

# 蚊虫乙酰胆碱酯酶的真核表达、纯化及活性测定

谭 烽<sup>1,2</sup> 兰文升<sup>2</sup> 崔 峰<sup>2</sup> 乔传令<sup>2</sup> 陈雯莉<sup>1</sup>

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 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 100101

**摘要** 利用 Trizol 法从尖音库蚊中提取总 RNA, 构建 cDNA 文库, 并克隆出乙酰胆碱酯酶外显子序列; 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统对蚊虫乙酰胆碱酯酶进行真核表达, 并利用 Ni-琼脂糖对酶进行纯化。采用 SDS-PAGE 对纯化产物进行检测, 结果表明得到了纯度较高的乙酰胆碱酯酶。参照 Ellman 法对酶的活性进行测定, 结果显示纯酶的活力为  $2.219 \times 10^{-4}$  mol/(min · g)。

**关键词** 有机磷农药; 乙酰胆碱酯酶; 昆虫杆状病毒表达系统; 纯化酶; 生物传感器

**中图分类号** Q 814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0423-05

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 是神经系统的重要物质, 它在胆碱神经突触处快速水解神经递质——乙酰胆碱而中止神经冲动的传递, 维持正常的神经冲动<sup>[1]</sup>。有机磷类杀虫剂能竞争性抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 它们通过共价磷酸化乙酰胆碱酯酶活性位点的丝氨酸残基而抑制酶的活性, 使乙酰胆碱在突触间的作用时间延长, 从而引起突触后膜乙酰胆碱受体的超兴奋, 引起神经系统的严重障碍, 达到杀虫的目的, 在机制上属于不可逆的抑制<sup>[2]</sup>。

有机磷杀虫剂在全球范围内被广泛使用, 占到了全球杀虫剂使用总量的 38%<sup>[3]</sup>。仅在美国, 每年就使用了 4 万 t 的有机磷农药<sup>[4]</sup>。目前, 我国杀虫剂的生产量占农药总产量的 75% 左右, 其中有机磷杀虫剂占杀虫剂总产量的 77%, 在年产量万吨以上的 6 个杀虫剂品种中, 有 5 个是有机磷杀虫剂。由于施用量大, 加之违规操作, 农药在环境中的残留超标问题十分突出, 已引起人们的高度重视<sup>[5]</sup>。有机磷农药品种多应用广, 它们能通过抑制人体内的乙酰胆碱酯酶活性而引起中枢神经系统的紊乱, 从而引起相应的中毒症状。

目前传统的检测有机磷农药残留的方法主要有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、气相色谱-质谱联用 (GC/MS) 和酶分析技术等<sup>[6]</sup>。生物传感器技术是近年来开发的一种新型的检测农药残留的方法, 跟传统的方法相比, 具

有快速、灵敏度高、成本低等特点<sup>[5]</sup>。一种有机磷水解酶 OPH 由于能够快速降解有机磷类农药而被广泛应用于农药残留的检测中<sup>[7-8]</sup>, 对甲基对硫磷的检测最低限度可达到  $0.3 \mu\text{mol/L}$ <sup>[9]</sup>。乙酰胆碱酯酶由于对农药特别敏感, 因此也被广泛应用于有机磷农药残留的检测中<sup>[10]</sup>。

本研究从尖音库蚊中克隆出乙酰胆碱酯酶基因 (*ache1*), 利用 Bac-to-Bac 系统对 AChE1 进行真核表达, 并对该酶进行纯化, 采用 SDS-PAGE 对纯化产物进行检测, 为乙酰胆碱酯酶在农药监测生物传感器中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品、细胞和质粒

用于基因克隆的尖音库蚊品系于 2007 年 7 月采集于广东省佛山市, 在实验室条件下 (光暗周期 14 h/10 h, 温度  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ) 常年饲养。pMD18-T 载体购自 TaKaRa; pFastBac1 载体、*E. coli* DH10Bac、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、sf9 细胞、SuperScript First-Strand 反转录试剂盒均购自 Invitrogen; Powerprep<sup>TM</sup> Hplasmid Purification Kits 高纯度质粒提取试剂盒购自 OriGene。

