

褐飞虱细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 的原核表达及多克隆抗体的制备

孙海霞¹, 陈俊², 杨之帆^{1,*}

(1. 湖北大学生命科学学院, 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 武汉 430062;

2. 武汉科技大学化学工程与技术学院, 武汉 430081)

摘要: 【目的】细胞色素 P450 单加氧酶在昆虫生长发育和适应环境过程中发挥着重要功能。【方法】本研究克隆了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 的开放阅读框(不含信号肽编码序列部分), 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中实现了高效表达, 经 Ni-NTA 琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化得到了重组的 CYP4C62 蛋白。将该蛋白免疫日本大耳白兔 *Oryctolagus cuniculus* 雄兔, 制备了兔抗 CYP4C62 血清抗体。采用间接 ELISA 方法检测了血清抗体的效价; 并通过 Western 印迹杂交检测了该抗体的免疫学特异性。【结果】结果表明, 通过大肠杆菌表达出的 CYP4C62 蛋白相对分子量为 56 kD。间接 ELISA 法检测表明, 制备的兔抗 CYP4C62 抗体的效价达到 1:100 000。Western 印迹杂交证实, 该抗体既可与异源表达的 CYP4C62 蛋白特异性结合, 也可以与褐飞虱总蛋白中内源的 CYP4C62 特异性结合, 表明具有较好的免疫反应特异性。【结论】CYP4C62 多克隆抗体的成功制备, 为后续分析 CYP4C62 在褐飞虱各组织中的时空表达水平, 并通过免疫组织化学法定位分析该蛋白的组织、细胞及亚细胞分布规律, 及最终解析 CYP4C62 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 褐飞虱; 细胞色素 P450 基因; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体; 免疫特异性

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2014)06-0656-07

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cytochrome P450 gene *CYP4C62* from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

SUN Hai-Xia¹, CHEN Jun², YANG Zhi-Fan^{1,*} (1. College of Life Sciences, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. College of Chemical Engineering and Technology, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract: 【Aim】The cytochrome P450s are important metabolic enzymes in insects because of their involvement in the growth and development of insects and their adaptation to environments. 【Methods】In this study, we cloned the open reading frame (ORF, excluding the coding sequence for the N-terminal signal peptide) of *Nilaparvata lugens* P450 gene *CYP4C62* and expressed it in *Escherichia coli*. The recombinant protein was purified by Ni-NTA agarose gel affinity system. Polyclonal antibody of CYP4C62 was then generated by immunization of the Japanese white male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with the purified protein. The antibody titer was monitored by indirect ELISA. The immune specificity of the antibody was determined by Western blot hybridization. 【Results】The results showed that the relative molecular weight of the recombinant CYP4C62 protein is about 56 kD. The antibody titer was estimated as high as 1:100 000 dilution ratio detected by indirect ELISA. Western blotting analysis showed that the antibody could bind specifically both the heterogeneously expressed CYP4C62 protein and the endogenous CYP4C62 from *N. lugens*. 【Conclusion】This study lays a foundation for further investigation of CYP4C62 expression levels in various tissues of *N. lugens*, localization of the protein at tissue, cellular and subcellular levels by immunohistochemistry, and ultimately revealing its biological function.

Key words: *Nilaparvata lugens*; cytochrome P450 gene; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibody; immune specificity

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500328, 31071679, 31272050, 31301675)

作者简介: 孙海霞, 女, 1986年生, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究, E-mail: 102channel@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sailyangzhf@hubu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-02-10; 接受日期 Accepted: 2014-04-13

水稻是最重要的粮食作物之一,世界上约有一半以上的人口以稻米为主食(Watanabe and Kitagawa, 2000)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål. 是一种单食性害虫,只能在普通野生稻和水稻上取食和繁殖后代,生长周期短,繁殖能力强且具有远距离迁移习性,所以难以防治,常常给水稻生产带来巨大损失。长期以来防治褐飞虱主要采取化学方法。自 20 世纪 70 年代以来许多国家和地区都监测到褐飞虱对很多农药产生了抗性(蔡海林等, 2007; 庄家祥等, 2008)。人们普遍认可的防治褐飞虱的重要策略之一,就是培育、推广具有抗虫性的水稻新品种(陈峰等, 2008),但目前种植的水稻抗性较弱,加上褐飞虱在品种抗性胁迫下会转变成新的“生物型”,使得抗性水稻品种丧失抗性,并相继从生产中淘汰(Matteson, 2000)。

