

飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 基因的原核表达*

高翠娥** 任晓宇 张学尧 张婷婷 张建珍 马恩波 吴海花***

(山西大学应用生物研究所, 太原 030006)

摘要 【目的】细胞色素 P450 是分布极其广泛的超家族酶, 在昆虫内源及外源化合物代谢中发挥着重要的作用。本文分析了飞蝗 *Locusta migratoria* *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 基因在不同组织部位的表达差异, 并对两种蛋白进行原核表达, 为其分子特性和生物学功能的深入研究提供基础资料。【方法】提取飞蝗 5 龄若虫不同组织部位的总 RNA, 体外反转录成 cDNA, 采用 Real-time PCR 和 RT-PCR 技术分析飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在不同组织部位的表达模式, 构建表达载体 pCW/*CYP408B1*、pCW/*CYP409A1* 和 pAC/CPR, 将 pCW/*CYP408B1* 和 pCW/*CYP409A1* 分别与 pAC/CPR 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中进行共表达。【结果】通过 PCR 检测, 发现 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在飞蝗 5 龄若虫触角、脑、视叶、咽下神经节、胸神经节和附腺中均有表达, 其中 *CYP408B1* 在附腺中表达量较高。原核表达结果显示, *CYP409A1* 和 CPR (NADPH 细胞色素 P450 还原酶) 均可表达, 蛋白分子量分别约为 58 ku 和 77 ku, 但均为包涵体, 而 *CYP408B1* 未能成功表达。【结论】本文揭示了飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在不同组织部位的表达模式, 并对 *CYP409A1* 和 CPR 进行了原核表达, 研究结果为深入探讨飞蝗细胞色素 P450 基因对杀虫剂的代谢解毒作用提供了实验依据和基础资料。

关键词 飞蝗, 细胞色素 P450, Real-time PCR, RT-PCR, 原核表达

Prokaryotic expression of the *CYP408B1* and *CYP409A1* genes in *Locusta migratoria*

GAO Cui-E** REN Xiao-Yu ZHANG Xue-Yao ZHANG Ting-Ting ZHANG Jian-Zhen
MA En-Bo WU Hai-Hua***

(Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract 【Objectives】Cytochrome P450s are ubiquitous superfamily enzymes that play important roles in the metabolism of endogenous and exogenous compounds in insects. In order to provide a basis for the further study of the molecular properties and biological functions of the *CYP408B1* and *CYP409A1* genes in *Locusta migratoria*, we analyzed their expression patterns in different tissues and performed the prokaryotic expression of these two genes. 【Methods】Total RNA of different tissues from fifth-instar nymphs of *L. migratoria* was used to synthesize cDNA using MLV reverse transcriptase. Real-time PCR and RT-PCR were conducted to analyze the mRNA expression patterns of *CYP408B1* and *CYP409A1*. In addition, the constructed expression plasmids pCW/*CYP408B1* and pCW/*CYP409A1* were co-expressed with pAC/CPR in *E. coli* BL21 (DE3), respectively. 【Results】*CYP408B1* and *CYP409A1* were expressed in the antenna, brain, optic lobe, subpharyngeal ganglion, thoracic ganglia and accessory gland, while *CYP408B1* had higher expression levels in the accessory gland by PCR. The prokaryotic expression results show that *CYP409A1* and CPR (NADPH-cytochrome P450 reductase) were successfully expressed in inclusion bodies. Their molecular weights were approximately 58 ku and 77 ku, respectively. The

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31320103921, 31172161, 31201548); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (20111401110006)

**第一作者 First author, E-mail: happygaocui@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuhaihua04@163.com

收稿日期 Received: 2014-03-31, 接受日期 Accepted: 2014-05-26

recombinant CYP408B1 was not expressed in the *E. coli* expression system. **[Conclusion]** The results reveal the expression patterns of CYP408B1 and CYP409A1 in different tissues of *L. migratoria* and confirm the expression of the recombinant CYP409A1 and CPR by a prokaryotic expression system. These results provide an experimental basis and basic data for further research on the detoxification of insecticides by cytochrome P450 genes in *L. migratoria*.

