

·研究简报·

聚乙二醇 8000对棉铃虫微粒体蛋白沉淀作用的研究

郑明奇^{1,2}, 张文吉², 邱星辉^{1*}, 冷欣夫¹

(1. 中国科学院 动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国农业大学 应用化学系, 农业部农药化学及使用技术重点实验室, 北京 100094)

摘要: 为建立棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 微粒体 P450的分离纯化方案, 比较了不同浓度下聚乙二醇 8000 (PEG8000)对棉铃虫幼虫中肠和脂肪体微粒体蛋白的沉淀作用。结果表明, 终浓度为 8.0×10^4 mg/L的 PEG8000可以使中肠和脂肪体微粒体蛋白的 78%沉淀下来, 其中包含的细胞色素 P450分别占中肠和脂肪体 P450总量的 28%和 34%。SDS-PAGE显示, 中肠微粒体经 8.0×10^4 mg/L的 PEG8000沉淀后, 被沉淀蛋白的分子质量主要集中在 14.1~40 kD和 66~97 kD范围内。

关键词: 棉铃虫; 细胞色素 P450; 聚乙二醇沉淀

中图分类号: Q559.9

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)01-0081-04

Precipitation of Microsomal Proteins in *Helicoverpa armigera* by PEG8000

ZHENG Ming-qi^{1,2}, ZHANG Wen-ji², QIU Xing-hui^{1*}, LENG Xin-fu¹

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application Technology, Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to develop a protocol for purifying cytochrome P450 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, the precipitation results of PEG8000 at different concentration to microsomal proteins of cotton bollworm were compared. The results showed that at the concentration of 8.0×10^4 mg/L, 78% microsomal proteins including 28% total P450 of midgut microsome or 34% total P450 of fatbody microsome were precipitated. SDS-PAGE showed that most of the precipitated microsomal proteins from midgut were those which molecular weight was among the range of 14.1~40 kD and 66~97 kD.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; PEG precipitation

细胞色素 P450 (简称 P450) 作为一类普遍存在于生物体中的氧化酶系, 在生物体内源性物质的生物合成和对外源物质的代谢中具有重要的作用。深入研究昆虫或植物中 P450 的性质与功能

对于新农药的创制和农药毒理学的研究具有重要意义。大量研究证实, 多种 P450 参与昆虫保幼激素 (juvenile hormones)、蜕皮激素 (molting hormones) 以及植物的油菜素内固醇 (brassinos-

收稿日期: 2004-07-23; 修回日期: 2004-10-20

作者简介: 郑明奇 (1971-), 男, 湖南临澧人, 理学博士, 主要从事农药毒理与使用技术研究; *通讯作者: 邱星辉 (1965-), 男, 博士, 副研究员. 联系电话: 010-62575748; E-mail: qiuxh@panda.ioz.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270885).

teroid)、赤霉素(gibberellins)等多种激素的生物合成。因此,参与催化这些激素生物合成的P450也成为创制活性高、选择性强和环境友好型农药的重要作用靶标。此外,P450对农药的降解作用,使农药形成低毒或无毒的代谢物,对深入了解昆虫和植物的抗药性以及除草剂的选择性机理等具有重要意义;P450对农药表现出的活化作用,使农药形成毒性更高甚至具有致癌作用的代谢物,则对深入了解农药对高等动物的毒性十分必要。

P450是由超基因家族编码的一类同功酶系,为了分析不同P450的性质、结构和功能,必须通过一定的分离纯化手段分离出单型P450。目前,P450的分离纯化主要采用色谱法^[1],要求微粒体中P450的比含量尽可能高。由于昆虫P450的总量和比含量低,因此去除微粒体中的非靶标蛋白,对微粒体P450进行一般性浓缩十分必要,也将有助于减轻后续色谱分离的困难。聚乙二醇8000(PEG8000)是一种多元醇,常用于哺乳动物微粒体P450的初步纯化。笔者对PEG8000初步纯化棉铃虫微粒体P450进行了研究,结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 于 1988 年采自河北邯郸,在室内无药剂接触条件下连续饲养至试验进行之日。

