

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.20240129

# 棉铃虫细胞色素 P450 基因 (*CYP6AE17* 和 *CYP6AE19*) 原核表达及多克隆抗体制备

刘 丽, 古丽·库尔班, 覃万里, 刘志兄, 阿依娜尔·叶尔肯, 迪娜·马合萨提, 马小丽\*  
新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

**摘要:** 【目的】通过克隆及表达棉铃虫 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 基因, 制备鼠抗棉铃虫细胞色素 P450 (*CYP6AE17*、*CYP6AE19*) 多克隆抗体, 为进一步研究细胞色素 P450 酶在棉铃虫中的功能奠定基础, 为棉铃虫的绿色防控提供理论依据。【方法】构建重组质粒 pET32a-*CYP6AE*, 诱导表达并纯化重组蛋白, 将其作为抗原免疫小鼠, 制备多克隆抗体, 利用 ELISA 检测多克隆抗体的效价, 通过 Western blot 检测多克隆抗体的特异性。【结果】*CYP6AE17*、*CYP6AE19* 基因 CDS 序列全长分别为 1 572 和 1 587 bp, 分别编码 523 和 528 个氨基酸。SDS-PAGE 分析结果表明, *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 基因均可在大肠杆菌原核表达系统中高效诱导表达, 重组蛋白主要以包涵体形式存在。ELISA 结果表明, 制备的鼠抗棉铃虫 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 多克隆抗体效价分别达 1 : 102 400 0 和 1 : 512 000, 且均可特异性识别棉铃虫体内的天然 P450 蛋白。【结论】该研究结果为进一步深入研究棉铃虫细胞色素 P450 酶的功能奠定了材料基础, 为棉铃虫防治新靶标的开发提供了理论依据。

**关键词:** 棉铃虫; 细胞色素 P450; 基因克隆; 原核表达纯化; 多克隆抗体

## Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cytochrome P450 (*CYP6AE17* and *CYP6AE19*) from *Helicoverpa armigera*

LIU Li, KUERBAN · Guli, QIN Wanli, LIU Zhixiong, YEERKEN · Aynar, MAHESATI · Dina, MA Xiaoli\*  
Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology,  
Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China

**Abstract:** 【Aim】We prepared mouse anti-*Helicoverpa armigera* cytochrome P450 (*CYP6AE17* and *CYP6AE19*) polyclonal antibodies by cloning and expressing *CYP6AE17* and *CYP6AE19* of *H. armigera*, aiming to lay a foundation for further research on the function of cytochrome P450 in *H. armigera* and provide a theoretical basis for the green control of *H. armigera*. 【Method】The recombinant plasmid pET32a-*CYP6AE* was constructed, and the recombinant protein was induced to be expressed, purified, and used as an antigen to immunize mice for the preparation of polyclonal antibodies. The titer and specificity of the prepared polyclonal antibodies were determined by ELISA and Western blot, respectively. 【Result】The coding sequences of *CYP6AE17* and *CYP6AE19* were 1 572 and 1 587 bp in length, encoding 523 and 528 amino acid residues, respectively. The results of SDS-PAGE showed that the *CYP6AE17* and *CYP6AE19* could be efficiently induced to be expressed in the prokaryotic expression system of *Escherichia coli*, and the recombinant proteins mainly existed in the form of inclusion bodies. ELISA results showed that the mouse anti-*H. armigera* cytochrome P450 (*CYP6AE17* and *CYP6AE19*) polyclonal antibodies were prepared with titers of 1 : 102 400 0 and 1 : 512 000, respectively. Both of them could specifically recognize the natural P450 protein in *H. armigera*. 【Conclusion】The results of this study laid a material foundation for further in-depth research on the functions of *H. armigera* cytochrome P450 and provided a theoretical basis for the development of new targets for controlling *H. armigera*.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; gene cloning; prokaryotic expression and purification; polyclonal antibody

收稿日期 (Received): 2024-09-23 接受日期 (Accepted): 2025-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060620, 32360662); 自治区面上项目 (2024D01C26)

作者简介: 刘丽, 女, 硕士研究生。研究方向: 农业昆虫与害虫防治。E-mail: liuli@stu.xju.edu.cn

\* 通信作者 (Author for correspondence), 马小丽, E-mail: xlm87@xju.edu.cn

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是世界性分布的农业重大害虫之一,对全球农业经济的发展产生了巨大威胁,因此,迫切需要寻求绿色可持续防控措施。新型绿色农药的开发是当前的研究热点(Almadiy *et al.*, 2023)。细胞色素 P450 酶系(cytochrome P450s, P450s)在昆虫解毒代谢异源物质中发挥了重要作用(Li *et al.*, 2022)。*CYP6AE* 是棉铃虫基因组中最大的 P450 亚家族之一,包含 10 个 P450 基因(施雨, 2017)。众多研究集中于 *CYP6AE14* 的解毒代谢功能(Chen *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2012),而由于 *CYP6AE* 基因之间的高度序列同一性,尚不能排除 *CYP6AE* 亚家族其他成员的代谢能力。曾有研究报道, *CYP6AE17*、*CYP6AE19* 在棉铃虫取食溴氰菊酯及  $\beta$ -蒎烯等植物次生代谢物质后上调表达(Shi *et al.*, 2018)。因此,对棉铃虫 *CYP6AE* 亚家族基因的功能进行深入研究,可为绿色农药的开发提供新的靶点。