### 1.2 仪器和设备

鹰眼凝胶影像系统 (EAGLE EYE<sup>TM</sup> II, STRATEGENE)、PCR 仪 (Perkin-Elmer 9600 Ce-

收稿日期: 2011-06-01

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2009AA06A417)

谭 烽, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。E-mail: tanfeng0402@163.com

通讯作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学。E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

tus thermal cycler 9600)、超纯水仪(Millipore)、核酸电泳装置(Bio-Rad)、紫外分光光度计(DU-800, BECKMAN)、蛋白电泳装置(Bio-Rad)、PCR 仪(Perkin-Elmer 9600 Cetus thermal cycler 9600)、超声波破碎仪(Soniprep 150 MSE)。

### 1.3 蚊虫乙酰胆碱酯酶基因(*ache1*)阅读编码框的克隆

Trizol 法提取库蚊 RNA 和构建 cDNA 文库。将蚊虫在液氮中充分研磨,溶于 600  $\mu\text{L}$  Trizol 试剂中,常温孵育 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿,充分振荡后室温放置 3 min,4  $^{\circ}\text{C}$  10 000 r/min 离心 15 min。转移上清至新管中,加 500  $\mu\text{L}$  异丙醇,室温放置 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  10 000 r/min 离心 15 min。弃上清,75%乙醇洗涤后,溶于 DEPC 处理的水中。利用 Invitrogen 提供的 SuperScript First-Strand 试剂盒构建 cDNA 文库。

根据致倦库蚊 GenBank 中 *ache1* 基因 mRNA 的序列(注册号为 XM\_001847396)设计引物,上游引物为 5'-CGGGATCCATGGAGATTCGA-3'(含 *Bam*H I 酶切位点),下游引物为 5'-G CCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGA - ATCTTGAAC-3'(含 *Xho* I 酶切位点和编码 6 个组氨酸的密码子)。以构建的 cDNA 文库为模板,PCR 扩增(94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min 后保存于 10  $^{\circ}\text{C}$ )*ache1* 基因的开放阅读框,送 Invitrogen 公司测序。

### 1.4 AChE 表达载体的构建

所用载体为 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统的特性质粒 pFastBac1,它带有来自于昆虫病毒的多角体强启动子,可使目的基因在昆虫细胞中高效表达,两边各有 1 个 Tn7 臂,同时含有 1 个庆大霉素抗性基因和 1 个 SV40 病毒多聚腺苷酸(SV40 polyA)信号序列,共同构成 Tn7 区域。将 *ache1* 基因连接到 pFastBac1 质粒上后,利用 Tn7 转座序列转座到 Bacmid 穿梭质粒中。

将 *ache1* 基因用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切消化后,连接到相同酶切消化的 pFastBac1 质粒上,命名为 pFast-*ache1*,转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,该感受态细胞含有病毒穿梭质粒(Bacmid),利用 pFastBac1 上面的 Tn7 区域,将基因片段转座到 Bacmid 上。在含有一定卡那霉素、庆大霉素、四环

素、IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)、X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)的固体培养基上培养 48 h,挑取白色阳性菌落,摇菌。用 M13-F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' 作为上游引物, M13-R: 5'-ACGTTTTTCTTCCGATACGA-3' 作为下游引物,菌液 PCR 验证,检测结果显示阳性的菌株为转座成功的菌株,转座成功后的质粒命名为 Bacmid-*ache1*。利用 Powerprep<sup>TM</sup> Hpplasmid Purification Kits 试剂盒提取高纯度的 Bacmid-*ache1*,测定其浓度。