Key words *Locusta migratoria*, cytochrome P450, Real-time PCR, RT-PCR, prokaryotic expression

细胞色素 P450 酶系 (Cytochrome P450 或 P450) 是血红素结合的超家族酶系, 在还原状态下与 CO 结合形成复合物, 该复合物在 450 nm 处有最大吸收特征峰 (Denisov *et al.*, 2005)。P450 酶系借助于电子传递系统, 把分子氧还原为水, 将其中一个氧原子与底物结合形成产物, 可催化 60 多种不同类型的化学反应, 主要是羟基化、脱烷基化和环氧化 (Guengerich, 2001)。P450 是一类分布极广的酶系, 存在于细菌、真菌、植物和动物等几乎所有的生物体内 (Feyereisen, 2006), 其功能具有多样性, 不仅能参与内源化合物如蜕皮激素、保幼激素和信息素等的代谢, 还能对多种外源化合物如杀虫剂、致癌物、环境污染物和植物毒素等进行代谢解毒 (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001; Feyereisen, 2005)。

研究表明, 昆虫对杀虫剂的抗药性与 P450 的代谢解毒功能有关 (Feyereisen, 2005), 目前对抗性相关的 P450 蛋白生化特性研究主要采用异源表达系统。利用大肠杆菌 *Escherichia coli* (Blake *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 2012)、酵母 (Shiningavamwe *et al.*, 2006)、杆状病毒介导的昆虫细胞表达系统 (Dunkov *et al.*, 1997) 等异源表达系统开展基因功能研究已有许多成功范例, 其中采用大肠杆菌原核表达体系的研究较多, 因为其具有周期短、成本低、操作简便等优势, 被广泛应用于外源基因表达的研究 (Vasilev *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2012; Cheesman *et al.*, 2013)。但由于缺乏内源电子供体, 而制约了对 P450 酶的催化反应和药物代谢能力的研究 (Fujita and Kamataki, 2002)。P450 蛋白需要 NADPH 细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 或 NADH 细胞色素 b5 还原酶将辅因子 NAD(P)H 提供的电子通过电子传递系统输送到 P450 的血红素结合

区, 在还原酶的辅助下才能完成其催化反应 (Paine *et al.*, 2004; Gillam, 2008)。为了克服这种局限性, 大多数研究将 CYP450 和 CPR 进行共表达 (Fujita and Kamataki, 2002)。

本实验室前期研究结果表明, 飞蝗 *Locusta migratoria* CYP408B1 和 CYP409A1 均参与溴氰菊酯的代谢解毒 (Guo *et al.*, 2012), 这两种蛋白如何对杀虫剂进行代谢解毒? 这是一个饶有兴趣并值得深入研究的科学问题, 据此, 本文将 CYP408B1 和 CYP409A1 分别与 CPR 进行共表达, 采用大肠杆菌表达体系进一步验证飞蝗 CYP408B1 和 CYP409A1 对溴氰菊酯的解毒作用, 探究其解毒机理, 为揭示飞蝗 P450 基因与杀虫剂代谢解毒的关系提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 飞蝗虫体为本实验室孵化饲养所得, 将蝗卵置于人工气候箱中孵化, 温度为 (26 ± 2) , 相对湿度 50%, 14L:10D, 选取活力旺盛并且大小一致的 5 龄若虫, 解剖其不同组织部位作为实验材料。

1.1.2 主要试剂 CYP408B1、CYP409A1 和 CPR 全长菌液、表达载体 pCWori 和 pAC-Kan-alphaGal4 为本实验室保存; TransStart FastPfu DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶、BL21(DE3) 感受态细胞、Trans1-T1 感受态细胞购自 TransGen 公司; 2 × Taq PCR MasterMix 购自 TIANGEN 公司; Gel Extraction Kit、Plasmid Miniprep Kit 均购自 OMEGA 公司; In-Fusion[®] HD Cloning Kit 购自 Clontech 公司; 限制性内切酶 NdeI、XbaI、NotI 和 MluI 购自 NEB 公司; δ -氨基- γ -酮戊酸 (ALA) 购自 Sigma 公司; 二硫

基苏糖醇 (DTT) 购自上海生工生物公司; 标准蛋白 Marker 购自 Thermor 公司; RNAiso Plus, RNase Inhibitor, RTase M-MLV (RNase H⁻) 购自 TaKaRa 公司; SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司; 其他试剂主要购自 TaKaRa、Solarbio 和上海生工生物公司。

1.2 引物

本研究引物采用 Primer Premier 5.0 软件和 <http://bioinfo.clontech.com/infusion/> 网站进行设计, 由上海英骏生物有限公司合成, 引物见表 1。

1.3 飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在 5 龄若虫不同组织部位的表达

1.3.1 实验材料的准备 选取活力旺盛的 5 龄若虫置于冰上, 解剖 6 个组织部位 (触角、脑、视叶、咽下神经节、胸神经节和附腺), 迅速冻存于液氮中, 每个组织部位 3 个生物学重复。

1.3.2 总 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成 将冻存于液氮中的样品迅速取出, 置于冷却的玻璃匀浆器中, 加入适量的 RNAiso Plus 后匀浆, 直至匀浆液透明, 然后将其转入 1.5 mL 的离心管中, 参照 TaKaRa 公司 Total RNA 提取试剂说明书提取总 RNA, 并测定 RNA 的浓度。吸取约 1