昆虫的细胞色素 P450 单加氧酶(简称 P450)在昆虫生长发育和适应环境过程中发挥着重要作用。人们通过研究昆虫细胞色素 P450 的功能、进化及多样性,加深对 P450 在昆虫适应宿主植物及参与杀虫剂抗性发生和发展规律方面的认识(Feyereisen, 2005; Scott, 1999)。本研究室此前对褐飞虱的 5 个 P450 基因(*CYP6AX1*, *CYP6AY1*, *CYP6CS1*, *CYP6CW1* 和 *CYP4CE1*)的研究表明,在若虫中这些 P450 基因均受抗性水稻的诱导,推测相应的 P450 单加氧酶的合成量会增加,从而增强褐飞虱代谢水稻中有毒次生物质的能力(Yang *et al.*, 2007; 杨之帆等, 2010; Yang *et al.*, 2011)。

有研究初步证实昆虫的某些 CYP4 家族基因受蜕皮激素的诱导并参与激素代谢,如海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的 P450 基因 *CYP4L8* 和 *CYP4M12* 以及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 P450 基因 *CYP4AC1*, *CYP4AC3*, *CYP4AD1* 及 *CYP4D1* 的表达均受到蜕皮激素的强烈抑制(Davies *et al.*, 2006)。Sutherland 等(1998)从太平洋折翅蠖 *Diploptera punctata* 咽侧体中克隆到 P450 基因 *CYP4C7*,并证实该基因与保幼激素的代谢相关。本实验室前期对褐飞虱的细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 进行了表达谱分析,结果表明,取食抗性水稻与感虫水稻后,该基因在表达水平上没有明显差异,而且通过 mRNA 原位杂交检测,发现褐飞虱取食抗性水稻后,该基因在中肠没有明显的表达水平变化,说明 *CYP4C62* 与抗性胁迫反应和有毒次生物质的解毒无关(张艳艳, 2009)。为了进一步了解 *CYP4C62* 的功能,我们拟通过原核表达系统表达

CYP4C62,制备其重组蛋白的多克隆抗体,为后续通过 Western 印迹杂交分析 *CYP4C62* 在褐飞虱不同组织中的表达水平,并通过免疫组化定位分析该蛋白的组织细胞学分布,及揭示 *CYP4C62* 在褐飞虱体内的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 生物材料和试剂

1.1.1 供试昆虫:褐飞虱 *N. lugens* 4 龄若虫取自实验室养殖的水稻中,环境条件为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度为 80%,光照周期为 16L:8D。

1.1.2 菌株、质粒载体及药品试剂:pET-23a 载体、*Escherichia coli* GOLD 及 *E. coli* BL21(DE3) 菌株均为本实验室保藏。PCR 试剂盒、限制性内切酶、*Ex Taq* DNA polymerase 和 pMD-18T 载体均为 TaKaRa 公司产品。TRIzol reagent 购自 Invitrogen 公司,弗氏佐剂购自 Sigma 公司,Western 印迹杂交所用发光试剂为碧云天生物技术研究所产品。HRP-羊抗兔 IgG 购自 ProteinTech Group 公司。其他生化试剂均为分析纯(A. R.)或以上级。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 引物设计与合成:根据已发表的褐飞虱 *CYP4C62* 的序列(GenBank 登录号为 163385.1),设计含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的特异性引物,用于扩增 *CYP4C62* 的开放阅读框(ORF)(不含信号肽编码序列)。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。正向引物序列为:5'-CCGGATCCATGCGGCGGATAAAAATAATCAACATG-3';反向引物序列为:5'-CCGCTCGAGCACCACCACCACCACCACAGACTGTGT TTTCTTTTCG-3'。

1.2.2 PCR 扩增反应:选取褐飞虱 4 龄若虫,用 TRIzol reagent 提取褐飞虱总 RNA,反转录获得 cDNA。以此 cDNA 为模板扩增 *CYP4C62* 部分序列。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 min,然后按照 94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 90 s,进行 30 次循环反应,最后于 72℃ 延伸 10 min。

1.3 重组蛋白表达

1.3.1 阳性克隆载体的构建及鉴定:经琼脂糖凝胶电泳分离并纯化回收目的 DNA 片段,用限制性内切酶消化纯化后的 DNA,再次回收目的 DNA,并与 pMD-18T 载体连接,转化 *E. coli* GOLD 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素的 LB 固体培养基,待菌落长出后,随机挑取 10 个菌落,经 PCR 扩增进行初步鉴

定,进一步提取阳性菌落的质粒并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定;将含正确重组质粒的阳性菌落送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3.2 表达载体的构建:用 *Bam*H I 和 *Xho* I 将 *CYP4C62* 的克隆序列从重组质粒中切下,纯化后定向连接到表达载体 pET-23a 上,将连接产物转化 *E. coli* GOLD 感受态细胞,从初步筛选的单菌落中提取质粒并进行酶切鉴定。

