

解毒酶基因 cDNA 克隆和高效表达

邢建民* 乔传令** 黄菁 李瑄 贾馨丹 李典谟

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理国家重点实验室 北京 100080)

关键词 解毒酶基因, 分子克隆, 高效表达, 解毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0199-04

昆虫抗药性的一个重要机制是其产生的解毒酶可以将大剂量的农药脱去毒性^[1]。酯酶活性升高是库蚊对有机磷杀虫剂抗性的主要机制,与酯酶 B1 有关的抗性最高^[2,3]。酯酶与有机磷杀虫剂有非常强的结合力,可以迅速与之形成强结合体^[4]。酯酶的解毒作用具有很高的手性专一性,在有机磷化合物,特别是高毒的有机磷化合物的解毒作用中非常重要^[1]。高效表达解毒酶基因,将昆虫解毒酶用于人畜解毒的目的研究还未见报道。本文报道在大肠杆菌中高效表达昆虫解毒酶,并将产物用于实验动物有机磷中毒的解毒研究,为昆虫抗性相关基因的开发利用提出了新方向,为解毒和污染治理提供了新途径。

昆虫杀虫剂抗性用于生物整治(Bioremediation)已受到越来越多的重视,Roe 等^[5]设想将昆虫杀虫剂抗性相关基因转入土壤微生物,使得这种微生物能够合成昆虫的解毒酶,降解土壤中残留的农药。Gordon 等^[6]则研究了将胆碱酯酶固定化用于清除皮肤表面沾染的有机磷化合物。本研究是在大肠杆菌中高效表达解毒酶,并将解毒酶用于实验动物有机磷中毒的解毒研究,为昆虫抗性相关基因的开发利用提出了新方向。下一步的工作中,我们将从分子机制上深入研究解毒酶的作用机理,为从分子水平设计高效解毒酶提供实验和理论依据,为解毒和污染治理提供新途径。同时,在分子水平上为新型、高效、低毒杀虫剂的设计提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 α 为本室保存,质粒 pBV220 由中国预防医学科学院病毒研究所张智清教授等^[7]构建。SUPER-SCRIPTTM 反转录第一链合成试剂盒为 GIBICO 公司产品,SK121 pfu 扩增克隆试剂盒购自上海生工生物工程技术服务公司,DNA 片段回收试剂盒购自鼎国生物技术发展中心,实验中所用的各种限制酶、T4DNA 连接酶为 Promega 公司产

品。敌敌畏(DDVP)系河北省邯郸市滏阳化工厂生产的 80% 乳油。

1.2 库蚊酯酶 B1 基因的克隆

提取单只 *Culex quinquefasciatus* TEM-R 的总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链,然后进行 PCR。根据 Mouches 等人^[2]报道的 B1 核苷酸序列设计引物,由上海生工生物工程技术服务公司合成。5' 端引物为: 5'-GCCAATTGAT-GAGTTTGGAAA-3', 3' 端引物为: 5'-GCCAATTGTTCTC-CTCAAAACAGC-3', 为便于在 pBV220 中的 *EcoRI* 位点插入进行表达,在引物中设计加入了 *MunI* 酶切位点。PCR 条件:变性, 94 $^{\circ}\text{C}$, 1min; 退火, 55 $^{\circ}\text{C}$, 1min; 延伸, 72 $^{\circ}\text{C}$, 3min, 共 30 个循环后,于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。PCR 产物经 *Taq* DNA 聚合酶在末端加 Λ 后,亚克隆到 pUCm-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白筛选得到阳性克隆,提取和纯化质粒,由北京赛百胜生物工程公司测序。

1.3 表达质粒 pBV220-B1 的构建

参照文献^[8]的方法进行克隆操作,构建步骤见图 2。

1.4 解毒酶的表达和检测

携带 pBV220-B1 的大肠杆菌 DH5 α 菌株在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,按 1:100 接种到新鲜的含氨苄青霉素的 LB 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 约为 0.5,立即转到 42 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 1~6h,离心收集菌体,用溶菌酶和超声波破碎菌体,离心后分别收集包涵体和上清。参照文献^[8],SDS-PAGE 检测解毒酶的表达,浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 8%,常规聚丙烯酰胺电泳,按文献^[9]的方法染色检测解毒酶活性。

1.5 实验鸡的 DDVP 中毒的解毒实验

成年来航母鸡 (*Gallus gallus*) (12 月龄,鸡重约 1.5kg 左右)购自北京农业大学实验鸡场,鸡购回后单独喂养,至少适应环境 1 周后才开始试验。自由取食和饮水,实验期间,鸡舍温度控制在 20 $^{\circ}\text{C}$ 左右,每天光照约 10h。实验鸡分成 4