μg 的 RNA, 参照 Reverse Transcriptase M-MLV 说明书合成第一链 cDNA, 将其贮存于 -20℃。

1.3.3 PCR 检测飞蝗 P450 的表达量 以 cDNA 为模板, *β-actin* 为内参基因, 采用 Real-time PCR 方法分析 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在飞蝗不同组织部位的表达情况, 实验设计 2 个技术重复, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。并同时用 RT-PCR 方法进一步分析其表达, PCR 参数为 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min (*CYP408B1* 30 个循环, *CYP409A1* 26 个循环, *β-actin* 23 个循环); 72℃ 10 min。用 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳检测其 PCR 产物。

1.4 飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 与 CPR 在大肠杆菌表达体系中共表达

1.4.1 基因序列的修饰 本文采用 *ompA*+2 修饰策略, 释放出 CYP450 蛋白, *ompA*+2 的核苷酸序列为 ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCGAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCGCCG, 用 PCR 方法将其导入 *P450* 的起始密码子前。CPR 的氮端采用 *pelB* 修饰策略, *pelB* 的核苷酸序列为 ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCC, 用 PCR 方法将其导入 CPR 的起始密码子前。

表 1 飞蝗 P450 基因 PCR 引物
Table 1 PCR primers of locust P450 genes

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primers sequence (5'-3')	引物用途 Primers application
<i>CYP408B1</i>	F:GACAGATTTTCTCCAGCCATAGC R:CAGTCAACTTAGTAACCAGCATTC	表达分析 Real-time PCR and RT-PCR
<i>CYP409A1</i>	F:AGTCGCTCCCGGCTGACT R:CGCTTCTGGTCCTTCCTGTT	表达分析 Real-time PCR and RT-PCR
<i>β-actin</i>	F:CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R:GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	表达分析 Real-time PCR and RT-PCR
<i>CYP408B1</i>	F:GCTTAGGAGGTCATATGATGAAAAAGACAGCTATCGCG R:GAACTCATAATCATATGTCATTTGCGAAGTTCCACACTAATTTTC	原核表达 Prokaryotic expression
<i>CYP409A1</i>	F:GCTTAGGAGGTCATATGATGAAAAAGACAGCTATCGCG R:GAACTCATAATCATATGTCAGAGGTGGACCAGGGGTTG	原核表达 Prokaryotic expression
<i>CPR</i>	F:GCTTAGGAGGTCATATGATGAAATACCTGCTGCCGACC R:GAACTCATAATCATATGTCAGCTCCATACATCTGAAG	原核表达 Prokaryotic expression

1.4.2 重组表达载体的构建及鉴定 以 *CYP450* 和 *CPR* 加修饰序列的菌液为模板,用各自的原核表达引物进行 PCR 扩增,切胶回收。pCWori 载体用 *NdeI* 进行单酶切,胶回收产物与酶切产物参照 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 说明书进行连接,获得重组载体 pCW/CYP408B1、pCW/CYP409A1 和 pCW/CPR。pAC-Kan-alphaGal4 载体先后用 *XbaI* 和 *NotI* 酶切,得到长度为 3 220 bp 的片段, pCW/CPR 先后用 *MluI* 和 *NotI* 酶切,得到长为 2 996 bp 的片段,将这两个片段用 T4 DNA 连接酶连接(pAC/CPR)。将 pCW/CYP408B1、pCW/CYP409A1 和 pAC/CPR 分别转化至感受态细胞 *Trans1-T1* 中,采用菌落 PCR 方法筛选与目的片段一致的菌落培养后进行序列测定(上海英骏生物公司),将序列无误的菌落经 LB 液体培养基培养后提取质粒,以其为模板进行 PCR 鉴定(载体构建示意图见图 1)。

1.4.3 细菌培养 构建好的表达载体 pCW/CYP408B1 和 pCW/CYP409A1 分别与 pAC/CPR 共转化于表达感受态 BL21(DE3)中,同时将 pCW/CYP408B1、pCW/CYP409A1、pAC/CPR 和 pCWori 分别转化于表达感受态

BL21(DE3)中,挑取单克隆菌株 BL21(DE3)接种于新鲜的 5 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄和(或)卡那、25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基中,于 37、200 r/min 震荡过夜培养(不要超过 16 h);将培养好的菌液以 1:100 比例稀释到新鲜含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄和(或)卡那、25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、1 mmol/L VB1、微量元素的 100 mL TB 液体培养基中(取 2.31 g KH_2PO_4 和 12.54 g K_2HPO_4 于 100 mL 水中溶解,高压灭菌,取 Tryptone 12 g、Yeast Extract 24 g 和甘油 4 mL 于 900 mL 去离子水中溶解,高压灭菌,灭菌后待冷却至 60 时将上面的磷酸缓冲液加入其中),30、200 r/min 培养 4 h,测定 OD_{600} 值,当 OD_{600} 值达到 0.7~1.0 时,加 ALA 至终浓度 0.5 mmol/L 和 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,在 30、200 r/min 培养 24 h (Michael *et al.*, 2005)。