1.3.3 重组蛋白的表达:将表达质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) *plys* S 感受态细胞,挑选单菌落接种于 6 mL 含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6,取 1 mL 保留做菌种,其余 5 mL 培养物中加入 0.4 mmol/L IPTG,诱导 4 h 后离心收集细菌细胞。

1.4 SDS-PAGE 分析表达产物

将收集的细菌细胞悬浮于 PBS (pH 8.0) 缓冲液中,经超声破碎后离心,取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测。根据上清部分与沉淀部分中的蛋白含量,判断其表达形式。

1.5 表达条件的优化

1.5.1 IPTG 浓度的优化:改变 IPTG 的浓度,按照 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 的浓度梯度进行表达,收集菌体破碎后进行电泳检测,根据检测结果确定诱导表达的最适 IPTG 浓度。

1.5.2 诱导温度的优化:在最适的 IPTG 浓度下,选取 20, 25, 30 和 35 $^{\circ}$ C 温度梯度进行表达,收集菌体破碎后进行电泳检测,根据检测结果确定诱导表达的最适温度。

1.5.3 诱导时间的优化:在最适的 IPTG 浓度和最佳温度条件下,选取 2, 4, 6 和 8 h 时间梯度进行表达,收集菌体破碎后进行电泳检测,根据检测结果确定表达的最佳时间。

1.6 CYP4C62 包涵体蛋白的制备和纯化

1.6.1 CYP4C62 包涵体蛋白的制备:先将菌体小量培养过夜后,按 1:100 (v/v) 放大培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6,加入 IPTG 至浓度为 0.6 mmol/L,25 $^{\circ}$ C 下诱导培养 4 h。离心收集诱导表达的菌体,重悬于 PBS (pH 8.0) 中,冰浴中超声破碎 (超声功率为 30 W,时间为 7 min,间隔 60 s,反复操作 4 次),4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀 (包涵体)。

加入适当的包涵体洗涤液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 2 mol/L 尿素, 2% Triton X-100) 洗涤 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清,并按上述条件重复洗涤 1 次。再加入适当的

包涵体溶解液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 2% Triton X-100) 溶解 2 h, 期间在涡旋器上剧烈振荡 5 次, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清备用。

1.6.2 CYP4C62 蛋白的纯化:将溶解好的包涵体用孔径 0.45 μ m 的滤膜过滤后,与 Ni-NTA 琼脂糖凝胶充分混合后,填入层析柱,用包涵体纯化缓冲液进行洗脱。收集各部分洗脱液,经 SDS-PAGE、Western 印迹杂交法分析各部分洗脱液。

1.6.3 CYP4C62 纯化蛋白的透析与浓缩:将含蛋白浓度较高的洗脱液部分转入透析袋中,用 PBS (pH 8.0) 透析过夜,然后用 PEG 20000 浓缩,采用 Bradford 法 (Bradford *et al.*, 1976),以 BSA 作为标准品测定浓缩蛋白的含量。纯化好的蛋白置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 CYP4C62 多克隆抗体的制备

挑选 2 ~ 3 kg 的日本大耳白兔 *Oryctolagus cuniculus* 雄兔,通过腹部皮下多点注射纯化的蛋白进行免疫。首次免疫前,由耳缘静脉采血 0.5 ~ 1.0 mL 备用 (用于效价检测);取 0.3 mL (约 0.8 mg) 纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂振荡混合均匀,进行第 1 次接种;首次免疫 7 ~ 9 d 后,用同量的纯化蛋白进行第 2 次免疫;7 ~ 9 d 后进行第 3 次免疫。免疫 4 次后,从免疫的兔耳缘静脉取血 1.0 ~ 1.5 mL,分离血清,间接 ELISA 法检测免疫血清的效价。在最后一次免疫 6 ~ 7 d 后通过颈动脉取血,分离血清,置 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 CYP4C62 多克隆抗体的特性鉴定

1.8.1 效价测定:采用间接 ELISA 法。以纯化的 CYP4C62 重组蛋白 (0.8 μ g/mL) 包被 ELISA 板,每孔加入 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜,于 37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,用 PBST (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g NaHPO₄ · 12H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, 0.05% Tween-20, pH 7.4) 洗涤 3 次后,加入 5% BSA 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。去除上清,依次加入不同稀释比例的兔抗血清、正常兔血清做对照,1:5 000 的 HRP-羊抗兔 IgG (37 $^{\circ}$ C 放置 2 h, PBST 洗 3 次)。最后加 TMB 底物液显色,终止反应后,酶标仪测定 A₄₅₀ 值。

