

重组乙酰胆碱酯酶的表达及其分子进化研究进展

董洁娴, 李振峰, 雷红涛, 何永盛, 王弘, 孙远明

华南农业大学食品学院 广东省食品质量安全重点实验室, 广东 广州 510640

董洁娴, 李振峰, 雷红涛, 等. 重组乙酰胆碱酯酶的表达及其分子进化研究进展. 生物工程学报, 2012, 28(5): 557-564.
Dong JX, Li ZF, Lei HT, et al. Expression and molecular evolution of recombinant acetylcholinesterase for detection of pesticide residues: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 557-564.

摘要: 乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 是酶抑制法检测农药残留的核心试剂。但天然提取的 AChE 存在含量低、纯化困难、稳定性差等不足, 因此, 高性能的重组 AChE 制备成为研究学者关注的热点。文中综述了重组 AChE 的表达、和分子进化等方面的研究成果, 并指出酶定向进化策略与表面展示技术结合是重组 AChE 活性改造的未来趋势。

关键词: 农药残留, 重组乙酰胆碱酯酶, 酶抑制检测法

Expression and molecular evolution of recombinant acetylcholinesterase for detection of pesticide residues: a review

Jiexian Dong, Zhenfeng Li, Hongtao Lei, Yongsheng He, Hong Wang, and Yuanming Sun

Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Food College of South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) plays a key role in the pesticide determination. However, the extraction of AChE from natural materials has the disadvantages of low yield, complex purification and poor stability. Therefore, the preparation of recombinant AChE with high performance becomes the hot topic of researchers in recent years. In this article we summarize the progress in the expression of recombinant AChE and the improvement of its analytical characteristic.

Received: August 30, 2011; **Accepted:** December 12, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871755), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2009A020101004).

Corresponding author: Yuanming Sun. Tel: +86-20-85283448; E-mail: ymsun@scau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30871755), 广东省科技计划项目 (No. 2009A020101004) 资助。

Finally, we point out that the directed evolution strategy combined with surface display technology is the future trend on improving recombinant AChE activity.

Keywords: pesticide residues, recombinant acetylcholinesterase, enzyme inhibition system

农药残留的快速检测对于农业、环保、食品安全等方面都具有非常重要的意义。基于乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 的酶抑制法在农药残留快速检测中得到了广泛应用^[1]。AChE 是生物神经传导中的一种关键性酶, 它可催化乙酰胆碱的水解, 具有能被有机磷和氨基甲酸酯类农药抑制的特性, 因此将 AChE 与样品反应, 可根据 AChE 活性受抑制程度, 检测样品中有机磷和氨基甲酸酯类农药含量。当前, 从生物体中分离提取的乙酰胆碱酯酶存在含量低、纯化困难、种属间灵敏度差异大、稳定性差等不足。为克服其不足, 近年来, 不少学者利用基因工程技术开展了重组 AChE 的研究, 并取得了重要进展。重组 AChE 具有制备规模大、纯化方便的优势, 而且重组 AChE 还能在基因水平上进行修饰, 使其具有天然提取 AChE 所没有的性能特征, 预示出良好的应用前景。

1 生物体内 AChE 的基因来源及其基因结构与活性关系

1.1 AChE 的基因来源

不同生物的 AChE 识别有机磷农药的能力不相同, 灵敏度差异较大, 其编码 AChE 的基因序列也存在着不同程度的差异。目前, 科研工作者已经从鱼、果蝇、鸡、蛇、鼠、线虫等多种生物体内克隆了 AChE 的 cDNA。该基因家族广泛分布于脊椎动物和无脊椎动物当中, 均编码 1 个长

度约 500~700 个氨基酸的多肽链, 且表现了很高的同源性^[2-3]。另外, 学者也开始从植物中克隆 AChE 基因, 日本的 Kosuke 等从一种耐盐植物盐角草 *Salicornia europaea* 中克隆得到 AChE 基因, 该基因仅编码 387 个氨基酸, 并结合前期从玉米和色拉豆这两种植物克隆的 AChE 基因进行比较分析, 发现该类植物 AChE 基因与动物源的 AChE 有相似的生物功能^[4]。