收稿日期:2000-10-13,修回日期:2000-12-15。

基金项目:国家“八六三”计划项目基金和国家自然科学基金(批准号:39980034)资助。

* 现工作单位:中科院化冶所青年室

** 联系作者。 Tel: 86-10-62553369; Fax: 86-10-62553369; E-mail: qiaoc@panda.izl.ac.cn

组实验一组同时给予 DDVP(装入空胶囊中,剂量为 170mg/kg,口服)和表达解毒酶的大肠杆菌(0.5g 湿菌体装入空胶囊中,口服);实验二组,先给予 DDVP(装入空胶囊中,剂量为 170mg/kg,口服) 40min 后给予表达解毒酶的大肠杆菌(0.5g 湿菌体装入空胶囊中,口服);对照一组只给予 DDVP(装入空胶囊中,剂量为 170mg/kg,口服);对照二组同时给予 DDVP(装入空胶囊中,剂量为 170mg/kg,口服)和转空质粒的大肠杆菌(0.5g 湿菌体装入空胶囊中,口服)。给药后密切观察被试鸡的急性中毒情况,在给药后 10d 称重,处死被试鸡。

2 结果

2.1 库蚊解毒酶基因 B1 的克隆和原核表达质粒的构建

RT-PCR 产物电泳显示约在 1.6kb 处出现特异扩增条带(图 1)。RT-PCR 产物经末端加 A 后,与克隆载体 pUCm-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白筛选得到阳性克隆。B1-cDNA 长为 1623bp,编码 540 个氨基酸,分子量 60.7kD,测序结果表明,B1-cDNA 序列与文献报道的序列完全相同。

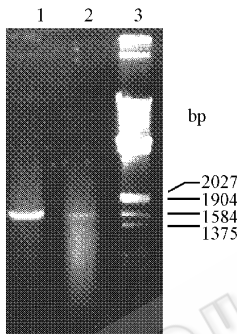


图 1 RT-PCR 产物的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of RT-PCR products

1 2. Products amplified by PCR ;

3. Molecular weight marker λ -HindIII + EcoRI

大量制备经测序鉴定的 pUCm-B1,经 *Mun*I 酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,试剂盒回收 1.6kb 大小的 DNA 片段,与 *Eco*RI 酶切并经末端去磷酸化的 pBV220 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性克隆,酶切鉴定插入方向,获得 B1 正向插入的 pBV220-B1(图 2)。

2.2 重组解毒酶 SDS-PAGE 和生物活性检测

SDS-PAGE 结果表明重组质粒 pBV220-B1 经 42 $^{\circ}$ C 高温诱导后,约在 60kD 处有一特异蛋白质条带(图 3),在菌体裂解物上清液和包涵体裂解物中都存在该特异条带,说明表达的解毒酶一部分以有活性的可溶性蛋白形式存在于细胞中。不含解毒酶基因的 pBV220 则没有该特异蛋白质条带。凝胶薄层扫描分析表明,解毒酶的最高表达量达到了菌体总蛋白量的 50%。采用常规聚丙烯酰胺电泳,用酯酶的特异性底物 β -乙酸萘酯染色,结果发现菌体裂解物上清液中出现了具有生物活性的酯酶的特异染色带(图 4)。