1.2 试剂

牛血清白蛋白(BSA)、二硫代苏糖醇(DTT)、苯基硫脲(PTU)、苯甲磺酰氟(PMSF)、丙烯酰胺(Acr)、双丙烯酰胺(Bis)、过硫酸胺(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、CHAPS{3-[3-cholamidopropyl]-dimethylammonio]-1-propanosulfonate}、甘氨酸、聚乙二醇8000(PEG8000)(Sigma公司);五甲基苯(PMB)(Aldrich公司);考马斯亮蓝R250(Fluka公司);低分子质量蛋白质标准物(Pharmacia公司);甘油、乙二醇单甲醚、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、连二亚硫酸钠(国产分析纯)。

1.3 棉铃虫微粒体 P450 酶液的制备

参照 Qiu 等方法^[2],在蜡盘上纵向解剖棉铃虫,取出中肠或脂肪体并去除内含物后置于冰冷的匀浆缓冲液(pH 7.5的0.1 mol/L磷酸钠缓冲液

中含1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU、1 mmol/L PMSF和质量分数为10%的甘油)中漂洗;将漂洗后的中肠或脂肪体置于电动玻璃匀浆器中匀浆;匀浆液在10 000 ×g下离心15 min;上清液经两层纱布过滤后在105 000 ×g下离心60 min,去掉上清液;沉淀物用重悬浮缓冲液(pH 7.5的0.1 mol/L磷酸钠缓冲液中含1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF和质量分数为20%的甘油)重新悬浮;重悬浮后的微粒体用Eppendorf管分装,于-80℃下保存备用。以上所有操作在冰上或0~4℃下进行,PTU和PMSF用乙二醇单甲醚溶解。

1.4 棉铃虫微粒体 P450 的初步纯化

1.4.1 不同浓度PEG8000对微粒体蛋白和P450的沉淀作用 参照 Wheelock 等方法^[3],将备用的中肠或脂肪体微粒体悬浮液在冰上融化,并用重悬浮缓冲液稀释,至蛋白浓度为2 mg/mL;加入1 ×10⁵ mg/L的CHAPS,至终浓度为5 ×10³ mg/L,轻轻摇匀后于冰上静置;4 h后分别取1 mL置于干净的试管中,加入4.0 ×10⁵ mg/L的PEG8000,使其最终浓度分别为0.20 ×10⁴、5.0 ×10⁴、8.0 ×10⁴、1.1 ×10⁵、1.4 ×10⁵ mg/L,用重悬浮缓冲液将各试管体积补至相同,轻轻摇匀后于冰上静置30 min;在4℃下10 000 ×g离心15 min,取上清液进行蛋白质浓度和P450含量的测定。

1.4.2 中肠微粒体P450的初步纯化 除PEG8000的终浓度为8.0 ×10⁴ mg/L外,其他同1.4.1。

1.5 棉铃虫微粒体 P450 含量的测定

参照 Omuro 和 Sato 方法^[4],将微粒体悬浮液用pH 7.5的0.1 mol/L磷酸缓冲液稀释至蛋白质浓度约为0.3~0.4 mg/mL,加入连二亚硫酸钠4~5 mg还原;5 min后将其一分为二,分别置入紫外可见分光光度计(Lambda Bio 40, PE公司)的参比池和样品池中记录基线;然后在样品池中通入一氧化碳1 min,静置10 min后进行390~500 nm全波长扫描,并记录扫描曲线和OD值。根据波长在450~490 nm间的吸光度差值以及摩尔消光系数(91 L·cm⁻¹·mmol⁻¹)计算微粒体中P450含量。

1.6 十二烷基苯磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照 Laemmli 方法^[5],采用质量浓度为4%的

浓缩胶和 12% 的分离胶; Bio-Rad Protean 垂直板电泳,按 Bio-Rad 公司推荐的程序操作;恒压 140V (单板)电泳 60 min,考马斯亮蓝 R250 染色。

1.7 蛋白浓度测定

按 Bradford 方法^[6],以 BSA 为标准蛋白。

1.8 数据分析

应用 SPSS11.0 软件进行数据分析,用独立样本 t 检验 (双尾)比较样本平均数的差异。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 PEG8000 对微粒体蛋白的沉淀作用