### 1.5 AChE 的表达和纯化

Bacmid 为穿梭质粒载体,它既能作为质粒在大肠杆菌 DH10Bac 细胞中扩增,又能作为毒粒去感染昆虫细胞。AChE 由脓疱病毒多角体蛋白启动表达。在 *ache1* 基因的上游有杆状病毒多角体蛋白启动子,下游有 SV40 polyA,整个表达在 sf9 宿主细胞中进行。

取 10  $\mu\text{g}$  质粒 DNA,加入 0.9% 的生理盐水至总体积为 200  $\mu\text{L}$ ,取转染试剂 4  $\mu\text{L}$ ,加入 0.9% 的生理盐水至总体积为 200  $\mu\text{L}$ 。将二者混匀,室温放置 5 min。加入稀释的 VigoFect,室温放置 15 min。逐滴加入活化的 sf9 细胞中,27  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养。转染的第 1 代为 P1,用 P1 液去转染大体积的细胞液,获得 P2。离心收集细胞,用连接缓冲液(500 mmol/L NaCl;20 mmol/L 磷酸钠;20 mmol/L 咪唑;pH 7.4)超声波破碎细胞,离心收集细胞裂解液。此时的溶液为粗酶溶液。

将 Ni-sepharose 用连接缓冲液平衡,按下列步骤纯化:加入 2 mL 粗酶溶液,让其顺着重力作用流出;加入 10 mL 连接缓冲液洗涤填料;加入 4 mL 洗提缓冲液(500 mmol/L NaCl;20 mmol/L 磷酸钠;250 mmol/L 咪唑;pH 7.4)洗脱填料,收集流出的溶液,为纯化产物。SDS-PAGE 检测纯化产物,其中分离胶为 10%,浓缩胶为 5%。

### 1.6 AChE 活性的测定

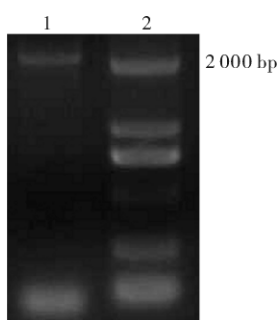
参照 Ellman<sup>[11]</sup> 的方法,反应体系:1 mmol/L 硫代碘化乙酰胆碱(ASChI)、0.5 mmol/L 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、适量蛋白、20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.6)。将酶液稀释 100 倍,每毫升体系加入 100  $\mu\text{L}$  酶液,对照组中用 100  $\mu\text{L}$  磷酸缓冲液(pH 7.6)代替。30  $^{\circ}\text{C}$  条件下,用 Beckman DU800 分光光度计测定  $D_{412\text{ nm}}$  值,每 15 s 测 1 次。蛋白浓度用 Bradford 法测定。

根据公式  $\frac{\Delta D}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{V/1000 \times \rho}$ , 计算出 AChE 的活性, 式中  $\Delta D$  为吸光值的变化率;  $V$  是所加酶液的体积, 单位为  $\mu\text{L}$ ;  $\rho$  是蛋白的质量浓度, 单位为  $\text{mg/mL}$ ; 所求得 AChE 比活力的单位为  $\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ache1* 基因开放阅读框的克隆

根据致倦库蚊 GenBank 中 *ache1* 基因 mRNA 的序列(注册号为 XM\_001847396)设计引物, 从尖音库蚊 cDNA 文库中扩增出 *ache1* 基因的开放阅读框, 全长为 2 109 bp(图 1), 经测序后与 GenBank 中公布的



1: *ache1*; 2: Marker.