2.3 实验动物解毒实验

实验鸡按 170mg/kg 体重给予 DDVP 后,实验二组和对

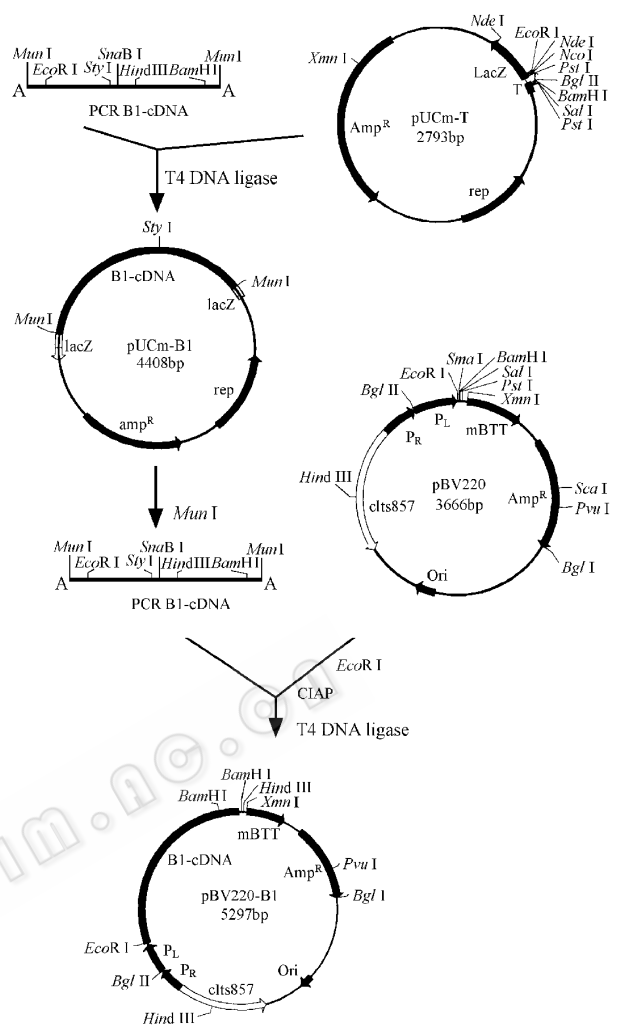


图 2 重组表达质粒 pBV220-B1 的构建

Fig.2 Consturction of recominant plasmid pBV220-B1

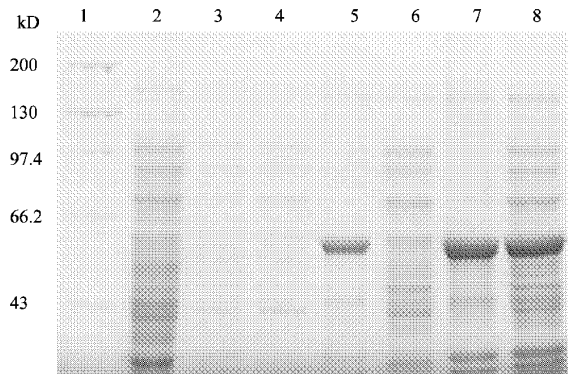


图 3 蛋白质表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of protein expressed in *E. coli*

1. Protein molecular weight marker

2. Protein expressed in *E. coli* transformed with pBV220

3. Protein expressed in *E. coli* transformed with pBV220-B1 uninduced

4. Cells supernatant of pBV220-B1 induced for 1h

5. Cells pellet of pBV220-B1 induced for 1h

6. Cells supernatant of pBV220-B1 induced for 6h

7. Cells pellet of pBV220-B1 induced for 6h

8. Cells lysate of pBV220-B1 induced for 6h

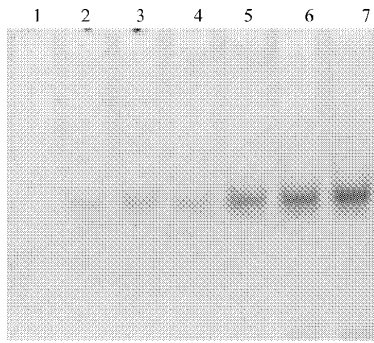


图4 蛋白质表达的非变性电泳分析

Fig.4 Detection of the esterase B1 by Non-denaturation electrophoresis

1~7. Cells supernatant of *E. coli* transformed with pBV220-B1 induced for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6h, respectively

照组约在 40min 内出现了急性中毒症状。实验一组症状较轻,没有明显急性中毒和迟发性神经毒性症状,在给转解毒酶工程菌 3h 后逐渐恢复正常;实验二组出现的急性中毒症状为衰弱无力,口吐粘液,给予转解毒酶基因工程菌后症状开始减轻,直至恢复正常,没有明显迟发性神经毒性症状。实验结束时,实验组鸡的体重没有明显下降。

对照一组和对照二组都出现了严重的急性中毒症状和迟发性神经毒性症状,部分实验鸡死亡,存活的实验鸡出现了不同程度的迟发性神经毒性症状,体重显著下降。

3 讨论

3.1 解毒酶基因的克隆和高效表达

蚊虫抗性的产生和传播是昆虫分子生物学的重要研究方向,蚊虫抗性相关酯酶已得到了较为深入的研究^[2,3,10,11]。由高活性的酯酶引起的抗性是蚊虫对有机磷杀虫剂抗性的主要机制^[4,12],我们利用 RT-PCR 方法从库蚊中克隆了高活性酯酶基因 B1 cDNA 编码序列,共 1623bp,分析了其核苷酸顺序,结果证实,与文献报道的完全相同。

有关蚊虫解毒酶基因在大肠杆菌中高效表达的研究还未见报道。本实验在大肠杆菌中高效表达了库蚊解毒酶基因。SDS-PAGE 分析显示,解毒酶蛋白的表达量达到了菌体总蛋白的 50% 以上。而在培养温度不超过 32℃ 时, $P_{R}P_L$ 启动子可以严格控制外源基因的表达,保证了培养前期细胞的快速生长。在大肠杆菌中表达外源基因时,外源基因与 SD 序列的距离非常重要,在质粒 pBV220 中,外源基因在多克隆位点的 *EcoRI* 位置插入往往可以获得高效表达,本实验再次证明了这一点。在研究中发现,大肠杆菌 DH5 α 表达的解毒酶既存在于可溶性的蛋白成分中,也形成不溶性的包涵体(图 3)。本实验还发现,随着诱导时间的延长,可溶性蛋白中有生物活性的解毒酶蛋白的含量明显增加(图 4)。一般情况下,在 15~20℃ 进行外源基因的诱导表达,可以减少温度对蛋白折叠的影响,获得高活性的蛋白^[13]。本实验的结果则显示,在 42℃ 的高温诱导下,大肠杆菌仍能合成大量的具有生物活性的解毒酶,这表明大肠杆菌合成的解毒酶在

