

分类号: S43

单位代码: 10335

密 级: 无

学 号: 21216183

浙江大学

硕士学位论文



二化螟田间种群酯酶 CsCaE026 的表达检测

Expression analysis of esterase CsCaE026 in the field population of
Chilo suppressalis (Walker) (Lepidoptera: Crambidae)

申请人姓名: 巨青松

指导教师: 姚洪渭 副教授

吕仲贤 研究员

叶恭银 教授

专业名称: 植物保护 (专业学位)

研究方向: 农业昆虫与害虫防治

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二〇一五年六月



二化螟田间种群酯酶 CsCaE026 的表达检测



论文作者签名: 巨青松

指导教师签名: 郑永利

论文评阅人: 双向隐名评阅

答辩委员会主席: 俞晓平 研究员 中国计量学院

委员 1: 沈志成 教授 浙江大学

委员 2: 吕仲贤 研究员 浙江省农业科学院

委员 3: 傅 强 研究员 中国水稻研究所

委员 4: 郑永利 高级农艺师 浙江省植物检疫局

答辩日期: 二〇一五年六月六日

**Expression analysis of esterase CsCaE026 in the field population of
Chilo suppressalis (Walker) (Lepidoptera: Crambidae)**



Author signature: Qingsong Ju

Supervisor signature: Hongwei Yao

Zhongxian Lv

External Reviewers: Anonymous

Examining Committee Chairperson:

Prof. Xiaoping Yu, Chinese Jiliang University

Examining Committee Members:

Prof. Zhicheng Shen, Zhejiang University

Prof. Zhongxian Lv,

Zhejiang Academy of Agricultural Sciences

Prof. Qiang Fu, China National Rice Research Institute

Senior Agronomist. Yongli Zheng,

Plant Quarantine Bureau of Zhejiang Province

Date of oral defence: 6.June.2015

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：巨青松

签字日期：2015 年 6 月 30 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：巨青松

导师签名：[Signature]

签字日期：2015 年 6 月 30 日

签字日期：2015 年 6 月 30 日

本研究承蒙

省科技厅项目

(2009C32041)

资 助

致 谢

本论文是在浙江大学昆虫科学研究所姚洪渭副教授和叶恭银教授的悉心指导和关怀下完成的。我的导师姚老师不仅在学业上，而且在生活上也给与了本人极大地关心和帮助，叶老师把握前沿的洞察力和求是的精神是我学习的榜样，吕仲贤老师在实习上给与的极大帮助和指导，在此一并表示真诚的感谢。他们渊博的知识、严谨的治学态度、宽广的胸怀、以诚待人的高贵品质，以及兢兢业业、任劳任怨的敬业精神使我终身受益。值此论文完成之际，谨向三位老师表示我最衷心的感谢和最崇高的敬意。

学习和研究期间，得到了浙江大学昆虫研究所全体老师的热心支持和关怀，由于他们的支持和帮助，使本研究得以顺利完成，在此表示感谢！

三年来，我有幸置身于一个团结互助、蓬勃向上的昆虫生理生化实验室。在这个大家庭中，虽有过辛苦，但回报多多；虽有过挫折，但依旧前进；虽有过迷茫，但未来光明；虽有过失望，但依旧有希望。三年的学习和生活的顺利完成，与实验室的老师、师兄师姐师弟师妹们的帮助和支持是分不开的。感谢方琦老师、黄佳老师；感谢师兄师姐，他们是齐易香、王飞、汪芳、朱宇、徐刚、严智超、姚尧、蒋鹏凌、刘玉娥；感谢师弟师妹，他们是陈利鹏、宁铎、杜玉萍、武亚苏、杨蕾、贾文茜、陈晓昂、肖山、王蓓蓓、党聪、李萌琪；感谢和我三年来一起走过的韩乃顺、滕子文、夏仁英、刘洋；还有已毕业的卢增斌博士、吴顺凡博士、常雪博士和钱岑博士。

在此，再次感谢我的导师姚洪渭老师三年来对我孜孜不倦的教诲和帮助，老师，您辛苦了！

感谢我最重要的父母和家人，在我十几年的求学生涯中所给与我的无私的爱。没有你们就没有今天的我，谢谢你们！

最后谨向参加本次论文评阅和答辩委员会的专家和教授们致以诚挚的谢意！

巨青松

2015年6月1日于紫金港

目录

前言	I
中文摘要	III
Abstract.....	V
第一部分 文献综述.....	1
第一章 二化螟及其抗药性的研究现状	2
1 二化螟的发生与危害.....	2
2 二化螟抗药性现状.....	3
3 二化螟抗药性机理.....	4
4 二化螟抗药性治理.....	4
5 展望.....	5
第二章 昆虫羧酸酯酶的研究进展	6
1 昆虫羧酸酯酶基因家族的命名和分类.....	6
2 昆虫羧酸酯酶的功能.....	7
3 昆虫羧酸酯酶与昆虫抗药性的关系	8
4 展望.....	9
第二部分 研究内容.....	9
第三章 二化螟酯酶基因的克隆与序列分析	10
1 材料与方法.....	10
1.1 材料、菌株、载体、试剂	10
1.2 主要实验仪器.....	10
1.3 总 RNA 抽提.....	11
1.4 cDNA 第一链的合成.....	12
1.5 PCR 扩增反应.....	12
1.6 PCR 产物纯化、回收.....	13
1.7 目的基因与克隆载体连接	13
1.8 连接产物的转化	14
1.9 转化子的筛选和验证	14

1.10 质粒 DNA 的抽提.....	15
1.11 二化螟酯酶基因的生物信息学分析	15
2 结果分析.....	16
2.1 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 的克隆与序列分析	16
2.2 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 的氨基酸序列与发育进化分析	18
3 小结	21
第四章 二化螟酯酶基因的原核表达及其抗体制备	22
1 材料与方法	22
1.1 载体、菌株及主要试剂	22
1.2 主要实验仪器	22
1.3 二化螟酯酶基因重组表达质粒的构建	22
1.3.1 目的基因的 PCR 扩增和产物纯化	22
1.3.2 目的基因及载体 pET-32a 酶切	23
1.3.3 酶切产物纯化	23
1.3.4 目的基因与载体连接	24
1.3.5 连接产物的转化	24
1.3.6 重组质粒的筛选和验证	24
1.4 <i>CsCaE026</i> 基因的原核表达	24
1.4.1 转化至 Rosetta 感受态细胞	24
1.4.2 <i>CsCaE026</i> 基因的诱导表达	24
1.4.3 蛋白表达形式的鉴定	25
1.5 蛋白样品 SDS-PAGE 检测	25
1.5.1 SDS-PAGE 凝胶配制	25
1.5.2 样品处理	25
1.5.3 上样和电泳	26
1.5.4 染色和脱色	26
1.6 多克隆抗体制备	26
1.7 Western Blot	26
2 结果与分析	27
2.1 二化螟 <i>CsCaE026</i> 基因重组表达质粒的构建	27
2.2 二化螟 <i>CsCaE026</i> 基因原核表达及 SDS-PAGE	27

2.3 多克隆抗体制备与 Western Blot 抗体验证	28
3 小结	29
第五章 二化螟酯酶基因的时空表达分析	31
1 材料与方法	31
1.1 供试昆虫	31
1.2 主要试剂和仪器	31
1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成	31
1.3.1 二化螟不同发育阶段总 RNA 提取	31
1.3.2 二化螟 5 龄幼虫不同组织总 RNA 提取	32
1.3.3 二化螟雌雄成虫不同躯体总 RNA 提取	32
1.3.4 cDNA 第一条链的合成	32
1.4 定量 PCR 引物的设计	32
1.5 荧光定量 PCR 及定量数据分析	32
1.6 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 蛋白表达的时空分析	33
2 结果与分析	34
2.1 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 表达的时间分布	34
2.2 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 表达的组织分布	35
2.3 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 表达的体躯分布	36
3 小结	38
第六章 二化螟酯酶基因的真核表达	40
1 材料与方法	40
1.1 载体、菌株及主要试剂	40
1.2 主要实验仪器	40
1.3 二化螟酯酶基因 <i>CsCaE026</i> 的 PCR 扩增和纯化	41
1.4 供体质粒的构建	41
1.4.1 目的基因及载体 pFastBac-THE 酶切	41
1.4.2 酶切产物纯化	42
1.4.3 载体酶切纯化产物的去磷酸化反应	42
1.4.4 目的基因与载体连接	42
1.4.5 连接产物的转化	43
1.4.6 供体质粒的筛选和验证	43

1.5 重组 Bacmid 的获得	43
1.5.1 供体质粒 CsCaE026/pFastBac 转入 DH10Bac 感受态细胞	43
1.5.2 重组 Bacmid 筛选和验证	43
1.5.3 提取重组病毒 CsCaE026/Bacmid	44
1.6 昆虫 Sf9 细胞的转染及表达	45
1.6.1 昆虫 Sf9 细胞的培养及转染	45
1.6.2 P1 病毒株的提取	46
1.6.3 P1 病毒株的扩增	46
1.6.4 重组蛋白的表达	46
1.7 重组蛋白的提取	46
1.7.1 收集昆虫细胞	47
1.7.2 清洗昆虫细胞	47
1.7.3 溶解昆虫细胞	47
1.8 蛋白纯化	47
1.9 蛋白浓缩	48
1.10 SDS-PAGE 和 Western Blot	48
2 结果与分析	48
2.1 供体质粒的构建	48
2.2 重组病毒 Bacmid 的构建	50
2.3 昆虫 Sf9 细胞的转染及病毒粒子的扩增	50
2.4 蛋白的表达	52
2.5 蛋白纯化和检测	52
3 小结	53
第七章 总结	55
1 二化螟酯酶基因 CsCaE026 的克隆及序列分析	55
2 二化螟酯酶基因 CsCaE026 的原核表达和多克隆抗体制备	55
3 二化螟酯酶基因 CsCaE026 的表达时空分布	55
4 二化螟酯酶基因 CsCaE026 在 Bac-to-Bac 系统中的表达	55
主要参考文献	59

前言

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 属鳞翅目(Lepidoptera)、螟蛾科(Crambidae), 是水稻上的重要害虫。二化螟以幼虫蛀食水稻叶鞘和茎秆而造成枯鞘、枯心和白穗, 并具有寄主范围广(包括水稻、玉米、甘蔗、蚕豆、茭白、油菜、高粱和小麦等)、越冬场所复杂和转株为害等特点。二化螟的发生与为害严重影响我国水稻的优质、高产和稳产, 尤其在我国南方稻区常因其连年爆发而造成巨大的粮食和经济损失。长期以来, 生产上对二化螟的防治一直主要以化学防治为主。各类杀虫剂如有机氯、有机磷、沙蚕毒素、大环内酯类、苯基吡唑类和二酰胺类等轮番用于二化螟防治, 但是大量、单一、持续地不合理用药, 导致二化螟极易产生田间抗性, 直接影响化学防治效果, 使得水稻螟害问题一直得不到解决。

二化螟具有较强的适应能力, 特别是对各类杀虫剂均能产生不同水平抗性。这与其生物学习性和生理学特性密切相关。目前, 公认的昆虫抗药性机制主要包括药剂解毒代谢能力增强、靶标敏感性降低和药剂表皮穿透率下降等。其中, 涉及药剂解毒的主要代谢酶有酯酶、多功能氧化酶(细胞色素 P450)和谷胱甘肽 S-转移酶等。这些代谢酶广泛分布于生物体内, 主要分解内源或外源有毒物质; 或者通过与有毒物质结合而隔离保护其作用靶标(唐振华, 1982)。杀虫剂的作用靶标因药剂种类而异, 其中包括乙酰胆碱酯酶作为有机磷与氨基甲酸酯的靶标, 属代谢水解酶, 主要参与胆碱能神经递质传递、神经发育与再生等。二化螟对不同杀虫剂产生的抗性机制不尽相同。如对杀螟硫磷抗性涉及羧酸酯酶活性增强(Konno 等, 1998); 对甲胺磷和三唑磷等抗性与多功能氧化酶活性增高及 AChE 靶标敏感性降低有关(Qu 等, 2003; 彭宇等, 2001; 韩招久等, 2003; 黄诚华等, 2005; Jiang 等, 2009); 对杀虫单抗性主要与多功能氧化酶活性升高有关(韩招久等, 2003)。

在各类代谢酶中, 酯酶是能水解内源和外源酯类化合物的所有酶的通称。酯酶广泛分布于动物、植物和微生物中, 其活性中心含有丝氨酸保守位点, 能够促进酯键的断裂与形成(Bornscheuer, 2002)。根据底物特异性与序列相似性, 昆虫酯酶可分为 α -酯酶、 β -酯酶、乙酰胆碱酯酶、保幼激素酯酶、gliotactins、神经连接蛋白、神经趋化蛋白和 glutactin 等 8 个亚家族。大多数具有催化活性的酯酶来自前

4 个亚家族 (Ranson *et al.*, 2002), 而后 4 个亚家族一般被认为没有催化活性, 主要与神经活动有关 (Oakeshott *et al.*, 2005)。酯酶在异源物代谢、信息素降解、生长发育和生殖调控以及神经形成等方面具有重要作用 (Yu *et al.*, 2009)。其通过基因扩增、表达上调及氨基酸突变来实现酶活性提高或对底物不敏感 (Li *et al.*, 2007), 导致杀虫剂的代谢抗性与靶标抗性 (周斌芬等, 2008); 并通过对保幼激素及神经递质乙酰胆碱的代谢降解 (Taylor and Radic, 1994; Riddiford *et al.*, 2003), 从而调节昆虫生长发育、生殖和神经活动等。研究表明, 每种昆虫体内通常含有 30~60 种不同的酯酶同工酶, 其中约 3/4 的酯酶同工酶具有催化活性 (Oakeshott 等, 2005)。Coppin 等 (2012) 对铜绿蝇 E3 酯酶采用定向突变进化技术筛选获得对拟除虫菊酯降解活性提高 100 倍以上的突变体。此外, 乙酰胆碱酯酶作为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标而被应用于环境中农药残留的检测, 具有前处理简便、检测时间短、所需设备简单和适于现场测定等优点。因此, 抗药性害虫体内的酯酶不仅可作为作用靶标开发新型高效“环境友好型”药剂, 还可为环境中农药污染指示以及生物修复提供丰富酶源。其中, 筛选、克隆害虫体内高效酯酶基因, 并离体表达获得大量活性重组酶蛋白是实现昆虫酯酶开发与应用的技术关键。

为此, 本论文以重要的水稻鳞翅目害虫——二化螟为研究对象, 在前期就二化螟酯酶同工酶组成及其基因种类鉴定的研究结果基础上, 对二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 进行了克隆与表达, 希以为深入理解酯酶在二化螟田间多种抗性机制共存下的作用机理提供理论基础, 为害虫田间抗性监测与治理、新型高效“环境友好型”药剂创制与开发以及农药残留环境监测和控制提供候选基因资源和技术基础。

中文摘要

二化螟是我国水稻上重要的钻蛀性害虫之一，可造成枯心和白穗等受害症状，进而导致严重的产量与经济损失。二化螟体内具有丰富的酯酶同工酶，并与其杀虫剂抗性密切相关。发掘二化螟酯酶基因资源，可以为害虫田间抗性监测与治理、新型高效“环境友好型”药剂创制与开发以及农药残留环境监测和控制提供基础。本论文就二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 进行克隆和表达研究，获得以下主要结果：

1 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的克隆和序列分析

克隆获得二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的全长 cDNA 序列，其开放阅读框为 1,671bp，编码 557 个氨基酸，预测分子量 63.66kD，等电点为 5.86。预测编码蛋白 N-端前 16 个氨基酸为信号肽序列，且含有 α/β -酯酶家族特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly 和催化三聚体（Ser207、Glu339 和 His453）等保守结构域以及二硫键结合位点（Cys82 和 Cys103）等。*CsCaE026* 基因属 α -酯酶亚家族。

2 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的原核表达分析

构建获得 *CsCaE026* 基因重组表达载体，并在大肠杆菌 Rosetta 菌株中诱导表达。重组表达产物分子量为 70kD，且形成包涵体，未能检测到酯酶活性。提取、纯化重组表达蛋白，并制备获得多克隆抗体。Western 杂交结果证实，二化螟 *CsCaE026* 基因在大肠杆菌中成功表达。

3 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的时空表达特征分析

分别采用实时荧光定量 PCR 技术和蛋白 Western 杂交技术，分析二化螟 *CsCaE026* 基因在转录与翻译水平的时空表达分布。明确 *CsCaE026* 基因在二化螟幼虫的中肠中高水平特异性表达。

4 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的真核表达分析

构建获得 *CsCaE026* 基因重组杆状病毒，并在昆虫 Sf9 细胞中进行表达。重组表达产物分子量为 90kD。Western 杂交结果证实，二化螟 *CsCaE026* 基因在昆虫细胞中成表达。

关键词：二化螟；酯酶；基因克隆；原核表达；多克隆抗体；时空分布；Bac-to-Bac 系统；真核表达

Abstract

The striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), is a major pest for rice production in China, which causes deadhearts and whiteheads and leads to yield loss. The esterase isozymes are relatively abundant in *C. suppressalis* and associated with the resistance to chemical insecticides. To explore esterase genes in *C. suppressalis* can provide the basis for monitoring and management of the resistance to insecticides in the fields, development of new efficient environmentally-friendly insecticides, and monitoring and control of pesticide residues in the environment. In this thesis, molecular cloning and expression analysis of an esterase gene, *CsCaE026* from *C. suppressalis* are conducted. The main results are summarized as follows:

1. Molecular cloning and sequence analysis of *C. suppressalis* *CsCaE026* gene

The full-length sequence of the esterase gene, *CsCaE026* was cloned from *C. suppressalis*, which open reading frame (ORF) was 1,671 bp and coded 557 amino-acid residues, with a predicted molecular mass of 63.66 kDa and a calculated isoelectric point of 5.86. A signal peptide of 16 amino acids, conserved domains of α/β -esterase family like Gly-x-Ser-x-Gly motif and the catalytic triad (Ser199, Glu323 and His453), and two sites for disulfide bond formation (Cys82 and Cys103) were predicted in the deduced protein sequence of *CsCaE026*. It was suggested that *CsCaE026* gene belongs to the subfamily of α -esterase.