1.4.4 重组蛋白样品的制备及 SDS-PAGE 检测 取 50 mL 经 IPTG 诱导的培养物,冰上放置 10 min,4 2 800 g 离心 20 min,收集菌体,弃上清;沉淀用 $2 \times \text{TSE Buffer}$ (100 mmol/L Tris Buffer, pH 7.6, 含有 500 mmol/L 蔗糖,0.5 mmol/L EDTA) 及等体积冰冷的无菌水重悬;加 0.25 mg/mL 溶菌酶,

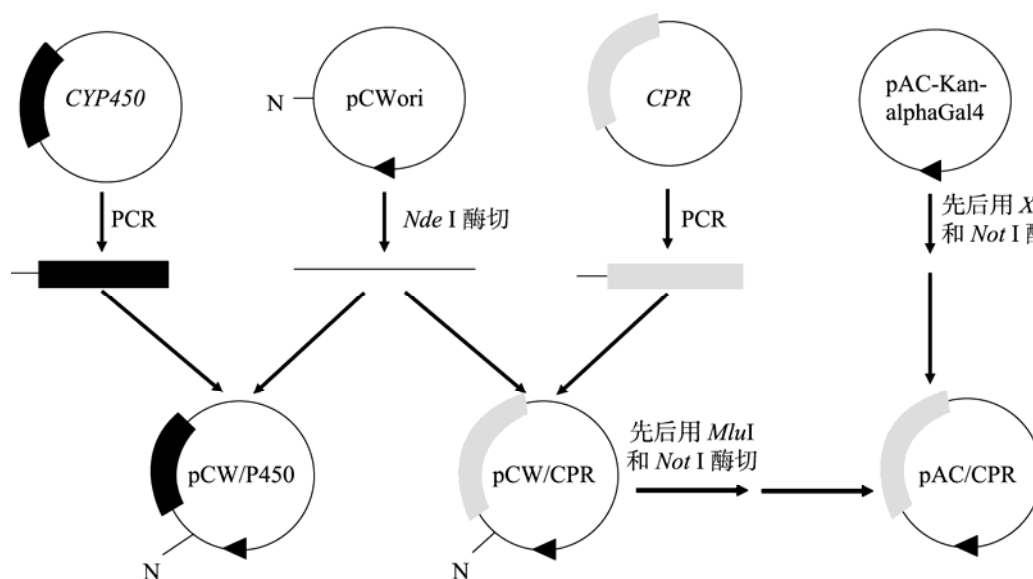


图 1 飞蝗表达载体 pCW/CYP450 和 pAC/CPR 的构建示意图

Fig. 1 Schematic representation for construction of the pCW/CYP450 and pAC/CPR expression vectors

图中 N 代表 *NdeI* 位点,黑色框代表 P450 基因,灰色框代表 CPR 基因。

N represents *NdeI* site, black bars represent P450 gene, and gray bars represent CPR gene in the map.

冰上 4 轻摇 30~60 min 后, 4 2 800 g 离心 20~25 min, 弃上清; 沉淀用冰冷的 Spheroplast resuspension buffer (100 mmol/L 磷酸钾溶液, 含有 6 mmol/L 乙酸镁, 20% (v/v) 甘油, 0.1 mmol/L DTT) 重悬, 然后置于 -80 过夜冻存; 次日将样品在冰上解冻后加入蛋白酶抑制剂 Aprotinin 和 Euepeptin 至终浓度为 1 μ g/mL, 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PSMF) 至终浓度为 1 mmol/L, 用移液枪尽量将其混匀, 冰浴中间歇超声破碎, 每破碎 3 s, 间歇 3 s, 反复破碎共 12 min。混合物转移到 1.5 mL 的离心

管中, 4 12 000 g 离心 12 min (Michael *et al.*, 2005), 所得的样品用于 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在 5 龄若虫不同组织部位的表达

采用 Real-time PCR 及 RT-PCR 检测飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 基因在不同组织部位的表达情况 (图 2), 结果显示: *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在 5 龄若虫的触角、脑、视叶、咽下神经节、胸神经节和附腺中均有表达, 其中 *CYP408B1* 在附腺

