

文章编号: 1000-7423(2007)-05-0376-05

# 白纹伊蚊蜕皮激素拮抗剂筛选酵母模型的建立

顾金保<sup>1</sup>, 孙彦涛<sup>2</sup>, 彭鸿娟<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 在毕赤酵母体内构建白纹伊蚊蜕皮激素转录活化系统, 建立高通量杀虫剂筛选模型, 用于筛选蜕皮激素代谢途径拮抗药物。方法 人工合成果蝇蜕皮激素响应元件 (EcRE) 5 次重复的序列, 与果蝇热激蛋白基因启动子 (pHSP27) 序列连接, 以绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因, 将 EcRE-pHSP27-GFP 片段亚克隆入 pPIC3.5k, 整合入毕赤酵母染色体构建阴性酵母 A。人工合成白纹伊蚊蜕皮激素受体 (EcR) 及超螺旋蛋白 (USP) 编码序列, 两个基因以双表达盒形式亚克隆入组成型表达质粒 pGAPZ, 整合入酵母染色体的另一位点, 使 EcR 与 USP 在酵母中组成型表达, 构建模型酵母 B。制备蜕皮激素拮抗剂虫酰肼悬液 (浓度为 0.83 mg/ml), 分别施加于模型酵母 B 与阴性酵母 A, 荧光显微镜下目测荧光强度, 与未施加药物的对照组比较。同时提取各组 RNA, 半定量 RT-PCR 检验 GFP 基因的转录效率。结果 模型酵母 B 发出绿色荧光, 而阴性酵母 A 与空白酵母 GS115 未见荧光, 表明在模型酵母体内表达的 EcR 与 USP 形成复合二聚体, 作用于 EcRE 启动 GFP 报告基因表达荧光蛋白。施用虫酰肼, 模型酵母 B 荧光强度明显减弱, 表明 GFP 的表达量减少。施用虫酰肼的模型酵母 B, GFP 与内参灰度比值 (为 0.614) 低于对照组 (1.134), 表明虫酰肼可降低模型酵母 B 体内 GFP 基因的转录水平。结论 在酵母体内建立了白纹伊蚊蜕皮激素转录活化系统, 该酵母模型可用于筛选作用于蜕皮激素代谢途径的药物。

**【关键词】** 白纹伊蚊; 蜕皮激素受体; 超螺旋蛋白; 蜕皮激素受体响应元件; 虫酰肼; 蜕皮激素拮抗物

中图分类号: R384.113

文献标识码: A

## Construction of a Yeast Model for Screening *Aedes albopictus* Ecdysone Agonist Pesticides

GU Jin-bao<sup>1</sup>, SUN Yan-tao<sup>2</sup>, PENG Hong-juan<sup>1\*</sup>

(1 Department of Pathogen Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2 PLA Command 66173, Datong 037034, China)

**【Abstract】 Objective** To reconstitute a transactivation system in yeast (yeast model) for screening the pesticides acting on ecdysone metabolism route and eventually influencing the process of ecdysis. **Methods** The fragment of 5 times repeated EcRE from *Drosophila melanogaster* was synthesized and the HSP27 promoter from *D. melanogaster* genome was amplified with PCR. The two sequences were connected and followed by a reporting gene—green fluorescence protein(GFP) gene. The EcRE-HSP27 promoter-GFP fragment was inserted into the expression plasmid pPIC3.5 and integrated into the yeast chromosome to construct yeast A. EcR and USP coding sequences of *Aedes albopictus* were synthesized, and these two fragments were inserted into *Pichia pastoris* expression plasmid pGAPZ as two respective reading frames. The two reading frames were integrated into *Pichia pastoris* chromosome in another recombinant site (pGAPZ and pPIC3.5k share different recombinant sites while being integrated into *Pichia pastoris* yeast chromosome). EcR and USP were constituted and expressed in the yeast. This recombinant yeast was called yeast B. The model yeast was thus constructed. A known ecdysone agonist-tebufenozide was used to test the yeast model. The effect of tebufenozide on the model yeast was observed under fluorescent microscope. Semi-quantitative RT-PCR was used to test the transcription level of GFP in the tebufenozide affected yeast and the control. **Results** In the model yeast, the intracellular expressed EcR and USP constituted EcR/USP heterodimer interacting with EcRE, the expression of GFP was activated, and green fluorescence was observed in model yeast under fluorescent microscope. Tebufenozide affected model yeast showed less fluorescence in comparison to the control model yeast, indicating that the transcription of GFP was suppressed by tubufenozide. Yeast