图 1 *ache1* 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of *ache1*

序列比对, 同源率为 97%。

### 2.2 表达载体的构建

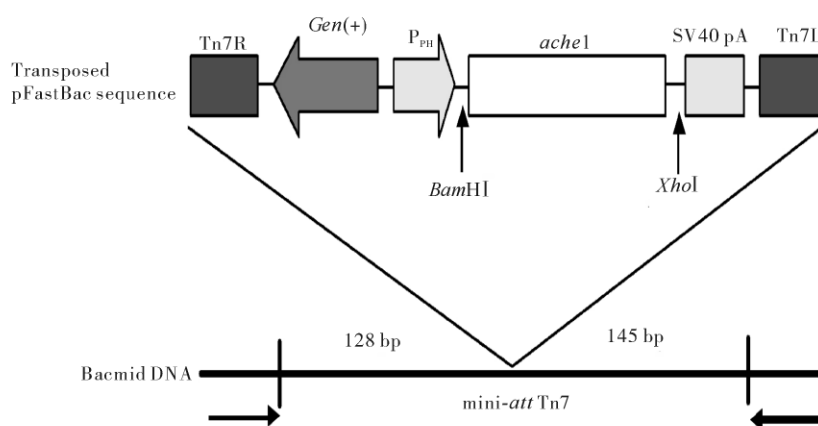
将 *ache1* 基因连接到 pFastBac1 质粒上后, 利用 Tn7 转座序列转座到 Bacmid 穿梭质粒中, 见图 2。挑取阳性克隆子, 菌液 PCR 验证阳性的为转座成功的表达载体。图 3 所示为菌液 PCR 结果, 为了增加结果的有效性, 用 M13 上下游引物与 *ache1* 上下游引物搭配, 经验证均为阳性。

### 2.3 AChE 的表达和纯化

将 Bacmid-*ache1* 经包装感染 sf9 细胞后, 整个蛋白的表达在 sf9 宿主细胞中进行。*ache1* 基因的上游由杆状病毒多角体蛋白启动子控制表达(图 2)。表达的蛋白经 Ni-sepharose 纯化后, 得到 35 mL 纯酶。经 SDS-PAGE 电泳检测(图 4), 电泳完毕后, 用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h 后脱色, 此时蛋白会显出蓝色, 图 4 箭头所示为纯化后的 AChE, 大约为 78 ku 左右, 阴性对照中没有出现相应的条带, 证明得到了纯化的 AChE。

### 2.4 AChE 活性的测定

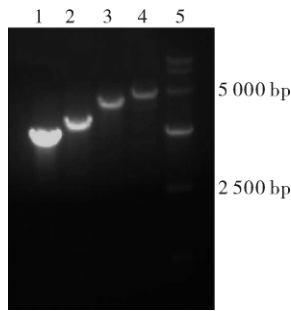
用 Ellman 法对纯化前的粗酶和纯化后的纯酶进行活性测定, 结果显示酶活性回收率为 71.24%。采用 Bradford 法测定纯酶蛋白的质量浓度为 0.011 mg/mL, 活力为  $2.219 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。



由 Tn7 转座到 Bacmid 质粒上的序列依次包括庆大霉素抗性基因(*Gen(+)*)、脓疱病毒多角体蛋白启动子、*ache1* 基因、病毒 SV40 多聚腺苷酸; *ache1* 的表达由脓疱病毒多角体蛋白启动子控制, 能被宿主 sf9 细胞中的转录元件识别并启动表达 Transposon was controlled by Tn7 sequence contains gentamicin resistance gene, polyhedrin promoter, *ache1*, SV40 polyadenylation signal. The expression of *ache1* was controlled by polyhedrin promoter, which was recognized by transcription elements of sf9 cells.

图 2 Bacmid-*ache1* 表达质粒结构

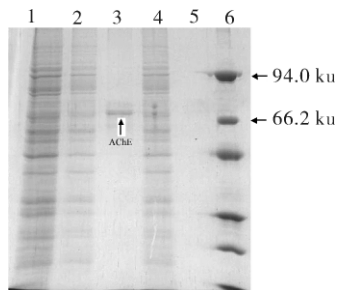
Fig. 2 Schematic diagram of Bacmid-*ache1* expression vector



1: M13F + M13R; 2: M13F + *ache1*R; 3: *ache1*F + M13R; 4: *ache1*F + *ache1*R; 5: Marker.