1.8.2 特异性鉴定:采用 Western 印迹杂交法。CYP4C62 重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后,转移至硝酸纤维素滤膜上,以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭滤膜后,依次用 1:5 000 (v/v) 的 CYP4C62 抗兔血清及 1:3 000 (v/v) 的 HRP-羊抗兔 IgG 孵育。最后加入化学发光试剂 ECL PLUS 后,滤膜覆盖 X 光片进行

曝光,最后对 X 光片进行显影、定影。

1.8.3 验证 CYP4C62 在褐飞虱中的表达: 褐飞虱总蛋白采用液氮研磨、RIAP 裂解液裂解、丙酮沉淀法制得。以此提取的总蛋白作为抗原, CYP4C62 多克隆抗体作为抗体, 采用 Western 印迹杂交法验证 CYP4C62 抗体与褐飞虱内源 CYP4C62 的结合特异性。

2 结果

2.1 褐飞虱细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 目的基因片段的扩增及序列分析

以褐飞虱 4 龄若虫为起始材料, 用 TRIzol reagent 提取总 RNA, 将总 RNA 反转录成 cDNA 并用作模板, 用 *CYP4C62* 特异性引物进行扩增, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 呈现一条清晰、单一、大小与预期相吻合的 DNA 条带, 大小约为 1 450 bp(图 1)。用 M13(+) 和 M13(-) 引物进行双向测序, 将测序结果与已登录的褐飞虱 *CYP4C62* 序列进行比对, 挑选无突变的序列作为模板。

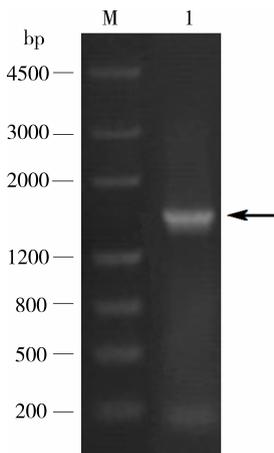


图 1 *CYP4C62* PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR product of *CYP4C62* by agarose gel electrophoresis

M: DNA Marker III; 1: PCR 产物 PCR product. 箭头指示为经琼脂糖凝胶电泳分离的 *CYP4C62* 扩增片段。The arrow indicates the PCR product of *CYP4C62* separated on agarose gel.

2.2 表达载体的构建

经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的基因片段, 亚克隆到 pET-23a 载体上, 转化 *E. coli* Gold 感受态细胞, 挑选菌落抽提质粒并进行酶切鉴定。如图 2 所示, 正确的重组质粒酶切后呈现两条清晰的条带, 一条带为 *CYP4C62* 片段, 另一条带为 pET-23a 载体片段约 3 600 bp。

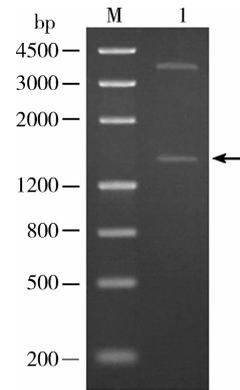


图 2 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定 pET-*CYP4C62* 重组质粒

Fig. 2 pET-*CYP4C62* recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I

M: DNA Marker III; 1: pET-*CYP4C62* 重组质粒酶切产物 pET-*CYP4C62* recombinant plasmid digested products. 箭头指示酶切释放的 *CYP4C62* 的片段。The arrow indicates the released *CYP4C62* fragment.

2.3 重组蛋白表达的鉴定

重组克隆菌经 IPTG 诱导后, 表达产物经 SDS-PAGE 分析表明在 56 kD 处出现了一条新蛋白带, 其大小与预期的重组蛋白带大小相符合, 只是显示上清中表达量不明显(图 3: A), 而沉淀中表达量较高(图 3: B), 转入空载体的菌中诱导后未见此带(图 3)。