基金项目: 国家自然科学基金(No.30471503)

作者单位: 1 南方医科大学病原生物学系, 广州 510515; 2 山西省大同市马军营 66173 部队营部, 大同 037034

\* 通讯作者, E-mail: floriapeng@hotmail.com

housekeeping gene Actin-1 was used as inner control, semi-quantitative RT-PCR was operated and the result was scanned. The ratio of the brightness of GFP to Actin-1 was calculated automatically, and that of tubufenozide added yeast and the control yeast was 0.614 and 1.134 respectively. This result showed a low transcription level of GFP in tebufenozide affected model yeast, comparing to that of the control. **Conclusion** The ecdysone-related transacting system in yeast has been constructed, and the model yeast can be used to screen the ecdysone agonists which can act on the ecdysone metabolic route.

**【Key words】** *Aedes albopictus*; Ecdysone receptor (EcR); Ultraspiracle protein (USP); Ecdysone receptor element (EcRE); Tebufenozide; Ecdysone agonist

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471503)

\* Corresponding author, E-mail: floriapeng@hotmail.com

昆虫的生长发育是通过定期的蜕皮实现的, 蜕皮过程是在甾醇、保幼素、20-羟基蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)等几种昆虫激素的调节下完成的<sup>[1]</sup>。20E的受体是核蛋白, 由蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)及超螺旋蛋白(ultraspiracle protein, USP)组成<sup>[2]</sup>。在蜕皮激素的诱导下 EcR 及 USP 结合形成二聚体, 只有 EcR/USP 二聚体才能与位于蜕皮激素可诱导基因启动子区的蜕皮激素响应元件(ecdysone response element, EcRE)相结合而启动早期基因的转录<sup>[3]</sup>。因而, 对这种激素依赖性的生化代谢步骤的任何干扰, 都可能导致靶昆虫的死亡或生长发育异常。研究表明 EcR 及 USP 的 DNA 结合域、配体结合域有很高的保守性, 而蜕皮激素靶基因启动子区 EcRE 的结构则以黑腹果蝇 EcRE 最具有代表性<sup>[4]</sup>, 不同种昆虫的 EcR、USP 可与果蝇 EcRE 结合并起到激活作用。Tran 等<sup>[5]</sup>在酵母菌中建立了一个针对云杉色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*, Cf)EcR 的配体调节转录激活系统, 应用果蝇 Hsp27 启动子序列上的响应元件 EcRE, 在 CfEcR、CfUSP 同时存在而没有配体诱导的情况下, 也可以使报告基因强烈表达。Bergman 等<sup>[6]</sup>进一步通过酵母双杂交证实 EcR 及 USP 在无蜕皮激素的诱导下可自行结合形成二聚体。因而可以在酵母体内同时表达白纹伊蚊的 EcR 及 USP, 利用形成的 EcR/USP 二聚体启动果蝇 EcRE-Hsp27 启动子, 启动报告基因的表达。本研究, 拟在酵母体内建立蜕皮激素转录活化系统, 并期望借助这个模型筛选蜕皮激素代谢途径的拮抗药物。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 质粒与菌株 真核表达载体 pPIC3.5K、pGAPZ $\alpha$ , 以及酵母菌株 GS115 购自美国 Invitrogen 公司, 增强型荧光蛋白载体 pEGFP-N1 购自美国 Clontech 公司, 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  株为本实验室保存。

1.2 合成序列 白纹伊蚊(*Ae. albopictus*) EcR 及 USP 的编码序列、果蝇 EcRE 由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成, 人工接头(adaptor)由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 主要试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sac* I、*Xba* I、*Hind* III、*EcoR* V、*Nco* I、*Bgl* II、*Bam* H I、*Not* I、*Sma* I、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、小牛肠碱性磷酸酶(CIP)、鼠白血病逆转录酶(M-MLV)及 *T<sub>4</sub>* DNA 聚合酶, 均购自宝生物工程(大连)有限公司, 限制性内切酶 *Avr* II 购自美国 New England Biolabs 公司, *Taq* DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸(dNTP)购自北京鼎国生物技术发展中心, 抗生素 Zeocin 购自美国 Invitrogen 公司, 酵母 RNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司, 蜕皮激素拮抗剂虫酰肼(tebufenozide)(白色粉剂)购自江苏靖江市山达化工有限公司, 低熔点琼脂糖购自美国 Sigma 公司。

