

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2017.02.011

应用哺乳动物抗体检测阿维菌素抗性果蝇 P 糖蛋白的表达

杨 敏¹⁺, 罗 亮²⁺, 张 锋¹, 伍一军^{2*}
¹河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002; ²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/分子毒理学实验室, 北京 100101

摘要:【目的】随着杀虫剂阿维菌素的广泛应用,靶标生物对其抗性问题的日益严重。以往的研究显示,细胞膜转运蛋白 P 糖蛋白可能与抗药性有关。但在昆虫对阿维菌素的抗性研究中,由于目前市场上缺少专门针对昆虫的商业化抗体,使得这一研究受限。为此,本研究尝试应用其他物种的抗体开展 P 糖蛋白的检测。【方法】以果蝇为测试昆虫,以阿维菌素作为测试药物,采用免疫印迹方法用鼠抗人 P 糖蛋白单克隆抗体检测阿维菌素敏感品系与阿维菌素抗性品系果蝇中的 P 糖蛋白的表达水平。【结果】检测出果蝇体内 P 糖蛋白的特异性表达,且无明显非特异性条带;与敏感品系果蝇相比,阿维菌素抗性品系果蝇 P 糖蛋白的表达水平明显升高。【结论】用针对人及其他脊椎动物的 P 糖蛋白单克隆抗体检测果蝇 P 糖蛋白的表达可行,且果蝇对阿维菌素的抗性可能与 P 糖蛋白的表达升高有关。

关键词: P 糖蛋白; 蛋白质印迹; 果蝇; 抗药性

Expression level of P-glycoprotein in avermectin-resistant *Drosophila melanogaster* by using the anti-human antibody

YANG Min¹⁺, LUO Liang²⁺, ZHANG Feng¹, WU Yijun^{2*}
¹College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; ²State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents/Laboratory of Molecular Toxicology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract:【Aim】With the widespread application of avermectin, the resistance of target organisms is becoming a more and more serious problem. Previous studies suggest that the membrane transporter P-glycoprotein (P-gp) overexpression is essential for resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs. However, insecticide resistance study was limited, partly because suitable commercial insect antibodies were not available.【Method】In this study, we used anti-human antibody for the detection of P-gp in insects. The expression of P-gp was detected by immunoblotting in the avermectin-sensitive and avermectin-resistant strains of *Drosophila melanogaster*, using mouse anti-human P-gp monoclonal antibody (C219) as the primary antibody.【Result】The expression of P-gp in the avermectin-resistant strain of *Drosophila* was higher than that in the avermectin-sensitive strain with no obvious nonspecific bands detected.【Conclusion】The expression level of P-gp in *Drosophila* may be related to the avermectin resistance. In addition, it is feasible to use anti-human antibody to detect the P-gp level in insects.

Key words: P-glycoprotein; Western blotting analysis; *Drosophila*; resistance

阿维菌素 (avermectins) 是一类由土壤阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 发酵而来的十六元大环内酯类化合物,具有高效广谱的杀虫活性,用于 80 多种有害生物的防治 (Lasota & Dybas, 1991)。由于长期使用,很多靶标生物对阿维菌素产生了抗性。然而,到目前为止,害虫对阿维菌素抗性产生的机制仍不清楚。以往的研究表明,一种最早在中国仓鼠卵巢细胞膜上发现的膜蛋白——P 糖蛋白

(P-glycoprotein, P-gp) 与细胞耐药性有关 (Juliano & Ling, 1976), 此蛋白可以将多种外源化合物运出细胞。现已在果蝇、按蚊等昆虫中发现 P-gp 的同源物 (Gerrard *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1991), 其表达水平可能与昆虫对一些杀虫剂 (如: 阿维菌素) 的抗性相关 (Aurade *et al.*, 2010; Lanning, 1996;)。