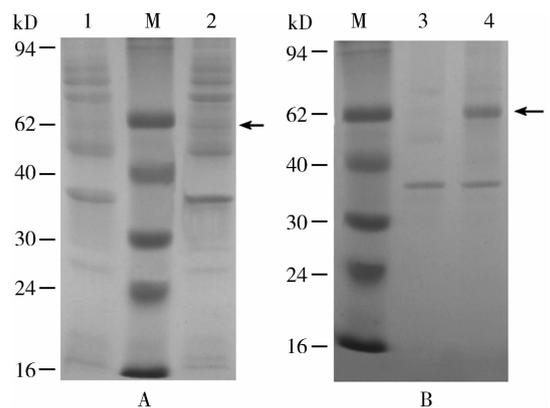


图 3 *CYP4C62* 蛋白的初步表达鉴定

Fig. 3 Detection of the expressed *CYP4C62* protein

A: 诱导后破菌上清 SDS-PAGE 电泳图 Supernatant of lysate after induction detected by SDS-PAGE electrophoresis. M: Blue Plus Protein Marker; 1: 转化 pET-23a 载体的转化菌 pET-23a transformant after induction; 2: 转化 *CYP4C62* 重组质粒的转化菌 *CYP4C62* transformant after induction. B: 诱导后破菌沉淀 SDS-PAGE 电泳图 Precipitate of lysate after induction detected by SDS-PAGE electrophoresis. M: Blue Plus Protein Marker; 3: 转化 pET-23a 载体的转化菌 pET-23a transformant after induction; 4: 转化 *CYP4C62* 重组质粒的转化菌 *CYP4C62* transformant after induction. 箭头指示表达的 *CYP4C62* 蛋白。The arrow indicates the expressed *CYP4C62* protein.

2.4 表达条件的优化

2.4.1 IPTG 浓度:用不同浓度的 IPTG 诱导,在未加入 IPTG 的对照组中有少量的 CYP4C62 蛋白表达,随着 IPTG 加入量的增加,蛋白的表达量也明显增加。0.6 mmol/L 的 IPTG 就可以使 CYP4C62 表达量最大化,继续提高 IPTG 的浓度对提高蛋白的表达量无明显作用(图 4)。

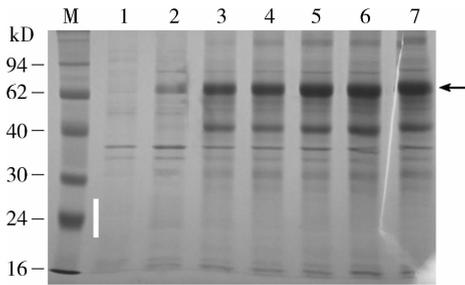


图 4 IPTG 浓度对 CYP4C62 蛋白表达量的影响

Fig. 4 Impact of IPTG concentration on the expression of CYP4C62

M: Blue Plus Protein Marker; 1: pET-23a 载体转化菌诱导后破菌沉淀 Precipitate of lysate from pET-23a transformant after induction; 2-7: IPTG 浓度分别为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 时, CYP4C62 重组质粒转化菌诱导后破菌沉淀 Precipitates of lysate from CYP4C62 transformant by IPTG induction at the concentration of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L, respectively. 箭头指示不同浓度 IPTG 诱导的 CYP4C62 蛋白。The arrow indicates the expressed CYP4C62 protein induced by different concentration of IPTG.

2.4.2 诱导温度:在 0.6 mmol/L 的 IPTG 浓度下,随着诱导温度的升高,上清中蛋白表达量无明显变化(结果未显示),而沉淀中蛋白的表达量在 25℃ 就有明显提高,此时杂蛋白量也相对较少,有利于后续纯化(图 5)。

2.4.3 诱导时间:在最适 IPTG 浓度和温度下,随着诱导时间的延长,CYP4C62 的表达量在一定时间内有所增加,诱导 4 h 后,继续延长诱导时间对提高蛋白的表达无明显作用(图 6)。

通过对培养温度、IPTG 的浓度及培养时间的探索得出最佳表达条件为:温度 25℃, IPTG 浓度 0.6 mmol/L, 诱导时间 4 h。

2.5 包涵体蛋白的制备

将诱导好的菌体破细胞后,收集沉淀得到包涵体,通过包涵体洗涤液对包涵体洗涤可以除去部分杂蛋白(结果未显示),通过包涵体溶解液溶解包涵体,可以溶解大量蛋白,并且随着溶解时间的延长,目的蛋白的溶解量也相应增加。

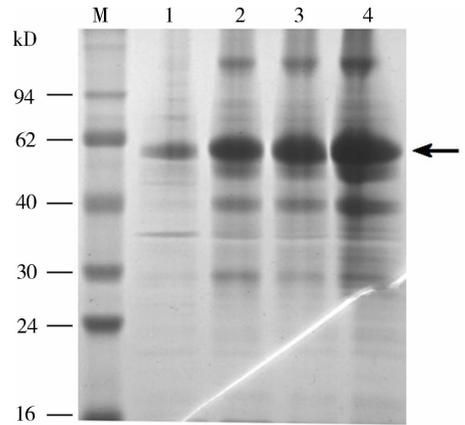


图 5 诱导温度对 CYP4C62 蛋白表达的影响

Fig. 5 Impact of induction temperature on the expression of CYP4C62

M: Blue Plus Protein Marker; 1-4: 加入 0.6 mmol/L IPTG 分别在 20, 25, 30 和 35℃ 下诱导 4 h, CYP4C62 重组质粒转化菌破菌沉淀 Precipitates of lysate from CYP4C62 transformant by induction with 0.6 mmol/L IPTG at 20, 25, 30 and 35℃, respectively, for 4 h. 箭头指示不同温度条件下诱导的 CYP4C62 蛋白。The arrow indicates the expressed CYP4C62 protein induced under different temperatures.

