

朱砂叶螨乙酰胆碱酯酶的原核表达及其活性分析*

彭博^{1,3} 卜春亚^{2,3**} 师光禄^{2,3} 李金玲^{1,3} 冯晓姣^{1,3} 韩晶玉^{1,3} 高品^{1,3} 王有年^{2,3}

¹北京农学院植物科学技术学院 北京 102206

²北京农学院生物科学与工程学院 北京 102206

³北京农学院农业部都市农业(北方)重点开放实验室 北京 102206

摘要 乙酰胆碱酯酶(AChE)在神经信号传导过程中起重要作用,是氨基甲酸酯类和有机磷类农药的主要作用靶标。对朱砂叶螨AChE进行体外表达和纯化,并分析其活性。将朱砂叶螨 ace 基因序列插入到原核高效表达载体pET-30a中,构建表达载体pET-30a/ ace ,转入表达菌株*Escherichia coli* BL21(DE3)中, IPTG诱导高效表达;镍柱纯化目的蛋白,经SDS-PAGE和Western Blot鉴定目的蛋白;以纯化的螨AChE为抗原制备抗螨AChE特异性抗体;改良的Ellman法测定螨AChE活性。结果获得了相对分子质量(M_r)约为 68×10^3 的较高纯度的螨AChE蛋白,检测大部分为可溶性表达,酶活检测具有乙酰胆碱酯酶活性,并制备了 10^7 效价的抗螨AChE特异性抗体。采用重组AChE($IC_{50} = 5.4 \text{ mmol/L}$)检测毒扁豆碱抑制活性比螨粗酶液($IC_{50} = 58.7 \text{ mmol/L}$)灵敏度提高11倍。本研究构建了螨AChE体外高效表达载体并获得了具有较好活性的重组螨AChE,可为抗AChE杀螨剂的体外高通量筛选和以AChE为靶标的农药残留检测奠定基础。图8表1 参19

关键词 朱砂叶螨;乙酰胆碱酯酶;原核表达;纯化;半数抑制浓度

CLC Q786 : S433.7

In vitro expression and activity analysis of acetylcholinesterase (AChE) of *Tetranychus cinnabarinus**

PENG Bo^{1,3}, BU Chunya^{2,3**}, SHI Guanglu^{2,3}, LI Jinling^{1,3}, FENG Xiaojiao^{1,3}, HAN Jingyu^{1,3}, GAO Pin^{1,3} & WANG Younian^{2,3}

¹Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

²College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

³Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture P. R. China, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract Acetylcholinesterase (AChE) plays an important role in the process of neural conduction, and is the major target of organophosphate and carbamate insecticides. In order to characterize *Tetranychus cinnabarinus* AChE, we studied the *in vitro* expression and purification of AChE of *T. cinnabarinus*, and determined its activity and sensitivity to physostigmine. The recombinant plasmid pET-30a/ ace was constructed by subcloning the AChE gene into pET-30a. The expression of AChE in *E. coli* BL21 (DE3) was detected by SDS-PAGE and Western Blotting. Then the AChE recombinant protein was purified by Ni-NTA column. The activity of AChE was assayed by the improved Ellman method. The pET expression vector of *T. cinnabarinus* AChE was constructed, and high quality of the mite recombinant AChE protein was obtained with a molecular weight (M_r) of 68×10^3 detected by SDS-PAGE and Western Blotting. The recombinant AChE protein had AChE activity, and the specific AChE antibody was obtained. Furthermore, physostigmine was found to be much more sensitive to recombinant AChE protein ($IC_{50} = 5.4 \text{ mmol/L}$) than mite crude extracts ($IC_{50} = 58.7 \text{ mmol/L}$). The high quality of AChE recombinant protein obtained in this study can be used for screening acetylcholinesterase inhibitors and detecting anti-AChE insecticide residues.

Keywords *Tetranychus cinnabarinus*; acetylcholinesterase (AChE); prokaryotic expression; purification; half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

收稿日期 Received: 2014-08-04 接受日期 Accepted: 2014-10-11

*国家自然科学基金项目(31200483)、北京市自然科学基金项目(6122005)、教育部科学技术重点研究项目(212001)、北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201210020001)和北京市教育委员会平台项目(KCT2014001)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200483), the Beijing Natural Science Foundation (6122005), the Key Project of Chinese Ministry of Education (212001), the Program of Beijing Municipal Commission of Education (KM201210020001), and the Platform Construction Program of Beijing Municipal Commission of Education (KCT2014001)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: buchunya@163.com)