较高温度时,仍能正常折叠,产生有生物活性的蛋白质。

3.2 解毒酶的解毒作用

有机磷化合物(包括 DDVP)的主要作用机制是抑制乙酰胆碱酯酶活性,使乙酰胆碱酯酶失去正常生理活性,导致乙酰胆碱的大量积累,引起神经中毒^[1]。实验一组没有出现明显的中毒症状,整个实验期间,实验鸡正常取食和饮水,说明解毒酶能阻止 DDVP 到达乙酰胆碱酯酶,去除 DDVP 的毒性,确保实验鸡的大脑中枢神经传导的功能。实验二组在喂食解毒酶后,中毒症状迅速减轻,没有表现迟发性神经毒性症状,说明解毒酶同时具有降解 DDVP 和复活乙酰胆碱酯酶的作用,其解毒作用可以是直接生理对抗,也可以是酶的重活化作用。

致谢 实验动物的处理得到了陈志强高级工程师的协助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] LENG X R(冷欣夫),TANG Z H(唐振华),WANG Y C(王荫长). Molecular Toxicology of Insecticides. In: Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance(杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性). Beijing: Chinese Agriculture Press, 1996, pp. 1~29
- [2] Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M *et al.* Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, **87**: 2574~2578
- [3] Mouches C, Pasteur N, Berge J B *et al.* Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, 1986, **233**: 778~780
- [4] Karunaratne S H P P, Hemingway J, Jayawardena K G I *et al.* Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistance and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 31124~31138
- [5] Roe R M, Hodgson E, Rose R L *et al.* Basic principles and rationale for the use of insect genes in bioremediation: esterase, phosphotriesterase, cytochrome P450 and epoxide hydrolase. *Rev Toxicol*. 1998, **2**: 169~178
- [6] Gordon R K, Feaster S R, Russell A J *et al.* Organophosphate skin decontamination using immobilized enzymes. *Chem Biol Interact*, 1999, **119-120**: 463~70
- [7] ZHANG Z Q(张智清), YAO L H(姚立红), HOU Y D(侯云德). Construction and application of a high level expression vector containing $P_{R}P_L$ promoter. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1990, **6**: 111~116
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1. 25~17. 35
- [9] Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F *et al.* Ellis Horwood Series in Gene Technology: Practical Isozyme Genetics. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988, p. 113
- [10] Lenormand T, Bourguet D, Guillemaud T *et al.* Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*, 1999, **400**: 861~864
- [11] Qiao C L, Marquine M, Pasteur N *et al.* A New esterase amplification involved in OP resistance in *Culex pipiens* mosquitoes

[12] Qiao C L ,Raymond M. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistance genes in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from America and China. -Heredity ,1995 ,74 :

339~345

[13] Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev ,1996 60 512~538

Cloning and High Level Expression of Mosquito Detoxifying Gene

XING Jian-Min QIAO Chuan-Ling* HUANG Jing LI Xuan JIA Xin-Dan LI Dian-Mo

(The State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents ,
Institute of Zoology ,Academia Sinica ,Beijing 100080 ,China)

Abstract The full-length cDNA of mosquito esterase B1 had been isolated and subcloned into pBV220. The recombinant vector pBV220B1 was constructed and transformed into *E. coli* DH5 α . A 60 kD protein was induced by 42°C and its expression was temperature-dependent. After 6h induction ,the target protein occupied 50% of the total protein. The expressed product existed in both inclusion body and soluble proteins in the cells. The amount of the soluble detoxifying enzyme increased along with the induction time. The data of detoxifying experiments indicated that the detoxifying enzyme in expression strain of *E. coli* can detoxified toxicity of organophosphate insecticides ,it showed a clear detoxifying affect on hens poisoned by organophosphate insecticides.

Key words *Culex quinquefasciatus* , esterase B1 gene cloning , high-level expression , detoxification , *E. coli*

Received October 13 2000

This work was supported by the National High Science and Technology Program(863) and the National Natural Science Foundation of China (39980034).

* Corresponding author. Tel 86-10-62553369 ; Fax 86-10-62553369 ; E-mail: qiaocl@panda. ioz. ac. cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals. im. ac. cn>