图3 构建的 Bacmid-*ache1* 电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram of Bacmid-*ache1*



1: 细胞裂解液 Total lysate of cells; 2: 纯化流出的废液 Efflux after purification; 3: 纯化后的酶液, AChE 大小为 78 ku 左右 Solution after purification, molecular mass of AChE was 78 ku; 4: 阴性对照纯化前的细胞裂解液 Lysate of control cells; 5: 阴性对照纯化后的溶液 Solution after purification of control cells; 6: Marker.

图4 AChE 纯化前后蛋白电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of AChE

### 3 讨论

Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统是一种常用的快速、高效真核蛋白表达系统<sup>[12]</sup>。该系统利用杆状病毒结构基因中多角体蛋白的强启动子,可以使真核生物的基因得到高效表达,并对表达产物进行正常的翻译后加工和糖基化修饰等功能,被广泛用于外源基因的表达。目前已有很多真核基因被成功地表达出来,比如胰岛素样生长因子 II<sup>[13]</sup>、泛素延伸蛋白基因 *Px-ubi*<sup>[14]</sup>、真菌细胞色素 P450<sup>[15]</sup>。乙酰胆碱酯酶由于其功能特殊性被广泛研究,目前很多物种的乙酰胆碱酯酶已被表达出来,如淡色库蚊乙酰胆碱酯酶<sup>[16]</sup>、人乙酰胆碱酯酶<sup>[17]</sup>、棉蚜乙酰胆碱酯酶<sup>[18]</sup>等,经测定都具有较好的生物活性。

近年来,由于有机磷农药残留的污染问题受到了人们的广泛关注,各国均在研究便捷、快速的农药污染监测方法。在这些快速监测方法中,酶是决定其灵

敏度和可靠性的最关键因子。目前农药残留监测方法多种多样,但是均具有一定的局限性,传统的物理化学方法操作步骤复杂、成本高、便携性差,新型方法也有稳定性不高、精确度不够等缺点,很难满足成本低廉、快速方便并能精确地进行实地监测的要求。

目前可用于农药残留监测的酶有羧酸酯酶、有机磷水解酶、丁酰胆碱酯酶及乙酰胆碱酯酶等<sup>[19]</sup>。在有机磷水解酶中主要应用的是 OPH,该酶对多种有机磷农药均有降解效果,国内外已有很多关于将 OPH 用于监测农药残留传感器的研究。利用有机磷水解酶监测的马拉硫磷最低精度可达 0.8  $\mu\text{g/L}$ <sup>[20]</sup>,利用 AChE 检测敌百虫的精度达 0.05  $\mu\text{g/L}$ <sup>[21]</sup>。而且,利用 AChE 监测的精度高于有机磷水解酶。利用有机磷水解酶监测的精度普遍很难达到我国卫生部制定的食品中农药残留标准。根据水体及食品中有机磷农药含量相关检测标准的限值,我国有机磷农药含量标准为  $0.86 \times 10^{-4} \sim 0.29 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$ (GB14552-2003:《水土中有机磷农药测定标准》、GB14552-2003:《粮食、水果和蔬菜中有机磷农药测定标准》)。本研究表达了蚊虫的 AChE,并利用末端的组氨酸标签对酶进行纯化,得到了纯化后的 AChE,该酶将在农药残留的检测中发挥着重要作用。

致谢 本研究是在中国科学院北京动物研究所农业虫鼠害综合治理国家重点实验室抗性分子遗传研究组完成的,课题组的老师们给予了热心的指导和帮助,在此表示感谢!

### 参 考 文 献

- [1] MASSOULIE J, PEZZEMENTI L, BON S, et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases[J]. Prog Neurobiol, 1993, 41: 31-91.
- [2] MALLENDER W D, SZEGLETES T, ROSENBERRY T L. Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the presence of peripheral site ligands; distinct effects of propidium and fasciculin[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 8491-8499.
- [3] SINGH B K, WALKER A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30: 428-471.
- [4] SHIMAZU M, MULCHANDANI A, CHEN W. Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 76: 318-324.