所测定各种浓度的 PEG8000 对中肠和脂肪体微粒体蛋白都有不同程度的沉淀作用 (见表 1),随着微粒体中 PEG8000 浓度的增加,被沉淀的微粒体蛋白不断增加。差异显著性检验显示,不同浓度的 PEG8000 对中肠微粒体蛋白的沉淀作用差异显著;对脂肪体微粒体,PEG8000 浓度为 8.0×10^4 mg/L 和 1.1×10^5 mg/L 时,对微粒体蛋白沉淀作用的差异不显著,其余浓度间的差异显著。

Table 1 The effects of PEG8000 at different concentration on the precipitation of microsomal proteins in *H. armigera*

PEG8000 /mg · L ⁻¹	Protein concentration /mg · mL ⁻¹			
	Midgut	Ratio	Fatbody	Ratio
0	1.920 ± 0.085	1.0	2.102 ± 0.215	1.0
2.0×10^4	1.373 ± 0.069	0.72	1.588 ± 0.091	0.76
5.0×10^4	0.832 ± 0.028	0.43	0.945 ± 0.075	0.45
8.0×10^4	0.419 ± 0.033	0.22	0.471 ± 0.065	0.22
1.1×10^5	0.288 ± 0.045	0.15	0.369 ± 0.061	0.18
1.4×10^5	0.200 ± 0.030	0.10	0.175 ± 0.020	0.08

2.2 不同浓度 PEG8000 对微粒体 P450 的沉淀作用

所测定各种浓度的 PEG8000 对中肠和脂肪体微粒体 P450 也有不同程度的沉淀作用,随着微粒体中 PEG8000 浓度的增加,被沉淀的微粒体 P450 不断增加 (见表 2)。差异显著性检验显示,浓度为 5.0×10^4 和 8.0×10^4 mg/L 时,PEG8000 对微粒体 P450 沉淀作用的差异不显著。

本实验的主要目的是分离纯化单型 P450,提

Table 2 The effects of PEG8000 at different concentration on the precipitation of microsomal P450 in *H. armigera*

PEG8000 /mg · L ⁻¹	Cytochrome P450 /nmol · (mg pro) ⁻¹			
	Midgut	Ratio	Fatbody	Ratio
0	0.691 ± 0.015	1.0	0.303 ± 0.007	1.0
2.0×10^4	0.623 ± 0.015	0.90	0.259 ± 0.010	0.86
5.0×10^4	0.563 ± 0.014	0.82	0.232 ± 0.015	0.77
8.0×10^4	0.498 ± 0.050	0.72	0.199 ± 0.003	0.66
1.1×10^5	0.152 ± 0.028	0.22	0.092 ± 0.015	0.30
1.4×10^5	0.050 ± 0.007	0.07	0.028 ± 0.006	0.09

高 P450 的纯度是每个纯化环节最主要的目标。由于昆虫 P450 含量低,因此,保持较高的 P450 回收率和总量也十分重要。鉴于此,微粒体中 PEG8000 终浓度为 1.1×10^5 mg/L 及以上浓度时,有大量的 P450 (>70%) 被沉淀,无法保证后续分离过程中有足够的 P450,因而不适合于棉铃虫微粒体 P450 的初步纯化;PEG8000 终浓度为 2.0×10^4 mg/L 时,尽管上清液中保留了近 90% 的 P450,但只有约 30% 的总蛋白被沉淀,初步纯化效果较差,因而也不适用于棉铃虫微粒体 P450 的初步纯化。

综合考虑 PEG8000 对总蛋白和 P450 的沉淀作用,PEG8000 在微粒体中的浓度为 8.0×10^4 mg/L 时适合棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P450 的初步纯化。

2.3 PEG8000 对中肠微粒体 P450 的初步纯化效果

棉铃虫中肠微粒体经 5.0×10^3 mg/L 的 CHAPS 增溶并经过 8.0×10^4 mg/L 的 PEG8000 初步纯化后,微粒体悬浮液变得澄清透明,水样缓冲液中的 P450 比含量较微粒体提高 2.1 倍,P450 回收率为 72%。