2. Prokaryotic expression of *C. suppressalis* *CsCaE026* gene

The Rosetta strain of *Escherichia coli* with recombinant plasmid of *CsCaE026* gene was induced and expressed as inclusion body. Its molecular weight was about 70KD. However, the esterase activity of the recombinant protein has not been detected. The polyclonal antibody of the recombinant protein was prepared. The result of Western blotting confirmed that the *CsCaE026* gene was expressed successfully in *E. coli*.

3. Temporal and spatial expression patterns of *C. suppressalis* *CsCaE026* gene

The temporal and spatial expression patterns of *CsCaE026* gene at both transcriptional level and translational level in *C. suppressalis* were analyzed by real-time quantitative PCR and protein western blotting. The *CsCaE026* gene was expressed at high level in the midgut of *C. suppressalis* larvae.

4. Eukaryotic expression of of *C. suppressalis* *CsCaE026* gene

A recombinant baculovirus carrying the *CsCaE026* gene was constructed using Bac-to-Bac expression system and then used to transduce Sf9 cells. The molecular weight of recombinant expression product was about 90KD. The Western-blotting result showed that the gene was successfully expressed in Sf9 cells.

Key words: *Chilo suppressalis*; Esterase; Gene cloning; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody; Temporal and spatial expression patterns; Bac-to-Bac expression system; Eukaryotic expression

第一部分 文献综述

第一章 二化螟及其抗药性的研究现状

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker), 属于鳞翅目, 螟蛾科, 是我国水稻上重要的钻蛀性害虫之一。它除了为害水稻外, 还为害茭白、荸荠、油菜和生姜等多种作物。其广泛分布于亚欧大陆多个国家, 具有越冬场所多、转株危害等特点。随着气温升高, 我国水稻品种和耕作制度等改变, 二化螟种群数量显著上升。以二化螟为主的水稻螟虫成为继 20 世纪 80 年代稻飞虱、90 年代棉铃虫之后又一严重威胁国计民生的重大害虫。目前, 我国水稻二化螟防治主要依靠化学防治, 但由于药剂长期、连续等不合理的使用, 导致二化螟的抗药性明显上升, 从而导致防治成本逐渐提高, 用药量加大, 环境污染进一步加剧。因此开展二化螟抗药性机理及其治理研究具有重要的意义。

1 二化螟的发生与危害

二化螟是世界水稻种植区为害颇具破坏性和持续性的重要害虫, 造成稻株枯鞘、枯心和白穗等多种症状 (Cheng *et al.*, 2010)。二代螟以幼虫为害水稻, 症状因水稻不同生育期而异。在水稻分蘖期, 初龄幼虫先是群集为害叶鞘, 造成枯鞘; 二龄末期以后逐渐分散蛀食心叶, 造成“枯心”苗。在水稻孕穗期, 幼虫蛀食稻茎, 造成枯孕穗。当水稻抽穗到扬花期, 幼虫咬断穗颈, 造成白穗。在灌浆到乳熟期, 三龄以上幼虫转株为害, 造成虫伤株。虫伤株的外表与健康株差别不大, 表现为米质差, 谷粒轻; 当幼虫蛀入稻茎后, 茎内组织全部被蛀空, 仅剩下一层表皮, 遇风吹折, 易造成倒伏。这种被害株秕谷多, 颜色灰枯, 形成半枯穗。

二化螟的发生情况与作物营养、气候、水稻品种和栽培制度等都有一定的关系, 比如茭白的营养条件比水稻丰富, 故以茭白为食料的二化螟发育快, 发生期要比水稻来得早, 甚至可能会增加一个世代。在水稻中, 杂交水稻的营养条件较好, 其老熟幼虫和蛹比常规稻上的要大。双季稻区, 由于水稻生育期相对较整齐, 螟盛孵期与其侵入水稻的有利生育期吻合程度不多, 二化螟发生程度相对较轻, 往往只是早稻发生稍重 (一代二化螟), 而双晚稻较轻 (三代二化螟)。上年暖冬或当年春

季温湿度较佳,则导致幼虫死亡率低,发生期提前,虫口基数高,危害重;若上年冬季寒冷且本年春季低温多雨,其幼虫死亡率较高,则发生期推迟,发生程度相对较轻。在单、双季稻混栽地区,二化螟由于存在单季稻的“桥梁田”作用而极易在晚稻上严重发生。

二化螟在亚洲主要分布于中国、日本、朝鲜、菲律宾、泰国和越南等国家,在欧洲广泛分布于法国、英国和西班牙等。在欧洲的法国和西班牙,二化螟为害水稻造成的损失达 15-20% (Breitler *et al.*, 2000)。在中国,二化螟在湖南、湖北、四川、浙江、江西、江苏、安徽、福建、陕西、河南及云贵高原都有广泛分布,其中常年在长江流域严重发生 (盛承发等, 2003)。湖南省, 1996-1998 年在汉寿县、1995 年在遥田、新市和高炉三地,因螟虫为害而导致整田倒伏,为历史之罕见。

2 二化螟抗药性现状

1957 年,世界卫生组织 (WHO) 对害虫的抗药性定义为昆虫对能杀死正常种群大部分个体药量所具有的耐受能力,并在种群中逐渐发展的现象。换句话说,由于长期单一的使用某种药剂后,害虫对该药剂的耐药力较原来正常情况下有明显增加的现象,其特点是这种由使用药剂而增加的抗药性是可以遗传的。杀虫剂的选择作用在抗性发展的过程中起了决定性的作用,药剂的选择使害虫群体中的敏感基因逐渐丧失,抗药基因逐渐聚集,当这种选择达到一定水平时 (抗药性个体约为 80%),便导致了害虫抗药性的产生。

二化螟抗药性最早在日本被报道。早在 1962 年, Ozaki 就发现日本香川二化螟已经对对硫磷产生抗性。我国从 1984 年开始对二化螟的抗药性展开调查。1992 年之前,除少数地区二化螟种群对敌百虫、杀螟松、甲基对硫磷及甲胺磷等有较低水平的抗性外,并未发现对主要防治药剂杀虫单产生明显抗性 (王强等, 1987)。但是,自 20 世纪 90 年代中期以后,各地关于二化螟对甲胺磷和杀虫单等产生抗性的报道层出不穷。二化螟对三唑磷产生抗性的情况在各地也不断出现,甚至二化螟对药剂锐劲特、毒死蜱、阿维菌素、氟虫腈和拟除虫菊酯类等杀虫剂也产生了不同程度的抗性。

3 二化螟抗药性机理

随着害虫抗药性的不断发展,对引起杀虫剂抗性机制问题的研究也受到了越来越多的关注。从最初的关于对几个重要解毒酶的研究,到利用早期的分子生物学技术手段对抗性基因进行克隆和表达,再到进入基因组学时代,借助于日新月异的现代生物技术手段和平台,有关害虫抗药性的研究愈来愈深入。害虫对杀虫剂的抗性机理主要包括两种:代谢抗性(metabolic resistance)即对杀虫剂解毒作用的增强和靶标抗性(target site resistance)即杀虫剂作用的靶标部位的敏感性降低(周斌芬等,2008)。

关于二化螟对杀虫剂的抗性机理的报道并不多。研究表明二化螟对杀螟硫磷的抗性受多方面因子控制,主要有:(1)多功能氧化酶(MFO)O-脱甲基活力增强;(2)羧酸酯酶活性增强;(3)乙酰胆碱酯酶(AChE)敏感度降低(韩启发等,1995;李秀峰等,2001)二化螟对马拉硫磷的抗药性由两个以上等位基因所控制,酯酶活性增高及乙酰胆碱酯酶抑制率降低是两个主要原因。

由此可见,解毒酶系在二化螟的抗药性中发挥了重要作用。在二化螟对某一种杀虫剂产生抗性后,可选用适当的增效剂增强药剂的毒力。

4 二化螟抗药性治理

长期大量、单一使用同一种药剂极易导致二化螟产生抗药性。为治理二化螟抗药性,首先必须加强对二化螟抗药性的监测和预警,提出并建立有效的抗性治理策略与治理体系。

加强对二化螟抗药性的监测和预警可以从以下几个方面出发:(1)科学合理轮换使用不同类型化学农药,限制使用已经产生抗性的杀虫剂,并尽量使用作用机制不同、无交互抗性的药剂,开发和利用对二化螟高效的新型杀虫剂。(2)加强对二化螟种群抗药性的监测,包括其抗性水平检测与抗性风险评估。(3)深入研究与抗性有关的代谢酶及靶标的分子机制,为开发抗性快速检测技术以及高效新型农药奠定基础。

二化螟的综合治理除了之前提到的正确的化学防治外,还应包括农业防治、物理防治、生物防治和抗性品种选育等各种防治措施的综合应用。(1)农业防治。

冬季及时处理茭白遗株，清除田块周围的杂草，处理单、双晚稻草以压低越冬代虫源；春季深耕灌水以消灭越冬代老熟幼虫和蛹；调整栽培制度以创造不利于二化螟生存的环境条件。（2）生物防治。使用生防菌（如苏云金杆菌、白僵菌等）防治二化螟；保护天敌和水生动物，在卵期释放赤眼峰和黑卵蜂等寄生蜂以抑制二化螟发生与危害。（3）物理防治。通过灯诱法或信息素诱杀螟蛾以减少螟虫发生（姜卫华，2011）。（4）种植抗性品种。通过选育水稻抗性品种，或采用现代遗传工程技术培育高抗二化螟的转基因抗虫水稻等。

5 展望

二化螟是重要的水稻害虫，直接影响水稻优质、高产和稳产。随着化学农药的大量使用，二化螟对一些常用农药已产生抗性。二化螟抗性产生的原因很复杂，因此，深入研究其抗药性机理、研发高效安全新型农药以有效防控二化螟颇为重要。

第二章 昆虫羧酸酯酶的研究进展

羧酸酯酶 (Carboxylesterase) 是一个多功能超家族酶系, 广泛存在于昆虫、哺乳动物、植物和微生物等生物中。羧酸酯酶能有效水解羧酸酯类产生相应的酸类和醇类, 其活性中心为 Ser-His-Glu 三联体, 属丝氨酸酶 (Cygler *et al.*, 1993) (Wheelock *et al.*, 2008)。

1 昆虫羧酸酯酶基因家族的命名和分类

羧酸酯酶是能水解羧酸酯的酶的总称。由于这类酶的底物有重叠, 所以分类存在困难 (Heymann and Jakoby, 1980)。目前, 公认的酯酶分类命名采用的是 Aldridge 分类系统 (Aldridge, 1953)。根据 Aldridge 的分类, 酯酶中对有机磷敏感且能被有机磷抑制的称为 B 类酯酶; 能耐受有机磷且能将其作为底物进行水解的称为 A 类酯酶; 既不被有机磷抑制, 又不能水解有机磷的称为 C 类酯酶。其中有些 A 类酯酶能通过活性位点上乙酰化的半胱氨酸水解有机磷, 因此这些酶被通称为磷酸酯酶 (EC 3.1.8), 而羧酸酯酶 (EC 3.1.1.1) 主要属于 B 类酯酶 (Reiner, 1993; Walker, 1993)。这些酶都有一个丝氨酸残基活性位点, 因此 B 类酯酶和丝氨酸水解酶属于相同类型。

此外, 根据底物的特异性和序列的相似性, 羧酸酯酶基因通常可分为 8 个亚家族: α -酯酶、 β -酯酶、乙酰胆碱酯酶、保幼激素酯酶、神经趋化蛋白, 神经连接蛋白, 胶质接触蛋白和 glutactin 等 (Sharakhova *et al.*, 2002)。根据功能不同, 可以将 8 个亚家族分为三大类, 即神经发育相关、胞内催化和蛋白分泌催化。通过进化分析表明, 保幼激素酯酶、 α -酯酶和 β -酯酶亚家族形成原始分支, 羧酸酯酶大多数的催化功能都与这 3 种酶有关 (Sharakhova *et al.*, 2002) (Oakeshott *et al.*, 2005)。

随着生物信息学的快速发展, 一些昆虫的转录组或基因组得到了解析。羧酸酯酶基因家族也随之得到了广泛的认识。例如, 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中已鉴定出 35 个羧酸酯酶基因, 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 24 个 (Claudianos *et al.*, 2006)、丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 41 个 (Oakeshott *et al.*,

2010)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 51 个 (Sharakhova *et al.*, 2002)、桃蚜 (*Myzus persicae*) 22 个 (Ramsey *et al.*, 2010)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 28 个 (Tsubota and Shiotsuki, 2010)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 49 个 (Richards *et al.*, 2008) 和小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 64 个等。

2 昆虫羧酸酯酶的功能

羧酸酯酶作为昆虫体内重要的解毒酶, 广泛分布于头部、中肠、触角、马氏管等组织中, 其功能也十分多样, 主要包括外源物的解毒, 信息素或激素的降解, 以及参与神经形成及发育调节等 (Sato and Hosokawa, 2006)。

外源物主要包括植物产生的有毒次生代谢物和人类合成的杀虫剂。昆虫对农药的抗性就是对外源物抗性的一种表现, 外源物的抗性主要包括对靶标位点敏感度的降低和解毒酶类代谢能力的提高。靶标位点敏感度下降主要是由于有限范围的核苷酸变化引起的, 而解毒酶类代谢能力的提高则包括基因扩增、基因过量表达和编码序列突变等 (Li *et al.*, 2007)。其中羧酸酯酶作为三大外源物解毒酶之一 (Hemingway *et al.*, 2004) 就是通过上述解毒方式增加昆虫对农药如有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯等以及植物有毒次生代谢物的耐受性 (Yan *et al.*, 2009) (Coppin *et al.*, 2012)。昆虫通过羧酸酯酶基因扩增来增强对杀虫剂的抗药性已有报道。如桃蚜羧酸酯酶 E4 和 FE4 通过基因扩增使蛋白过量产生, 从而增强对一些农药的隔离和降解作用 (Blackman *et al.*, 1999)。另外, 基因的过量表达也能增强昆虫对杀虫剂的抗药性, 例如库蚊的抗性品系就是通过基因表达上调从而使酯酶基因 A1 过量表达 (Raymond *et al.*, 1998)。羧酸酯酶基因突变同样可以促进昆虫抗性品系的产生, 铜绿蝇和家蝇的抗性品系中酯酶基因 *LcaE7* 和 *MdaE7* 发生 Gly137 Asp 点突变, 导致羧酸酯酶活性降低和有机磷水解速率的提高 (Newcomb *et al.*, 1997; Claudianos *et al.*, 1999)。

此外, 羧酸酯酶还能帮助昆虫降解一些植物有毒次生代谢物, 例如桑叶的汁液中富含一种对鳞翅目幼虫高毒性的生物碱——拟糖生物碱 (Konno *et al.*, 2006),

但家蚕以桑叶为食物, 生长良好, 即是通过特异性解毒酶如羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶等降解毒素, 从而能以桑叶为食 (Asano *et al.*, 2001)。

信息素在昆虫行为调控的信号传导过程中极为关键, 而昆虫触角与表皮中的酯酶在降解信息素等方面起着重要作用。第一个信息素降解酶是在多音天蚕 (*Antheraea polyphemus*) 中被得到鉴定, 命名为触角特异感觉器酯酶 (ApolSE) (Maibèche-Coisne *et al.*, 2004)。ApolSE 能以极快的速度降解信息素 (Vogt *et al.*, 1985)。虽然人们很早对气味降解酶类 (ODEs) 如何降解信息素这一过程有了一定的研究, 但是至今仍很少有相关酯酶基因在这方面的研究报道。从西方蜜蜂中鉴定得到的一个酯酶在雄蜂中过表达, 可能参与信息素乙酸组分的降解, 从而阻断信号传递 (Kamikouchi *et al.*, 2004)。从斜纹夜蛾触角中发现的酯酶 SICXE10 能有效水解植物挥发物, 且其表达水平能被该植物气味显著诱导升高, 表明该酯酶可能参与气味的降解作用 (Merlin *et al.*, 2007)。

酯酶参与生长发育调节以及神经形成等已有报道, 如保幼激素酯酶能调节昆虫发育、变态和繁殖等 (Riddiford, 1994), 乙酰胆碱酯酶主要水解位于昆虫中枢神经系统的毗邻胆碱能突触的神经递质乙酰胆碱 (Jallon and Wicker-Thomas, 2003)。神经连接蛋白、胶质接触蛋白和神经趋化蛋白等被认为是与细胞-细胞相互作用有关的粘附蛋白 (Oakeshott *et al.*, 2005)。西方蜜蜂的神经连接蛋白可能与神经发育调节相关 (Biswas *et al.*, 2010)。

3 昆虫羧酸酯酶与昆虫抗药性的关系

昆虫羧酸酯酶能够介导有机磷类、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类等杀虫剂的抗性产生。白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 溴氰菊酯抗性品系的羧酸酯酶活力明显高于敏感品系 (刘洪霞, 2012)。对高效氯氰菊酯抗性倍数高达 4419.07 倍的家蝇进行酶活测定, 发现抗性品系体内的羧酸酯酶活性显著高于敏感品系的, 而细胞色素 P450 和 GSTs 等活性并没有显著变化 (Zhang *et al.*, 2007)。羧酸酯酶在害虫对氯虫苯甲酰胺、多杀菌素等新型杀虫剂的抗性发展中也具有一定的作用。