朱砂叶螨 (*Tetranychus cinnabarinus*) 是蛛形纲蜱螨目叶螨科的一种多食性害螨^[1], 又名红蜘蛛、棉叶螨、棉红蜘蛛。在我国各地都有分布, 是农作物生产上的主要害螨之一^[2]。朱砂叶螨繁殖能力强, 世代周期短, 在短时间里能够迅速形成一定数量的种群, 扩散快, 它们以植株汁液为食物来源, 造成植物组织的机械损伤, 严重危害了我国农作物, 给农业生产造成了巨大的损失^[3-4]。随着杀虫剂广泛开发和应用, 螨类抗药性已成为农业生产的重大问题, 国内外的报道也越来越多。

1943年乙酰胆碱酯酶的名字首次被Korun提出^[5], 乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7) 是一种丝氨酸水解酶, 其“经典功能”是在神经元和神经肌肉接头处快速水解神经递质乙酰胆碱 (Acetylcholine, ACh), 使ACh对突触后膜的兴奋作用终止, 以保证神经信号在生物体内正常传递; “非经典功能”包括神经突触的生成、细胞增殖、细胞凋亡和细胞黏附等与神经冲动传递无关的功能^[6]。AChE是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标, 活性位点丝氨酸被磷酸化和氨基甲酰化后, 神经冲动的正常传导功能被阻断, 从而导致昆虫的死亡。近几年来, 美国环境保护协会提出, 一些抗乙酰胆碱酯酶的杀虫剂会进入胎儿和儿童脑部, 破坏正在发育中的神经系统, 有研究表明有机磷农药对胎儿和儿童的生长发育产生影响, 有些影响甚至持续终生^[7-8]。

毒扁豆碱又名依色林 (Eserine), 是豆科植物毒扁豆种子中主要的生物碱, 是一种非选择性可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 也是最先发现的抗胆碱酯酶药物, 毒扁豆碱可以抑制G1和G4 AChE的形成^[9]。毒扁豆碱氨基甲酰部分和胺基部分与AChE的酯解部分结合, 发挥乙酰胆碱酯酶抑制剂的作用^[10]。当AChE与ACh的作用中, 毒扁豆碱作为底物时, 反应的中间体氨基甲酸酯水解变慢, 氨基甲酸基影响水解速率, 而氨基甲酸酯形式的AChE螯合作用, 从而阻止ACh进一步水解^[11]。

随着人们对环境保护的意识不断加强, 在倡导可持续发展农业的今天, 对人畜无害的选择性杀虫剂的研究和开发尤为迫切。利用朱砂叶螨乙酰胆碱酯酶作为靶标, 建立快速筛选杀螨活性物质的方法对农产品优质生态安全有长远的发展前景。目前研究主要采用粗酶液来进行活性检测, 粗酶液中的杂蛋白对研究结果有着不同程度的影响。本研究拟通过构建原核表达载体pET-30a/*ace*, 实现AChE在大肠杆菌中的表达, 获得高纯度的朱砂叶螨乙酰胆碱酯酶, 可为进一步将AChE应用于有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测提供依据, 同时为研制以螨特有的AChE保守活性位点为靶标的新型选择性杀虫剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌株和载体: *Escherichia coli* DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; pET-30a由本实验室保存。

(2) 朱砂叶螨: 室内饲养的敏感品系, 温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度RH = (50 $\pm$ 10)%, 光照L:D = 18 h:6 h。

(3) 主要试剂: 限制性内切酶 (*EcoR* I 和 *Xho* I) 、Ex

Taq酶、dNTP、DNA Marker购自Takara公司, 蛋白Marker、Efficient Chemiluminescence Kit购自Genview公司, HRP标记山羊抗兔IgG (H+L) 购自鼎国公司, Ni-NTA购自武汉晶诚生物公司, BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据本实验室向GenBank提交的朱砂叶螨*ace*全基因序列^[12] (GenBank登录号: AGI96546.1) 去除信号肽, 设计带有*EcoR* I 酶切位点的上游引物 (*ace*-F) 5'-CGGAATTCAATGTTTCTCCTCCGCCTT-3' 和带有*Xho* I 酶切位点的下游引物 (*ace*-R) 5'-CCGCTCGAGTTACCTTAAGCTAGGTAAG-3', 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.2.2 目的基因的扩增 以实验室克隆保存的T/*ace*质粒为模板, *ace*-F和*ace*-R为引物进行PCR扩增, PCR扩增50 μL 体系如表1所示, PCR扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离检测, 胶回收、纯化得到带有双酶切位点的*ace* DNA序列。

表1 *ace*基因PCR扩增体系

Table 1 PCR reaction system of *ace* gene

成分 Component	$V/\mu\text{L}$
10 $\times$ Buffer	5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4
dNTP (2.5 mmol/L)	4
cDNA	0.5
Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1
H ₂ O	34.5
Ex-Taq (5 u/ μL)	0.25
总量 Total	50