图 1 是中肠微粒体 P450 经 5.0×10^3 mg/L 的 CHAPS 增溶和 8.0×10^4 mg/L 的 PEG8000 初步纯化后,上清液和沉淀部分的 SDS-PAGE 图。可以看出,中肠微粒体中,分子质量在 14.1~40 kD 和 66~97 kD 范围内的大部分蛋白被 PEG8000 沉淀,40~62 kD 间的大部分蛋白仍然保留在上清液中,而这正是 P450 的分子质量范围。

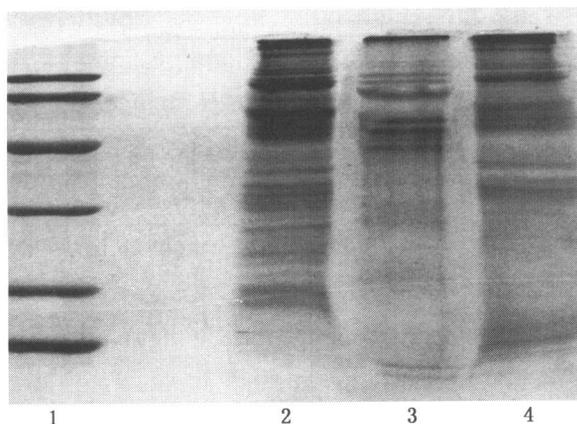


Fig 1 The SDS-PAGE profiles of microsomes P450 from midgut in *H. armigera*

Lane 1 represents markers with molecular weights of 97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4 kD.

Lane 2~4 represents microsomal preparation, supernatant and pellet of PEG 8000 precipitation, respectively.

3 讨论

尽管蛋白沉淀的方法不能使微粒体不同型P450得到实质性的分离,但可以去除大量的磷脂、P450还原酶以及其他微粒体蛋白,从而大大减轻后续色谱分离的难度。

目前,常用于微粒体P450沉淀的方法主要有PEG沉淀、硫酸铵沉淀、丙酮沉淀。由于丙酮沉淀很容易导致P450变性,而本研究则要求保留P450的活性,因此不能采用。尽管硫酸铵容易从沉淀后的溶液中透析去除,但回收率较PEG沉淀法的低。柱色谱法的回收率较高,一般为45%~60%,而且大多数的细胞色素 b_5 和P450还原酶能被同时去除,但操作复杂。PEG沉淀法的回收率较高,一般为50%~70%,但PEG难以通过透析去除;由于PEG是一种多元醇,有助于提高微粒体P450的

稳定性,因此无须将PEG去除,可以直接进入色谱中进行分离。因此,PEG沉淀法更适合本研究的要求^[7]。

本研究表明,PEG8000对棉铃虫微粒体中的非靶标蛋白有较好的沉淀效果,但与PEG8000的使用浓度有关。PEG8000浓度过低,沉淀非靶标蛋白的效果较差,浓度过高,不但大量的P450被沉淀,而且容易引起P450变性。对于棉铃虫中肠和脂肪体微粒体蛋白,当微粒体中PEG8000浓度为 8.0×10^4 mg/L时,既去除了较多的非靶标蛋白又保留了较高含量的P450,初步纯化效果较好。SDS-PAGE图显示,中肠微粒体蛋白经PEG8000沉淀后,P450分子质量范围内(40~60 kD)的蛋白只有少量被沉淀,与P450含量检测的结果相吻合。

参考文献:

- [1] Ryan D E, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 [J]. *Pharmac Ther*, 1990, 45: 153-239.
- [2] Qiu X H, Li W, Leng X F. Cytochrome P450 monooxygenases in the cotton bollworm (*Lepidoptera: Noctuidae*): tissue difference and induction [J]. *J Econ Entomol*, 2003, 96 (4): 1283-1289.
- [3] Wheelock G D, Scott J G. Simultaneous purification of a cytochrome P450 and cytochrome b_5 from house fly (*Musca Domestica L.*) [J]. *Insect Biochem*, 1989, 19 (5): 481-488.
- [4] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1964, 22 (7): 2730-2738.
- [5] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature (London)*, 1970, 227: 680-685.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-252.
- [7] Roos P H. Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b_5 [J]. *J Chromatography B*, 1996, 684: 107-131.

(Ed J N S H)