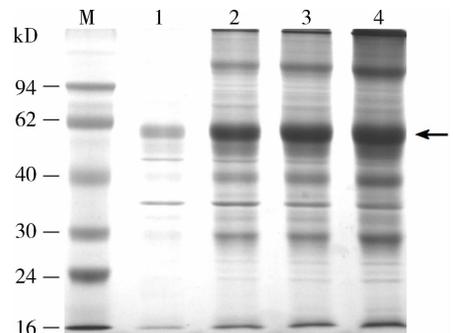


图 6 诱导时间对 CYP4C62 蛋白表达的影响

Fig. 6 Impact of induction time on the expression of CYP4C62 M: Blue Plus Protein Marker; 1-4: 加入 0.6 mmol/L IPTG 25℃ 下分别诱导 2, 4, 6 和 8 h, CYP4C62 重组质粒转化菌破菌沉淀 Precipitates of lysate from CYP4C62 transformant by induction with 0.6 mmol/L IPTG at 25℃ for 2, 4, 6 and 8 h, respectively. 箭头指示诱导不同时间(h) CYP4C62 蛋白的表达水平。The arrow indicates the expression CYP4C62 protein induced for different hours.

2.6 CYP4C62 的纯化鉴定

在制备好的包涵体溶解液中加入 0.1 mmol/L DTT, 再加入层析柱中, 收集流出液, 反复上样 3 次。洗脱液含有 0.1 mmol/L 的 DTT, 分部收集流出液, 经 SDS-PAGE 检测洗脱结果。结果显示 20 mmol/L 咪唑洗脱下单一的蛋白(图 7: A); 另一方面由于载体上有组氨酸标签, 利用组氨酸标签进行 Western 印迹杂交分析也可检测纯化的蛋白是不是 CYP4C62 重组蛋白, 结果显示纯化的蛋白的确为 CYP4C62 蛋白(图 7: B)。收集纯化蛋白, PBS (pH

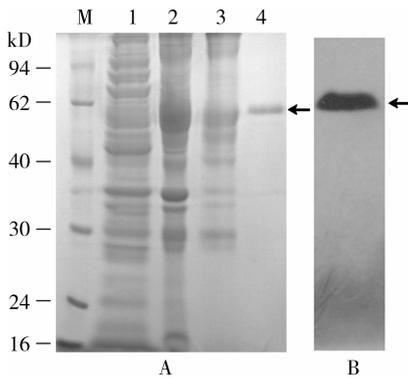


图7 重组蛋白纯化检测

Fig. 7 Detection of the purified recombinant protein

A: SDS-PAGE 电泳图 Detection of purified CYP4C62 by SDS-PAGE electrophoresis; M: Blue Plus Protein Marker; 1: CYP4C62 粗蛋白上清 Supernatant of CYP4C62 crude protein; 2: CYP4C62 粗蛋白沉淀 Precipitate of CYP4C62 crude protein; 3: 包涵体溶解液 The dissolved liquid of inclusion bodies; 4: 纯化蛋白 Purified CYP4C62 protein. B: CYP4C62 纯化蛋白 Western 印迹杂交检测图 Detection of purified CYP4C62 protein by Western blot hybridization. 箭头指示经镍柱纯化的 CYP4C62 蛋白。The arrow indicates the CYP4C62 protein purified by Ni-NTA agarose gel affinity.

8.0) 透析过夜, PEG 20000 浓缩, Bradford 法测定蛋白含量。纯化的蛋白于 -20°C 保存备用。

2.7 CYP4C62 多克隆抗体的鉴定

2.7.1 抗体效价: 日本大耳白雄兔经 4 次免疫后, 分别用间接 ELISA 法检测血清抗体的效价, 结果表明, 随免疫次数的增加抗体的效价逐渐上升, 终效价可达 1:100 000。

2.7.2 特异性: 用制备的 CYP4C62 多克隆抗体分别对 *E. coli* 细胞表达的异源 CYP4C62 粗蛋白和 CYP4C62 纯化蛋白作 Western 印迹杂交分析, 结果显示在预期大小的位置呈现特异性的结合条带(图 8: A, B), 表明所制备的抗体具有较好的免疫学活性。