1.2.3 pET-30a/*ace*表达载体的构建 用限制性内切酶*EcoR* I 和*Xho* I 消化PCR产物, 回收目的片段, 与经相同酶双酶切的pET-30a载体连接, 产物转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素的LB平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养16 h, 挑单菌落, 提取质粒, 进行*EcoR* I/*Xho* I 双酶切鉴定。鉴定正确的载体由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序, 测序正确的重组质粒命名为pET-30a/*ace*。

1.2.4 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达 pET-30a/*ace*质粒转化*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落, 提取质粒进行双酶切鉴定, 获得含有重组质粒的表达菌株。将阳性菌株划线培养, 挑取单菌落于3 mL 含有卡那霉素的LB培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min培养7 h; 随后取100 μL 于10 mL含有卡那霉素的LB培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min培养20 h; 随后取10 mL于90 mL含有卡那霉素的LB培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min震荡培养至OD_{600 nm}值约为0.6-0.8; 将100 mL培养基培养液分成2份, 一份加入IPTG至终浓度为1 mmol/L, 另一份不加IPTG作为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min震荡培养, 0 h、2 h、5 h、6 h、7 h、8 h、10 h和21 h分别取1 mL全菌液进行12%分离胶和5%浓缩胶的SDS-PAGE电泳分析。

1.2.5 目的蛋白的可溶性分析和纯化 在摸索重组质粒诱导表达条件的基础上, 选取诱导表达量最高的7 h作为最终的

诱导表达时间. 将含有pET-30a/ace质粒的*E. coli* BL21 (DE3) 菌株划线培养, 挑单菌落于10 mL含有卡那霉素的LB培养基中, 37 ℃, 180 r/min培养8 h, 培养的10 mL菌液全部加入到1 L含卡那霉素的LB培养基中扩大培养, 37 ℃, 180 r/min培养至OD_{600 nm}值约为0.6-0.8, 取1 mL菌液留样; 于1 L菌液中加入IPTG至终浓度为1 mmol/L, 28 ℃, 120 r/min震荡培养7 h, 取1 mL菌液留样, 其余菌液15 000 r/min离心8 min, 弃上清, 收集菌体于-80 ℃保存.

诱导表达后收集的菌块用结合缓冲液A (10 mmol/L Na₂HPO₄、1.8 mmol/L KH₂PO₄、140 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl, pH 8.0) 洗涤一次, 沉淀用30 mL裂解缓冲液 (结合缓冲液A 30 mL、1 mg/mL Leupetin 151 μL、1 mg/mL Aprotin 151 μL、1 mg/mL DNase 151 μL、1 mmol/L PMSF) 重悬, 加入1.65 mL 10 mg/mL溶菌酶和10% TritonX-100于冰上静置20 min, 期间不断搅拌. 400 W功率下, 每个循环超声5 s, 冷却3 s, 共180个循环破碎菌体; 4 ℃ 8 000 r/min离心35 min, 收集上清, 沉淀和上清分别留样.

按照纯泰®Ni-NTA说明书, 在4 ℃条件下纯化蛋白. 将收集的上清加至已平衡的5 mL Ni-NTA中, 加入10 mL结合缓冲液A, 颠倒混匀2 h后自然沉降, 上清留样后丢弃; 将结合了目的蛋白的Ni-NTA灌入层析柱中, 用30 mL结合缓冲液A洗去未结合蛋白; 用50 mL 50 mmol/L咪唑洗脱缓冲液洗去与Ni-NTA非特异结合蛋白, 电泳留样; 最后加入25 mL 250 mmol/L咪唑洗脱缓冲液, 每管收集1 mL, 测定OD_{280 nm}值, 保留流出峰.

1.2.6 纯化产物的超滤浓缩 按照Amicon® Ultra-15离心过滤器使用方法, 把流出峰用50 mmol/L pH 8.0的Tris-HCl置换250 mmmol/L咪唑洗脱缓冲液, 并浓缩成目的蛋白溶液, 于-80 ℃保存.

1.2.7 抗体制备和目的蛋白的Western Blot分析 将纯化的AChE作为抗原制备兔源抗体, 用于Western Blot检测的一抗. 选取生理指标正常的新西兰大白兔两只, 免疫前耳缘静脉采集1 mL血液, 4 ℃放置过夜, 6 000 r/min离心5 min, 收集血清为阴性对照, -20 ℃保存备用; 首次免疫将等体积的抗原与弗氏完全佐剂充分乳化后, 颈部皮肤内多点注射, 每只新西兰大白兔免疫剂量为500 μg蛋白; 第二次免疫, 首免两周后, 将等体积的抗原和弗氏不完全佐剂充分乳化后, 颈部皮肤皮内多点注射, 每只免疫剂量为250 μg蛋白; 第3次免疫, 二免两周后, 直接颈部皮肤皮内多点注射重组AChE蛋白. 三免后兔耳缘静脉采血并分离血清, 利用间接ELISA法检测血清中多抗的效价, 最后用60 mL无菌注射器心脏采集50 mL的血液, 4 ℃放置过夜, 6 000 r/min离心15 min, 收集血清, 得到朱砂叶螭AChE兔源抗体.