羧酸酯酶活性改变是昆虫对有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的重要原因。羧酸酯酶介导的害虫抗药性主要是通过提高对杀虫剂的水解活性，增强对杀虫剂的阻隔或者改变酶与底物的亲和力来发挥作用（Ranson *et al.*, 2011）（Wheelock *et al.*, 2005）。有关羧酸酯酶催化杀虫剂水解过程主要分为两步：（1）羧酸酯酶的 Ser-OH 进攻亲核试剂酯键的羰基碳，形成四聚体中间产物，释放醇类物质，羧酸酯酶活性部位丝氨酸的酰化；（2）加水脱酰作用，羧酸产物释放，酯酶恢复原始构象（Montella *et al.*, 2012）。

4 展望

昆虫羧酸酯酶的研究已有快速发展，随着越来越多的昆虫基因组测序的完成，有利于从基因组层面来解析昆虫羧酸酯酶不同的结构和功能，了解昆虫羧酸酯酶相关的抗药性分子机理，并促进高效、环保、低毒的新型杀虫剂的研发。

第二部分 研究内容

第三章 二化螟酯酶基因的克隆与序列分析

二化螟俗称蛀心虫、钻心虫等，属鳞翅目螟蛾科，是我国水稻上危害严重的常发性害虫之一。水稻是在分蘖期受害造成枯心苗、枯鞘，在抽穗期受害则造成白穗和虫伤株，对粮食生产造成严重影响。目前，生产上防治二化螟仍以化学防治为主。由于长期、单一、不合理使用化学农药，造成二化螟对常用农药产生了抗性。

酯酶是一种水解酶，是生物体内三大代谢解毒酶系之一，在昆虫体内广泛的分布。酯酶的功能主要是解毒，即分解外源的有毒有害物质；或者通过与有毒物质相结合，使这些有毒物质无法到达作用靶标（唐振华，1982）。在昆虫体内，最重要的酯酶有羧酸酯酶、磷酸酯酶、胆碱酯酶等，这些酯酶或催化杀虫剂酯键断裂，参与杀虫剂的代谢，或发生突变而对药剂敏感性降低（郭晓霞等，2000）。为此，本章对二化螟酯酶基因进行了克隆和序列分析，旨在为进一步研究二化螟酯酶的功能及其与抗药性的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、菌株、载体、试剂

材料：二化螟采自浙江富阳稻田，饲养条件为温度 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度大于 80%、光周期 16h: 8h（光照：黑暗）；

菌株：大肠杆菌 Trans-T1 感受细胞购自北京全式金生物技术有限公司；

载体：克隆质粒载体 pEASY-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；

试剂：总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司；凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司；反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；X-gal（5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷），IPTG（Isopropyl- β -D-thiogalactoside, 丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷），氨苄青霉素（Ampicillin）等购自上海生工；T4 连接酶购自 TaKaRa 公司；其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 主要实验仪器

Eppendorf 移液枪、Bio-Rad 琼脂糖电泳仪、Bio-Rad PCR 仪、Bio-Rad 凝胶成像系统、Tissuelyser 研磨仪、Eppendorf 高速冷冻离心机等。

1.3 总 RNA 抽提

总 RNA 的提取采用 Trizol 法。取人工气候室内连续繁殖多代饲养的 3 龄二化螟 3 头并用 75%酒精清洗，装入放有 Trizol 试剂的 2mL 无菌离心管中，按照试剂说明书抽提其总 RNA。具体方法步骤如下：

(1) 组织匀浆

在 2mL 离心管中加入 1mL Trizol 和一粒不锈钢珠，用 Tissuelyser 研磨仪以每秒 30 次的频率，打碎研磨 3min，以充分研磨裂解二化螟组织，将匀浆液在室温下孵育 5 分钟使样品完全裂解。

(2) RNA 分离

按照每 1 mL Trizol 加 0.2mL 的氯仿，盖紧离心管管盖，用手用力摇晃离心管 15 秒并将其在室温下孵育 2-3min，在 2-8℃下 12,000×g 离心 15min。离心后混合物分成三层：下层红色的为苯酚-氯仿层、中间层和上层无色的水样层。RNA 全部存在于水样层当中，水样层的容量大约为所加 Trizol 体积的 60%。

(3) RNA 沉淀

将水样层溶液转移到干净的 1.5mL 离心管中，通过将水样层和异丙醇混合来沉淀 RNA。按照每 1mL Trizol 加 0.5mL 异丙醇。将混合的样品在 15-30℃条件下孵育 10min，并在 2-8℃下 12,000×g 离心 10min。RNA 沉淀在离心前通常不可见，离心后会形成一层胶状沉淀附着于离心管壁和管底。

(4) RNA 洗涤

移去上层悬液，用 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀，每 1mL Trizol 至少加 1mL 的 75%乙醇。将混合的样品在 2-8℃条件下 7,500×g 离心 5min。

(5) RNA 再溶解

离心后将 75%乙醇吸出，然后干燥 RNA 沉淀。注意不能让 RNA 沉淀完全干燥那样会大幅度地降低其溶解性。加入适量的 RNase-free Water 溶解提取的 RNA。

用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度，并根据需要进行适当稀释，用于下一步实验或于-80℃保存备用。

1.4 cDNA 第一链的合成

参照反转录试剂盒 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书，将二化螟总 RNA 反转录成 cDNA 第一条链。具体操作步骤如下：
向 PCR 管中加入：

Total RNA	1 μg
Anchored Oligo(dT) Primer	1 μL
Random Primer	1 μL
2× TS Reaction Mix	10 μL
TransScript RT/RI Enzyme Mix	1 μL
gDNA Remover	1 μL
RNase-free Water	5 μL

20 μL	

将混合物短暂离心后置于 PCR 仪上进行后续反应，PCR 反应程序为 25℃ 10min，42℃ 30min，85℃ 5min，产物置于 4℃保存备用。

1.5 PCR 扩增反应

以反转录的 cDNA 为模板，利用 Primer5.0 软件设计引物（由上海生工生物工程公司合成），上游引物：5'-TTG AAG TGT CTA CAG AAA TGT TCG-3'，下游引物：5'-AAT AGT GGG GAG ACA TTC TTG A-3'进行 PCR 扩增。具体如下：

PCR 反应体系：	Template DNA	2 μL
	Forward Primer	1 μL
	Reverse Primer	1 μL
	2× TransTaq HiFi PCR Super Mix	10 μL
	ddH ₂ O	6 μL

		20 μL

PCR 反应条件：94℃ 3min, (94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min) × 35 循环, 72℃ 10min。

PCR 扩增产物用 1.0%的琼脂糖胶进行电泳检测。

1.6 PCR 产物纯化、回收

采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化回收, 所有离心均在室温下进行, 具体操作步骤参照试剂盒说明书:

- (1) 在紫外灯下用干净的刀片切下有目的 DNA 的琼脂糖凝胶, 放入干净的 1.5mL 离心管中称重, 计算凝胶重量 (提前称量离心管重量), 该重量作为一个凝胶体积 (如 100mg=100μL)。
- (2) 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A, 混合均匀后在 75℃ 水浴锅中加热, 以每 2min 间断混合, 直至凝胶块完全熔化 (约 10min)。
- (3) 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B 溶液, 混合均匀。
- (4) 吸取步骤 3 中的混合液, 转移至 DNA 制备管中 (已置于 2ml 离心管中) 12,000×g 离心 1min。弃滤液。
- (5) 将制备管放回 2mL 离心管, 加 500 μL Buffer W1, 12,000×g 离心 1min, 弃滤液。
- (6) 将制备管放回 2mL 离心管, 加入 700μL 的 Buffer W2 (已加入指定体积的无水乙醇), 12,000×g 离心 1min, 弃滤液。以同样的方法再用 700μL 的 Buffer W2 洗涤一次 12,000×g 离心 1min, 弃滤液。
- (7) 将制备管放回 2mL 离心管中, 12,000×g 离心 1min, 完全去尽柱中残液;
- (8) 将制备管放于洁净的 1.5mL 离心管中, 在制备膜中央加 20μL 的去离子水, 室温静置 1min。12,000×g 离心 1min 洗脱 DNA (将去离子水加热至 65℃ 将会提高洗脱效率)。
- (9) 用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 用于下一步实验或于 -20℃ 保存备用。

1.7 目的基因与克隆载体连接

将 PCR 回收产物与 pEASY-T1 载体相连接, 连接反应的体系为:

PCR 回收产物	4 μ L
pEASY-T1 Cloning Vector	1 μ L

	5 μ L

轻轻混匀后，25℃孵育 20min。反应结束后，将离心管置于冰上用于下一步实验或者-20℃保存备用。

1.8 连接产物的转化

- (1) 取 100 μ L 的 TransT1 感受态细胞于冰上，自然融化，待融化至 2/3 后取出 50 μ L 于另一离心管中（提前预冷）；
- (2) 将连接产物全部转入至 50 μ L 的感受态细胞中，轻轻混匀，冰上静置 30min；
- (3) 42℃热激 45s 后，立即置于冰水混合物上 3min；
- (4) 向离心管中加入 500 μ L LB 液体培养基（不含 Amp），轻轻混匀后，37℃，200rpm 振荡培养 1h；
- (5) 在含 Amp（100 μ g/mL）抗性的 LB 固体培养基平板上加入 40 μ L 20mg/mL X-gal 和 7 μ L 100 mg/mL IPTG 溶液，将其涂布均匀；
- (6) 待 IPTG 和 X-gal 被吸收后，取 200 μ L 培养的菌液于上述平板，将菌液涂布均匀，37℃培养 1 h 后，倒置平板，过夜培养。

1.9 转化子的筛选和验证

- (1) 在 LB 板上挑取若干个白色单菌落，分别接种于 1mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中，37℃，200rpm 振荡培养至 OD 为 0.6 左右；
- (2) 以培养的菌液为模板，引物为 M13 通用引物，全式金公司的 Easy Taq 酶进行菌液 PCR 验证，PCR 反应体系为：

模板 DNA	1 μ L
Forward Primer	1 μ L
Reverse Primer	1 μ L
2× Easy Taq PCR Super Mix	10 μ L
ddH ₂ O	7 μ L

20 μ L

PCR 反应条件：94℃ 3min, (94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min) $\times$ 35 循环, 72℃ 10min。

- (3) PCR 产物经 1.0%的琼脂糖胶电泳检测鉴定后, 将含有目的基因的菌液送博尚生物技术有限公司测序。

1.10 质粒 DNA 的抽提

将测序正确的菌液进行质粒的抽提, 质粒 DNA 抽提采用 Axygen Plasmid Kit, 具体操作方法参照试剂盒说明书:

- (1) 将测序正确的菌液扩大培养至 5mL, 室温 12,000 $\times$ g 离心 1min 沉淀菌种;
- (2) 吸尽上清, 向沉淀中加入 250 μ L 含有 RNase A 的 Buffer S1, 漩涡振荡使菌体重新悬浮, 不应留有小的菌块并将其转移至 1.5mL 无菌离心管;
- (3) 加入 250 μ L 的 Buffer S2, 温和的上下翻转离心管 4-6 次使菌体充分裂解, 直至形成透亮的溶液;
- (4) 加入 350 μ L 的 Buffer S3, 温和地上下翻转离心管 6-8 次, 至形成白色絮状沉淀, 室温 12,000 $\times$ g 离心 15min;
- (5) 吸取上清至吸附柱中, 室温 12,000 $\times$ g 离心 1min, 弃滤液;
- (6) 加入 500 μ L 的 Buffer W1 于吸附柱中, 室温 12,000 $\times$ g 离心 1min, 弃滤液;
- (7) 加入 700 μ L 的 Buffer W2 (加入指定体积无水乙醇) 于吸附柱中, 室温 12,000 $\times$ g 离心 1min, 弃滤液;
- (8) 重复上步骤一次;
- (9) 将空柱放回收集管中, 室温 12,000 $\times$ g 离心 1min 至完全去尽柱中残液;
- (10) 将柱子放入新的灭菌 1.5mL 离心管中, 加入 20 μ L 的去离子水, 室温静置 1min。12,000 $\times$ g 离心 1min 洗脱 DNA (将去离子水加热至 65℃ 将会提高洗脱效率)。
- (11) 抽提的质粒用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 用于下一步实验或于 -20℃ 保存备用。

1.11 二化螟酯酶基因的生物信息学分析

利用生物信息学软件对克隆并测序的二化螟酯酶基因 cDNA 序列进行氨基酸序列分析：运用 SeqMan 软件对克隆到的二化螟酯酶基因 cDNA 序列进行分析，并在 NCBI 网站进行 Blastx 比对分析，同源性比较采用 NCBI 中的 BlsatP 工具，序列多重比对采用 ClustalW 和 GeneDoc 软件；利用 Signal IP 4.1 在线预测蛋白信号肽；利用 NetNGlyc1.0 分析糖基化位点；利用 TMHMM 2.0 分析跨膜结构域；运用 MEGA 5.1 软件构建系统发育进化树等。

2 结果分析

2.1 二化螟酯酶基因 CsCaE026 的克隆与序列分析

以二化螟 3 龄幼虫 cDNA 为模板对二化螟酯酶基因 CsCaE026 进行 RT-PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测出与预期大小一致的目的条带（图 3.1），经 DNA 回收和 TA 克隆测序，获得了基因的 cDNA 序列。

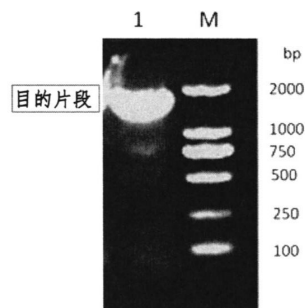


图 3.1 二化螟 CsCaE026 基因的 PCR 扩增

泳道 1：PCR 扩增的目的片段；M：DNA 分子量标准

Fig.3.1 PCR Amplification of CsCaE026 gene in C. suppressalis

Lane 1: PCR Amplification of target fragment; M: DNA molecular weight marker.

采用 NCBI-ORF Finder 工具分析，该基因开放阅读框全长 1,671bp，编码 557 个氨基酸（图 3.2）。BlastP 分析显示，该基因预测氨基酸序列与家蚕羧酸酯酶同源性最高达 77%。表明所获序列为二化螟羧酸酯酶基因，命名为 CsCaE026。预测其

蛋白分子量为 63.66kD，等电点为 5.86。利用 Signal IP 4.1 在线预测蛋白信号肽，N-端前 16 个氨基酸为信号肽（图 3.3）。

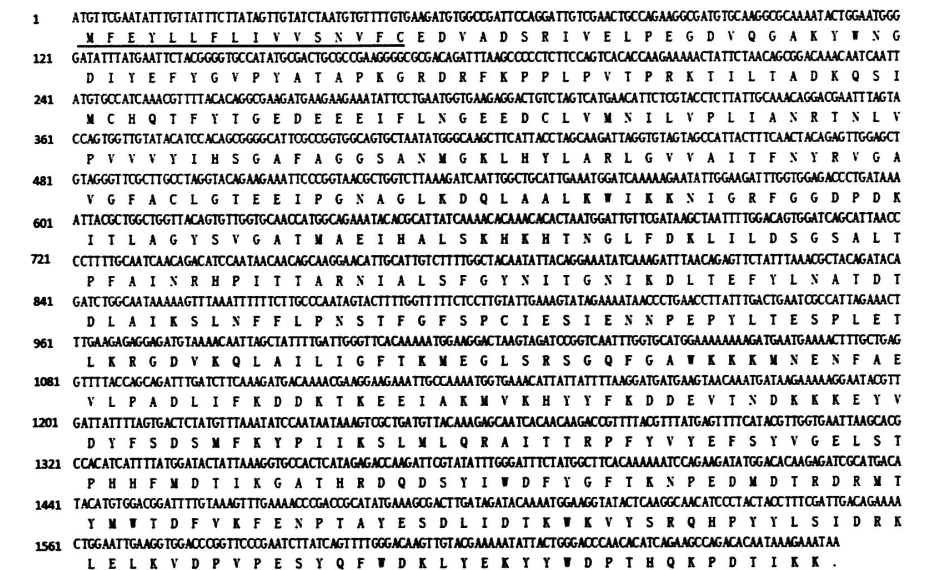


图 3.2 二化螟 *CsCaE026* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.3.2 cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of *CsCaE026* gene of *C. suppressalis*

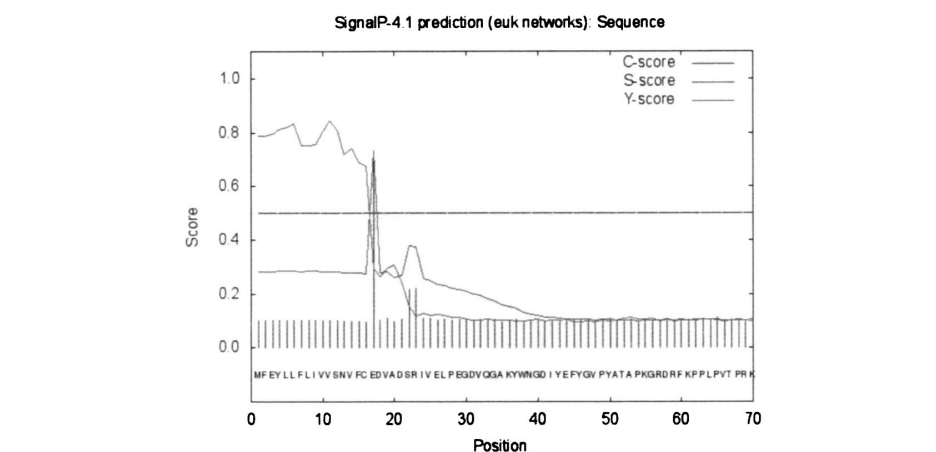


图 3.3 二化螟 *CsCaE026* 基因编码氨基酸的信号肽分析

Fig.3.3 Analysis of the signal peptide of *CsCaE026* gene in *C. suppressalis*

2.2 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的氨基酸序列与发育进化分析

序列多重比对分析显示，二化螟 *CsCaE026* 基因编码蛋白中具有水解活性所必需的 Ser207、Glu339 和 His453，保持着 α/β -酯酶家族的特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly 及二硫键结合位点 (Cys82 和 Cys103) (图 3.4)。通过 NCBI 在线预测发现 *CsCaE026* 蛋白包含一个酯酶的结构域 (图 3.5)，表明该蛋白属于酯酶超家族。