2.7.3 褐飞虱中 CYP4C62 的表达验证: 进一步用制备的 CYP4C62 抗兔血清与褐飞虱整虫提取的总蛋白进行 Western 印迹杂交, 结果也显示出特异性的条带, 且条带非常清晰(图 8: C, 箭头所示), 说明制备的 CYP4C62 多克隆抗体也可以与内源的 CYP4C62 特异性结合。

3 讨论

真核生物的许多蛋白是分泌性蛋白或膜锚定蛋白, 要通过原核细胞高水平表达这些蛋白, 在设计外源基因表达盒时, 必须从成熟蛋白质编码序列开始 (Wilson, 2007)。因此在本研究中去掉了 CYP4C62

5'端的信号肽编码序列, 以期实现高水平表达, 获得足够的 CYP4C62 蛋白。然而实验过程中 CYP4C62 并没有大量出现在大肠杆菌细胞裂解液的上清部分, 而是主要以包涵体的形式存在于沉淀中, 改变诱

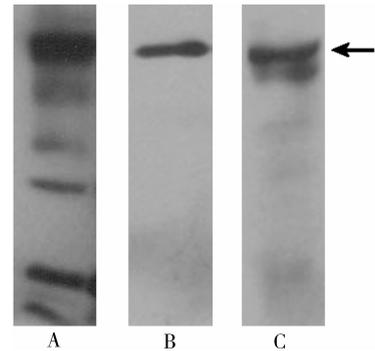


图8 CYP4C62 多克隆抗体的免疫特异性检测

Fig. 8 Detection of the immune specificity of CYP4C62 polyclonal antibody

A: CYP4C62 粗蛋白 Western 印迹杂交结果 Detection of CYP4C62 in crude protein from CYP4C62 transformant by Western blot hybridization; B: CYP4C62 纯化蛋白 Western 印迹杂交结果 Detection of purified CYP4C62 from CYP4C62 transformant; C: 褐飞虱整虫总蛋白中的内源 CYP4C62 的检测 Detection of endogenous CYP4C62 in the total protein from *Nilaparvata lugens*. 箭头指示用制备的 CYP4C62 多克隆抗体检测到的 CYP4C62 蛋白条带。The arrow indicates the CYP4C62 protein detected by using the prepared CYP4C62 polyclonal antibody.

导条件甚至采用低温 (4°C) 仍无法提高上清中的蛋白含量。许多通过大肠杆菌细胞异源表达的蛋白都存在这种现象 (Baneyx, 1999)。

设计引物时, 在对应蛋白 C 端的引物的 5' 末端另加了 6 个组氨酸 (His) 密码, 期望增加重组蛋白与 Ni 柱的结合能力, 提高回收率。表达后对上清部分进行纯化, 但并未分离到 CYP4C62 蛋白, 这可能与表达产物大量形成包涵体有关。

虽然包涵体蛋白无生物活性, 但对于制备多克隆抗体无影响。此外, 由于包涵体表达量大, 可以为纯化目的蛋白带来很大的方便, 所以实验中采用 CYP4C62 包涵体纯化蛋白。在纯化过程中添加 0.1 mol/L DTT 成功纯化到单一的目的蛋白, 这是因为 DTT 可以打开蛋白二硫键有利于蛋白基团的暴露 (安宇等, 2007), 但是高浓度的 DTT 对 Ni 柱有损伤, 应尽量避免使用。

在前期工作中对 CYP4C61 进行了半定量研究表明, CYP4C61 主要在脂肪体中表达, 原位杂交结果表明 CYP4C61 在中肠中无表达, 说明该基因在褐飞虱适应环境及解毒中不起作用, 可能参与内源物质的代谢 (刘晓黎, 2010)。也有文献证实, 昆虫的

P450 家族的成员参与脂肪酸、激素等内源物质的代谢。那么作为 CYP4 家族中与 CYP4C61 同一分支的 CYP4C62 是否也可能参与体内的内源物质代谢, 尚有待进一步的研究。

后续可以开展的工作有: 利用所制备的多克隆抗体检测 CYP4C62 在褐飞虱不同组织中的表达, 采用免疫组织化学的方法从蛋白水平对 CYP4C62 进行细胞定位。另一方面由于细胞色素 P450 是膜结合蛋白, 不稳定, 直接从昆虫中分离 P450, 再重组有活性的酶系来研究其功能具有相当的难度(郑明奇等, 2005), 可以通过杆状病毒表达系统进行异源表达, 重建 P450 代谢酶系, 从而确定 CYP4C62 的天然代谢底物。

本研究以纯化的 CYP4C62 重组蛋白免疫日本大耳白雄兔, 制备了 CYP4C62 多克隆抗体。所获抗血清经间接 ELISA 法检测, 其效价达到 1:100 000 以上; Western 印迹杂交证实该抗体具有良好的特异性。作为阶段性成果, 这些结果为后续深入研究 CYP4C62 的生物学功能奠定了基础, 期望能为人们了解褐飞虱的生理生化和生长发育、寻找科学防治褐飞虱的新策略提供一定的理论参考。