取纯化的AChE进行SDS-PAGE电泳后, 以70 V恒压电转110 min到硝酸纤维素膜上, 用5%脱脂奶粉封闭液4 ℃封闭过夜, TBST洗涤后加入制备的兔源AChE抗体 (1:1 000 000稀释), 37 ℃孵育1 h, TBST充分洗涤后加入HRP标记山羊抗兔IgG (1:10 000稀释), 37 ℃孵育40 min, TBST洗涤后用ECL化学发光试剂盒进行检测, 使用化学发光仪进行拍照.

1.2.8 BCA蛋白定量和酶活力测定 蛋白定量严格按照Thermo Scientific公司试剂盒说明书稀释标准品, 测定OD_{562 nm}值, 绘制吸光值与蛋白浓度相关的标准曲线, 依据蛋白样品

的吸光值计算出样品的蛋白浓度.

运用ATCh-DNTB (硫代乙酰胆碱-二硫对硝基苯甲酸) 法, 在412 nm处检测反应生成的巯基和DTNB所得的产物TNB的量作为朱砂叶螭乙酰胆碱酯酶活力的指标. 用BIO-RAD X-Mark测定吸光值, 将样品加至96孔板中, 180 μL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为空白对照, 80 μL AChE重组蛋白加100 μL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为实验组, 每个处理重复3个孔, 再加入20 μL DTNB (0.4 mmol/L DTNB, 1.5 mmol/L NaHCO₃) 显色剂和40 μL ATChI (1.0 mmol/L) 底物, 混匀, 30 ℃孵育30 min, 412 nm检测吸光值.

1.2.9 毒扁豆碱对AChE活性的抑制 取8 mg朱砂叶螭用500 μL含0.1% Triton-X100的50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 液氮充分研磨后, 4 ℃, 5 000 r/min离心10 min, 取上清即朱砂叶螭粗酶液, 于-80 ℃保存. 粗酶液采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度.

用50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶解毒扁豆碱, 将样品加入到96孔板中, 180 μL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为空白对照, 80 μL 0.4 mg/mL AChE加100 μL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为阳性对照, 80 μL 0.4 mg/mL AChE加100 μL 毒扁豆碱溶液 (终浓度1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L) 作为实验组, 每个处理重复3个孔, 再加入20 μL DTNB (0.4 mmol/L DTNB, 1.5 mmol/L NaHCO₃) 显色剂和40 μL ATChI (1.0 mmol/L) 底物, 混匀, 30 ℃孵育30 min, 412 nm检测吸光值. 计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阳性对照OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{阳性对照OD值} - \text{空白对照OD值}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 目的基因ace的扩增

以实验室保存的朱砂叶螭T/ace质粒为模板, ace-F和ace-R为引物进行PCR扩增, 电泳检测后 (图1) 进行胶回收, 得到带有双酶切位点的ace基因序列.

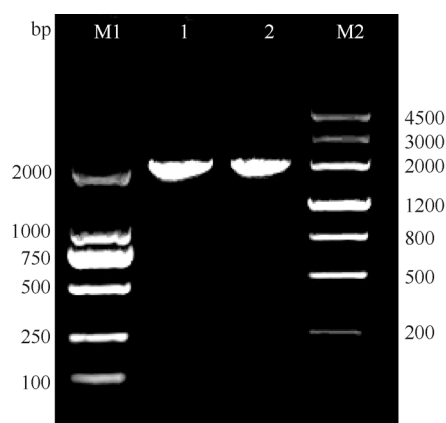


图1 ace的PCR扩增. M1: DL200 DNA Marker; 1和2: ace; M2: DNA MarkerⅢ.

Fig. 1 PCR amplification of ace. M1: DL200 DNA Marker; 1 and 2: ace; M2: DNA MarkerⅢ.

2.2 原核表达载体的构建

pET-30a经EcoR I和Xho I双酶切与双酶切的ace基因连

接, 转化感受态*E. coli* DH5 α , 扩大培养, 提取质粒(图2), 并用*Eco*R I和*Xho*I进行双酶切电泳验证(图3), 产生约1 842 bp和5 422 bp的条带, 分别与朱砂叶蟥*ace*基因和pET-30a载体大小相一致, 经测序比对后, 序列正确. 将正确的表达载体pET-30a/*ace*转化到*E. coli* BL21 (DE3)中, 测序结果与目的基因序列一致.