1.4 合成引物 质粒构建过程中所用引物, 均用 DNAMAN 软件设计, 由北京市百赛生物工程公司合成。

1.5 测序 由上海博亚公司完成。

## 2 方法

2.1 白纹伊蚊 EcR 及 USP 的人工合成 人工合成白纹伊蚊 EcR 及 USP, 目标基因克隆在 pUC57 质粒上。

2.2 pGAP-EcR-USP 酵母表达质粒的构建 将人工合成的 EcR 亚克隆入 pGAPZ 质粒磷酸甘油醛脱氢酶启动子(pGAP)的下游, 酵母细胞色素 C 基因转录终止序列(CYC1TT)上游, 构建 pGAP-ECR-AOX1TT 读码框。

根据 pGAPZ 质粒上的转录延长因子启动子(pTEF1)及 CYC1TT 序列, 分别设计上下游引物 T1: 5'-GAGCTCCCCACACACCATAG-3', T2: 5'-GAATTCGCCCCTTAGATTAG-3', C1: 5'-TCTAGACACGTCCGACGGC-3' 及 C2: 5'-AAGCTTAGCTTGCAAATTAAG-3', 引物引入酶切位点, 以 pGAPZ 为模板, PCR 扩增出

pTEF1 及 CYC1TT 序列, 将这两个片段分别插入人工合成基因 USP 质粒(pUC57-USP)的上游和下游, 构建 pTEF1-USP-CYC1TT 读码框。

*Hind* III 和 *Sac* I 双酶切回收目的基因 pTEF1-USP-CYC1TT 序列, 接入 pGAP-EcR-AOX1TT 读码框的下游。构建双读码框酵母表达质粒 pGAP-EcR-USP, 经质粒测序验证无误。

2.3 pPIC3.5K-EH-GFP 酵母表达质粒的构建 人工合成 EcRE 5 次重复的序列, 从果蝇基因组 DNA 中扩增出热激蛋白 27 启动子(pHSP)序列, 连接到 EcRE 序列下游, 再将 EcRE-pHSP 序列接入 pGFP-N1 质粒 GFP 基因的上游, 构建质粒 pEH-GFPN1。

将 pEH-GFPN1 质粒进行 *Bgl* II、*Not* I 双酶切, 获得片段 EcRE-pHSP-GFP, 利用相同的酶切位点将该片段亚克隆入 pPIC-3.5k 质粒。重组质粒 pPIC3.5K-EH-GFP 经测序验证无误。

2.4 pPIC3.5K-EH-GFP 质粒转化酵母 GS115 构建成酵母 A *Bgl* II 酶切 pPIC3.5K-EH-GFP 质粒, 凝胶纯化回收线性质粒, 电转化酵母, 组胺酸缺陷型平板筛选阳性克隆, 抗生素 G418<sup>+</sup>梯度阳性平板筛选高拷贝克隆。根据 GFP 基因设计引物 GFP1: 5'-TATACG-TAATGGTGAGCAA-GGGCG-3', GFP2: 5'-ATCCAAG-GGTTGGCTAGATCCGGTGGAT-3'。以阳性克隆基因组 DNA 为模板, 以 GFP1、GFP2 为引物进行 PCR 鉴定。

2.5 pGAP-EcR-USP 质粒转化酵母 A, 构建成酵母 B, 即筛选模型 *Avr* II 酶切 pGAP-EcR-USP 质粒, 凝胶纯化回收线性质粒, 电转化酵母 A, Zeocin<sup>+</sup>梯度平板筛选阳性高拷贝克隆, 以阳性克隆基因组 DNA 为模板, 以 C1、C2 为引物进行 PCR 鉴定。

2.6 酵母模型的荧光鉴定 从平板上挑取酵母 A、酵母 B 和空白酵母(酵母 GS115)克隆, 分别至培养液中, 29℃ 250 r/min 培养 12、24、36、48 及 60 h 后, 荧光显微镜下目测荧光强度, 并分别测定  $A_{600}$  值。