在昆虫学研究中,蛋白质异源表达系统主要包括大肠杆菌 *Escherichia coli* 原核表达系统、酵母表达系统和昆虫细胞表达系统等(Shangguan *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2024)。其中,大肠杆菌原核表达系统以其高表达量、低成本、操作简单等优点被广泛应用(祁浩和刘新利, 2016; Pan *et al.*, 2024)。*pEASY-T3* 作为一种常用的克隆载体,常选用大肠杆菌作为宿主细胞(李良斌等, 2023; 付开赞等, 2020; Wei *et al.*, 2021)。*pEASY-T3* 的 3'末端带有一个 T,可与 PCR 产物的 A 高效互补配对,显著提高 PCR 产物连接和克隆的效率(Peng *et al.*, 2024)。*Transetta* (DE3) 菌株常被用于构建含 T7 启动子的高效表达载体,如 *pET* 载体。*pET* 载体是一种常用的原核表达载体,含有多个 His-tag、GST-tag、NusA-tag 等融合、纯化标签。这些蛋白标签的表达不影响目的蛋白的转录和翻译,有利于蛋白质纯化和溶解等(陈存等, 2024)。众多研究采用大肠杆菌异源表达昆虫细胞色素 P450 酶(Guo *et al.*, 2024; Lei *et al.*, 2024),该表达系统可在 1~2 d 内提供足够产量的重组蛋白,且不会影响其内源性活性(Li *et al.*, 2024)。本研究利用大肠杆菌原核表达系统异源表达棉铃虫 *CYP6AE17*、*CYP6AE19* 基因,获得大量高质量重组纯化蛋白,可为多克隆抗体的制备提供坚实基础。

抗体是研究基因和蛋白质结构和功能的重要

工具,包括单克隆抗体和多克隆抗体。与单克隆抗体相比,多克隆抗体制备方法简单、廉价易得且周期短,更容易储存和稀释(宁慧敏等, 2024)。目前,表达纯化重组蛋白,制备多克隆抗体已在生物、医学等多个领域得到普遍应用(Brocato *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024c; Zong *et al.*, 2024)。迄今为止,细胞色素 P450 多克隆抗体已在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)、棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 等昆虫中得到制备(孙海霞等, 2014; 魏原杰等, 2017),而通过棉铃虫制备 *CYP6AE* 基因多克隆抗体的研究尚少。本研究制备鼠抗棉铃虫细胞色素 P450 (*CYP6AE17*、*CYP6AE19*)多克隆抗体,可为后续棉铃虫细胞色素 P450 酶功能的研究奠定基础,为其他昆虫多克隆抗体的制备提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

健康雄性 BALB/c 小鼠 *Mus musculus* 购自新疆医科大学实验动物中心,棉铃虫及幕衣蛾 *Tineola bisselliella* (Hummel) 为新疆大学生物资源基因工程重点实验室室内人工饲养。表达载体 *pET32a(+)* 质粒为本实验室前期保存。*Trans-T1* 和 *Transetta* (DE3) 菌株感受态细胞、*pEASY<sup>®</sup>-T3 Cloning Kit* 和 *pEASY<sup>®</sup>-Blunt Cloning Kit* 克隆载体、限制性内切酶 (*FlyCut<sup>®</sup> Xho I*、*FlyCut<sup>®</sup> EcoR I*、*FlyCut<sup>®</sup> Hind III*)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG (IgG-HRP)、质粒小提试剂盒 (*EasyPure<sup>®</sup> Plasmid MiniPrep Kit*)、DNA 快速凝胶提取试剂盒 (*EasyPure<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit*)、His 标签蛋白纯化树脂 (*ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin*) 均购自北京全式金生物技术有限公司;弗氏完全佐剂 (*Freund's complete adjuvant, FCA*)、弗氏不完全佐剂 (*Freund's incomplete adjuvant, FI-CA*) 购自 Sigma 公司;四甲基联苯胺 (*tetramethylbenzidine, TMB*) 显色试剂盒、二氨基联苯胺 (*diaminobenzidine, DAB*) 显色试剂盒购自 Thermo 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (*BCA Protein Assay Kit*) 购自北京索莱宝科技有限公司;昆虫蛋白提取试剂盒 (*BBproExtra<sup>®</sup>*) 购自上海贝博生物科技有限公司;其余所用的化学试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 棉铃虫 *CYP6AE* 原核表达载体的构建及鉴定

根据 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 基因的编码序列 (coding sequence, CDS),设计具有 *Hind III*、*Xho I*

和 *EcoR* I 酶切位点的引物(表 1)。以课题组前期保存的棉铃虫 5 龄幼虫中肠 cDNA 为模板,PCR 扩增 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 基因带有酶切位点的目的片段,扩增程序为:95 °C 2 min;95 °C 20 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s,35 次循环;72 °C 5 min。利用 DNA 快速凝胶提取试剂盒将目的片段纯化回收后,与 pEASY-T3 克隆载体连接并转化至大肠杆菌 *Trans-T1* 感受态细胞中,PCR 鉴定阳性克隆,扩增程序为:94 °C 10 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,32 次循环;72 °C 7 min。