为了解昆虫对阿维菌素的抗性与 P-gp 的关系, 本研究采用蛋白质印迹 (Western blotting) 方法对 P-gp 进行检测。蛋白质印迹也被称为免疫印迹 (immunoblotting) 技术 (Towbin *et al.*, 1979), 具有敏感、简便等优点, 被广泛用于分子生物学、微生物学及免疫学等多个领域。然而, 在昆虫学研究中, 由于缺乏专门针对昆虫蛋白检测的商业化抗体, 限制了这一技术的应用 (Ginanova *et al.*, 2015; Jonusaite *et al.*, 2016)。本文以果蝇 P-gp 的免疫印迹方法为例, 以脊椎动物蛋白质抗体替代昆虫抗体检测目的蛋白 (P-gp) 的表达, 进而研究昆虫抗药性的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 果蝇来源及饲养 野生黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Canton-S) 由美国俄勒冈健康科学研究大学 (Oregon Health & Science University) 的 Kretzschmar 教授惠赠 (命名为 SABM); 抗阿维菌素果蝇由中国科学院动物研究所分子毒理学实验室用野生型果蝇汰选而成, 抗药性倍数 30 倍 (命名为 RABM)。果蝇的培养基配方及配制参照 Bloomington 提供的方法 (http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/caltechfood.htm)。果蝇饲养温度: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$; 保种温度: $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$; 光周期: 16 h 光照: 8 h 黑暗; 相对湿度: 50%~70%。

1.1.2 主要试剂与抗体 阿维菌素 (含 93% abamectin B1a, 7% B1b) 购自中农大生物技术公司, 苯基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine)、抑肽酶 (aprotinin)、亮肽素 (leupeptin) 和胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin) 及丽春红等试剂购自美国 Sigma 公司, ECL 发光液购自碧云天生物技术研究, 丙烯酰胺购自东京化成工业株式会社, 甲叉双丙烯酰胺和过硫酸铵购自美国 Merck 公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。小鼠抗人的 P-gp 单克隆抗体 (C219) (一抗) 购自 Merck 公司, 羊抗鼠 IgG 抗体

(二抗) 购自北京康为世纪生物科技有限公司。其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要实验仪器 5417R 型台式控温离心机 (德国 Eppendorf 公司), 梅特勒—托利多 xs10 专业型分析天平 (瑞士梅特勒—托利多公司), 人工气候箱 (宁波江南仪器厂), ChemiDocXRS 化学发光检测系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

果蝇麻醉系统: 二氧化碳透气板、二氧化碳气枪 (美国 LabScientific 公司) 和二氧化碳气瓶。

1.2 方法

1.2.1 果蝇组织总蛋白提取 取 40 头果蝇成虫置冰上用二氧化碳麻醉, 立即加入适量裂解液 ($20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5, 1% CHAPS, $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 10% glycerol, $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 , $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 及蛋白酶抑制剂——抑肽酶、亮肽素和胃蛋白酶抑制剂的混合物), 冰上静置 10 min, 玻璃匀浆器上下匀浆 30 次左右, 离心 (500 g) 3 min, 取上清, 再离心 (16000 g , 4°C) 10 min, 收集上清液作为测定样品。参照 Bradford (1976) 和 Lowry *et al.* (1951) 的方法测定蛋白质含量。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 制备凝胶, 分离胶质量浓度为 10%, 浓缩胶质量浓度为 5%。电泳条件: 浓缩胶中电压 80 V, 分离胶中电压 150 V, 当指示剂溴酚蓝到达距凝胶下缘 1 cm 处停止电泳。

1.2.3 免疫印迹反应 停止电泳后取下凝胶, 将与凝胶尺寸相当的滤纸和 PVDF 膜及海绵块按照凝胶、滤纸、膜和海绵的顺序放好, 在转移缓冲液 ($20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $192\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸, 15% 甲醇, 0.5% SDS) 中浸泡 20 min 后开始转印。转印电流 250 mA, 时间 90~120 min。转印完后将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液 (PBS 溶液, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 封闭 1 h, 再用一抗 (小鼠抗人 P-gp 抗体) 反应 2 h。然后在 PBST 溶液中漂洗 3 次, 每次 10 min, 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗鼠 IgG), 室温摇荡 1 h, 再用 PBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入新配制的 ECL 混合液, 均匀覆盖, 立即上机检测, 照相并记录结果。