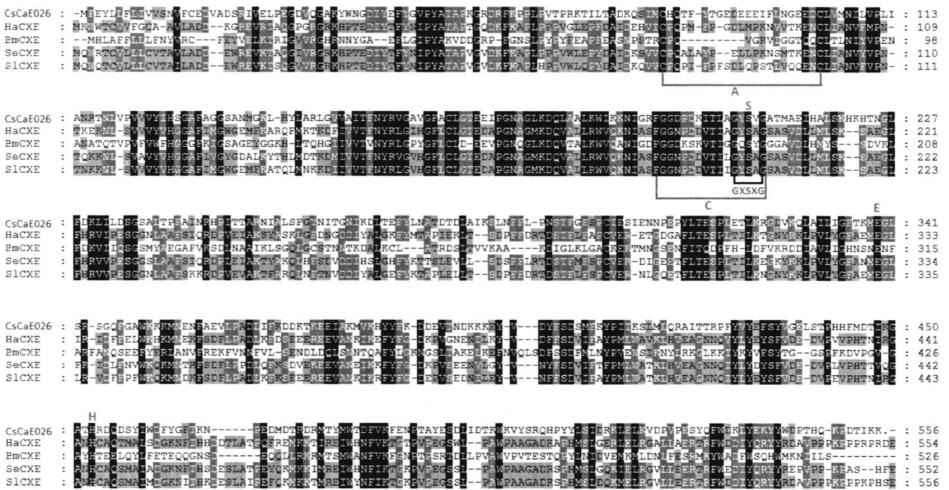


图 3.4 二化螟 *CsCaE026* 与其他昆虫羧酸酯酶氨基酸序列多重比对

羧酸酯酶来源及其 GenBank 登录号分别如下：HaCXE，棉铃虫，ADF43455；BmCXE，家蚕，NP_001177297；SeCXE，甜菜夜蛾，AGJ94046；SiCXE，海灰翅夜蛾，ACV60241。
A：二硫键结合位点；C：酶活性中心区域；S：丝氨酸残基；E：谷氨酸残基；H：组氨酸残基；GX SXG：催化基序。

Fig. 3.4 Alignment analysis of the amino acid sequences between *CsCaE026* in *C. suppressalis* and carboxylesterase in other insects
The origin of carboxylesterases and their GenBank accession numbers are as follows: HaCXE, *Helicoverpa armigera*, ADF43455; BmCXE, *Bombyx mori*, NP_001177297; SeCXE, *Spodoptera exigua*, AGJ94046; SiCXE, *Spodoptera littoralis*, ACV60241.
A: disulfide bond binding sites; C: active site area; S: serine residue; E: glutamic acid residue; H: histidine residue; GX SXG: catalytic motif.

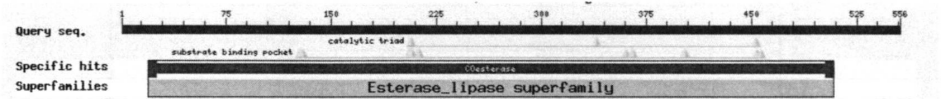


图 3.5 二化螟 CsCaE026 催化结构分析

Fig.3.5 Conserved catalytic domain of CsCaE026 in *C. suppressalis*

由于糖基化位点在 CsCaE026 蛋白的氨基酸序列上分布与酶的活性有关，为此对 CsCaE026 蛋白氨基酸序列进行了 N-糖基化位点的预测。结果显示该蛋白的 115、262、276、293 和 4915 个位点可能为潜在的 N-糖基化位点（图 3.6）。对其跨膜结构域进行预测，没有发现跨膜结构域（图 3.7）。

为研究二化螟羧酸酯酶基因 *CsCaE026* 与其同源基因在进化中的关系，对不同昆虫羧酸酯酶基因构建系统发育进化树。采用邻近法（neighbor joining）重复 1000 次，分析结果表明二化螟 *CsCaE026* 与家蚕羧酸酯酶处于同一进化枝上，进化上关系较近且属于 α -酯酶（图 3.8）。

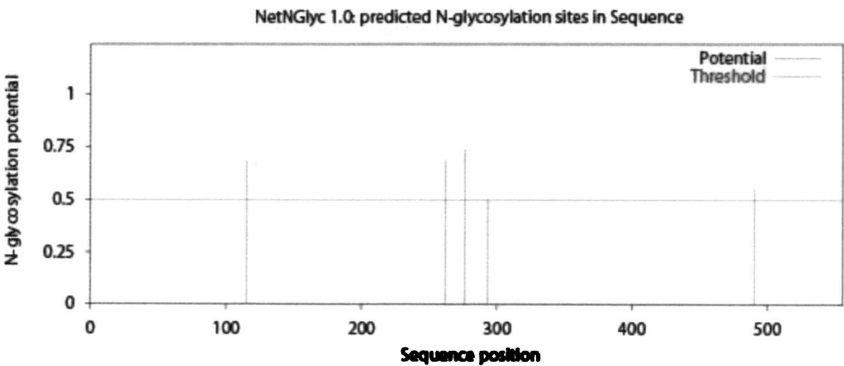


图 3.6 二化螟 CsCaE026 蛋白糖基化位点预测

Fig.3.6 Glycosylation site prediction of amino acid sequence of CsCaE026 in *C. suppressalis*

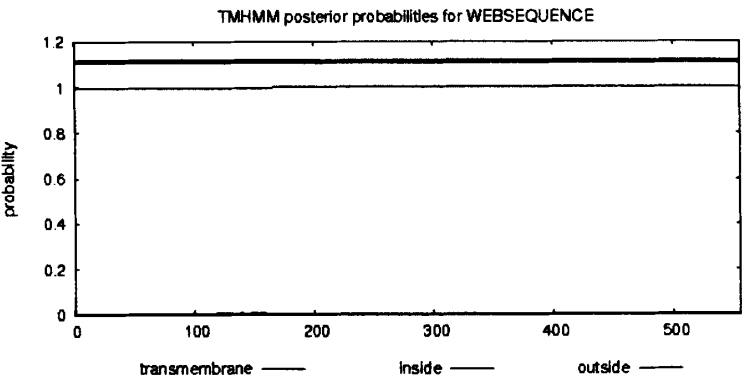


图 3.7 二化螟 CsCaE026 蛋白跨膜结构域预测

Fig.3.7 Trasmembrane region prediction of amino acid sequence of CsCaE026 in *C. suppressalis*

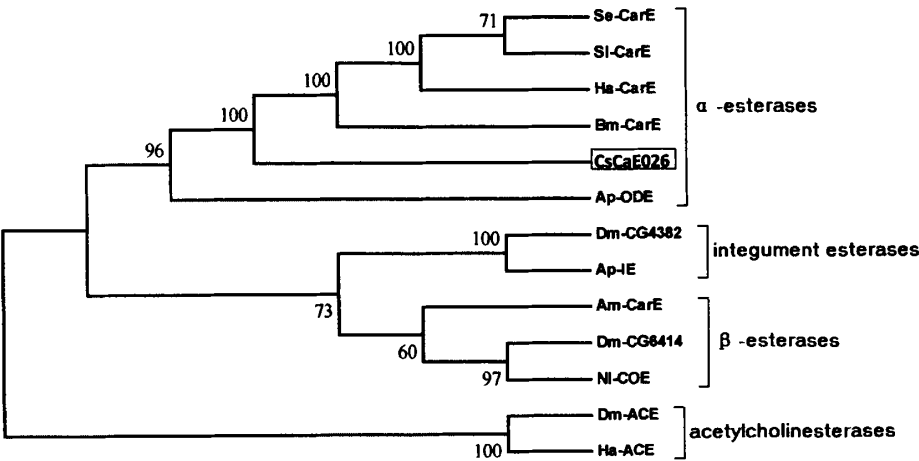


图 3.8 二化螟 CsCaE026 的进化关系分析

Fig.3.8 Analysis of neighbor-joining tree of CsCaE026 in *C. suppressalis*

其他昆虫羧酸酯酶及 GenBank 检索号如下：甜菜叶蛾 *Spodoptera exigua* (Se-CarE, AGJ94046)；海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* (SI-CarE, ACV60241)；棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Ha-CarE, ADF43455)；家蚕 *Bombyx mori* (Bm-CarE, NP_001177297)；多音天蚕 *A. polyphemus* (Ap-ODE, AAM14415)；黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Dm-CG4382, AAF45912)；多音天蚕 *A. Polyphemus* (Ap-IE, AAM14416)；意大利蜜蜂 *A. mellifera* (Am-CarE, AB083009)；黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Dm-CG6414, AAF45912)；褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (NI-COE, AF302777)；黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Dm-ACE, AAF54915)；棉铃虫 *H. armigera* (Ha-ACE, AAM14416)

3 小结

本研究利用 RT-PCR 技术，克隆了二化螟酯酶基因 *CsCaE026*，并进行相关的生物信息学分析。该基因开放阅读框为 1,671bp，共编码 557 个氨基酸，预测其分子量大小约为 63.66kD，等电点为 5.86。经 Signal IP 4.1 在线预测蛋白信号肽，N-端前 16 个氨基酸为信号肽。

将二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 推导的氨基酸序列与 NCBI 搜索到已公布的其他昆虫的羧酸酯酶氨基酸序列进行同源对比分析，发现该基因具有丝氨酸活性中心 GYSVG，催化三聚体（Ser207、Glu339 和 His453）等羧酸酯酶保守结构域，以及具有 α/β -酯酶家族的特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly 和二硫键结合位点（Cys82 和 Cys103）。为研究二化螟羧酸酯酶基因 *CsCaE026* 与其同源基因在进化中的关系，对不同昆虫的羧酸酯酶基因构建系统发育进化树。采用邻近法（neighbor joining）重复 1000 次，分析结果表明 *CsCaE026* 与家蚕羧酸酯酶处于同一进化枝上，进化上关系较近且属于 α -酯酶。

本论文通过分子水平对二化螟酯酶基因进行克隆和分析，旨在为进一步挖掘和验证其功能，深入开展抗药性机理研究和指导新农药的开发提供参考和借鉴。

第四章 二化螟酯酶基因的原核表达及其抗体制备

大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早、应用最广泛的表达系统。与其他表达系统相比，大肠杆菌表达系统具有培养周期短、目的基因表达水平高、抗污染能力强、成本较低等优点。在基因表达技术中占有重要的地位，是生物技术产业化和分子生物学研究发展进程中的重要工具。本章利用大肠杆菌表达系统，通过 pET32a 构建了表达载体，然后在菌株 Rosetta 中对 CsCaE026 基因进行体外表达，同时制备了多克隆抗体，为进一步对 CsCaE026 基因的表达及功能作用机制的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株及主要试剂

载体：载体 pET-32a 为本实验室保存；

菌株：大肠杆菌 Rosetta 菌株为本实验室保存；Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；

试剂：PCR 纯化试剂盒、酶切纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等购自 Axygen 公司；限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Not*I、T4 连接酶等购自 Takara 公司；蛋白质分子量标准、PVDF、免疫印迹 ECL 检测试剂盒等购自 Bio-Rad 公司；BugBuster Master Mix 购自 Novagen 公司；甲醇、冰醋酸等其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 主要实验仪器

Bio-Rad 蛋白质电泳设备和电半干转设备；eppendorf 水平摇床和离心机；Bio-Rad PCR 仪等。

1.3 二化螟酯酶基因重组表达质粒的构建

1.3.1 目的基因的 PCR 扩增和产物纯化

用 BioEidt 软件分析酶切位点后，设计引物序列（由上海生工合成），分别为上游引物：5'-CGG GAT CCA TGT TCG AAT ATT TG-3'（带有酶切位点 *Bam*HI）

和下游引物：5'-GGG CGG CCG CTT ATT TCT TTA TTG T-3'（带有酶切位点 *NotI*）；以二化螟 3 龄幼虫 cDNA 为模板来扩增目的基因，具体如下：PCR 反应条件为 94℃ 变性 30sec，60℃ 退火 30sec，72℃ 延伸 1.5min，共进行 35 个循环，最后 72℃ 保温 10min；反应体系同第三章 1.5。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

PCR 产物纯化方法同第三章 1.6。

1.3.2 目的基因及载体 pET-32a 酶切

分别用 *BamHI* 和 *NotI* 双酶切目的基因 PCR 纯化产物和载体 pET-32a，反应体系如下：

酶切体系为：	DNA 纯化产物/pET-32a	0.5 μg
	FastDigest	1.0 μL
	Buffer	2.0 μL
	ddH ₂ O	16.5 μL

		20.0 μL

反应条件：37℃ 反应 5-10min

1.3.3 酶切产物纯化

使用 Axygen 的酶切纯化试剂盒对酶切反应产物进行纯化，纯化后的 DNA 不含酶蛋白、引物及单核苷酸。步骤参照试剂盒说明书如下（所以离心均在室温下进行）：

- （1）在酶切的反应液中，加入 3 个反应液体积的 Buffer PCR-A（若混合液不足 100μL，则加至 100μL）；混匀后，将其转移至 DNA 制备管中，并将 DNA 制备管置于 2mL 的离心管中（由试剂盒提供），12,000×g 离心 1min，弃滤液；
- （2）将 DNA 制备管置于 2mL 离心管中，加入 700μL 的 Buffer W2（已经加入指定体积的无水乙醇），12,000×g 离心 1min，弃滤液；
- （3）将 DNA 制备管置于 2mL 离心管，加入 400μL 的 Buffer W2，12,000×g 离心 1min；

(4) 将 DNA 制备管置于无菌的 1.5mL 离心管中，在制备管膜中央加适量的去离子水，室温静置 1min。12,000×g 离心 1min 洗脱 DNA（将去离子水加热至 65℃将会提高洗脱效率）。

1.3.4 目的基因与载体连接

将纯化回收的 pET-32a 与目的片段用 T4 DNA 连接酶进行连接。反应体系如下：

10× T4 DNA Ligase Buffer	2.5 μL
目的基因片段	10.0 μL
载体 pET-32a	3.0 μL
T4 DNA 连接酶	1.0 μL
ddH ₂ O	8.5 μL

25.0 μL	

轻轻混匀后，16℃ 反应连接过夜。

1.3.5 连接产物的转化

将 10μL 的连接产物转化至 Trans-T1 感受态细胞中，转化产物涂布在含有 Amp 的 LB 平板上，37℃ 过夜培养。方法同第三章 1.8。

1.3.6 重组质粒的筛选和验证

挑取单克隆菌落，进行 PCR 鉴定和筛选，将含有与目的基因大小一致的菌液送博尚生物技术有限公司测序。将测序正确的菌液大体积培养并提取质粒，重组质粒命名为 CsCaE026/pET-32a。方法同第三章 1.9 和 1.10。

1.4 CsCaE026 基因的原核表达

1.4.1 转化至 Rosetta 感受态细胞

将 pET-32a 和重组质粒 CsCaE026/pET-32a 各取 5μL 质粒转化至表达菌株 Rosetta。转化方法同第三章 1.8。37℃ 过夜培养。

1.4.2 CsCaE026 基因的诱导表达

- (1) 挑选单菌落接种于 LB 液体培养基中（含 100μg/ml Amp）中，37℃、200rpm 条件下培养 8h 左右；
- (2) 接种 1ml 上述菌液于 100ml 新鲜 LB 培养基中，培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右；

- (3) 选择 18℃ 低温诱导，在不同浓度 IPTG (0.1、0.5、1.0mmol/L)、不同时间 (2、4、6 小时) 条件下进行诱导表达以得到最适诱导表达条件；

1.4.3 蛋白表达形式的鉴定

重组蛋白是以包涵体还是可溶形式表达，需要对其进行鉴定。本实验使用 BugBuster Master Mix (Novagen) 预混蛋白抽提试剂抽提蛋白，方法如下：

- (1) 用经预先称重的离心管 4℃，12,000×g 离心 10min 收集菌体，然后倒去液体，称量菌液沉淀湿重；
- (2) 室温下温和涡旋 BugBuster Master Mix 与菌液沉淀混匀，每克菌液需要 5ml 抽提试剂（预先加入加蛋白酶抑制剂）；
- (3) 室温下将重悬的菌液在摇床上低速孵育 10-20min；
- (4) 4℃，12,000×g 条件下离心 20min 以去除不溶的菌体碎片并将上清转入另一新试管，沉淀用适量的 PBS 溶液重悬（沉淀即为包涵体）；
- (5) 取上清和沉淀各 15μL 并加入 5μL 的 4× SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 min；
- (6) 将煮好的样品 12,000×g 离心 1min，各取 20μL 进行 SDS-PAGE 电泳，根据电泳结果确定蛋白表达情况。

1.5 蛋白样品 SDS-PAGE 检测

1.5.1 SDS-PAGE 凝胶配制

每块 10% 分离胶需要：H₂O 1.9ml、30% 丙烯酰胺 1.7ml、1.5M Tris-HCl (pH8.8) 1.3ml、10% SDS 0.05ml、10% 过硫酸铵 0.05ml、TEMED 0.002ml。每块 10% 浓缩胶需要：H₂O 0.08ml、30% 丙烯酰胺 0.17ml、1.5M Tris-HCl (pH6.8) 0.13ml、10% 过硫酸铵 0.01ml、TEMED 0.001ml。