以构建的克隆质粒 pEASY-T3-*CYP6AE17* 和 pEASY-T3-*CYP6AE19* 为模板 PCR 扩增获得带有特异性酶切位点的目的片段并回收。将重组质粒与 pET32a(+)载体经 *Xho* I、*EcoR* I 和 *Hind* III 同步酶切后回收目的片段,利用 T4 DNA 连接酶将回收产物于 25 °C 连接 2 h 后转化至大肠杆菌 *Trans-T1* 感受态细胞,PCR 鉴定阳性重组子正确后,37 °C 培养 12 h,按照质粒小提试剂盒提取重组质粒。

表 1 构建 *CYP6AE* 基因原核表达载体的引物序列

Table 1 Primer sequences for *CYP6AE* prokaryotic expression vector construction

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>CYP6AE17</i> -F	<u>CCCAAGCTT</u> CACAACCTCGAAACATGATCACCAC
<i>CYP6AE17</i> -R	<u>CCGCTCGAGACATCTTATAGGTTCTTCAGTAGCC</u>
<i>CYP6AE19</i> -F	<u>CGGAATTC</u> CATGTATCCAACGCGGTTACCA
<i>CYP6AE19</i> -R	<u>CCGCTCGAGGCTATTCATCGGCTCTCTCC</u>

下划线代表酶切位点,波浪线代表保护碱基。

Underlined lines represent enzymatic sites and wavy lines represent guard bases.

### 1.3 重组蛋白的诱导表达

将构建好的测序正确的阳性重组质粒 pET32a-*CYP6AE17* 和 pET32a-*CYP6AE19* 转入 *Transetta* (DE3)感受态细胞中,菌液 PCR 及双酶切鉴定阳性后,接种于含 50 mg · mL<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至  $D_{600\text{nm}}$  值为 0.6~0.8。加入终浓度为 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 IPTG,37 °C 诱导表达 6 h,并离心(4 °C,11 200 r · min<sup>-1</sup>,15 min)收集沉淀。超声破碎(超声 5 s,间歇 5 s,共 40 min)再离心,收集上清和沉淀,并利用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

### 1.4 重组蛋白的纯化

经 SDS-PAGE 检测发现,重组蛋白主要以包涵体形式存在。用 8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素溶液溶解包涵体,4 °C 过夜变性,11 200 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上

清液,经 0.45 μm 的滤膜过滤后加到镍柱上,并用不同浓度咪唑(20、100、200、300 mmol · L<sup>-1</sup>)的平衡缓冲液洗脱目的蛋白。收集每个洗脱组分用于 SDS-PAGE 分析。高浓度咪唑(300 mmol · L<sup>-1</sup>)洗脱组分在 4 °C 下用不同浓度梯度尿素(6.0、4.0、2.0、1.0、0.5 和 0.0 mmol · L<sup>-1</sup>)透析,收集透析液并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。

### 1.5 小鼠多克隆抗体制备

首次免疫前,从未经处理的小鼠眼眶静脉采血,分离血清作为阴性对照。初次免疫,将 100 μg 纯化的重组蛋白用 PBS 稀释至 200 μL,与等体积弗氏完全佐剂混合乳化,通过足垫和皮下多点注射对小鼠进行免疫。每个抗原注射 2 只小鼠,每只小鼠注射 150 μL。此后,每次免疫注射的时间间隔为 14 d,3 次免疫结束后开始全血采样。血液样本在 4 °C 下静置过夜,4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,上清即为抗血清样本。

### 1.6 小鼠多克隆抗体效价检测

将纯化蛋白稀释至 10 μg · mL<sup>-1</sup> 后加入酶标板中,每孔 100 μL,进行 ELISA 试验测定多克隆抗体效价。将酶标板置于 4 °C 包被过夜,弃去孔内液体,洗板;加入 100 μL 5%脱脂奶粉,37 °C 封闭 2 h,弃去孔内液体,洗板;每孔加入 2 倍倍比稀释的抗血清 100 μL,初始稀释比为 1:100 0,共稀释 12 个浓度梯度,37 °C 孵育 1 h,洗板;每孔加入 100 μL 1:500 0 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h,洗板;每孔加入 100 μL TMB 底物显色液,避光显色 5 min,随后加入 50 μL 2 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液终止反应,10 min 内用多功能酶标仪检测免疫后血清吸光度  $D_{450\text{nm}}$  及未免疫血清吸光度  $D_{450\text{nm}}$ ,并计算比值。

### 1.7 多克隆抗体特异性检测

按照昆虫蛋白提取试剂盒提取棉铃虫及幕衣蛾总蛋白,进行 Western blot 检测。将纯化重组蛋白 *CYP6AE17* 及 *CYP6AE19*、棉铃虫总蛋白和幕衣蛾总蛋白经 10%的 SDS-PAGE 分离后转移至 NC 膜上;NC 膜浸没于 5%脱脂奶粉,室温封闭 2 h,洗膜;一抗按 1:200 0 比例稀释后,4 °C 过夜孵育,洗膜;二抗按 1:500 0 稀释后,室温孵育 1.5 h,洗膜;配制 DAB 显色液 1 mL 滴加至膜上,避光显色 3 min,立即用蒸馏水冲洗,停止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的构建与鉴定