2.7 施加虫酰肼验证模型酵母 取吸光度相同 ( $A_{600}=0.30$ ) 的模型酵母(酵母 B)和酵母 GS115, 各分为两组 [即模型药物组(a组)、模型对照组(b组)、阴性药物组(c组)、阴性对照组(d组), 共 4 组], 每组 100  $\mu$ l, 加入 10 ml 培养基中, 其中 a、c 两组各加入虫酰肼 0.1 g 制成悬液(浓度为 0.83 mg/ml)。b、d 两组不加虫酰肼作为对照。同法培养 12、24、36、48 及 60 h 后, 荧光显微镜下目测荧光强度, 并分别测定  $A_{600}$  值。

2.8 半定量 RT-PCR 法检测模型药物组和模型对照组的 GFP 基因转录效率

2.8.1 引物设计 根据酵母管家基因肌动蛋白-1 基因 (*Actin-1*) 设计引物, Actin1: 5'-TGTCACCAACTG-GGACGATA-3', Actin2: 5'-AACCAGCGTAAATTG-GAACG-3'。

2.8.2 反转录 使用美国 Omega 公司酵母总 RNA 提取试剂盒分别提取模型药物组, 模型对照组和酵母 GS115 总 RNA, 使用随机引物、M-MLV 反转录合成 cDNA。

2.8.3 PCR 扩增 以反转录后产物为模板, 以 *Actin-1*、*Actin-2*、GFP1、GFP2 为引物, 扩增 GFP、*Actin-1* 基因。

2.8.4 PCR 产物分析 用 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分析, 黑马凝胶成像分析软件 (hema V3.41) 分析各条带灰度, 求与内参的比值。

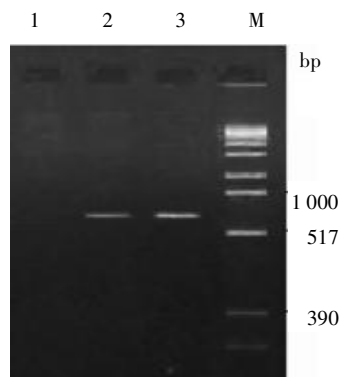
## 结 果

### 1 pGAP-EcR-USP 与 pPIC3.5K-EH-GFP 酵母表达质粒的鉴定

重组质粒测序结果经 DNAMAN 软件比对与理论要求序列一致。

### 2 酵母 A 的鉴定

以酵母 A 阳性克隆基因组 DNA 为模板, 以 GFP1、GFP2 为引物, 经 PCR 扩增出 730 bp 左右的片段, 与预期结果一致(图 1)。

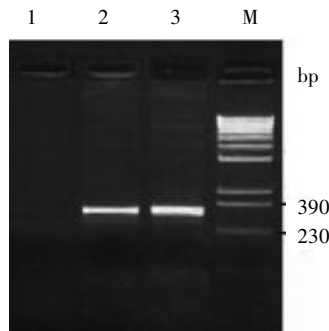


M: DNA 标志物, 1: 酵母 GS115, 2: pPIC3.5K-EH-GFP 质粒, 3: 酵母 A。  
M: DNA marker, 1: Yeast GS115, 2: Plasmid pPIC3.5K-EH-GFP, 3: Yeast A.

图 1 重组酵母 A 鉴定图  
Fig.1 Identification of the recombinant yeast A

### 3 酵母 B 的鉴定

以酵母 B 阳性克隆基因组 DNA 为模板, 以 C1、C2 为引物, 经 PCR 扩增出 320 bp 左右的片段, 与预期结果一致(图 2)。



M: DNA 标志物, 1: 酵母 A, 2: pGAP-EcR-USP 质粒, 3: 酵母 B。  
M: DNA marker, 1: Yeast A, 2: Plasmid pGAP-EcR-USP,  
3: Yeast B.

图 2 重组酵母 B 鉴定图

Fig.2 Identification of the recombinant yeast A

#### 4 酵母模型的荧光鉴定

荧光显微镜下可见球状的酵母细胞发出绿色荧光(图 3), 目测酵母细胞于培养 48 h 荧光强度最高。阴性对照组酵母 A 和空白对照组(酵母 GS115) 均未见荧光, 表明将白纹伊蚊 EcR 及 USP 在酵母细胞内结合形成 EcR/USP 二聚体, 二聚体作用于响应序列 EcRE, 启动 HSP27 启动子, 从而启动报告基因 GFP 表达。