参考文献 (References)

- An Y, Li J, Li SX, Zhao J, Fan LQ, Yuan QS, 2007. Research on recombinant carboxypeptidase B and solubility of its inclusion body. *Food and Drug*, (10A): 1–5. [安宇, 李节, 李素霞, 赵健, 范立强, 袁勤生, 2007. 重组羧肽酶 B 及其包涵体溶解性的研究. *食品与药品*, (10A): 1–5]
- Baneyx F, 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 411–421.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Cai HL, Bo LY, Zhou XM, Huang C, 2007. Research on insecticide resistance of *Nilaparvata lugens*. *Acta Agric. Jiangxi*, 19(4): 58–61. [蔡海林, 柏连阳, 周小毛, 黄灿, 2007. 褐飞虱抗药性研究进展. *江西农业学报*, 19(4): 58–61]
- Chen F, Fu Q, Luo J, Gui LY, 2008. Progress in research of rice variety resistance to *Nilaparvata lugens* and virulence variation of *Nilaparvata lugens*. *J. Yangtze Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 5(1): 5–10. [陈峰, 傅强, 罗举, 桂连友, 2008. 水稻品种对褐飞虱的抗性及其致病性变异研究进展. *长江大学学报(自然科学版)*, 5(1): 5–10]
- Davies L, Williams DR, Aguiar-Santana IA, Pedersen J, Turner PC, Rees HH, 2006. Expression and down-regulation of cytochrome P450 genes of the CYP4 family by ecdysteroid agonists in *Spodoptera littoralis* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 801–807.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam. 1–77.
- Liu XL, 2010. Molecular Cloning and Expression of Two Novel P450 Genes, CYP4C61 and CYP6CW1 in *Nilaparvata lugens*. MSc Thesis, Hubei University, Wuhan. [刘晓黎, 2010. 褐飞虱细胞色素 P450 两个新基因 CYP4C61 和 CYP6CW1 的克隆及表达研究. 武汉: 湖北大学硕士学位论文]
- Matteson PC, 2000. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 549–574.
- Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757–777.
- Sutherland TD, Unnithan GC, Andersen JF, Evans PH, Muratalive MB, Szabo LZ, Mash EA, Bowers WS, Feyereisen R, 1998. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12884–12889.
- Watanabe T, Kitagawa H, 2000. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Econ. Entomol.*, 93: 1192–1198.
- Wilson CJ, Zhan H, Swint-Kruse L, Matthews KS, 2007. The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64: 3–16.
- Yang Z, Yang H, He G, 2007. Cloning and characterization of two cytochrome P450 CYP6AX1 and CYP6AY1 cDNAs from *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 64: 88–99.
- Yang ZF, Liu XL, Zhang YY, 2010. Molecular cloning and expression profiling of cytochrome P450 monooxygenase gene CYP4CE1 in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(3): 257–268. [杨之帆, 刘晓黎, 张艳艳, 2010. 褐飞虱细胞色素 P450 单加氧酶基因 CYP4CE1 的克隆及表达谱. *昆虫学报*, 53(3): 257–268]
- Yang ZF, Zhang YY, Liu XL, Wang XX, 2011. Two novel cytochrome P450 genes CYP6CS1 and CYP6CW1 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae): cDNA cloning and induction by host resistant rice. *Bull. Entomol. Res.*, 101(1): 73–80.
- Zhang YY, 2009. Cloning and Expression Profile of P450 Genes from CYP4 and CYP6 Families in *Nilaparvata lugens*. MSc Thesis, Hubei University, Wuhan. [张艳艳, 2009. 褐飞虱 CYP4、6 家族 P450 基因的克隆及表达研究. 武汉: 湖北大学硕士学位论文]
- Zheng MQ, Zhang WJ, Qiu XH, Leng XF, 2005. Partial purification of microsomal P450s from midgut of the bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(3): 359–364. [郑明奇, 张文吉, 邱星辉, 冷欣夫, 2005. 棉铃虫中肠微粒体 P450 的分离纯化. *昆虫学报*, 48(3): 359–364]
- Zhuang JX, Wang KC, Zhong LS, 2008. Field efficacy test of several pesticides for controlling *Nilaparvata lugens*. *Pestic. Sci. Adm.*, 29(4): 26–27. [庄家祥, 王开春, 钟立赛, 2008. 几种药剂防治褐飞虱田间药效试验. *农药科学与管理*, 29(4): 26–27]