1.5.2 样品处理

将收集的蛋白样品中加入适量 4× 上样缓冲液，沸水浴加热 5-10min，以充分变性蛋白。

1.5.3 上样和电泳

样品冷却到室温后，将蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。为了便于观察转膜效果和电泳效果，以及判断蛋白分子量的大小，最好使用预染蛋白质分子量标准 Marker (TaKaRa 公司)。本实验使用的是 Bio-Rad 的标准电泳装置，电泳时，低电压可以设置在 60-80V，高电压设置在 150V 左右。一般电泳时当溴酚蓝指示带移动至距离胶下缘 1.5cm 处可结束电泳。

1.5.4 染色和脱色

电泳结束后，关掉电源，取出玻璃板，在长短两块玻璃板空隙内，用塑料片轻轻撬动，即可将胶面与一块玻璃板分开，然后轻轻将胶片托起，放入培养皿中染色，使用考马斯亮蓝染色，染色 2-4h，必要时可过夜。弃去染色液，用蒸馏水把胶表面漂洗几次，然后加入考马斯亮蓝脱色液，进行扩散脱色，经常换脱色液，直至蛋白质带清晰为止。

1.6 多克隆抗体制备

在确定蛋白的表达形式后，如果表达蛋白在包涵体内，由于包涵体蛋白难以形成正确的空间构象，因此可能不具备生物学功能，但可以作为制备多克隆抗体的免疫原，所以将在最佳诱导条件下诱导的包涵体蛋白经提取纯化后送去杭州华安生物有限公司做多克隆抗体。

1.7 Western Blot

多克隆抗体制备完成后，需用 Western Blot 对其检测，具体步骤如下：

(1) 转膜 (Transfer)

将经过 SDS-PAGE 后的蛋白胶放于玻璃板上，测量其大小，剪取大小相同的 PVDF 膜，做好标记；先用 100% 甲醇溶液在培养皿中充分浸泡 PVDF 膜，使其完全充分湿润；剪取大小相同的 2 块滤纸，将 PVDF 膜和胶同时放在转移缓冲液内平衡 15min；在半干电转印仪上将其中 1 块滤纸放于最底层，然后依次放上 PVDF 膜、蛋白胶和另外 1 块的滤纸，对齐后用干净的玻璃棒轻柔并均匀地碾压，以驱赶气泡，直至无气泡；恒压进行电转，一般 16V 转 15-20min，蛋白质从负极向正极移动。

转膜的效果可以观察所使用的预染蛋白质分子量标准，通常分子量最大的 1-2 条带较难全部转到膜上。

(2) 封闭 (Blocking)

转膜完成后，立即把 PVDF 膜放到预先准备好的 TBS-T 洗涤液，漂洗 3-5min，以洗去膜上的转膜液，漂洗 3 次；加入 5%脱脂奶粉的 TBS-T 封闭液，在摇床上缓慢摇动，室温封闭 60min，也可以 4℃ 封闭过夜。

(3) 一抗孵育 (Primary antibody incubation)

封闭完后，用 TBS-T 洗涤液漂洗 5 次，每次 5min；一抗即为制备的多克隆抗体，按适当比例用 5%脱脂奶粉的 TBS-T 稀释。室温下在摇床上摇动孵育 1h。

(4) 二抗孵育 (Secondary antibody incubation)

用 TBS-T 洗涤液漂洗 5 次，每次 5 分钟；用按适当比例稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 为二抗反应 1h。

(5) 蛋白检测 (Detection of proteins)

用 TBS-T 洗涤液漂洗 4 次，每次 5 分钟，然后用 TBS 洗涤 5 分钟；采用化学发光法对膜进行拍照检测。

2 结果与分析

2.1 二化螟 *CsCaE026* 基因重组表达质粒的构建

在目的基因 PCR 扩增的正向和反向引物中分别添加 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切位点。以二化螟 3 龄幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，电泳检测获得与预期大小一致的目的条带 (1,671bp)；利用 *Bam*HI 和 *Not*I 双酶切目的基因 *CsCaE026* 和 pET-32a 载体；回收目的条带与 pET-32a，用 T4 连接酶连接；并转化至 Trans-T1 感受态细胞，PCR 检测筛选阳性克隆，重组表达质粒经测序证实构建成功。重组质粒命名为 *CsCaE026/pET-32a*。

2.2 二化螟 *CsCaE026* 基因原核表达及 SDS-PAGE

将重组质粒 *CsCaE026/pET-32a* 转化至大肠杆菌 Rosetta 菌株进行表达。对蛋白表达条件优化，选择 18℃ 低温诱导、不同浓度 IPTG (0.1、0.5、1.0mmol/L)、不

同时间（2、4、6 小时）进行诱导表达。表达组分经 SDS-PAGE 表明目的蛋白主要位于裂解沉淀中，说明该蛋白主要是以包涵体形式表达且得到最佳诱导条件为 0.5mmol/L IPTG 诱导 2h（图 4.1）。在最佳诱导条件下诱导 500mL 的菌液，提取蛋白，SDS-PAGE 对包涵体中蛋白进行检测，结果表明：重组质粒表达产物显示出了大小约 70kDa 的条带。由于目的蛋白分子量约为 63.66kDa，加上载体标签表达的蛋白，约为 70kDa，因此重组表达载体可能在大肠杆菌中得到了正确表达（图 4.2）。

对硝基苯醋酸酯（p-NPA）为底物，对 CsCaE026 重组蛋白进行了酶活测定，结果并未检测到酯酶活性。这可能与在大肠杆菌中缺乏 CsCaE026 酯酶翻译后的加工系统，从而不能形成正确的构象，导致原核表达产物不具酯酶活性。

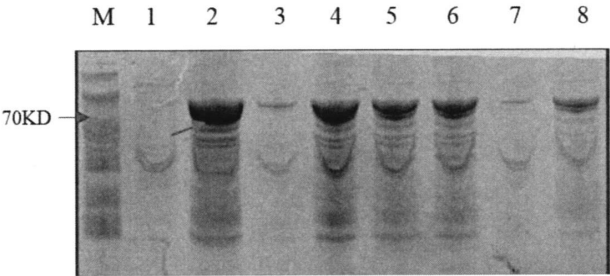


图 4.1 不同 IPTG 浓度和时间诱导 CsCaE026 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析
M：蛋白质分子量标准；泳道 1：无 IPTG 诱导 2h；泳道 2：0.5mmol/L IPTG 诱导 2h；泳道 3：无 IPTG 诱导 4h；泳道 4：0.1mmol/L IPTG 诱导 4h；泳道 5：0.5mmol/L IPTG 诱导 4h；泳道 6：1.0mmol/L IPTG 诱导 4h；泳道 7：无 IPTG 诱导 6h；泳道 8：0.5mmol/L IPTG 诱导 6h。

Fig4.1 SDS-PAGE analysis of CsCaE026 gene expression induced by different IPTG concentrations and times

M: molecular weight marker; Lane1: no IPTG for 2h; Lane2: 0.5mmol/L IPTG for 2h; Lane3: no IPTG for 4h; Lane4: 0.1mmol/L IPTG for 4h; Lane5: 0.5mmol/L IPTG for 4h; Lane6: 1.0mmol/L IPTG for 4h; Lane7: on IPTG for 6h; Lane8: 0.5mmol/L IPTG for 6h.

2.3 多克隆抗体制备与 Western Blot 抗体验证

原核诱导表达出的包涵体蛋白难以形成正确的空间构象，因此可能不具有生物学功能，只具有目的蛋白的一级结构。但可以作为制备多克隆抗体的免疫原，所以可将大量表达的外源蛋白用于制备多克隆抗体。Western Blot 对抗体进行验证，一

抗为多克隆抗体，二抗为辣根过氧化物酶（HRP），结果显示在大小约为 70kD 处有明显的条带，大小与预期的目的蛋白分子量一致（图 4.3）。说明抗体的制备是成功的。

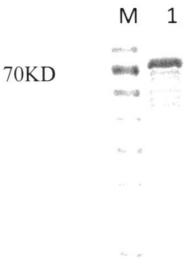


图 4.2 *CsCaE026* 基因在大肠杆菌 Rosetta 中的表达
M：标准蛋白样品；泳道 1：质粒 *CsCaE026/pET-32a* 在大肠杆菌 Rosetta 中的表达

Fig4.2 Expression of *CsCaE026* gene in *E.coli* Rosetta strain
M: molecular weight marker; Lane1: proteins from Rosetta transformed with *CsCaE026/pET-32a* plasmid

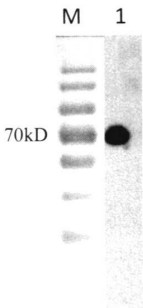


图 4.3 多克隆抗体的 Western Blotting 验证
M：标准蛋白样品；泳道 1：稀释 1000 倍的多克隆抗体 Western Blotting 结果

Fig4.3 Western Blotting Verification of Polyclonal antibodies
M: molecular weight marker; Lane1: Dilution 1000 times of Polyclonal antibodies

3 小结

原核表达所采用的大肠杆菌表达系统是目前来说最常用的外源蛋白表达系统，具有培养周期短、操作简单、成本较低、表达产量高等优点，特别是在规模化的生物工程中具有不可替代作用。为此本章研究的目的在于一方面希望表达出具有活性的蛋白用来进行酯酶活性的测定，另一方面希望得到大量的外源蛋白用于制备多克隆抗体。因此选择了采用原核表达的方式来进行蛋白表达。外源蛋白在大肠杆菌中通常以包涵体或者可溶性两种形式表达存在。包涵体蛋白一般不备生物学功能，只

具有目的蛋白的一级结构。形成包涵体的主要原因有：（1）大肠杆菌在进行诱导表达时，蛋白合成的速度非常快，以至于没有足够的时间来进行折叠，导致二硫键不能正确配对，过多的蛋白形成非特异性结合，从而使得蛋白质无法达到足够的溶解度；（2）因为重组蛋白是大肠杆菌的异源蛋白，缺乏真核生物翻译后修饰所需要的酶类，致使中间体大量积累，容易导致包涵体沉淀的形成；（3）外源蛋白受诱导温度、诱导时间和 IPTG 浓度的影响，当诱导条件不佳时，容易形成包涵体。

总体来说，大肠杆菌表达系统作为目前应用最广泛的蛋白质表达系统具有较多优点，但是也存在一些不足，比如目的蛋白常以包涵体形式表达，且产物纯化困难，表达产物的生物学活性较低，原核表达系统翻译后的加工修饰体系不完善等。因此，关于表达产物的构象、分泌、定位和修饰加工的研究是今后大肠杆菌表达系统研究的重点方向。

本实验中二化螟酯酶基因在大肠杆菌中表达时，对 IPTG 浓度和诱导时间均有一定的敏感性。然而在实验过程中，一个非常棘手的问题是高效表达的重组蛋白在细胞内凝集，形成不溶的、无活性的包涵体。所以原核表达出的包涵体蛋白不能用来进行酯酶活性的测定，但可以作为制备多克隆抗体的免疫原。所以可将大量表达的外源蛋白用于制备多克隆抗体。从 SDS-PAGE 图谱看，表达产物在分子量约为 70kD 处出现了表达条带，与预期蛋白分子量一致；用制备的多克隆抗体作为一抗对表达产物作 Western Blot 分析结果，表达产物显示同样的阳性结果反应。上述结果表明 *CsCaE026* 基因在大肠杆菌表达系统中表达成功，但并未检测到重组蛋白的酯酶活性。为二化螟酯酶基因在昆虫及真核表达产物中的检测及功能作用机制的进一步研究奠定了基础。

第五章 二化螟酯酶基因的时空表达分析

近年来,随着分子生物学技术的不断快速发展,实时荧光定量 PCR 技术在昆虫学研究中的应用越来越广泛。该技术克服了传统 PCR 技术的假阳性以及不能定量等缺点,具有准确可靠、特异性强、灵敏度高等优点,越来越受到昆虫学家的青睐。本章分别应用实时荧光定量 PCR 技术和蛋白免疫检测技术,分析了二化螟 *CsCaE026* 基因转录及翻译水平的时空表达分布,以探讨二化螟酯酶 *CsCaE026* 基因的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

二化螟来源及饲养条件同第三章 1.1。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 (Trizol Reagent) 购自 Invitrogen 公司;定量 PCR 试剂盒 (TransStartTM Top Green qPCR SuperMix) 和反转录试剂盒 (TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix) 购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白质分子量标准、PVDF、免疫印迹 ECL 检测试剂盒等购自 Bio-Rad 公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

Bio-Rad 蛋白质电泳设备、水平摇床和电半干转设备;Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System 定量 PCR 仪、Bio-Rad PCR 仪、eppendorf 离心机等。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

1.3.1 二化螟不同发育阶段总 RNA 提取

选取健康且大小一致的处于不同发育阶段的二化螟:3 个卵块(约 50 粒卵)、50 头 1 龄幼虫;5 头 3 龄幼虫、5 龄幼虫、蛹、和成虫(雄与雌)各 1 头。用液氮快速冷冻后迅速放入 -80℃ 备用保存。每种虫态(共 6 种)至少重复 3 次。样品 RNA 的提取采用 Trizol 法,所提取的 RNA 置于 -80℃ 保存备用(详细的总 RNA 提取步骤同第三章 1.3)。

1.3.2 二化螟 5 龄幼虫不同组织总 RNA 提取

选取健康且大小一致的二化螟 5 龄老熟幼虫若干头，用剪刀剪破幼虫腹足，轻压虫体，收集血细胞于同一无菌离心管中，用液氮快速冷冻后迅速放入-80℃备用保存。将提取完血细胞的二化螟幼虫固定在蜡盘上，置于解剖镜下解剖分离出表皮、脂肪体、中肠、马氏管和神经索等，用 PBS 缓冲液冲洗后，相同组织收集在同一无菌离心管中，用液氮快速冷冻后迅速放入-80℃备用保存。每种组织（共 6 种）至少重复 3 次。采用 Trizol 法提取样品 RNA，-80℃保存备用。

1.3.3 二化螟雌雄成虫不同躯体总 RNA 提取

选取健康且大小一致的二化螟雌、雄成虫各若干头。二化螟成虫固定在蜡盘上，置于解剖镜下解剖分离雌雄成虫头（去除触角）、胸、腹、足、翅、触角不同躯体样品。用 PBS 缓冲液冲洗后，相同躯体收集在同一无菌离心管中，用液氮快速冷冻后迅速放入-80℃备用保存。每种躯体（共 6 种）至少重复 3 次。采用 Trizol 法提取样品 RNA，-80℃保存备用。

1.3.4 cDNA 第一条链的合成

将二化螟不同发育阶段、5 龄幼虫不同组织、雌雄成虫不同躯体的 RNA，参照反转录试剂盒说明书步骤合成 cDNA 第一条链，以此作为定量 PCR 的模板（cDNA 合成步骤同第三章 1.4）。

1.4 定量 PCR 引物的设计

根据二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 序列，运用 Primer 3 在线引物设计网站，设计用于荧光实时定量 PCR 的引物 *CsCaE026qRT-F*、*CsCaE026qRT-R* 和内参 *β-actin* 序列，引物由上海英俊生物公司合成（表 5.1）。所合成的引物先用 PCR 进行检测，验证后再用于定量反应。

1.5 荧光定量 PCR 及定量数据分析

荧光定量 PCR 试剂盒为 TransStart™ Top Green qPCR SuperMix，具体步骤参照试剂盒说明书，定量 PCR 反应体系如下：

Forward Primer (10μM)	0.4 μL
Reverse Primer (10μM)	0.4 μL
2× TransStart™ Top Green qPCR SuperMix	10.0 μL

Passive Reference Dye	0.4 μL
Template	1.0 μL
ddH ₂ O	7.8 μL

	20.0 μL

定量 PCR 反应程序为：(94 ℃ 30 s, 94℃ 5 s, 60℃ 34 s) × 40 循环，反应结束后读取 Ct 值，溶解曲线参数设置为默认。

采用 $\Delta\Delta C_T$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 进行相对定量分析。每次试验样品设置 3 次生物学重复以减小误差，其中每个试验处理设 3 次重复。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行计算，其中 $\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$ ， $\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$ ， $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$ 。实验数据采用 DPS 软件 (唐启义和冯明光, 2007) 对各处理进行方差分析。

表 5.1 实时定量 PCR 中使用的引物
Table 5.1 Primers used in real-time qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物长度 Amplicon size	退火温度(℃) T _m	用途 Purpose
CsCaE026qRT-F	CGCATATGAAAGCGACTTGA	177	59.98	qRT-PCR 检测目的基因
CsCaE026qRT-R	TCTGGCTTCTGATGTGTTGG	177	59.83	Target gene detection with qRT-PCR
β-action-F	ACATATGCTGGAAGGTGGAC	196	60.12	qRT-PCR 检测内参基因
β-action-R	AAGGACCTGTACGCCAACAC	196	60.04	Reference gene detection with qRT-PCR

1.6 二化螟酯酶基因 CsCaE026 蛋白表达的时空分析

将 1.3 中存放于 -80℃ 中的不同发育阶段的二化螟、二化螟 5 龄幼虫不同组织、二化螟雌雄成虫不同躯体加入适量的 PBS 缓冲液 (加入蛋白酶抑制剂)，用研磨仪磨碎，离心后取上清，测定蛋白浓度。将蛋白定量，用 Western blot 检测 CsCaE026 蛋白的差异表达。