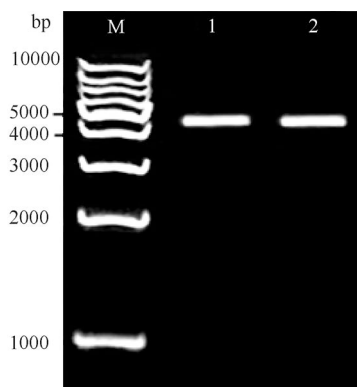


图2 pET-30a/*ace*重组质粒. M: 1 kb DNA Marker; 1和2: pET-30a/*ace*重组质粒.

Fig. 2 Recombinant plasmid pET-30a/*ace*. M: 1 kb DNA Marker; 1 and 2: Recombinant plasmid pET-30a/*ace*.

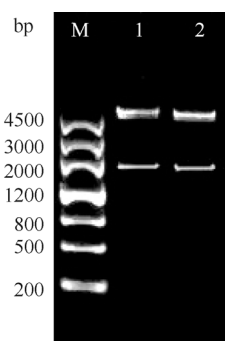


图3 重组质粒pET-30a/*ace*双酶切鉴定. M: DNA Marker; 1和2: 双酶切重组质粒.

Fig. 3 Digestion production of pET-30a/*ace*. M: DNA Marker; 1 and 2: pET-30a/*ace*.

2.3 重组质粒的诱导表达

将含有表达载体pET-30a/*ace*的*E. coli* BL21 (DE3), 划线培养, 挑取单菌落震荡培养, 经IPTG诱导表达0-21 h, 分别取不同诱导时间的表达产物进行SDS-PAGE检测(图4), 结果表明, 与未经诱导的对照组蛋白表达条带比对, IPTG诱导的重组菌体在 M_r 68×10^3 左右的位置出现一条特异的条带, 这与软件分析得到的去除信号肽后的AChE蛋白相对分子质量约 68×10^3 的结果相一致. 在诱导2-21 h的时间段内目的蛋白都有表达, 7 h表达量最高, 而随着诱导时间的增加, 蛋白表达量基本不变.

2.4 重组蛋白的可溶性分析和纯化

对超声波破碎后获得的上清、沉淀以及Ni柱纯化前后的样品进行SDS-PAGE分析(图5), 可以观察到上清和沉淀中均有AChE重组蛋白的表达, 但上清比沉淀的表达量多, 表

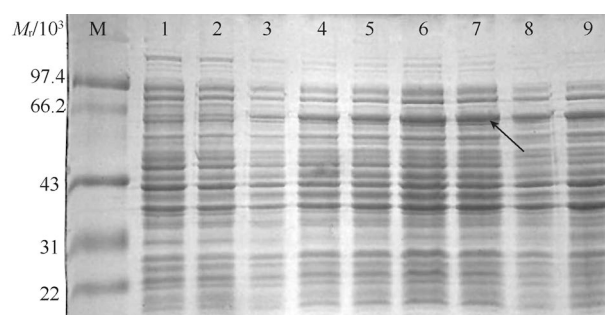


图4 IPTG不同诱导时间AChE表达情况的SDS-PAGE分析. M: 蛋白marker; 1: 未诱导表达的全菌; 2: 诱导表达0 h的全菌; 3-9分别是: 诱导表达2 h、5 h、6 h、7 h、8 h、10 h和21 h的全菌.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of AChE expression induced by IPTG. M: protein marker; 1: Control (No IPTG induction); 2: Expressed products induced for 0 hour; 3-9: Expressed products induced for 2, 5, 6, 7, 8, 10 and 21 hours.

明表达的目的蛋白大部分可溶; 与Ni-NTA结合2 h后的上清中几乎没有重组蛋白, 可以说明AChE大部分已经结合到Ni-NTA上; 50 mmol/L咪唑洗脱缓冲液洗下了层析柱中非特异结合的蛋白, 而目的蛋白并没有被洗脱下来; 250 mmol/L咪唑洗脱液洗脱下了纯度较高的重组蛋白AChE. 在SDS-PAGE分析中(图6), 阴性对照即只有pET-30a载体的*E. coli* BL21 (DE3) 经过与重组蛋白相同的实验条件诱导表达的情况, 阴性对照几乎没有表达蛋白, 更没有目的蛋白的表达, 说明检测到的AChE蛋白是由重组载体pET-30a/*ace*编码的; 大小约 26×10^3 的蛋白可能是由菌株基因组表达的.

