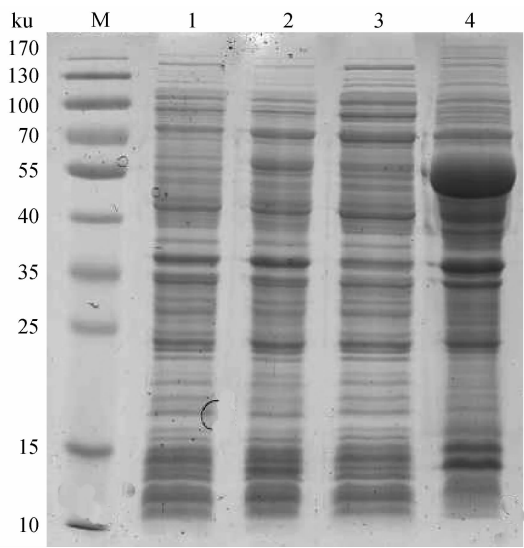


图 5 重组蛋白的诱导表达

Fig. 5 Expression of rCYP450

M. 蛋白标志物; 1. 诱导前; 2. IPTG 诱导后; 3. 上清; 4. 沉淀。

M: protein marker; 1. *E. coli* Rosetta/pET-28a-CYP450 before induction; 2. *E. coli* Rosetta /pET-28a-CYP450 after induction; 3. supernatant; 4. precipitate.

细胞色素 P450 是害虫对杀虫剂解毒作用增强以及害虫产生抗药性的主要原因之一(杨凡,2008), P450 在参与害虫抗药性方面主要表现为其酶活性的增强以及表达量的增加,而这些可在基因转录及翻译水平上得以改善,随着分子生物学技术的日趋成熟,将来势必会对 P450 基因与害虫抗药性关系的机制研究越来越深入,本研究通过克隆并表达了东亚飞蝗细胞色素 P450 基因,期望其能对 P450 参与的抗药性分子机理的研究提供技术及理论上的支持,以及对于日后开发更好的杀虫剂及害虫的治理方便提供理论基础与指导。

参考文献 (References)

Estabrook RW, 1996. The remarkable P450s: A historical overview of the versatile heme protein catalysts. *TASEB J.*, 10:202 - 204.

Feyereisen R, Keener JF, Farnsworth DE, Nebert DW, 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *PNAS*, 86(5):1465 - 1469.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Rrank RF, Gonzalez J, Coon MJ, Gunsalus

- IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW, 1993. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12(1):1–15.
- Ray JW, 1967. The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide. *Biochem. Pharmacol.*, 16(1):99–107.
- Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(9):757–777.
- Wen ZM, Pan LP, Berenbaum MR, Schuler MA, 2003. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(9):937–947.
- Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu XJ, Guo YP, Ma EB, 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71(1):3–15.
- 黄俊勇, 冷欣夫, 1991. 细胞色素 P450 酶系的研究进展. 昆虫知识, 28(5):308–312.
- 冷欣夫, 邱星辉, 2001. 细胞色素 P450 酶系的结构功能与应用前景. 北京: 科学出版社. 1–7.
- 苏寿泚, 叶炳辉, 1996. 现代昆虫学. 第 1 版, 北京: 高等教育出版社. 234.
- 杨帆, 2008. 昆虫细胞色素 P450 与抗药性关系研究进展. 四川动物, 27(3):460–463.
- 翟启慧, 1995. 昆虫分子生物学的一些进展: 杀虫剂抗性的分子基础. 昆虫学报, 38(4):493–501.
- 占昌寿, 2009. 东亚飞蝗综合防治技术及常用防治药剂的比较. 农技服务, 26(5):93–94.
- 张昕, 2002. 昆虫细胞色素 P450 与抗药性关系的分子生物学研究进展. 中国寄生病防治杂志. 15(1):62–64.
- 郑明奇, 邱星辉, 张文吉, 2001. 棉铃虫细胞色素 P450 的分子生物学. 生命的化学, 21(3):229–231.