经基因测序和 BLAST 比对分析,2 个基因序列与 NCBI 中原始序列(GenBank 登录号:PP163089.1、PP163087.1)相似性均在 97%以上,证明所获得的 2 个基因均为细胞色素 P450 酶基因。2 个基因 CDS 序列全长分别为 1 572 和 1 587 bp,分别编码 523 和 528 个氨基酸。以棉铃虫 5 龄幼虫中肠 cDNA 为模板,扩增获得 2 条大小在 1 600 bp 左右且包含 CDS 序列的特异性条带(图 1),构建重组质粒,对其双酶切后出现 2 排明显条带(图 2),上排为载体,下排为目的基因,双酶切验证正确,证明重组质粒成功构建。

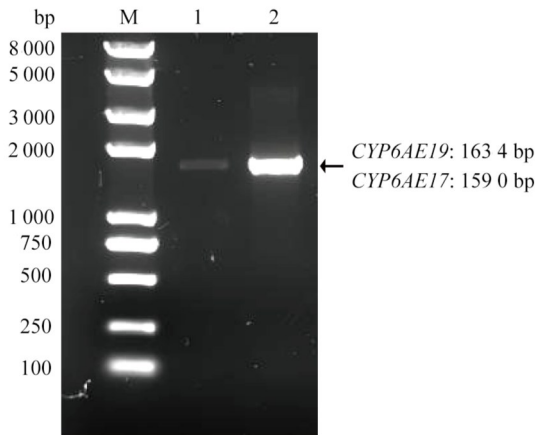


图 1 CYP6AE17 和 CYP6AE19 基因扩增

Fig.1 Amplification of CYP6AE17 and CYP6AE19 genes  
M: DNA marker; 1: CYP6AE19; 2: CYP6AE17.

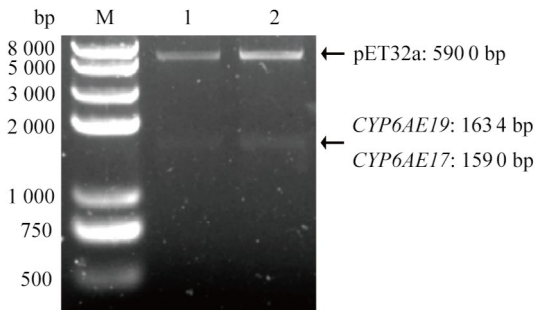


图 2 CYP6AE17 和 CYP6AE19 的重组质粒双酶切鉴定  
Fig.2 Identification of recombinant plasmids of CYP6AE17 and CYP6AE19 by double enzyme digestion

M: DNA marker; 1: pET32a-CYP6AE19; 2: pET32a-CYP6AE17.

### 2.2 重组蛋白的表达与纯化

将重组质粒 pET32a-CYP6AE 转入大肠杆菌并诱导表达,超声破碎离心后,经 SDS-PAGE 检测分

析,2 种 CYP6AE 重组蛋白均为包涵体蛋白(图 3)。用 Ni-NAT 柱对沉淀中蛋白进行纯化,并通过 10% 的 SDS-PAGE 检测,结果表明,低浓度的咪唑(20、100、200 mmol · L<sup>-1</sup>)可洗脱杂蛋白,高浓度 300 mmol · L<sup>-1</sup>咪唑洗脱可获得较为单一的目的蛋白(图 4)。经尿素透析及超滤后,BCA 法测定重组 CYP6AE17 和 CYP6AE19 蛋白浓度分别为 0.30 和 0.29 μg · μL<sup>-1</sup>。

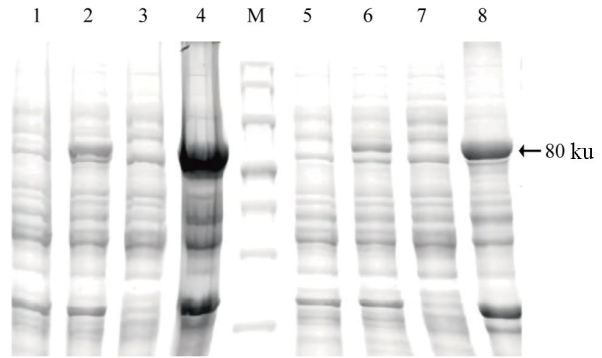


图 3 重组棉铃虫 CYP6AE17 和 CYP6AE19 蛋白诱导

Fig.3 Induction of recombinant *Helicoverpa armigera* CYP6AE17 and CYP6AE19 proteins

1 和 5: IPTG 诱导前; 2 和 6: IPTG 诱导后; 3 和 7: 超声上清; 4 和 8: 超声沉淀; M: 蛋白质分子质量标准。  
1 and 5: Before IPTG induction; 2 and 6: After IPTG induction; 3 and 7: Sonication supernatant; 4 and 8: Sonication precipitation; M: Protein marker.