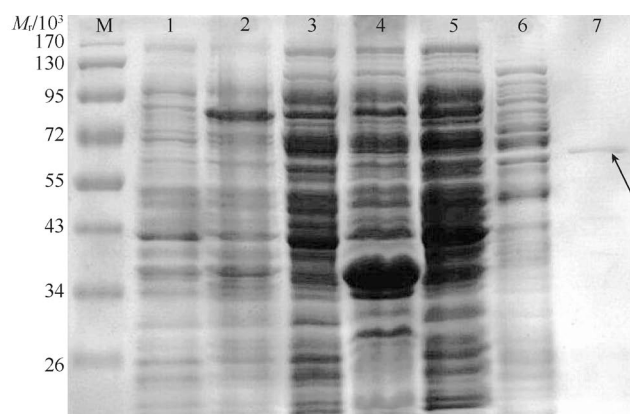


图5 诱导表达产物可溶性和纯化情况SDS-PAGE分析. M: 蛋白Marker; 1: 未诱导表达的全菌; 2: 诱导表达7 h的全菌; 3: 超声破碎离心后上清; 4: 超声破碎离心后沉淀; 5: 与Ni-NTA结合后上清; 6: 50 mmol/L咪唑洗脱的液体; 7: 250 mmol/L咪唑洗脱的收集峰液体.

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purification of AChE recombinant protein. 1: Control (No IPTG induction); 2: Expressed products induced for 7 hours; 3: Supernatant after ultrasonic disruption; 4: Pellet after ultrasonic disruption; 5: Supernatant after combined with the Ni column; 6: Product eluted by 50 mmol/L Imidazole Buffer; 7: Product eluted by 250 mmol/L imidazole Buffer.

2.5 蛋白的Western Blot分析

为进一步验证目的蛋白的表达, 以纯化的AChE作为抗原, 制备免源AChE多克隆抗体作为一抗, HRP标记山羊抗兔IgG作为二抗, 进行了目的蛋白的Western Blot分析, 结果

(图7)表明,在 68×10^3 左右处有特异性免疫印迹条带,进一步证明了纯化出的蛋白即目的蛋白朱砂叶螭AChE.

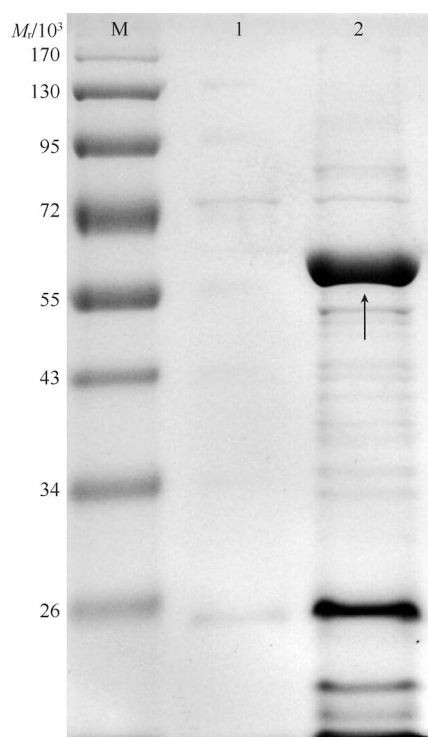


图6 重组蛋白AChE SDS-PAGE纯度分析. M: 蛋白Marker; 1: 阴性对照; 2: 超滤浓缩的重组AChE.

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified recombination AChE protein. M: Protein marker; 1: Control (*E. coli* BL21 transformed by empty vector); 2: Purified AChE.

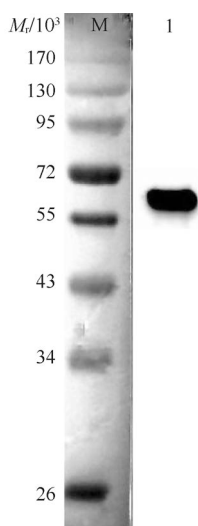


图7 重组蛋白AChE的Western-blot检测. M: 蛋白marker; 1: 纯化的AChE.

Fig. 7 Western-blot analysis of AChE recombinant protein. M: Protein marker; 1: Purified AChE.

2.6 BCA蛋白定量和酶活力测定

按照Thermo Scientific公司试剂盒说明书稀释标准品,根据在562 nm测得的吸光值绘制标准曲线,由样品的吸光值

计算出样品蛋白浓度.纯化的朱砂叶螭乙酰胆碱酯酶稀释成一系列浓度梯度,反应体系中加入ATChI作为底物,DTNB作为显色剂,30℃孵育一定时间后,412 nm处测定吸光值.高浓度螭AChE重组蛋白的酶活性设为100%,由图8可见,重组AChE的活性明显高于对照组,朱砂叶螭AChE重组蛋白的酶活性随着酶浓度的增加而增加,酶活性与酶浓度之间存在显著的正相关性,说明纯化得到的蛋白具有AChE的活性.

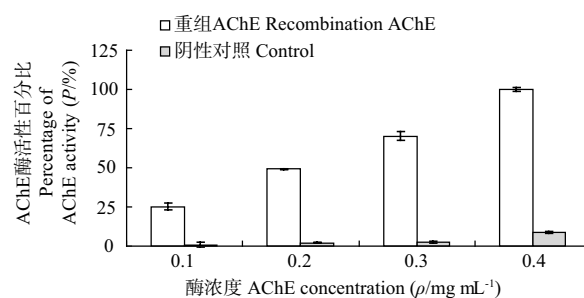


图8 重组AChE酶活测定.