2 结果与分析

经查阅资料, 笔者分析、筛选了不同来源的 P-gp 抗体, 其中多为针对小鼠、大鼠和人的抗体。将小

鼠 P-gp 的氨基酸序列与其相对应的果蝇 P-gp 的氨基酸序列进行比较,发现其 P-gp 的全部氨基酸序列相似性为 43%(通过 GenBank 登录号 NM_057483.4 和 M33581.1 可查阅具体序列)。但就抗原表位而言,一种针对人和小鼠等脊椎动物的 P-gp 的兔源多克隆抗体(美国 Abcam 公司,货号 ab98322)的抗原表位序列(863~912 位氨基酸)与果蝇的相似性为 42%(表 1);另一种抗人及其他哺乳动物(小鼠、

大鼠、灵长类等) P-gp 的小鼠来源的单克隆抗体(C219),抗原表位的 N 端氨基酸序列(VQAALD)及 C 端氨基酸序列(VQEALD)与果蝇很接近,相似性为 83.3%(表 2)。根据抗体所针对的蛋白质抗原表位氨基酸序列的相似程度,本研究选择小鼠抗人的 P-gp 单克隆抗体(C219)作为检测果蝇 P-gp 表达的抗体。

表 1 兔抗人 P-gp 多克隆抗体所针对的抗原表位蛋白序列在果蝇和人类中的比较
Table 1 Comparison of the antigen epitope sequences for the rabbit anti-P-glycoprotein polyclonal antibody between *Drosophila* and human

种名 Species	氨基酸序列(863~912 位)比对 863-912 amino acids sequence alignment	相似程度 Similarity/%
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	ANCPHIVGSVILEAKMMSNAVVREKQVIEEACRIATESITNIRTVAGLRR	100
人 <i>Homo sapiens</i>	AIVPIIAIAGVVEKMLSGQALKDKKELEGACKIATEAIENFRTVVSLTQ	42

表 2 小鼠抗人 P-gp 单克隆抗体(C219)所针对的 P-gp 抗原表位蛋白序列在各物种间的比较
Table 2 Comparison of antigen epitope sequences for the mouse anti-P-glycoprotein monoclonal antibody among the species

种名 Species	抗原表位序列 Epitope sequences	
	N 端	C 端
	N-terminal fragment	C-terminal fragment
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	VQQALD	VQQALD
人 <i>Homo sapiens</i>	VQVALD	VQEALD
小鼠 <i>Mus musculus</i>	VQAALD	VQEALD
仓鼠 <i>Mesocricetus auratus</i>	VQAALD	VQEALD
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	VQAALD	VQEALD

用 Western blotting 技术测定了 P-gp 在阿维菌素抗性品系(RABM)和敏感品系(SABM)果蝇中的表达情况,结果显示,RABM 品系的 P-gp 表达量比 SABM 品系高出大约 2 倍(图 1),说明果蝇对阿维菌素的抗性可能与其体内 P-gp 表达水平升高有关。

3 讨论

昆虫组织与脊椎动物组织的免疫印迹技术的步骤基本一致,主要涉及蛋白质提取、电泳、转膜、免疫反应等。但昆虫组织 P-gp 膜蛋白有一定的特殊性,在进行免疫印迹检测时需注意以下问题。

首先,由于大部分昆虫表皮含有坚硬的几丁质,有可能因蛋白质提取不充分而检测不出目的蛋白。在实际操作中,可先将昆虫在提取液中浸泡 10 min,使几丁质软化,再使用匀浆器或均质器尽量将组织充分匀浆。本实验中所测定的 P-gp 是一种膜蛋白,操作过程中要保持低温(如冰上操作),