### 2.3 多克隆抗体效价检测

纯化的重组 CYP6AE17 和重组 CYP6AE19 融合蛋白作为抗原,小鼠经 3 次免疫后,用 ELISA 检测抗体效价,若免疫后血清 D<sub>450 nm</sub> 与未免疫血清 D<sub>450 nm</sub> 的比值>2.1 则为阳性,阳性所在的最高稀释倍数即为效价。结果如图 5 所示,抗 CYP6AE17 多克隆抗体的效价为 1 : 102 400 0,抗 CYP6AE19 多克隆抗体的效价为 1 : 512 000,说明制备的抗体已达预期目标,可用于后续试验。

### 2.4 多克隆抗体特异性检测

采用 Western blot 检测多克隆抗体的特异性。如图 6 所示,重组蛋白 pET32a-CYP6AE17、pET32a-CYP6AE19 均在分子质量 80 ku 附近出现特异性条带。此外,多克隆抗体均可与棉铃虫体内的天然细胞色素 P450 蛋白结合,而不能与幕衣蛾天然蛋白结合,表明制备的 CYP6AE17 和 CYP6AE19 多克隆抗体特异性良好。

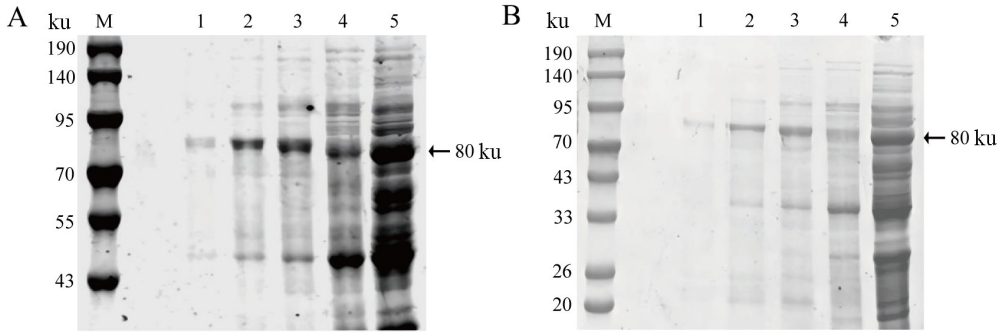


图 4 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 重组蛋白纯化

Fig.4 Purification of recombinant *CYP6AE17* and *CYP6AE19* proteins

A: *CYP6AE17*; B: *CYP6AE19*. 1~4: 300、200、100、20 mmol · L<sup>-1</sup>咪唑蛋白的洗脱液; 5: 流穿液; M: 蛋白质分子质量标准。  
A: *CYP6AE17*; B: *CYP6AE19*. 1~4: Eluents of 300, 200, 100 and 20 mmol · L<sup>-1</sup> imidazolium proteins;  
5: Flow-through solution; M: Protein marker.

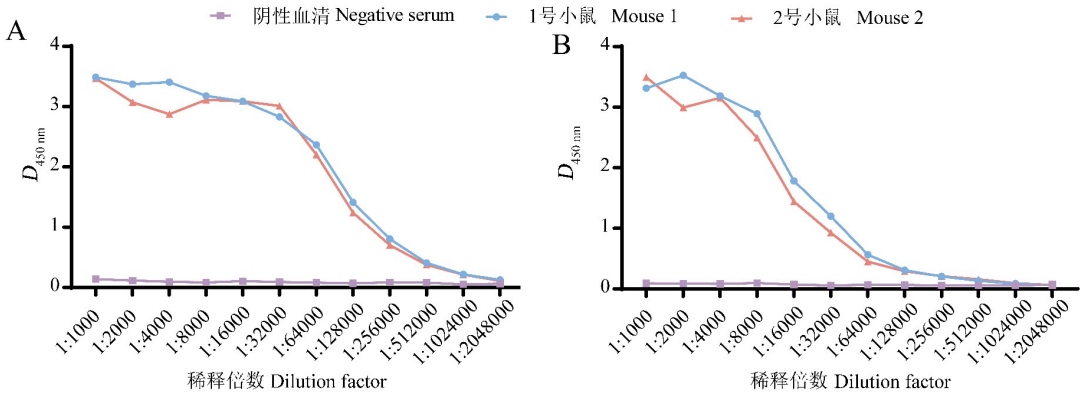


图 5 ELISA 检测多克隆抗体的效价

Fig.5 ELISA for the detection of the potency of polyclonal antibodies

A: *CYP6AE17*; B: *CYP6AE19*.

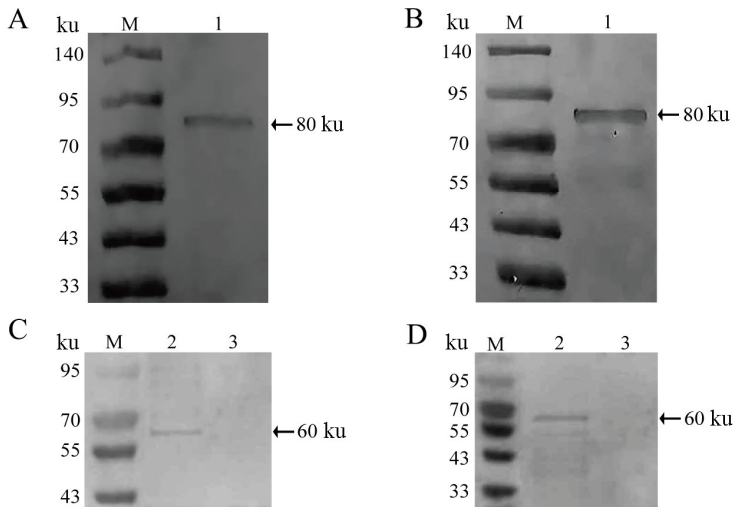


图 6 Western blot 法鉴定多克隆抗体特异性

Fig.6 Characterization of polyclonal antibody specificity by Western blot

A 和 C: *CYP6AE17*; B 和 D: *CYP6AE19*. 1: 重组纯化蛋白; 2: 棉铃虫总蛋白; 3: 幕衣蛾总蛋白; M: 蛋白质分子质量标准。  
A and C: *CYP6AE17*; B and D: *CYP6AE19*. 1: Recombinant proteins after purification; 2: Total proteins of *Helicoverpa armigera*;  
3: Total proteins of *Tineola bisselliella*; M: Protein marker.