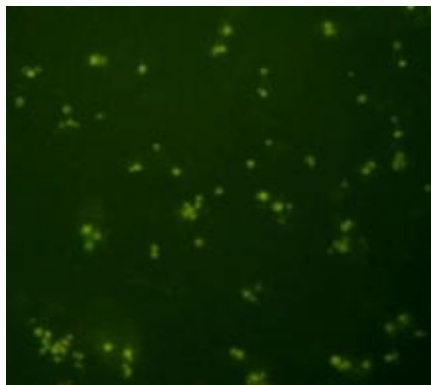
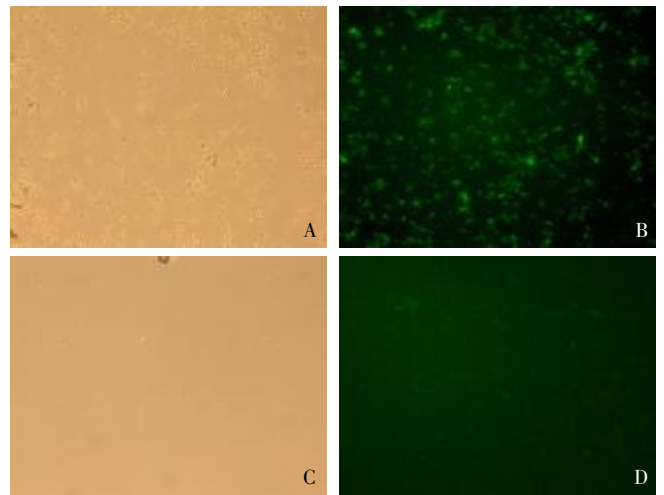


图 3 荧光显微镜下见带有绿色荧光的酵母 (10×40)

Fig.3 Yeast with green fluorescence under fluorescent microscope (10×40)

#### 5 施加虫酰肼后的模型药物组与模型对照组酵母在荧光显微镜下的对比

培养 12、24、36、48 及 60 h 各组酵母  $A_{600}$  值, a 组: 0.12、0.32、0.75、1.20、1.30; b 组: 0.12、0.32、0.76、1.21、1.32; c 组: 0.12、0.33、0.77、1.22、1.35; d 组: 0.12、0.32、0.75、1.19、1.31, 各组间差异不明显, 可见虫酰肼对酵母生长曲线无明显影响。各取 48 h 培养液 10  $\mu$ l 荧光显微镜下目测, 药物组模型酵母荧光强度明显减弱(图 4)。



A: 模型对照照明视野, B: 模型对照组荧光显微镜下, C: 模型药物组照明视野, D: 模型药物组荧光显微镜下。

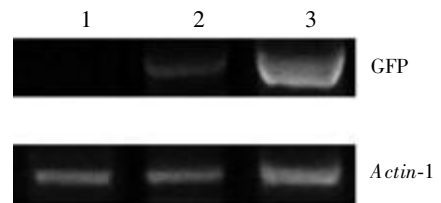
A: Yeast B under visual light microscope, B: Yeast B under fluorescent microscope, C: Yeast A under visual light microscope, D: Yeast A under fluorescent microscope.

图 4 施加与未施加虫酰肼的模型酵母在明视野与荧光显微镜下的对比

Fig. 4 Comparison of tebufenozide added model yeast A and control model yeast B under visual light and fluorescent microscopes

#### 6 RT-PCR 验证 GFP 基因的表达效率

以酵母肌动蛋白基因 *Actin-1* 作为内参, 检验 GFP 基因的转录效率。PCR 产物为 2 条带, 大小分别为 737 bp 和 283 bp, 符合预期 GFP、*Actin-1* 基因大小。通过各条带灰度, 求各道 GFP 与内参灰度的比值。模型药物组比值为 0.614, 模型对照组比值为 1.134。可见施加药物后酵母的 GFP 基因的转录水平明显减弱(图 5)。



1: 未转化酵母 GS115, 2: 模型药物组, 3: 模型对照组。

1: Negative control yeast, 2: Model yeast affected by tebufenozide, 3: Control model yeast.