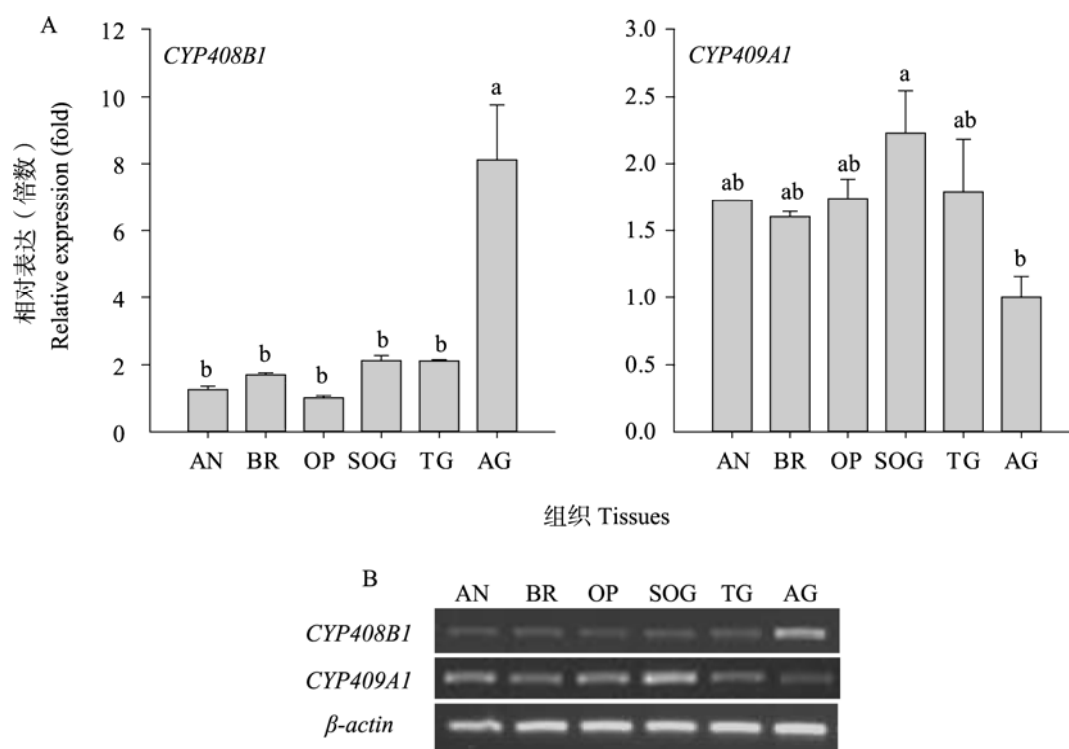


图 2 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在飞蝗不同组织部位的相对表达量

Fig. 2 The expression levels of *CYP408B1* and *CYP409A1* in different tissues of *Locusta migratoria*

A. 采用 Real-time PCR 方法分析 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 的相对表达量; B. 采用 RT-PCR 方法分析 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 的相对表达量。

A. Analysis of the expression levels for *CYP408B1* and *CYP409A1* by Real-time PCR; B. Analysis of the expression levels for *CYP408B1* and *CYP409A1* by RT-PCR.

AN: 触角; BR: 脑; OP: 视叶; SOG: 咽下神经节; TG: 胸神经节; AG: 附腺。

AN: Antenna; BR: Brain; OP: Opticlobe; SOG: Subpharygeal ganglion; TG: Thoracic ganglia; AG: Accessory gland.

柱状图上标有不同字母表示 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在飞蝗不同组织部位相对表达量有显著性差异 ($P < 0.05$, Duncan's 多重分析, $n=3$)

Histograms with different letters indicate that the expression of *CYP408B1* 和 *CYP409A1* in different tissues of *L. migratoria* are significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test, $n=3$.

中有较高的表达 (图 2:A)。同时采用 RT-PCR 分析,电泳检测显示同样的结果 (图 2:B)。

2.2 飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 与 *CPR* 在大肠杆菌表达体系中共表达

2.2.1 表达载体的验证 构建好的表达载体 pCW/*CYP408B1*、pCW/*CYP409A1* 和 pAC/*CPR* 提取质粒进行 PCR 鉴定,PCR 产物片段大小分别为 1 642 bp、1 654 bp 和 2 143 bp,大小与预期相近,测序结果表明插入的序列正确无误 (图 3)。

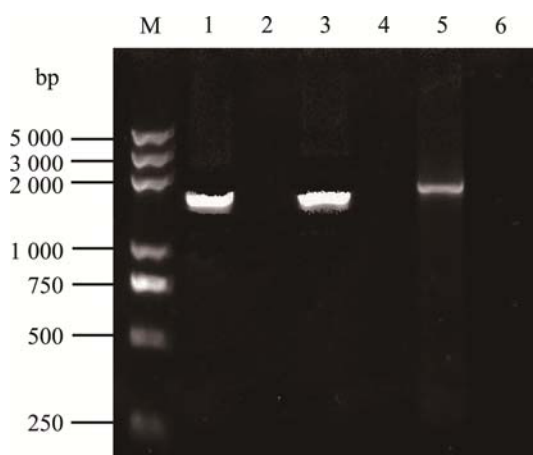


图 3 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid

M: DL5000 分子量标准;泳道 1: pCW/*CYP408B1* 的 PCR 扩增产物;泳道 3: pCW/*CYP409A1* 的 PCR 扩增产物;泳道 5: pAC/*CPR* 的 PCR 扩增产物;泳道 2、4、6 均为 pCWori 的 PCR 扩增产物。

M: DL5000 DNA marker; Lane 1: PCR product of pCW/*CYP408B1*; Lane 3: PCR product of pCW/*CYP409A1*; Lane 5: PCR product of pAC/*CPR*; Lane 2, 4, 6: PCR products of pCWori.