Fig. 8 Measurement of AChE activity.

2.7 毒扁豆碱对AChE活性的抑制

随着毒扁豆碱浓度的增加,其对AChE活性的抑制率增大.进一步计算得出,毒扁豆碱对重组朱砂叶螭AChE的 IC_{50} 为5.39 mmol/L,表明表达产物具有乙酰胆碱酯酶的活性.对比螭粗酶液($\text{IC}_{50} = 58.67$ mmol/L)与重组AChE($\text{IC}_{50} = 5.39$ mmol/L)对毒扁豆碱的敏感程度,发现重组AChE对毒扁豆碱的敏感性远高于(约11倍)螭粗酶液对其的敏感性,这很好地避免了粗酶液中杂蛋白对AChE活性的影响,为进一步利用基因工程原理制备朱砂叶螭AChE检测有机磷及氨基甲酸酯类农药残留提供了依据.

3 讨论

现有杀虫剂的作用靶标有很多种,有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂作用靶标是乙酰胆碱酯酶,烟碱类、硝基亚甲基杂环化合物和沙蚕毒素类杀虫剂作用靶标是烟碱型乙酰胆碱受体,吡啶类、环戊二烯类、二环苯甲酸酯类杀虫剂类和二环磷脂类作用靶标是 γ -氨基丁酸受体氯离子通道,DDT和拟除虫菊酯类杀虫剂作用靶标是神经轴突钠离子通道^[13].乙酰胆碱酯酶是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的重要作用靶标^[14-15],通过抑制中枢神经系统中AChE对神经递质ACh的水解作用干扰和阻止突触传导,导致昆虫的死亡. AChE能够被低浓度的有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抑制,在体外情况下这种现象尤为明显^[16],有研究用朱砂叶螭的天然匀浆作为粗酶液来筛选杀螭活性物质,但是在天然匀浆中包含除了AChE以外的多种蛋白,这些蛋白的存在可能干扰抗AChE杀螭活性物质筛选.粗提液中包含的解毒酶能催化水解农药,酯酶可能作为AChE的替代靶标,从而保护AChE^[17].本研究利用基因工程原理获得了表达可溶性有活性AChE蛋白的菌株,体外大量表达朱砂叶螭乙酰胆碱酯酶,有助于直接在体

外高通量筛选新型杀虫剂, 这种方法有效地避免了朱砂叶螨体内多种蛋白的干扰, 很大程度上提高了体外检测乙酰胆碱酯酶抑制剂的灵敏度, 更准确地检测农药残留量, 同时提供了试验和检测所需的核心材料AChE, 免去了大量饲养朱砂叶螨复杂的前期准备工作。

本研究选用高效表达载体pET-30a成功构建了pET-30a/*ace*, 并在*E. coli* BL21 (DE3) 中分泌表达。BL21 (DE3) 即*E. coli* BL21 被DE3噬菌体感染后成为溶源性细菌, 整合DE3噬菌体的DNA。pET-30a属于pET载体系统, 含有启动子T7lac, 而且带有lac阻遏物(lacI)编码基因, 未诱导时抑制目的基因的表达。在IPTG诱导条件下, T7RNA聚合酶诱导表达, 启动T7噬菌体启动子, 高水平表达目的基因。将基因的克隆过程与表达过程分开, 是pET载体系统的优势。方晓东利用RT-PCR技术从家蝇中克隆到*ace*基因, 构建了pET22b原核表达载体, 并且转化BL21 (DE3) 获得了家蝇乙酰胆碱酯酶的原核表达^[18]。何琳对家蚕乙酰胆碱酯酶基因构建了pET41b-AChE原核表达载体, 在大肠杆菌中成功表达了该基因^[19]。本研究利用大肠杆菌表达系统表达的螨AChE蛋白具有乙酰胆碱酯酶的活性, 与粗提酶液相比, 毒扁豆碱对纯化AChE的半数抑制浓度IC₅₀值减少11倍, 表明纯化AChE对毒扁豆碱的敏感性远高于粗酶液, 这为进一步将AChE应用于有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测提供了依据。

原核表达系统能够在短时间内获得表达产物, 具有较多的优点, 但是利用原核表达系统表达真核蛋白时存在着一些缺陷: 表达的蛋白容易产生包涵体, 导致产物纯化困难; 不具备转录后加工的功能, 不能对内含子进行剪切, 所以只能表达cDNA序列; 缺少真核表达系统蛋白修饰的酶系统, 不能够形成正确的蛋白构象, 可能影响重组蛋白的活性。受原核表达系统缺陷的影响, 本研究中, 获得的AChE重组蛋白酶活性有待提高, 今后拟采用真核表达系统, 以期获得酶活性更高的重组朱砂叶螨乙酰胆碱酯酶, 为将AChE应用于有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测提供理论依据, 同时, 应用于研制和检测以螨特有的AChE保守活性位点为靶标的新型选择性杀虫剂。