图 5 模型药物组与模型对照组酵母的半定量 RT-PCR 结果

Fig. 5 Semi-quantitative RT-PCR results of model yeast affected by tebufenozide and the control

### 讨 论

第 3 代杀虫剂即昆虫生长调节剂(insect growth regulator, IGR)主要包括壳多糖合成抑制剂、蜕皮激素类似物(MHAs)、保幼激素类似物(JHHs)等<sup>[7]</sup>, 它们能作用于害虫生长和发育的关键阶段, 改变害

虫的形态、生活习性,抑制其生长发育和繁殖,最终导致害虫死亡,具有杀虫活性高、专一性强、对人畜安全等优点,是当代开发非杀性药剂的重点。但随着使用时间和范围扩大,害虫抗药性成为主要问题,而减少单一类型杀虫剂连续使用时间,开发多种杀虫剂循环、联合使用是减少害虫抗药性产生的首选策略,但新杀虫剂的发现成功率却逐年下降,这主要是由于筛选方法,交叉抗性等问题造成的。传统的杀虫剂筛选主要依靠对活体昆虫,昆虫细胞系进行研究,这样就会造成试验敏感性低、作用靶点不明、对象少、周期长及成本高等问题。所以建立可以高通量筛选杀虫剂的高效筛选模型是十分必要和紧迫的。目前昆虫蜕皮过程的分子机制已渐清晰,20余种昆虫的 EcR 和(或)USP 基因以及 EcRE 已被克隆和测序,其主要功能也已获知,这为建立高通量新药筛选模型提供了可靠的理论依据<sup>[8]</sup>。

本模型的基础选取白纹伊蚊的 EcR、USP 基因和黑腹果蝇 EcRE 基因,主要是由于 EcR 及 USP 的 DNA 结合域、配体结合域有很高的保守性<sup>[9]</sup>,黑腹果蝇 EcRE 最具有代表性,所以作用于这些部位的化合物可能对昆虫具有广泛杀灭作用。目前已有的蜕皮激素类似物杀虫剂如虫酰肼对不同种类昆虫的杀虫活性差异,主要与其与 EcR 配体结合区内氨基酸残基的结合方式与亲和性大小决定<sup>[10]</sup>,所以针对这些部位的化合物可能对白纹伊蚊乃至蚊类有较为专一的杀灭作用。总之,对酵母模型中蜕皮激素代谢途径任何一个靶点产生干扰作用的化合物都有可能成为昆虫杀虫剂。

本试验构建的酵母模型在荧光显微镜下可见绿色荧光,证明在酵母模型内表达的 EcR 与 USP 形成了复合二聚体,并作用于 EcRE 启动 GFP 报告基因表

达荧光蛋白。使用蜕皮激素拮抗剂虫酰肼对酵母模型初步检测,虫酰肼作用下的模型药物组酵母荧光强度远低于未加药物的模型对照组酵母,表明 GFP 的表达受到抑制。半定量 RT-PCR 检验 GFP 基因的转录效率,表明在虫酰肼作用下酵母模型内 GFP 基因的转录水平低于对照组,证明本研究模型成功构建。

### 参 考 文 献

- [1] Thummel CS, Chory J. Steroid signaling in plants and insectsc-ommon themes, different pathways[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 3113-3129.
- [2] Smagghe G, Dhadialla TS, Lezzi M. Comparative toxicity and ecdysone receptor affinity of non-steroidal ecdysone agonists and 20-hydroxyecdysone in *Chironomus tentans*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32: 187-192.
- [3] Riddiford LM. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis[J]. *Receptor*, 1993, 3: 203-209.
- [4] Antoniewski C, Mugat B, Delbac F, et al. Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 2977-2986.
- [5] Tran HT, Askari HB, Shaaban S, et al. Reconstruction of ligand-dependent transactivation of *Choristoneura fumiferana* ecdysone receptor in yeast[J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15: 1140-1153.
- [6] Bergman T, Henrich VC, Schlattner U, et al. Ligand control of interaction *in vivo* between ecdysteroid receptor and ultraspiracle ligand-binding domain[J]. *Biochem J*, 2004, 378: 779-784.
- [7] Dinan L, Whiting P, Girault LP, et al. Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor[J]. *Biochem J*, 1997, 327: 643-650.
- [8] Carmichael JA, Lawrence MC, Graham LD. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design[J]. *Biol Chem*, 2005, 280: 22258-22269.
- [9] Orłowski M, Szyszka M, Kowalska A, et al. Lasticity of the ecdysone receptor DNA binding domain[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 2166-2184.
- [10] Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, et al. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74: 492-497.

(收稿日期:2006-09-28 编辑:富秀兰)

## 【消息】

### 更 正

本刊 2007 年第 4 期 346 页左栏第 11~13 行:“美丽筒线虫基因组序列的测定及基因组和蛋白质组学的研究也在很大程度上带动了整个生命科学的发展。”其中的“美丽筒线虫”改为“秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)”。特此更正。

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》编辑部