并在提取液中加入蛋白酶抑制剂,以防止样品在制备过程中降解。

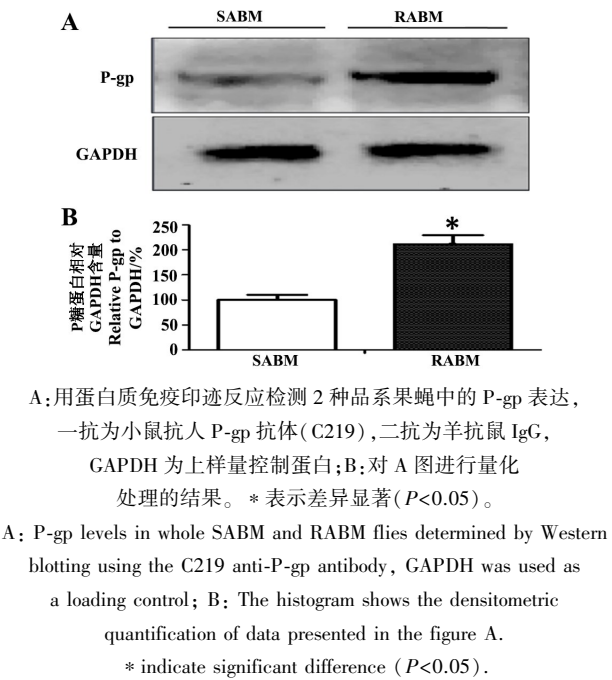


图 1 阿维菌素抗性品系(RABM)与敏感品系(SABM)果蝇中的 P 糖蛋白(P-gp)表达水平
Fig.1 P-glycoprotein (P-gp) expression in abamectin resistant (RABM) and sensitive (SABM) adult *Drosophila*

其次,目前市场上尚无专门针对昆虫 P-gp 的抗体,在没有条件制备抗体时,需要寻找合适的抗体替代品。选用抗体时,需查看抗体所针对物种的目标蛋白质的抗原表位氨基酸序列与昆虫对应的待检测蛋白质的氨基酸序列的相似性。为了保证效果,应选择与所针对的蛋白质抗原表位序列相似

性高的抗体。随着技术的进步,新的制备抗体的方法正逐渐产生,除采用哺乳动物血清制备抗体的常规方法外,最近有报道可利用细菌批量生产抗体(Na *et al.*,2016),有条件的实验室可进行尝试。

参考文献

- AURADE R M, JAYALAKSHMI S K, SREERAMULU K, 2010. P-glycoprotein ATPase from the resistant pest, *Helicoverpa armigera*: purification, characterization and effect of various insecticides on its transport function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembrane*, 1798(6): 1135–1143.
- BRADFORD M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- GERRARD B, STEWART C, DEAN M, 1993. Analysis of Mdr50: a *Drosophila* P-glycoprotein/multidrug resistance gene homolog. *Genomics*, 17(1): 83–88.
- GINANOVA V, GOLUBKOVA E, KLIVER S F, BYCHKOVA E, MARKOSKA K, IVANKOVA N, TRETYAKOVA I, EVGEN'EV M, MAMON L, 2015. Testis-specific products of the *Drosophila melanogaster* sbr gene, encoding nuclear export factor 1, are necessary for male fertility. *Gene*, 577(2): 153–160.
- JONUSAITE S, KELLY S P, DONINI A, 2016. The response of claudin-like transmembrane septate junction proteins to altered environmental ion levels in the larval mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Comparative Physiology B*, 186(5): 1–14.
- JULIANO R L, LING V, 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455(1): 152–162.
- LANNING C L, 1996. Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 47(4): 395–407.
- LASOTA J A, DYBAS R A, 1991. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. *Annual Review of Entomology*, 36(1): 91–117.
- LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, RANDALL R J, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- NA H, LAVER J D, JEON J, SINGH F, ANCEVICIUS K, FAN Y, CAO W X, NIE K, YANG Z, LUO H, 2016. A high-throughput pipeline for the production of synthetic antibodies for analysis of ribonucleoprotein complexes. *RNA*, 22(4): 636–655.
- TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(9): 4350–4354.
- WU C T, BUDDING M, GRIFFIN M S, CROOP J M, 1991. Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. *Molecular and Cellular Biology*, 11(8): 3940–3948.

(责任编辑:杨郁霞)