2 结果与分析

2.1 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 表达的时间分布

以 β -actin 作为内参基因，利用实时荧光定量 PCR 对不同发育阶段二化螟体内酯酶基因 *CsCaE026* 的转录水平进行分析（图 5.1）。结果表明，*CsCaE026* 在二化螟不同发育阶段均有表达，其中以幼虫期表达量相对较高，蛹期和成虫期表达量相对较低。不同阶段以 5 龄幼虫的表达量为最高，且与卵期、蛹期和成虫期等存在显著性差异（ $P<0.05$ ），但与 1 龄和 3 龄幼虫差异不显著。卵期、蛹期和成虫期之间表达差异不显著。

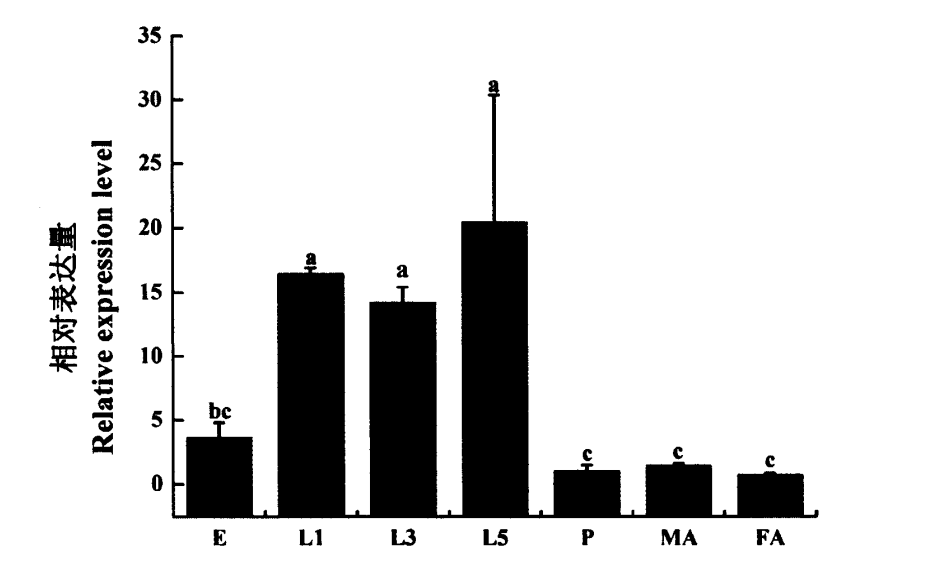


图 5.1 二化螟不同发育阶段 *CsCaE026* 转录水平分析

E: 卵; L1: 1 龄幼虫; L3: 3 龄幼虫; L5: 5 龄幼虫; P: 蛹; MA: 雄成虫; FA: 雌成虫

柱上标有不同小写字母表示平均数经 Duncan's 多重比较后差异达显著 ($P<0.05$)。下同。

Fig. 5.1 Quantitative analysis of *CsCaE026* transcription in developmental stages of *C. suppressalis*

E: eggs; L1: 1st instar larva; L3: 3rd instar larva; L5: 5th instar larva; P: pupa; MA: male adult; FA: female adult

Different letters above bars indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple-range test. The same hereinafter.

对不同发育阶段的二化螟，研磨离心后取上清，将蛋白样品定量（5μg），用 Western blot 检测其蛋白的表达量（图 5.2）。结果表明，CsCaE026 蛋白在幼虫期和蛹期较多，在卵期和成虫期表达量较少。

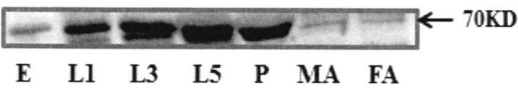


图 5.2 二化螟不同发育阶段 *CsCaE026* 翻译水平分析
Fig. 5.2 Quantitative analysis of *CsCaE026* translation in developmental stages of *C. suppressalis*

2.2 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 表达的组织分布

以β-actin 作为内参基因，利用实时荧光定量 PCR 对二化螟 5 龄幼虫不同组织中 *CsCaE026* 基因的转录水平进行分析（图 5.3）。结果表明，*CsCaE026* 基因在 5 龄幼虫各组织中均有表达，其中以中肠的表达量为显著最高（P<0.05）；其次是神经索、脂肪体、马氏管和血细胞等，表皮的表达量为最低，但后者之间表达差异不显著。

对解剖出的二化螟 5 龄幼虫不同组织，研磨离心后取上清，将蛋白样品定量（5μg），用 Western blot 检测其蛋白的表达量（图 5.4）。结果表明，*CsCaE026* 在中肠中的蛋白表达量为最多；马氏管、神经和脂肪体等略有表达；表皮和血细胞中基本无表达。这与 *CsCaE026* 转录水平表达量的测定结果一致。

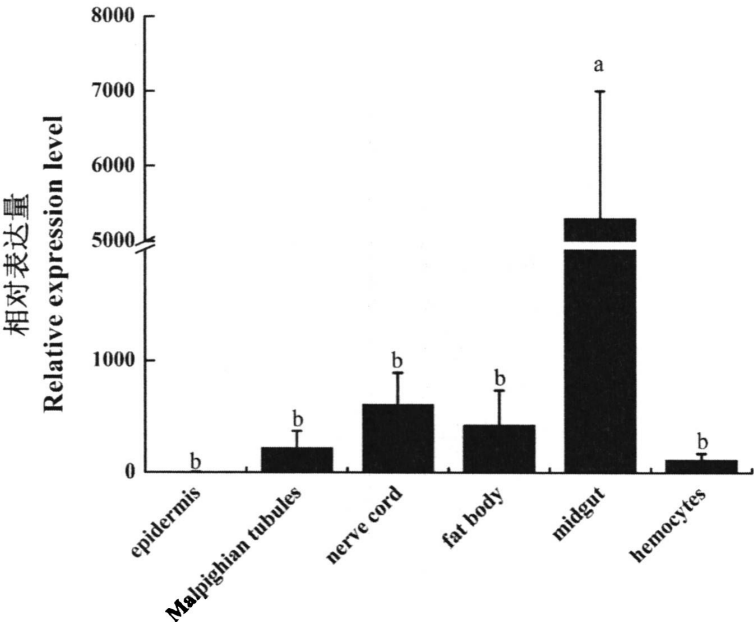


图 5.3 二化螟 5 龄幼虫不同组织 *CsCaE026* 转录水平分析

Fig. 5.3 Quantitative analysis of *CsCaE026* transcription in 5th instar larval tissues of *C. suppressalis*

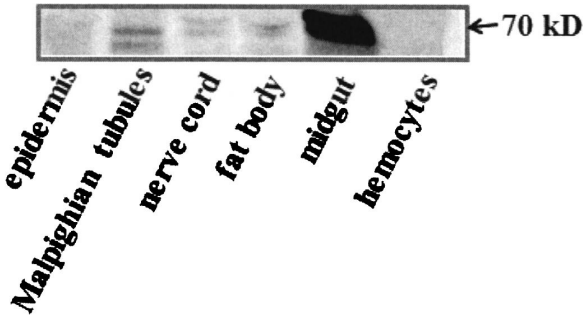


图 5.4 二化螟 5 龄幼虫不同组织 *CsCaE026* 翻译水平分析

Fig. 5.4 Quantitative analysis of *CsCaE026* translation in 5th instar larval tissues of *C. suppressalis*

2.3 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 表达的体躯分布

以 β -actin 作为内参基因，利用实时荧光定量 PCR 技术对二化螟成虫不同体躯酯酶 *CsCaE026* 基因的转录水平进行分析（图 5.5）。结果表明，*CsCaE026* 在二化螟成虫体躯各部分中均有表达。雄蛾体躯各部分的表达量均高于雌蛾，且均以头部和翅的表达量为最高，触角表达量为最低；其中翅在雄蛾与雌蛾之间的表达差异达到极显著水平（ $P\leq0.01$ ），头部、胸部和腹部在雄蛾与雌蛾之间的表达差异达显著水平（ $P\leq0.05$ ），而足和触角在雄蛾与雌蛾之间的表达差异不显著。

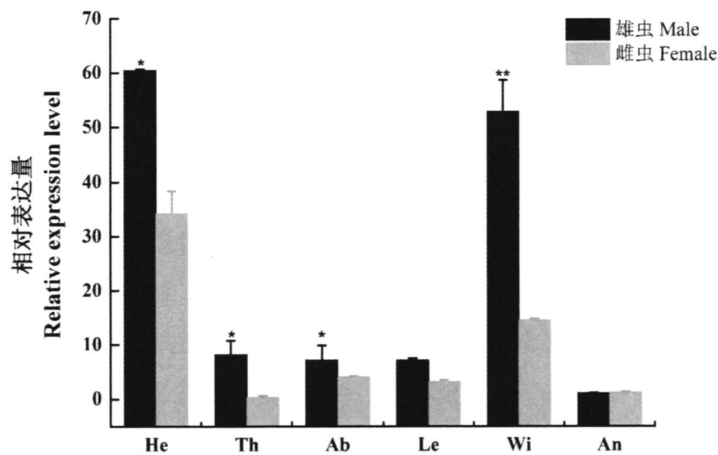


图 5.5 二化螟成虫不同体躯部分 *CsCaE026* 的转录水平分析

**表示经 t-测验雌、雄之间存在 $P\leq0.01$ 水平上的差异，*表示经 t-测验雌、雄之间存在 $P\leq0.05$ 水平的差异

He: 头（去掉触角）；Th: 胸部；Ab: 腹部；Le: 足；Wi: 翅；An: 触角。下同。

Fig. 5.5 Quantitative analysis of *CsCaE026* transcription in adult body parts of *C. suppressalis*

** indicates significant difference at 0.01 level between female and male by t-test, * indicates significant difference at 0.05 level between female and male by t-test

He: head with antennae removed; Th: thorax; Ab: abdomen; Le: leg; Wi: wings; An: antenna. The same hereinafter.

对解剖获得的二化螟雌、雄成虫躯体不同部分，研磨离心后取上清，将蛋白样品定量（5 μ g），用 Western blot 检测其蛋白的表达量（图 5.6）。结果表明，

CsCaE026 在雄虫中的蛋白表达量比雌虫略高，且均以头部、胸部、腹部和翅表达量为较高。

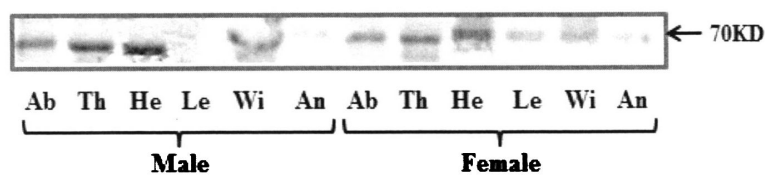


图 5.6 二化螟成虫不同体躯部分 *CsCaE026* 的翻译水平分析
Fig. 5.6 Quantitative analysis of *CsCaE026* translation in adult body parts of *C. suppressalis*

3 小结

酯酶是动物体内比较普遍而且很重要的一种解毒酶系。它可以通过水解酯类化合物的酯键，或与亲脂类有毒化合物结合，降低有毒化合物的有效浓度来降低其毒性。许多杀虫剂分子是含有酯键的酯类化合物，如有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂。不同的酯酶在昆虫的生长发育以及抗性形成中的作用不同。羧酸酯酶作为昆虫体内重要的解毒酶，分布于头部、中肠、触角和马氏管等组织中，其功能也十分多样，主要包括外源物的解毒，信息素或激素的降解，以及参与神经形成及调节发育等。

采用实时荧光定量 PCR 技术分析二化螟 *CsCaE026* 基因在不同生长发育阶段和组织的转录水平分布。结果表明：（1）在二化螟的不同发育阶段，*CsCaE026* 基因在幼虫期转录量较高，其中 5 龄幼虫期转录量最高，且与卵期、蛹期和成虫期等转录量之间差异显著；（2）在 5 龄幼虫的不同组织，*CsCaE026* 在中肠中的转录量最高，且与表皮、马氏管、神经索、脂肪体和血细胞等转录量之间差异显著；（3）在雌、雄成虫体躯不同部分中，雄蛾体躯各部分转录量均高于雌蛾，且均以头部和翅的转录量最高，触角转录量最低。

采用免疫检测技术分析二化螟 *CsCaE026* 基因在不同生长发育阶段和组织的翻译水平分布。结果表明，*CsCaE026* 在二化螟不同发育阶段的蛋白表达以幼虫期和

蛹期较高，卵期和成虫期较低；在 5 龄幼虫不同组织的蛋白表达以中肠最多，马氏管、神经和脂肪体等较低，表皮和血细胞基本无表达；在成虫体躯各部分的蛋白表达以雄蛾明显较高，且均以雄蛾头部、胸部、腹部和翅等的蛋白表达相对较高。

由此可见，二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 主要是在幼虫期的中肠中大量表达，推测与食物中有毒物质的代谢降解有关。

第六章 二化螟酯酶基因的真核表达

二化螟 *CsCaE026* 基因在大肠杆菌的重组表达产物不具有酯酶活性。为探明该基因的酶学特性及其生物学功能，需进行真核表达。

众所周知，杆状病毒表达系统 (Baculovirus expression vector system, BEVS) 是 20 世纪 80 年代发展起来的真核表达系统，是将外源基因通过位点的特异性转座作用整合到 Bacmid 中去，经过筛选重组 Bacmid，然后直接转染昆虫细胞，得到纯的重组病毒，同时高效表达外源基因的一种系统。Smith 等 (1983) 利用 AcMNPV 在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 细胞成功地表达了 β -干扰素；Maeda 等 (1985) 利用 BmNPV 在家蚕幼虫体内高水平表达了人的 α -干扰素。本研究在通过 RT-PCR 成功克隆 *CsCaE026* 基因的基础上，利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统对基因进行了真核表达，为进一步研究二化螟酯酶 *CsCaE026* 基因的功能提供材料。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株及主要试剂

载体：载体 pFastBac-HTE 为浙大昆虫所张传溪赠送 (图 6.1)；

菌株：DH10Bac 感受态细胞、Sf9 昆虫细胞为本实验室保存；Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；

试剂：PCR 纯化试剂盒、酶切纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司；T4 连接酶、碱性磷酸酶、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 等为 Takara 公司产品；PVDF、DNA 标准分子量、蛋白质分子量标准、免疫印迹 ECL 检测试剂盒等购自 Bio-Rad 公司；蛋白纯化试剂盒 ProteinIso™ Ni-NTA Resin 购自北京全式金生物技术有限公司；抗生素：卡那霉素 (Kanamycin) (50mg/ml)，四环素 (Tetracyclin) (10mg/ml)，庆大霉素 (Genlamycin) (50mg/ml) 等其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 主要实验仪器

Bio-Rad 蛋白质电泳设备和电半干转设备；eppendorf 水平摇床和离心机、Bio-Rad 琼脂糖电泳仪、Bio-Rad PCR 仪、Bio-Rad 凝胶成像系统等。

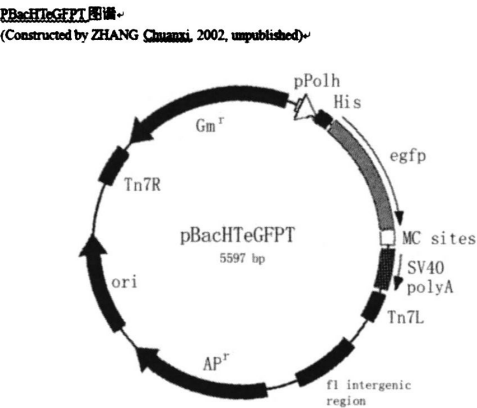


图 6.1 pFastBac-THE 图谱

Fig. 6.1 pFastBac-THE map

1.3 二化螟酯酶基因 CsCaE026 的 PCR 扩增和纯化

利用 Primer5.0 软件设计引物（上海生工合成），上游引物 5'-CGG GAT CCG ACG ACG ACG ACA AGA TGT TCG AAT ATT TG-3'（含 *Bam*HI 酶切位点），下游引物为 5'-CCG CTC GAG TTA TTT CTT TAT TGT-3'（含 *Xho*I 酶切位点）。以二化螟 3 龄幼虫 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增：94℃ 5 min，（94℃ 30sse，55℃ 30sec，72℃ 2min）×30 循环，72℃ 10 min，扩增产物保存于 4℃。反应体系同第三章 1.5。PCR 扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

PCR 产物纯化步骤见第三章 1.6。

1.4 供体质粒的构建

1.4.1 目的基因及载体 pFastBac-THE 酶切

分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切目的基因 PCR 纯化产物和载体 pFastBac-HTE，反应体系如下：

酶切体系为： DNA 纯化产物/pFastBac-THE 0.5 μg

FastDigest	1.0 μL
Buffer	2.0 μL
ddH ₂ O	16.5 μL
20.0 μL	

反应条件：37℃反应 10min。

1.4.2 酶切产物纯化

将目的基因与载体的酶切反应液用酶切产物纯化试剂盒纯化，方法同第四章 1.3.3。

1.4.3 载体酶切纯化产物的去磷酸化反应

使用宝生物工程有限公司的碱性磷酸酶（ALP）将载体酶切纯化产物去磷酸化，使载体不发生能自连，反应体系如下：

酶切纯化产物	20 μL
10× Alkaline Phosphatase	5 μL
CIAP	2 μL
ddH ₂ O	23 μL
50 μL	

将混合物短暂离心后，37℃反应 30min。

1.4.4 目的基因与载体连接

将纯化回收的 pFastBac-HTE 载体与目的片段用 T4 DNA 连接酶进行连接。反应体系如下：

10× T4 DNA Ligase Buffer	2.5 μL
目的基因片段	10.0 μL
载体 pFastBac-THE	3.0 μL
T4 DNA 连接酶	1.0 μL
ddH ₂ O	8.5 μL
25.0 μL	

轻轻混匀后, 16°C 反应连接过夜。

1.4.5 连接产物的转化

分别取 15 μ L 的连接产物转化至感受态大肠杆菌 Trans-T1 中, 转化产物涂布于含有 Amp 的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。方法同第三章 1.8。