2.2.2 重组蛋白 SDS-PAGE 检测 将重组质粒转化于表达感受态细胞 BL21 (DE3) 中,经 IPTG 诱导后,将其诱导培养物超声破碎,离心收集样品,用 SDS-PAGE 检测。结果表明:*CYP408B1* 单独或与 *CPR* 共转化感受态细胞均没有表达,而 *CYP409A1* 单独或与 *CPR* 共转化感受态细胞均有表达,*CPR* 也有表达,但都以包涵体形式存在于超声破碎后的沉淀中 (图 4)。

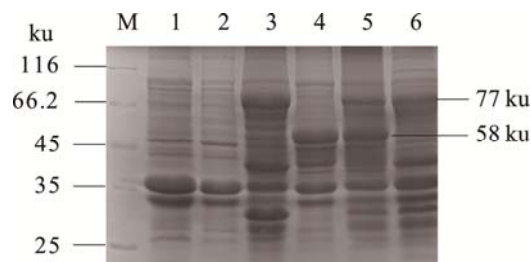


图 4 重组蛋白 *CYP408B1*、*CYP409A1* 和 *CPR* 的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 4 SDS-PAGE identification of recombinant proteins

M: 蛋白质分子量标准;泳道 1: pCWori-BL21(DE3)诱导的电泳结果;泳道 2: pCW/*CYP408B1*-BL21(DE3)诱导的电泳结果;泳道 3: pCW/*CYP408B1*-pAC/*CPR*-BL21(DE3)诱导的电泳结果;泳道 4: pCW/*CYP409A1*-BL21(DE3)诱导的电泳结果;泳道 5: pCW/*CYP409A1*-pAC/*CPR*-BL21(DE3)诱导的电泳结果;泳道 6: pAC/*CPR*-BL21(DE3)诱导的电泳结果。

M: Protein molecular weight; Lane 1: pCWori-BL21(DE3) with IPTG; Lane 2: pCW/*CYP408B1*-BL21(DE3) with IPTG; Lane 3: pCW/*CYP408B1*-pAC/*CPR*-BL21(DE3) with IPTG; Lane 4: pCW/*CYP409A1*-BL21(DE3) with IPTG; Lane 5: pCW/*CYP409A1*-pAC/*CPR*-BL21(DE3) with IPTG; Lane 6: pAC/*CPR*-BL21(DE3) with IPTG.

3 讨论

P450 酶几乎分布于昆虫所有的组织中,尤其在肠道和脂肪体中含量最高,例如 Saner 等 (1996) 采用免疫组织化学方法及 Brun 等 (1996) 采用原位杂交技术分别证明 *CYP6A2* 广泛分布在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的不同组织中。本实验室前期研究工作发现飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在前肠、中肠、胃盲囊、后肠、马氏管、脂肪体、肌肉、卵巢和精巢中均有表达 (Guo *et al.*, 2012)。本文研究结果显示,*CYP408B1* 和 *CYP409A1* 在飞蝗 5 龄若虫的触角、脑、视叶、咽下神经节、胸神经节和附腺中也有表达,进一步表明上述基因在飞蝗体内分布广泛。本文发现 *CYP408B1* 在附腺中有较高的表达,表明该基因在附腺中具有特殊功能。附腺是昆虫生殖系统的组成部分,由分泌部和贮存部两部分组成,雌性附腺的分泌物主要是保护和固定卵的作用 (靳远祥等, 2005); 雄性附腺的分泌

物在雌性的生殖和行为变化中具有重要作用,包括促进卵子的发生和产卵、增加取食能力和增强免疫反应等 (Baldini *et al.*, 2012)。Halloween 基因中的 *CYP307B1* 在赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 雄性成虫附腺中有较高的表达,表明在该组织部位中可以合成蜕皮激素,而蜕皮激素与脊椎动物的性激素具有类似的功能,从而调控其生理行为 (Hentze *et al.*, 2013)。由此,推测 *CYP408B1* 可能在飞蝗生殖行为方面也具有一定的作用。