### 3 讨论

细胞色素 P450 广泛存在于微生物、动物、植物等体内,包括多个超家族成员(Nie *et al.*, 2024)。实验室前期研究发现,棉铃虫 2 个基因 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 在 5 龄暴食期高表达。此外,棉铃虫取食含有不同浓度棉酚的人工饲料后,中肠 *CYP6AE17* 和 *CYP6AE19* 的转录水平活性随着棉酚浓度的升高而显著升高,中肠被普遍认为是昆虫的主要解毒器官(Li *et al.*, 2019)。这表明,*CYP6AE* 在棉铃虫对次生植物代谢物的反应中具有潜在解毒调节作用。为进一步研究 *CYP6AE* 在棉铃虫体内的功能,明确细胞色素 P450 酶在取食不同浓度棉酚后蛋白质水平的表达情况,需制备多克隆抗体,为进一步深入研究细胞色素 P450 酶的功能奠定基础。

高质量抗原的制备是获得特异性良好的多克隆抗体的关键,而表达载体及宿主细菌的选择对于获得重组蛋白抗原至关重要。本研究选择 pEASY-T3 和 pET32a(+) 作为克隆载体和表达载体,通过基因克隆得到了大小为 1 590 和 1 634 bp 的棉铃虫 *CYP6AE17*、*CYP6AE19* 基因序列,并通过大肠杆菌原核表达系统成功表达了 *CYP6AE17*、*CYP6AE19* 基因。

pET32a(+) 是一种高拷贝数质粒,其序列中包含 T7 启动子,可驱动目的基因高水平转录,实现大肠杆菌中目的蛋白的高表达量,其 C 端的 6×His 标签等纯化标签也有助于亲和纯化(Liu *et al.*, 2023; Sivakumar *et al.*, 2024)。由于 pET 载体本身带有 His 标签,故重组纯化蛋白分子质量较棉铃虫天然 P450 蛋白分子质量高约 20 ku。经 SDS-PAGE 分析,检测到分子质量约 80 ku 的条带,条带大小符合预期,且重组蛋白以包涵体的形式存在。利用大肠杆菌异源表达重组蛋白通常会形成包涵体(Fang *et al.*, 2023)。包涵体蛋白的溶解变性剂通常为尿素或盐酸胍,但盐酸胍的变性能力强,变性后不易复性(李志煜等,2024),故选用 8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素溶液溶解包涵体蛋白。溶解后的包涵体蛋白经不同浓度咪唑纯化洗脱,获得可制备多克隆抗体的高纯度及高浓度 *CYP6AE17*、*CYP6AE19* 重组纯化蛋白抗原。

多克隆抗体制备方法简单,生产成本低,目前已得到广泛应用(Stokanic *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024a, 2024b)。小鼠和新西兰白兔 *Oryctolagus cu-*

*niculus* 为制备多克隆抗体最常用的宿主物种,但小鼠的免疫过程耗时短、成本低(吴婕等,2024),在多克隆抗体制备研究中使用广泛(陈睿等,2022; 李雪等,2021; Sedzro *et al.*, 2024)。故本试验以重组纯化蛋白作为抗原,注射免疫小鼠,成功制备得到多克隆抗体,其中 *CYP6AE17* 多克隆抗体的效价比为 1 : 102 400 0, *CYP6AE19* 多克隆抗体的效价比为 1 : 512 000, 2 种抗血清的吸光度  $D_{450\text{ nm}}$  均为免疫前血清的 2.1 倍以上,表明可用于后续研究。但 *CYP6AE17* 多克隆抗体的效价较 *CYP6AE19* 更高,说明 *CYP6AE17* 多克隆抗体注射小鼠后免疫效果更强,这可能是由于蛋白浓度差异及不同小鼠个体间的差异造成。Western blot 结果表明,2 种抗体均可与棉铃虫天然蛋白成功结合,且条带大小符合预期,证明棉铃虫体内存在细胞色素 P450 的表达。然而,与 Shi *et al.* (2018) 细胞色素 P450 的 Western blot 鉴定结果中的条带相比颜色较浅,这种差异可能由于其通过构建细胞系,制备微粒体来提取蛋白,而本研究从棉铃虫幼虫中肠组织提取天然蛋白,蛋白提取量可能受到组织量等因素的影响,蛋白提取方法的差异也可能导致蛋白提取量的差异。抗体与幕衣蛾天然蛋白无法结合,表明制备的多克隆抗体与棉铃虫天然蛋白特异性结合,抗体特异性良好。

综上所述,本研究构建了重组质粒 pET32a-*CYP6AE17* 和 pET32a-*CYP6AE19*, 成功诱导表达及纯化了重组蛋白,制备了多克隆抗体,为后续进一步探究 *CYP6AE* 亚家族及细胞色素 P450 的功能研究奠定了材料基础,为棉铃虫防治新靶标的开发提供了理论依据。