参考文献 [References]

- 孙庆田, 孟昭军. 危害蔬菜的朱砂叶螨生物学特性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2001, **23** (2): 24-25 [Sun QT, Meng ZJ. Biological characteristics of *Tetranychus cinnabarinus*, a vegetable pest [J]. *J Jilin Agric Univ*, 2001, **23** (2): 24-25]
- 何林, 谭仕禄, 曹晓芳, 赵志模, 邓新平, 王进军. 朱砂叶螨的抗药性选育及其解毒活性研究[J]. 农药学报, 2003, **5** (4): 23-29 [He L, Tan SL, Cao XF, Zhao ZM, Deng XP, Wang JJ. Research on resistance breeding and detoxification activity of *Tetranychus cinnabarinus* [J]. *Chin J Pest Sci*, 2003, **5** (4): 23-29]
- 于江南. 新疆农业昆虫[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003: 152-157 [Yu JN. Xinjiang agricultural insects [M]. Wulumuqi: Xingjiang Science and Technology Press, 2003: 152-157]
- Kalaiselkar A, Govardhana naidu V, Venugopal rao N. Efficacy of some pesticides against citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* [J]. *Ind J Entomol*, 2003, **65** (3): 308-310
- Heymann E. Carboxylesterase and amidases [M]. New York: Academic Press, 1980: 291-323
- Das A, Dikshit M, Nath C. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, **81**: 89-99
- Bradman A, Barr DB, Claus Henn BG, Drumheller T, Curry C, Eskenazi B. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study [J]. *Environ Health Persp*, 2003, **111** (14): 1779-1782
- Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, Garfinkel R, Andrews H, Hoepner L, Barr DB. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2005, **206** (2): 246-254
- Hemlann A. Mucche M principles of the rapeutics of galanthamine [J]. *Drugs Today*, 1997, **33** (4): 259-263
- 边红玲. 毒扁豆碱的结构修饰及抗胆碱酯酶构效关系的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009 [Bian HL. Synthesis of analogues related to physostigmine and structure/activity relationships for anticholinesterase activity [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009]
- 胡海峰, 朱宝泉, 龚炳永. 乙酰胆碱酯酶及其抑制剂的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, **20** (2): 81-87 [Hu HF, Zhu BQ, Gong BY. Research progress of acetylcholinesterase and its inhibitors [J]. *Foreign Pharmaceutical Antibiot*, 1999, **20** (2): 81-87]
- 冯晓娇, 卜春亚, 师光禄, 高品, 王有年, 彭博, 李金玲, 韩晶玉. 朱砂叶螨乙酰胆碱酯酶基因的克隆与特征[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (5): 751-758 [Feng XJ, Bu CY, Shi GL, Gao P, Wang YN, Peng Bo, Li JL, Han JY. Gene cloning and character analysis of acetylcholinesterase from *Tetranychus cinnabarinus* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (5): 751-758]
- 唐振华, 吴士雄. 昆虫抗药性的遗传与进化[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000 [Tang ZH, Wu SX. Heredity and evolution of insect resistance [M]. Shanghai: Scientific and Technological Literature Publishing House, 2000]
- Hama H. Pest resistance to pesticides [M]. US: Springer, 1983: 299-331
- Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, **108** (94): 19-31
- 刘洪霞, 高希武, 冷培恩. 花翅摇蚊乙酰胆碱酯酶底物专一性及对胆碱酯酶抑制剂敏感度的比较[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14** (2): 211-214 [Liu HX, Gao XW, Leng PE. Substrate specificity of acetylcholinesterase and its sensitivity to cholinesterase inhibitor in *Chironomus kiinensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (2): 211-214]
- 彭霞, 陶科, 滕云, 黄晓, 侯太平. 农药靶标乙酰胆碱酯酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2008, **45** (1): 189-193 [Peng X, Tao K, Teng Y, Huang X, Hou TP. Purification and characterization of acetylcholinesterase, a kind of pesticide target [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, **45** (1): 189-193]
- 方晓东. 家蝇乙酰胆碱酯酶基因的克隆、表达及三维结构预测分析[D]. 海南: 华南热带农业大学, 2007 [Fang XD. Molecular cloning expressing and 3-D structure analyzing of *Musca domestica Ace* gene [D]. Hainan: South China University of Tropical Agriculture, 2007]
- 何琳. 家蚕神经系统靶点基因克隆与功能研究[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2007 [He L. Gene clone and functional study of insecticides targets in central neuronal system in *Bombyx mori* [D]. Shanghai: Chinese Academy of (Sciences Shanghai Institute for Biological Sciences), 2007]