1.4.6 供体质粒的筛选和验证

挑取白色单克隆菌落, 进行 PCR 鉴定, 将含有与目的基因大小一致的菌液送博尚生物技术有限公司测序。将测序正确的菌液大体积培养并提取质粒, 重组质粒命名为 CsCaE026/pFastBac。方法同第三章 1.9、1.10。

1.5 重组 Bacmid 的获得

1.5.1 供体质粒 CsCaE026/pFastBac 转入 DH10Bac 感受态细胞

将供体质粒 CsCaE026/pFastBac 转化至 DH10Bac 感受态细胞, 在含有一定卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG、X-gal 的固体培养基上培养。操作步骤如下:

- (1) 在刚解冻的 DH10Bac 感受态细胞中加入 1 μ L 的供体质粒, 轻轻混匀混合物, 在冰上静置 30min;
- (2) 42°C 水浴热激 45sec, 然后快速将离心管转移到冰浴中 2min, 该过程不要摇动离心管;
- (3) 向每个离心管中加入 500 μ L 无抗生素的 LB 液体培养基, 混匀后置于 37°C, 200rpm 培养 4h, 使细菌复苏;
- (4) 在含有 50 μ g/ml Kan、7 μ g/ml Gentamicin 和 10 μ g/ml tetracycline 等抗生素的 LB 固体培养基平板上加入 40 μ L 20mg/mL X-gal 和 7 μ L 100mg/mL IPTG 溶液, 将其轻轻涂布均匀并晾干;
- (5) 取 200 μ L 培养的菌液于上述平板, 将菌液轻轻涂布均匀;
- (6) 将平板置于 37°C 烘箱中至液体被完全吸收, 倒置平板, 37°C 培养 48h 以上。

1.5.2 重组 Bacmid 筛选和验证

在 LB 固体培养基上挑取白色阳性菌落, 挑入含有 3 种抗生素的液体培养基, 37°C 振荡培养 8h。用 M13-F: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'作为上游引物, M13-R: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'作为下游引物进行菌液 PCR 验证, 通

过 PCR 片段的大小来确定转座是否成功，将转座成功后的质粒即重组 Bacmid 命名为 CsCaE026/ Bacmid。具体步骤如下：

- (1) 在 LB 平板上挑取若干个白色单菌落，分别接种于 1mL 含 50μg/ml Kan、7μg/ml Gentamicin 和 10μg/ml tetracycline 等抗生素的 LB 液体培养基中，37℃ 振荡培养；
- (2) 以培养的菌液为模板，M13 为引物，PCR 反应所使用的酶为 TOYOBO 公司生产的 KOD-Plus 酶，反应体系如下：

10×Buffer for KOD-Plus	2.50 μL
2 mM dNTPs	2.50 μL
25 mM MgSO ₄	0.50 μL
M13 Forward	0.75 μL
M13 Reverse	0.75 μL
Template DNA	0.50 μL
KOD-Plus	0.50 μL
ddH ₂ O	2.00 μL

10.00 μL	

将混合物短暂离心后置于 PCR 仪上进行后续反应。

PCR 反应程序为：94℃ 2 min，（94℃ 15 s，55℃ 30 s，68℃ 2min）×35 循环

(3) 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将含有与目的基因大小一致的菌液送博尚生物技术有限公司测序。

1.5.3 提取重组病毒 CsCaE026/Bacmid

将测序正确的菌液采用碱法提取重组病毒 CsCaE026/Bacmid，步骤如下：

- (1) 将测序正确的菌液吸取少量加入至含有 50μg/ml Kan、7μg/ml Gentamicin 和 10μg/ml tetracycline 的 20ml LB 液体培养基；
- (2) 37℃，200rpm 培养至菌体生长到稳定期；
- (3) 用 1.5ml 无菌离心管 12,000×g 离心 1min 收集菌体；
- (4) 倒掉上清，加 0.3ml 的 S1 悬浮沉淀，轻轻地震荡或上下混匀；
- (5) 加 0.3ml 的 S2 轻轻混匀，室温孵育 5min。

- (6) 缓慢加入 0.3ml S3, 并温和地上下翻转离心管数次, 至形成白色絮状沉淀, 然后冰上放置 5-10min;
- (7) 12,000×g 离心 10min;
- (8) 轻轻的将上清转移到含有 0.8ml 异丙醇的无菌离心管, 不要吸到白色沉淀。颠倒混匀, 冰上放置 5-10min。
- (9) 室温 12,000×g 离心 15min;
- (10) 弃去上清, 不要浮起沉淀, 加入 0.5ml 70%的乙醇。颠倒离心管数次清洗沉淀;
- (11) 室温 12,000×g 离心 5min。
- (12) 尽可能多的除去上清, 不要搅动沉淀。室温 5-10min 风干沉淀, 注意不要过分干燥;
- (13) 加 20 μ L 的无菌水重新溶解 DNA 沉淀, -20℃保存备用。

1.6 昆虫 Sf9 细胞的转染及表达

1.6.1 昆虫 Sf9 细胞的培养及转染

转染的昆虫细胞系为 Sf9, 所用的细胞培养液为 Sf-900II, 使用 25mL 的细胞培养瓶培养, 培养温度为 27℃。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, 整个表达在 Sf9 宿主细胞中进行。转染步骤如下:

- (1) 确保培养的 Sf9 细胞数在 $1.5-2.5 \times 10^6$ cell/ml。6 孔板中每孔加 2ml 无血清的 Sf9 细胞培养液且每孔含 8×10^5 cell, 室温放置 15min。
- (2) 取两支 1.5ml eppendorf 管配制下列溶液: 溶液 A: 1 μ g 重组杆状病毒 DNA 溶于 100 μ L 无血清的培养液中; 溶液 B: 将 8 μ l CellfectinII 稀释于 100 μ L 无血清的培养液中; 合并溶液 A 和溶液 B, 轻轻混匀室温放置 15-30min。
- (3) 将溶液混合物逐滴加入到 1 中, 27℃培养 2-3d, 直到能够看到病毒感染现象 (有荧光, 细胞不再生长, 细胞核充满细胞等)。

1.6.2 P1 病毒株的提取

当细胞出现病毒感染现象后，尤其是有荧光出现（pFastBac-HTE 含有 GFP），则证明了 CsCaE026 已在昆虫细胞中进行了扩增。然后就可以从每个孔中收集含有病毒的细胞至 1.5ml 无菌的离心管中，500×g 离心 5min 除去细胞和大碎片；将上清转移至新离心管中，这就是 P1 病毒株，4℃避光保存。

1.6.3 P1 病毒株的扩增

P1 病毒株是低滴度，小规模毒株，需要使用这株去感染细胞，从而产生高滴度的 P2 病毒株。依照下列步骤在 6 孔板中扩增 P1 毒株：

- (1) 感染当天，准备 Sf9 细胞， 2×10^6 cell/孔。培养细胞室温 1h；
- (2) 1h 后在显微镜下检查细胞的吸附情况；
- (3) 每孔加入合适数量的 P1 毒株；
- (4) 在 27℃培养箱孵育细胞 48h；
- (5) 感染后 48h，从每个孔收集 2ml 含有病毒的培养液，转到 2ml 无菌离心管。500×g 离心 5min 弃去细胞和碎片。
- (6) 将上清转到 2ml 离心管。这就是 P2 毒株。4℃避光保存。

1.6.4 重组蛋白的表达

当有了合适滴度的病毒株后，即可进行重组蛋白的表达。具体步骤如下：

- (1) 在 24 孔板接种 Sf9 细胞 6×10^5 cell/孔，细胞室温放置至少 30min；
- (2) 弃去培养基用新鲜的培养基清洗。换上 300μl 新鲜培养基；
- (3) 在合适的 MOI 值时每孔加入适量毒株，包括适量的对照毒株；
- (4) 27℃培养箱培养；
- (5) 在合适的时间收获细胞或培养基（分泌表达）（感染后 3d 左右）。-20℃保存。

1.7 重组蛋白的提取

病毒感染细胞 3d 左右，就可以收集细胞提取蛋白，使用 I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent 来提取细胞蛋白，具体操作步骤如下。

1.7.1 收集昆虫细胞

将感染表达的细胞在室温下 $800\times g$ 离心 5min, 然后将培养液吸出 (保留), 留下昆虫细胞;

1.7.2 清洗昆虫细胞

- (1) 加入与培养液等体积的 PBS, 轻轻的悬浮细胞;
- (2) 室温 $800\times g$ 离心 5min, 倒出上清;
- (3) 重复步骤 (1) 和 (2)。

1.7.3 溶解昆虫细胞

- (1) 每 5×10^6 - 2×10^7 个细胞加入 1ml 的 I-PER Reagent (使用前在 I-PER Reagent 中加入蛋白酶抑制剂) 来清洗细胞;
- (2) 用枪上下吸打使之悬浮, 中等速度漩涡细胞 5sec;
- (3) 冰上孵育 10min;
- (4) 在 4°C , $15,000\times g$ 离心 15min;
- (5) 小心的转移上层含有可溶性蛋白溶液至新试管。保留沉淀 (包含不可溶的蛋白和细胞碎片) 用于进一步分析。

1.8 蛋白纯化

使用 ProteinIso™ Ni-NTA Resin (全氏金公司) 对提取的蛋白进行纯化。具体操作步骤: 用 ProteinIso™ Ni-NTA Resin 对 His 标签蛋白进行分离纯化的过程包括:

- (1) 装柱: 悬浮介质, 根据待纯化的蛋白量, 将适量的介质加入层析柱内静置 5min。
- (2) 平衡: 用 5-10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱。为了提高特异性结合, 平衡缓冲液中可加入低浓度的咪唑 (10-20mM)。
- (3) 上样: 样品缓冲液应尽可能与平衡缓冲液一致。为了避免层析柱堵塞, 样品应经离心或微滤处理 ($0.45\mu\text{M}$)。
- (4) 洗涤: 用 5-10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱 (80-100mM 咪唑), 收集流出液。
- (5) 洗脱: 不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白。平衡液配制不同浓度的咪唑, 进行

梯度洗脱。

1.9 蛋白浓缩

为了去除高浓度咪唑，减少对后续实验的影响，获得高浓度的蛋白，使用 For Concentration and Purification of Biological Solutions Centrifugal Filter Units 对纯化的蛋白进行浓缩，步骤如下：

- (1) 将纯化的蛋白样品分批加入超滤管中，8,000×g 离心 20min；
- (2) 在样品离心完后加入 2 ml PBS 缓冲液，8,000×g 离心 20min；
- (3) 重复步骤 (2) 两次；
- (4) 超滤管中最后剩下的溶液即为浓缩后的蛋白，吸取至无菌的 1.5ml 离心管中，测定蛋白浓度；

1.10 SDS-PAGE 和 Western Blot

将经过纯化、浓缩后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测，操作步骤同第五章 1.5。用制备的多克隆抗体作为一抗，以辣根过氧化物酶（HRP）为二抗，对提取的重组蛋白进行 Western blot 检测。具体操作步骤同第五章 1.7。

2 结果与分析

2.1 供体质粒的构建

在 *CsCaE026* 基因的正向和反向引物分别添加 *Bam*HI 和 *Xho*II 酶切位点对其 cDNA 进行 PCR 扩增（图 6.2），测序表明与预期序列一致（1,671bp）；用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 分别对 *CsCaE026* 和 pFastBac-HTE 载体进行双酶切（图 6.3 和 6.4），酶切产物用 1%琼脂糖进行电泳检测并回收目的条带；用 T4 连接酶进行连接，转化至 TransT1 感受态细胞，筛选阳性克隆（图 6.5），PCR 片段与理论大小相符，经测序验证说明杆状病毒转移载体构建成功。转移载体命名 *CsCaE026/pFast*。

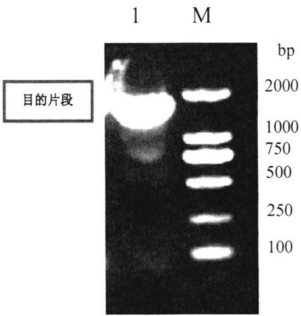


图 6.2 二化螟 *CsCaE026* 基因的 PCR 扩增
泳道 1: PCR 扩增的目的片段; M: DNA 分子量标准
Fig.6.2 PCR Amplification of *CsCaE026* gene in *C. suppressalis*
Lane1: PCR Amplification of target fragment; M: DNA molecular weight marker

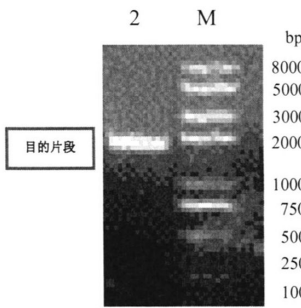


图 6.3 *CsCaE026* 基因的酶切电泳图
泳道 2: 目的基因酶切片段; M: DNA 分子量标准
Fig.6.3 Electrophoretogram of *CsCaE026* gene after digestion
Lane2: Fragment of target gene after digestion; M: DNA molecular weight marker

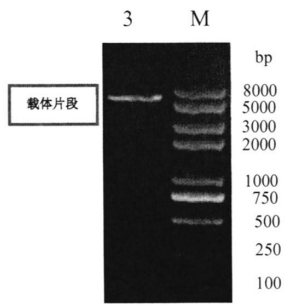
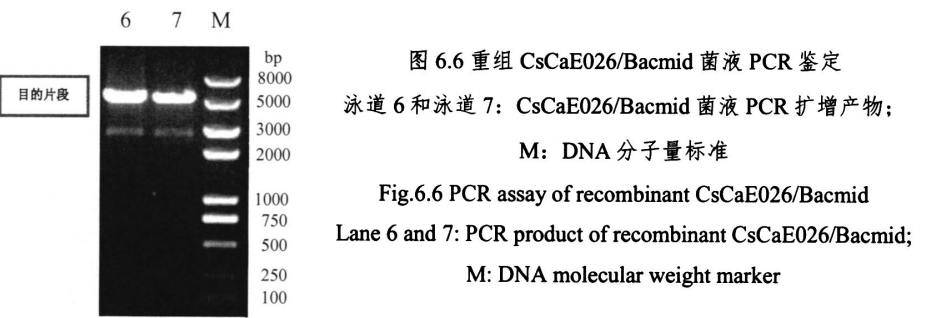


图 6.4 pFastBac-HTE 载体的酶切电泳图
泳道 3: 载体的酶切片段; M: DNA 分子量标准
Fig.6.4 Electrophoretogram of the vector pFastBac-THE after digestion;
Lane3: Enzyme digestion electrophoretogram of the targetfragment.M: DNA molecular weight marker



2.2 重组病毒 Bacmid 的构建

用重组转移载体 CsCaE026/pFast 和阳性对照 pFastBac 转化至含有穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 感受态细胞，挑取发生转座作用生成的白色菌落，提取重组 Bacmid DNA，并作菌落 PCR 分析鉴定（图 6.6），得到整合位点正确的重组 Bacmid 即为重组病毒 CsCaE026/Bacmid（对照命名为 pFast/Bacmid）。电泳结果显示：PCR 扩增得到的片段正好等于 2,430bp DNA+732bp（GFP）DNA+目的基因（1,671bp）。这些结果表明目的基因与 Bacmid 发生重组且位置正确。



2.3 昆虫 Sf9 细胞的转染及病毒粒子的扩增

采用脂质体（CellFection Reagent）包裹含有目的基因重组转移载体的线状病毒 DNA 的方法，转染昆虫细胞。光镜下每日观察细胞形态的变化，直到能够看到病毒感染现象（有荧光，细胞不再生长，细胞核充满细胞等）。2-3d 后收取培养液，500×g 离心 5 min 所得的上清即为第一代病毒株 P1（图 6.7）。P1 中所含病毒粒子

的浓度可能较低，被感染昆虫细胞的数量也较少，导致蛋白的表达量较低。因此，取 P1 感染新的大体积昆虫细胞从而产生高滴度 P2，这样使病毒粒子的浓度迅速增加。3d 左右收取培养液， $500\times g$ 离心 5 min 所得的上清即为 P2 病毒株（图 6.8）。

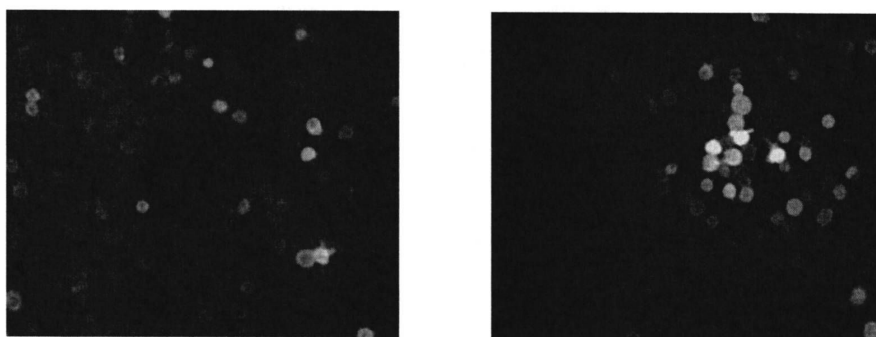


图 6.7 P1 病毒株：重组病毒感染的 Sf9 细胞

左：重组 CsCaE026/Bacmid 感染的 Sf9 细胞；右：重组 pFast/Bacmid 感染的 Sf9 细胞

Fig.6.6 P1 viruses: Sf9 cells infected by recombinant viruses

Left: Sf9 cells infected by recombinant CsCaE026/Bacmid; Right: Sf9 cells infected by recombinant pFast/Bacmid