- [5] 丁小霞,李培武,周海燕,等.花生农药最大残留限量标准比对研究[J].中国油料作物学报,2011,33(5):527-532.
- [6] 王新雄,成秀娟,徐伟松,等.农产品农药残留检测技术的发展[J].广西农业科学,2008,39(5):700-704.
- [7] MULCHANDANI A, MULCHANDANI P, CHEN W. Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase[J]. Analytical Chemistry, 1999, 71: 2246-2249.
- [8] MULCHANDANI P, MULCHANDANI A, KANEVA I, et al. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1999, 14: 77-85.
- [9] KUMAR J, JHA S K, DSOUZA S F. Optical microbial biosensor for detection of methyl parathion pesticide using *Flavobacterium* sp. whole cells adsorbed on glass fiber filters as disposable biocomponent[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21: 2100-2105.
- [10] PALCHETTI I, CAGNINI A, CARLO M D, et al. Determination of pesticides in real samples using a disposable biosensor[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 337: 315-321.
- [11] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRESV J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961, 6: 88-95.
- [12] ANDERSON D, HARRIS R, PLYAYES D, et al. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system[J]. Focus, 1996, 17: 53-58.
- [13] 赵红,汪承亚,段宇,等.利用 Bac-to-Bac 表达系统高效表达胰岛素样生长因子 II[J].南京医科大学学报,2001,21(3):175-178.
- [14] 李晓梅,陈永,李珣,等.小菜蛾泛素延伸蛋白基因的克隆与原核表达[J].华中农业大学学报,2011,30(1):54-60.
- [15] ZHOU J G, JIANG Y, DUAN Y Y, et al. Over expression of fungal cytochrome P450 nor gene in Sf9 cells by using Bac-to-Bac baculovirus expression system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44: 177-181.
- [16] 李春晓,赵彤言,刘美德,等.重组淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的基因表达及活性测定[J].寄生虫与医学昆虫学报,2006,13(2):31-35.
- [17] 马兴元,谭建华,李阳芳,等.人乙酰胆碱酯酶(AChE) cDNA 克隆及真核表达载体的构建[J].中国生物制品学杂志,2003,16(2):75-78.
- [18] 董双林,韩召军, MARTIN S WILLIAMSON. 利用 Bac-to-Bac 系统表达棉蚜的乙酰胆碱酯酶[J].动物学研究,2006,27(1):75-80.
- [19] 张荷丽,舒友琴.茶叶中农药多残留检测方法概述[J].湖北农业科学,2010,49(2):476-478.
- [20] WHITE B J, HARMON H J. Optical solid-state detection of organophosphates using organophosphorus hydrolase[J]. Biosens Bioelectron, 2005, 20: 1977-1983.
- [21] GHINDILIS A L, MORZUNOVA H C, BARMIN A V, et al. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1996, 11: 873-880.

## Expression and purification of acetylcholinesterase from culex by Bac-to-Bac baculovirus system and the activity determination

TAN Feng<sup>1,2</sup> LAN Wen-sheng<sup>2</sup> CUI Feng<sup>2</sup> QIAO Chuan-ling<sup>2</sup> CHEN Wen-li<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents in Agriculture,  
Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract** The residues of the high toxic organophosphorous can cause chronic poisoning. At present, the detection of organophosphorous residue needs complicated operation, time consuming and high cost. Here, we harvested total RNA of mosquito by Trizol methods, constructed cDNA library, and got the exon of acetylcholinesterase. The acetylcholinesterase from culex was expressed by Bac-to-Bac system, then the enzyme was purified using Ni-sepharose. The crude and purified enzyme was tested and verified by SDS-PAGE. The enzyme activity was determined by Ellman methods. It will be of great significance to biosensors in organophosphorous pesticides detection.

**Key words** organic phosphorus pesticides; acetylcholinesterase; baculovirus expression system; purified enzyme; biosensor

(责任编辑:张志钰)