### 参考文献

- 陈存, 刘韩, 翁静凤, 杨运航, 任迎虹, 2024. 紫色色杆菌转氨酶基因表达载体的构建及其原核表达. *中国生物制品学杂志*, 37(9): 1070-1074.
- 陈睿, 高焯宏, 赵学楠, 杨敏仪, 吴惠娟, 王荣智, 汪世华, 2022. 2 种石房蛤毒素完全抗原交联方法的比较及多克隆抗体的制备. *生物安全学报*, 31(2): 185-190.
- 李良斌, 武丽仙, 许雅静, 刘芳, 陈大福, 刘家莉, 赵红霞, 2023. 蜂巢小甲虫气味结合蛋白基因 *AtOBP1* 的分子特性及功能研究. *昆虫学报*, 66(1): 19-26.
- 李雪, 古丽·库尔班, 张龙, 马小丽, 2021. 小鼠抗棉铃虫

- 硫酸酯酶(HaSulfl)多克隆抗体的制备与鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 37(10): 936-941.
- 李志煜, 马旭升, 马永华, 郑海学, 2024. 非洲猪瘟病毒 DP71L 蛋白原核表达及其多克隆抗体制备. 中国兽医科学, 54(9): 1-10.
- 付开赞, 常瑞, 丁新华, 何江, 吐尔逊·阿合买提, 任羽, 郭文超, 2020. 马铃薯甲虫结节性硬化复合物基因 *LdTSC1* 和 *LdTSC2* 基因的克隆及功能分析. 生物安全学报, 29(1): 23-30.
- 宁慧敏, 彭娜娜, 陈玉豪, 李欣颖, 范杰, 2024. PRRSV GP2-GP4 融合蛋白原核表达及多克隆抗体的制备. 现代畜牧科技, 52(8): 22-26.
- 祁浩, 刘新利, 2016. 大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展. 安徽农业科学, 44(17): 4-6.
- 施雨, 2017. 棉铃虫细胞色素 P450 基因系统发育分析及外源化合物代谢相关 P450 基因的功能表达. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 孙海霞, 陈俊, 杨之帆, 2014. 褐飞虱细胞色素 P450 基因 *CYP4C62* 的原核表达及多克隆抗体的制备. 昆虫学报, 57(6): 656-662.
- 魏原杰, 王亚美, 黄丽娜, 刘宁, 赵洁, 艾新宇, 刘小宁, 2017. 棉蚜 P450 *CYP6CY3* 的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备. 中国农业科学, 50(7): 1351-1360.
- 吴婕, 杜菁, 樊繁, 任金阳, 卢会鹏, 张力, 雷昕诺, 曹世诺, 吴植, 朱睿, 朱善元, 2024. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白原核表达及多克隆抗体制备. 中国畜牧兽医, 51(10): 4522-4530.
- ALMADIY A A, NENAAH E G, ALBOGAMI Z B, SHAWER M D, ALASMARI S, 2023. *Cupressus sempervirens* essential oil, nanoemulsion, and major terpenes as sustainable green pesticides against the rice weevil. *Sustainability*, 15(10): 1-20.
- BROCATO R L, WU H, KWILAS S A, PRINCIPE L M, JOSLEYN M, SHAMBLIN J, CHIVUKULA P, BAUSCH C, LUKE T, SULLIVAN E J, HOOPER J W, 2024. Preclinical evaluation of a fully human, quadrivalent-hantavirus polyclonal antibody derived from a non-human source. *mBio*, 15(10): 1-17.
- CHEN C, PI W H, ZHANG Y, NIE C X, LIANG J, MA X, ZHANG W J, 2019. Effect of a functional recombinant cytochrome P450 enzyme of *Helicoverpa armigera* on gossypol metabolism co-expressed with NADPH-cytochrome P450 reductase in *Pichia pastoris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155: 15-25.
- FANG Y D, LIU J Y, XIE F, LIU L P, ZENG W W, WANG W H, 2023. Antibody preparation and age-dependent distribution of TLR8 in bactrian camel spleens. *BMC Veterinary Research*, 19(1): 1-16.
- GUO X X, HOU J G, ZHANG W J, ZHANG Y H, LI H L, CAO W J, LI H H, LI X S, 2024. A cytochrome P450 monooxygenase (*CYP337B5*) plays a key role in regulating juvenile hormone biosynthesis and degrading chlorantraniliprole in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 27(3): 1-13.
- LEI L, GAO Z H, ZHAO Q L, WANG C, WANG Y, WANG H F, CHI X P, XU B H, 2024. Identification of the cytochrome P450 gene *AccCYP6A13* in *Apis cerana cerana* and its response to environmental stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 202: 1-10.
- LI H, ZHAO P Y, LI S Y, GUO J Y, HAO D J, 2024. Trial and error: new insights into recombinant expression of membrane-bound insect cytochromes P450 in *Escherichia coli* systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 273(2): 1-11.
- LI S Y, LI H, WANG J T, CHEN C, HAO D J, 2022. Hormetic response and co-expression of cytochrome P450 and cuticular protein reveal the tolerance to host-specific terpenoid defences in an emerging insect pest, *Pagiophloeus tsushimanus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Pest Science*, 96(1): 141-160.
- LI Q L, SUN Z X, SHI Q, WANG R M, XU C C, WANG H H, SONG Y Y, ZENG R S, 2019. RNA-seq analyses of midgut and fat body tissues reveal the molecular mechanism underlying *Spodoptera litura* resistance to tomatine. *Frontiers in Physiology*, 10: 1-12.
- LIU Y B, ZHU P, JI C D, DONG L H, YI W J, 2023. Fusion expression, purification, and characterization of cytokeratin 19 fragments in *E. coli* for enhanced stability in diagnostic applications. *Protein Expression and Purification*, 215: 1-7.
- NIE G B, WU F, DUAN Z, WANG S S, 2024. Genome-wide analysis of the cytochrome P450 superfamily suggests its roles in coumarin biosynthesis and salt stress response in *Melilotus albus*. *Environmental and Experimental Botany*, 220: 1-13.
- PAN Q, YU S J, LEI S, ZHANG S H, DING L L, LIU L, LI S C, WANG X F, LOU B H, RAN C, 2024. Bacterial symbionts contribute to insecticide susceptibility of *Diaphorina citri* via changing the expression level of host detoxifying genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(27): 15164-15175.
- PENG W, JIANG C X, CAI G F, LIU L L, GUO X Q, GAO X N, LI G Y, ZHENG Z H, LIU P, LIU P, 2024. Preparation of polyclonal antibody against thrombospondin 2 recombinant protein and its functional verification in pulmonary hy-