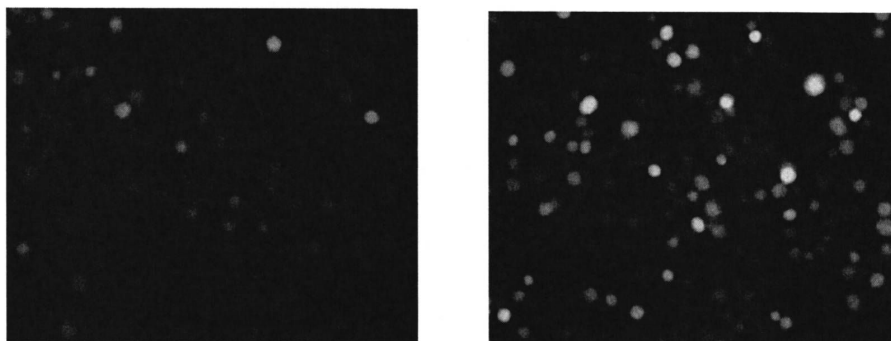


图 6.8 P1 病毒株的扩增（P2）

左：重组 CsCaE026/Bacmid 病毒株 P1 在 Sf9 细胞中的扩增；

右：重组 pFast/Bacmid 病毒株 P1 在 Sf9 细胞中的扩增

Fig.6.8 Amplification of P1 viruses (P2)

Left: Amplification of recombinant CsCaE026/Bacmid P1 viruses in Sf9 cells;

Right: Amplification of recombinant pFast/Bacmid P1 viruses in Sf9 cells

2.4 蛋白的表达

当有了合适滴度的病毒株后，即可进行重组蛋白的表达。大量的因素影响蛋白的最优表达，包括细胞状态、MOI 和时间等。一般使用在细胞处于中对数期时（密度为 1×10^6 - 2×10^6 cell/ml）、MOI 为 1-5 之间感染细胞 3-4d 即可获得大量表达蛋白（图 6.9）。

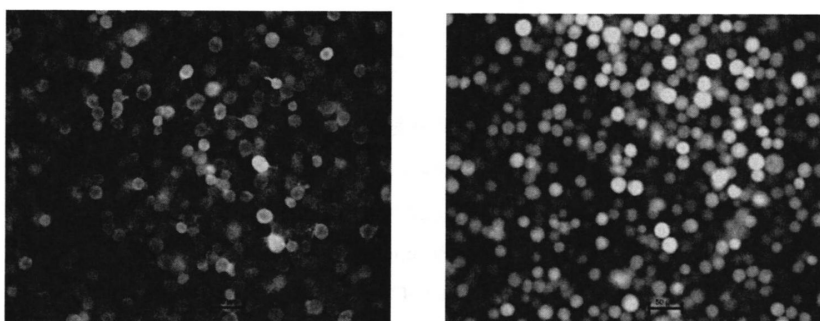


图 6.9 重组病毒的蛋白表达

左：重组病毒 CsCaE026/Bacmid 的表达；右：重组病毒 pFast/Bacmid 的表达

Fig.6.9 Protein expression of recombinant viruses

Left: Protein expression of recombinant CsCaE026/Bacmid viruses; Right: Protein expression of recombinant pFast/Bacmid viruses

2.5 蛋白纯化和检测

在大量表达蛋白后，需要对蛋白进行提取、纯化和浓缩。由于 pFastBac-THE 上带有 His 标签，蛋白纯化采用 Ni-NTA 方法。蛋白纯化样品经 SDS-PAGE 后，用半干电转的方法将蛋白转移到 PVDF 膜上，用第四章中制备的多克隆抗体作为一抗，辣根过氧化物酶（HRP）为二抗，进行 Western blot 分析。结果表明：CsCaE026 表达产物在约 90kD 左右处有目的条带（图 6.10），证明 CsCaE026 在昆虫细胞中表达成功。

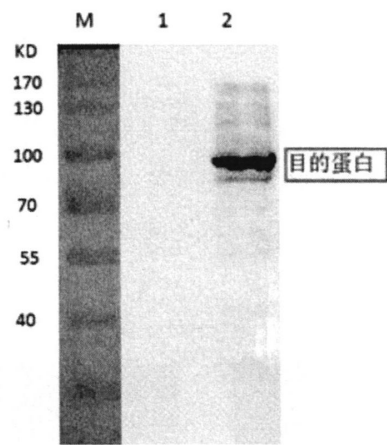


图 6.10 *CsCaE026* 在 Sf9 细胞中表达产物的 Western blot 分析

M: 蛋白标准分子量; 1: 对照; 2: *CsCaE026* 表达产物;

Fig.6.10 Western blot analysis of *CsCaE026* expression products in Sf9 cells

M: Standard protein marker; 1: Sample from Sf9 cells infected with pFast/Bacmid; 2: Sample from Sf9 cells infected with *CsCaE026*/Bacmid

3 小结

杆状病毒表达系统自从第一次用来表达干扰素以后，在许多重组蛋白表达中得到广泛应用，已有许多种外源基因在该系统中得到了表达。相对于其他表达系统它具有以下几个方面的优点：（1）重组蛋白具有完整的生物学功能：杆状病毒表达系统为高表达的外源蛋白在细胞内进行正确的折叠、二硫键的搭配以及寡聚物的形成提供良好的环境，可使表达产物在结构和功能上接近天然蛋白。（2）能进行翻译后的加工修饰（Ailor and Betenbaugh，1999）：杆状病毒表达系统具有对蛋白质完整的翻译后加工能力，包括磷酸化、糖基化、酰基化、信号肽切除及肽段的切割和分解等，修饰的位点与天然蛋白在细胞内的情况完全一致。该表达系统利用细菌的 Tn7 转座子，构建了 AcMNPV 病毒的穿梭载体 Bacmid，它既能在大肠杆菌中低拷贝复制和稳定分离，又可以直接转染昆虫细胞，得到病毒粒子。外源基因通过位点特异性转座作用整合到 Bacmid 中，经过筛选重组 Bacmid，直接转染昆虫细胞，得到纯的重组病毒，同时高效表达外源基因，该系统具有快速、稳定、高效等优点。

本实验选用了 pFastBac-HTE 质粒，其 Polyhedrin promoter 下游带有 ATG 起始密码子、6×His tag、TEV 蛋白酶酶切识别位点 ENLYFQG、EGFP 以及多克隆位点，有利于用 Ni-NTA 树脂分离纯化，需要时还可以切除 N 端融合蛋白（张传溪等，1999）。

本研究是首次使用杆状病毒表达系统对二化螟中克隆到的酯酶基因 *CsCaE026* 进行的重组表达的研究。已知 *CsCaE026* 基因编码 557 个氨基酸（见第三章），预测其分子量大小约为 63.66kD，用制备的多克隆抗体作为一抗对表达产物进行 Western blot 免疫分析，分析结果显示 *CsCaE026* 表达产物在 90kD 左右（EGFP 蛋白大小约为 27kD）处有目的地条带。上述实验结果均表明采用杆状病毒表达系统成功表达了 *CsCaE026* 基因。此外虽然本实验表达出了大量的蛋白，但还需要对表达蛋白的活性和功能作进一步的研究，为明确二化螟酯酶基因的功能奠定基础。

第七章 总结

本论文对二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 进行了克隆和分析, 并对其时空表达动态、蛋白表达等进行了研究, 同时制备了多克隆抗体。明确了 *CsCaE026* 基因在二化螟的发育阶段及各组织的分布表达情况, 对 *CsCaE026* 基因的基本信息有了初步的了解, 为日后研究 *CsCaE026* 基因的功能等研究奠定了基础, 也为关于二化螟抗药性的综合治理提供依据。

1 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的克隆及序列分析

本研究利用 RT-PCR 技术, 克隆了二化螟酯酶基因 *CsCaE026*, 并进行相关的生物信息学分析。该基因开放阅读框为 1,671bp, 共编码 557 个氨基酸, 预测其分子量大小约为 63.66kD, 等电点为 5.86。经 Signal IP 4.1 在线预测蛋白信号肽, N-端前 16 个氨基酸为信号肽。

将二化螟酯酶 *CsCaE026* 基因 cDNA 推导的氨基酸序列与其他物种进行同源对比分析, 发现该基因具有含丝氨酸活性中心 GYSVG, 催化三聚体 (Ser207、Glu339 和 His453) 等羧酸酯酶保守结构域。以及具有 α/β -酯酶家族的特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly 和二硫键结合位点 (Cys82 和 Cys103)。 *CsCaE026* 其他昆虫的羧酸酯酶基因构建系统发育进化树。分析结果表明 *CsCaE026* 与家蚕羧酸酯酶处于同一进化枝上, 进化上关系较近且属于 α -酯酶。

2 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的原核表达和多克隆抗体制备

通过 pET32a 构建了表达载体 *CsCaE026/pET32a*, 利用大肠杆菌表达系统, 在菌株 Rosetta 中进行表达, 对表达产物用 SDS-PAGE 进行表达定位, 发现表达产物存在于包涵体内。从 SDS-PAGE 图谱看, 表达产物在分子量约为 70kD 处出现了表达条带, 与预期蛋白分子量一致; 将大量表达产物进行提取和纯化, 制备了兔抗多克隆抗体; 用制备的多克隆抗体作为一抗对表达产物作 Western Blot 分析结果, 表达产物显示同样的阳性结果反应, 与预期的蛋白分子量大小一致, 上述结果说明 *CsCaE026* 基因在大肠杆菌表达系统中成功的表达。

3 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的表达时空分布

CsCaE026 基因在二化螟不同发育阶段中均有表达, 在幼虫期表达量相对较高, 以 5 龄幼虫期表达量最高且与卵期、蛹期、成虫期表达差异显著 ($p \leq 0.05$); *CsCaE026* 在高龄幼虫各组织中均有表达, 在中肠中表达量最高且与表皮、马氏管、神经索、脂肪体、血细胞表达量之间差异显著, 其他组织之间表达差异不显著; *CsCaE026* 在二化螟成虫各躯体中均有表达, 雄蛾各躯体表达量高于雌蛾, 且都是在头部和翅中表达量最高。在翅中, 雄蛾的表达与雌蛾的表达差异达到极显著 ($p \leq 0.01$), 在头、胸、腹中, 雄蛾的表达与雌蛾的表达差异显著。

CsCaE026 蛋白表达结果表明: 在二化螟的不同发育阶段中, *CsCaE026* 蛋白表达在幼虫期和蛹期较多, 在卵期和成虫期表达量较少; 在 5 龄幼虫各组织中, *CsCaE026* 蛋白表达在中肠中最多, 马氏管、神经、脂肪体中略有表达, 表皮和血细胞中基本无表达; 在成虫各躯体中, *CsCaE026* 蛋白在雄虫中表达量比在雌虫中略高, 且都是在头、胸、腹、翅表达相对较高。

4 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 在 Bac-to-Bac 系统中的表达

构建了 *CsCaE026* 的供体质粒 *CsCaE026/pFastBac* 和重组杆状病毒 *CsCaE026/Bacmid*, 用 *CsCaE026/Bacmid* 在昆虫细胞 Sf9 中进行了表达。Western blot 检测结果显示, 表达产物在约 90kD 有一条特异性条带 (一抗为制备的多克隆抗体), 与预期目的蛋白分子量大小一致, 这说明 *CsCaE026* 基因在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中表达成功。对研究二化螟酯酶基因的功能奠定了基础。

本论文的创新点:

1. 克隆获得二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 全长序列;
2. 二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 在大肠杆菌中表达获得重组蛋白, 并制备获得兔抗多克隆抗体;
3. 明确二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 的表达时空分布特征;
4. 利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统在昆虫 Sf9 细胞中真核表达二化螟酯酶基因 *CsCaE026*, 获得重组表达蛋白。

今后研究方向：

1. 开展二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 真核重组表达蛋白的酶学特性分析；
2. 开展二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 真核重组表达蛋白对不同农药的敏感性与降解代谢能力分析；
3. 开展二化螟酯酶基因 *CsCaE026* 抑制表达对二化螟生物学特征以及对不同农药敏感性的影响研究。

主要参考文献

- 韩启发, 庄佩君, 唐振华, 1995. 二化螟对杀螟硫磷产生抗性的机理. *昆虫学报*, 38(3): 266-271.
- 姜卫华. 2011. 二化螟的抗药性及综合防治研究. 南京农业大学.
- 李秀峰, 韩召军, 陈长琨, 李国清, 王荫长, 2001. 二化螟对杀虫单等 4 种杀虫剂的抗药性. *南京农业大学学报*, 24(1): 43-46.
- 刘洪霞, 冷培恩, 徐仁权, 姬淑红, 刘曜, 2012. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性和敏感品系羧酸酯酶性质比较. *应用昆虫学报*, 49(2): 403-407.
- 盛承发, 王红托, 盛世余, 高留德, 宣维健, 2003. 我国稻螟灾害的现状 & 损失估计. *应用昆虫学报*, 40(4): 289-294.
- 唐振华等. 1982. 农药害虫抗药性[M]. 北京农业出版社.
- 王强, 谭福杰, 尤子平, 1987. 二化螟对六类杀虫剂的耐药性及增效剂的增效作用研究. *南京农业大学学报*.
- 周斌芬, 唐振华, 高菊芳, 2008. 昆虫代谢抗性的研究进展. *农药*, 47(5): 313-315.
- Aldridge WN, 1953a. Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53(110-117).
- Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, 2001. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4208-4213.
- Biswas S, Reinhard J, Oakeshott J, Russell R, Srinivasan Mandyam V, Claudianos C, 2010. Sensory regulation of neuropeptides and neurexin I in the honeybee brain. *PLoS ONE*, 5(2): e9133.
- BLACKMAN, SPENCE, FIELD, DEVONSHIRE, 1999. Variation in the chromosomal distribution of Amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity*, 82(2): 180-186.
- Bornscheuer UT, 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(1): 73-81.
- Breitler JC, Marfà V, Royer M, Meynard D, Vassal JM, Vercambre B, Frutos R, Messegue J, Gabarra R, Guiderdoni E, 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cry1B synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports*, 19(12): 1195-1202.
- Cheng X, Chang C, Dai SM, 2010. Responses of striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: pyralidae), from Taiwan to a range of insecticides. *pest management science*, 66(7): 762-766.
- Coppin CW, Jackson CJ, Sutherland T, Hart PJ, Devonshire AL, Russell RJ, Oakeshott JG, 2012.

- Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5): 343-352.
- Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG, 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8): 675-686.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson R, Biswas S, Schuler M, Berenbaum M, Feyereisen R, Oakeshott J, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615- 636.
- Cygler M, Schrag J, Sussman J, Harel M, Silman I, Gentry M, Doctor B, 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 2(3): 366- 382.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7): 653- 665.
- Heymann E, Jakoby WB, 1980. Carboxylesterases and amidases. Enzymatic basis of detoxication, Volume II. (ed. by E. Heymann and W. B. Jokoby) pp. 291- 323. *Academic Press, New York*.
- Jallon JM, Wicker-Thomas C, 2003. 9- Genetic studies on pheromone production in *Drosophila*. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*: 253- 281.
- Kamikouchi A, Morioka M, Kubo T, 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zoological Science* 21: 53-62.
- Konno K, Ono H, Nakamura M, Tateishi K, Hirayama C, Tamura Y, Hattori M, Koyama A, Kohno K, 2006. Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5): 1337-1341.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52:231-253
- Maibèche-Coisne M, Merlin C, François M, Queguiner I, Porcheron P, Jacquin-Joly E, 2004. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra Brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chemical Senses*, 29(5): 381-390.
- Merlin C, Rosell G, Carot-Sans G, François M, Bozzolan F, Pelletier J, Jacquin-Joly E, Guerrero A, Maibèche-Coisne M, 2007. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation. *Insect Molecular Biology*, 16(1): 73- 81.
- Montella IR, Schama R, Valle D, 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(4): 437-449.
- Newcomb R, Campbell P, Ollis D, Cheah E, Russell R, Oakeshott J, 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers

- insecticide resistance on a blowfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14: 7464-7468.
- Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. *Comprehensive Molecular Insect Science*: 309- 381.
- Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C, 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19(Supplement s1): 147- 163.
- Ramsey JS, Rider DS, Walsh TK, Vos MD, Gordon KHJ, Ponnala L, Macmil SL, Roe BA, Jander G, 2010. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology*, 19(Supplement s2): 155-164.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591) :179 -181.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27(2): 91-98.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N, 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1376): 1707-1711.
- Reiner E, 1993. Recommendations of the IUBMB nomenclature committee: comments concerning classification and nomenclature of esterases hydrolysing organophosphorus compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 87:15- 16.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, Beeman RW, Gibbs R, Beeman RW, Brown SJ, Bucher G, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949-955.
- Riddiford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in insect physiology*: 213- 274.
- Sharakhova MV, Unger MF, Claudianos C, Abgrall C, Ortelli F, Hemingway J, Collins FH, Ranson H, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591): 179-181.
- Satoh T, Hosokawa M, 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 162(3): 195-211.
- Tsubota T, Shiotsuki T, 2010. Genomic and phylogenetic analysis of insect carboxyl/cholinesterase genes. *Journal of Pesticide Science*, 35(2): 310-314.
- Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD, 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 82(24): 8827-8831.
- Walker C, 1993. The classification of esterases which hydrolyse organophosphates: recent developments. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1-3): 17- 24.
- Wheelock CE, Shan G, Ottea J, 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2): 75-83.
- Wheelock CE, Phillips BM, Anderson BS, Miller JL, Miller MJ, Hammock BD. 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 195: 117-178
- Yan S, Cui F, Qiao C, 2009. Structure, Function and applications of carboxylesterases from insects for insecticide resistance. *Protein & Peptide Letters*, 16(10): 1181-1188.
- Yu QY, Lu C, Li WL, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10:553.
- Zhang L, Gao X, Liang P, 2007. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1): 65- 72.