本实验室前期通过 RNAi 分析发现飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 对溴氰菊酯有解毒作用 (Guo *et al.*, 2012), 这一特有的生物学现象使得我们对飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 的深入研究产生了浓厚的兴趣。为了揭示飞蝗 *CYP408B1* 和 *CYP409A1* 对溴氰菊酯的解毒机理,本文采用大肠杆菌表达体系从蛋白水平开展研究。

采用大肠杆菌表达系统表达 P450 膜结合蛋白时,为了获得有功能性的 P450 完整蛋白,构建表达载体前,*CYP450* 基因的氮端需要修饰,本研究采用 *ompA*+2 修饰策略,由于不需要改变基因编码区序列,所以 *ompA*+2 修饰策略与其他修饰策略 (如 17- α 策略) 相比,具有一定优势。P450 蛋白需要辅酶因子提供的电子通过电子传递系统输送到 P450 的血红素结合区,才能完成其催化反应 (Paine *et al.*, 2004; Gillam, 2008), 这一过程需要由 CPR 来完成。为了克服这种局限性,大多数研究将 *CYP450* 和 *CPR* 进行共表达 (Fujita and Kamataki, 2002)。此外,我们采用 *pelB* 修饰策略对 *CPR* 进行修饰,然后将 *CYP450* 和 *CPR* 共表达。*ompA*+2 和 *pelB* 引导序列在大肠杆菌表达体系中被细菌信号肽酶移除,从而释放出 *CYP450* 和 *CPR* 蛋白 (Michael *et al.*, 2005)。本研究将 *CYP450* 基因导入 P450 常用的表达载体 pCWori 中,*CPR* 导入 pAC-Kan- α Gal4 载体中,其复制子为 p15A,其可与复制子为 colE1 的质粒共存于同一个细胞中 (刘志刚等, 2002), 且该载体的抗性与 pCWori 不同,从而可以在大肠杆菌表达系统中实现 *CYP450*

和 *CPR* 的共表达。

本文原核表达研究结果显示,*CYP408B1* 没有表达,而 *CYP409A1* 和 *CPR* 虽有表达,但都以包涵体的形式存在。已有研究表明,细菌培养过程中的各种条件,如在 *E. coli* 表达体系中有时会产生内毒素或蛋白酶水解、密码子偏好性以及宿主菌株等均能导致目的蛋白不能成功表达 (王启斌等, 2008)。此外,还有许多因素可能造成蛋白不能正确折叠,从而形成包涵体。如董元凌 (2012) 认为 P450 蛋白带有含铁原卟啉的辅基,在大肠杆菌中表达时,可能由于蛋白质生物合成速率较快,细胞内金属转运的速率不能与之匹配,引起不含铁金属辅基的脱辅蛋白堆积,不能正确折叠,而形成包涵体。李清等 (2012) 研究认为,影响蛋白折叠中间体稳定的因素很多,比如温度、pH 值、分子伴侣和离子强度等都可能影响蛋白的可溶性。Wilkinson 和 Harrison (1991) 研究表明,蛋白质平均电势、等电点、形成构象残基百分比、半胱氨酸残基数目、脯氨酸数目、亲水性和氨基酸总数目,都与包涵体的形成有关。

利用大肠杆菌表达系统表达膜结合蛋白的工作比较困难,本文中飞蝗 *CYP409A1* 虽已成功表达,但以包涵体的形式存在,而 *CYP408B1* 没有得到成功表达。但本研究成功构建了 pCW/*CYP408B1*、pCW/*CYP409A1* 和 pAC/*CPR* 表达质粒以及共表达技术体系,为下一步大肠杆菌表达系统的相关研究工作提供了技术平台及实验依据。

参考文献 (References)

- Anzenbacher P, Anzenbacherova E, 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (5/6): 737–747.
- Baldini F, Gabrieli P, Rogers DW, Catteruccia F, 2012. Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases. *Pathogens and Global Health*, 106(2): 82–93.
- Blake JAR, Pritchard M, Ding S, Smith GCM, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T, 1996. Coexpression of a human P450 (*CYP3A4*) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase

- system in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 397(2/3): 210–214.
- Brun A, Cuany A, Le Mouel T, Berge J, Amichot M, 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, *CYP6A2*, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(7): 697–703.
- Cai H, Jiang J, Yang Q, Chen Q, Deng Y, 2012. Functional characterization of a first *Avian* cytochrome P450 of the CYP2D subfamily (*CYP2D49*). *PLoS ONE*, 7(6): e38395.
- Cheesman MJ, Traylor MJ, Hilton ME, Richards KE, Taylor MC, Daborn PJ, Russell RJ, Gillamb EMJ, Oakeshott JG, 2013. Soluble and membrane-bound *Drosophila melanogaster* *CYP6G1* expressed in *Escherichia coli*: purification, activity, and binding properties toward multiple pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(5): 455–465.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I, 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews*, 105(6): 2253–2277.
- Dong YL, 2012. Cloning and prokaryotic expression of cytochrome *CYP337A1* gene in the silkworm, *Bombyx mori*. Master Dissertation. Chongqing: Southwest University. [董元凌, 2012. 家蚕细胞色素 CYP337A1 的克隆与原核表达. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Dunkov BC, Guzov VM, Mocelin G, Shotkoski F, Brun A, Amichot M, Ffrench-Constant RH, Feyereisen R, 1997. The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: structure, localization, heterologous expression, and induction by Phenobarbital. *DNA and Cell Biology*, 16(11): 1345–1356.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450 // Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Oxford. 1–77.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34(6): 1252–1255.
- Fujita K, Kamataki T, 2002. Genetically engineered bacterial cells co-expressing human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase: prediction of metabolism and toxicity of drugs in humans. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17(1): 1–22.
- Gillam EM, 2008. Engineering cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1): 220–231.
- Guengerich FP, 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6): 611–650.
- Guo YQ, Zhang JZ, Yu RR, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, 2012. Identification of two new cytochrome P450 genes and RNA interference to evaluate their roles in detoxification of commonly used insecticides in *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 87(7): 709–717.
- Hentze JL, Moeller ME, Jørgensen AF, Bengtsson MS, Bordoy AM, Warren JT, Gilbert LI, Andersen O, Rewitz KF, 2013. Accessory gland as a site for prothoracicotrophic hormone controlled ecdysone synthesis in adult male insects. *PLoS ONE*, 8(2): e55131.
- Ji YX, Xu MK, Chen YY, Jiang YH, Du X, 2005. Extraction and two-dmi ensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 31(1): 97–99. [靳远祥, 徐孟奎, 陈玉银, 姜永煌, 杜鑫, 2005. 家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析. 蚕业科学, 31(1): 97–99.]
- Li Q, Zhang XY, Zhang JZ, Ma EB, 2012. Cloning and prokaryotical expression of CarE gene in *Locusta migratoria manilensis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 666–672. [李清, 张学尧, 张建珍, 马恩波, 2012. 东亚飞蝗羧酸酯酶基因的克隆和原核表达. 应用昆虫学报, 49(3): 666–672.]
- Liu ZG, Lin JB, Kang TJ, Yu WY, 2002. The influence of coexpression of TrxA and DsbC to the expeesion of heterogenous protein with multiple disulfide bonds. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 18(4): 486–489. [刘志刚, 林建波, 康铁军, 俞炜源, 2002. 共表达 TrxA 和 DsbC 对富含二硫键的异源蛋白在大肠杆菌中表达的影响. 中国生化与分子生物学报, 18(4): 486–489.]
- Michael PP, Lesley M, Thomas FE, 2005. Establishment of functional human cytochrome P450 monooxygenase systems in *Escherichia coil* // Phillips IR, Shephard EA (eds.). Cytochrome P450 Protocols (Methods in Molecular Biology). 2nd Edition. New Jersey: Humana Press Inc. 19–29.
- Paine MJI, Scrutton NS, Munro AW, Roberts GCK, Wolf CR, 2004. Electron transfer partners of cytochrome P450 // Ortiz de Montellano PR (ed). Cytochromes P450: Stucture, Mechanism and Biochemistry. 3rd Edition. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 115–148.
- Saner C, Weibel B, Wurgler FE, Sengstag C, 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* *CYP6A2* enzyme in *Succhuromyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(1): 46–58.
- Shiningavamwe A, Obiero G, Albertyn J, Nicaud JM, Smit M, 2006. Heterologous expression of the benzoate para-hydroxylase encoding gene (*CYP53B1*) from *Rhodotorula minuta* by *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (2): 323–329.

- Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lian LY, Muller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, Sutcliffe MJ, Paine MJ, 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 492–502.
- Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ, 2012. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 6(3): e1595.
- Vasilev NP, Julsing MK, Koulman A, Clarkson C, Woerdenbag HJ, Ionkova I, Bos R, Jaroszewski JW, Kayser O, Quax WJ, 2006. Bioconversion of deoxypodophyllotoxin into epipodophyllotoxin in *E. coli* using human cytochrome P450 3A4. *Journal of Biotechnology*, 126: 383–393.
- Wang QB, Zhang ZQ, Fang JM, Chen YS, 2008. Research progress expression of mammalian CYP450 in *E. coli*. *Herald of Medicine*, 27(9): 1083–1085.[王启斌, 张志权, 方建敏, 陈永顺, 2008. 哺乳动物CYP450在大肠埃希菌上表达的研究进展. *医药导报*, 27(9): 1083–1085.]
- Wilkinson DL, Harrison RG, 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9(5): 443–448.