- pertension syndrome in broilers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 274(1): 1–10.
- SEDZRO J C, SMITH S A, SCOTT A, WANG Y Q, TRAVERS R J, HEMP R, MORSE C N, MORRISSEY J H, 2024. Antipolyphosphate monoclonal antibodies derived from autoimmune mice. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 8(6): 1–11.
- SHANGGUAN X X, YANG X Y, WANG S Y, GENG L J, WANG L N, ZHAO M F, CAO H H, ZHANG Y, LI X L, YANG M S, XU K D, ZHENG X H, 2024. Genome-wide identification and expression pattern of sugar transporter genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Insects*, 15(7): 1–16.
- SHI Y, WANG H D, LIU Z, WU S W, YANG Y H, FEYEREISEN R, WU Y D, 2018. Phylogenetic and functional characterization of ten P450 genes from the *CYP6AE* subfamily of *Helicoverpa armigera* involved in xenobiotic metabolism. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 79–91.
- SIVAKUMAR J, ANSU S P, ASWATHY S, SUKUMAR R, INDIRA K, SENBAGAM D, PRAHALATHAN C, ANBARASU K, 2024. Expression and purification of epinecidin-1 variant (Ac-Var-1) by acid cleavage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1): 1–15.
- STOKANIC M M, SIMOVIC A, JOVANOVIC V, RADOMICROVIC M, UDOVICKI B, RISTIVOJEVIC M K, DJUKIC T, VASOVIC T, ACIMOVIC J, SABLJIC L, LUKIC I, KOVACEVIC A, CUJIC D, GNJATOVIC M, SMILJANIC K, STOJADINOVIC M, RADOSAVLJEVIC J, STANIC-VUCINIC D, STOJANOVIC M, RAJKOVIC A, VELICKOVIC T C, 2023. Sandwich ELISA for the quantification of nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 based on polyclonal antibodies from two different species. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1): 1–18.
- TAO X Y, XUE X Y, HUANG Y P, CHEN X Y, MAO Y B, 2012. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*, 21(17): 1–15.
- WANG A P, CHEN Z T, ZHOU J M, CHEN Y M, LIU Y K, LIU H L, LIANG C, ZHU X F, ZHANG Y, XIN C, WEI J J, ZHANG B X, TANG X Y, LU M J, QI Y H, ZHANG G P, 2024a. Development and characterization of monoclonal antibodies against p37 protein of African swine fever virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264: 1–12.
- WANG B J, QIN Y T, SUN Z S, ZHU X Z, JIA Z, CHEN K Y, LIU D J, WANG J Y, ZOU J, 2024b. Production and characterization of monoclonal antibodies against grass carp CD4-1 and CD4-2. *Aquaculture and Fisheries*, 9(2): 154–163.
- WANG J H, AMOAH S, STAFFORD J L, 2024c. A leukocyte immune-type receptor specific polyclonal antibody recognizes goldfish kidney leukocytes and activates the MAPK pathway in isolated goldfish kidney neutrophil-like cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 159: 1–15.
- WANG Q T, FANG K, QI L Z, WANG X, PAN Y, LI Y S, XI J H, ZHANG J H, 2022. Purification and functional characterization of a soluble trehalase in *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 13(10): 1–18.
- WEI C, SHI Y, LI G Y, HUANG C, ZHUANG Y, SHU B, CAO X H, LI Z Q, HU G L, LIU P, GUO X Q, 2021. Preparation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  polyclonal antibody: its application in fatty liver hemorrhagic syndrome. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182: 179–186.
- XU L, ZHAO J, XU D J, XU G C, PENG Y C, ZHANG Y N, 2024. New insights into chlorantraniliprole metabolic resistance mechanisms mediated by the striped rice borer cytochrome P450 monooxygenases: a case study of metabolic differences. *Science of the Total Environment*, 912: 1–12.
- ZONG S M, JIANG Y P, SALZMAN K Z, XIAO L B, ZHAO J, XU D J, XU G C, GE L Q, TA Y A, 2024. Cloning and expression profiling of voltage-gated sodium channel gene (VGSC) from *Spodoptera frugiperda*. *Gene*, 931: 1–6.

(责任编辑:陈晓雯)