1.2 AChE 的基因结构与活性关系

在 AChE 基因序列分析的基础上, 学者们对不同种属生物中 AChE 的功能进行了分析, 并取得了进展。研究发现由于其基因外显子和内含子在数目、结构上的差异, 使得 AChE 基因的功能在不同生物中存在着差异^[5-6]。从已克隆的 AChE 基因来看, 大部分生物的 AChE 均由单个 AChE 基因编码, 但也发现家蚕等生物中存在 2 种不同 AChE 基因。甚至在线虫 *Caenorhabditis elegans* 基因组中发现了 4 种不同的 AChE 基因。这同一生物所携带的不同 AChE 对抑制剂的敏感性不同, 对底物的催化性质也存在着差别。另外, 研究发现 AChE 的催化亚基是由单个基因编码的, 其羧基末端肽的基因序列表现出多样性, 而且不同亚基 AChE 基因序列与 AChE 在细胞内转运、降解、聚合和锚定等功能存在相关关系^[7]。随着 AChE 基因结构和活性关系逐渐明了, 相关研究的成果为重组 AChE 的体外表达以及蛋白质工程改造提供了有力依据。

2 AChE 的体外异源表达

2.1 昆虫杆状病毒表达系统和毕赤酵母表达系统

随着自然界越来越多生物的 AChE 基因被克隆, 多种的表达系统被应用于重组 AChE 制备以及性能鉴定。在重组 AChE 外源表达过程中, AChE 基因供体和表达系统的匹配、表达密码子偏爱性、序列 GC 含量、糖基化、信号肽等因素都是影响表达水平的关键点, 目前使用较广泛的是昆虫杆状病毒表达系统和毕赤酵母表达系统。由于 AChE 的基因供体大多为昆虫, 在昆虫杆状病毒表达系统进行重组 AChE 表达, 能产生正确的糖基化修饰, 保证重组 AChE 的稳定性, 大多科研工作者选用昆虫杆状病毒表达系统制备重组 AChE (表 1)。毕赤酵母表达系统具有操作简便、高表达、高稳定、高分泌以及具有良好的翻译后加工修饰系统等特点, 脊椎动物和非脊椎动

物的重组 AChE 都能在该表达系统实现制备, 而且表达产物活性较其他表达系统高, 近年已经得到广泛应用 (表 1)。

2.2 其他表达系统

大肠杆菌^[14]、哺乳动物细胞^[15]和转基因植物^[16]等表达系统也应用于重组 AChE 的制备 (表 1), 但报道较少。由于重组 AChE 基因供体主要来源于真核生物, 密码子偏爱性和大肠杆菌有较大的差异。而且缺少糖基化修饰过程, 与酵母表达系统相比, 大肠杆菌表达的重组 AChE 具有稳定性差、性能低于天然 AChE 等缺点, 因此大肠杆菌原核表达系统难以广泛应用于重组 AChE 的表达。对于真核表达系统而言, 哺乳动物细胞表达系统也可用于表达重组 AChE, 常用的宿主细胞有中国仓鼠卵巢细胞、非洲绿猴肾细胞、人类胚胎肾细胞等, 但是利用细胞培养的方式表达重组 AChE 成本较高, 难以满足大规模的

表 1 不同种属的 AChE 基因在不同表达系统中的应用

Table 1 Expression systems applied in the preparation of recombinant AChE from different species

Expression system	Surce of gene	Expression level	Specific activity	Pesticide for test
Baculovirus expression system	<i>African malaria mosquit</i> ^[8]	1.54 µg/mL	523 U/mg (purified)	Carbaryl Paraoxon Malathion Dichorvos
	<i>House fly</i> ^[9]	0.42 mg/100mL	118.9 U/mg (purified)	Carbofuran Methomyl Carbarly Malathion Paraoxon
	<i>Schizaphis graminum</i> ^[10]	4.0 mg/L	245 U/mg (purified)	
<i>Pichia pastoris</i> expression system	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> ^[11]	2 g/L	3 300 U/mg (purified)	Chlorpyrifos
	<i>Drosophila</i> ^[12]	Not indicated	180 U/mg (total)	Dichorvos
	Human origin ^[13]	76% secreted protein	200 U/mg (total)	Not indicated
<i>Escherichia. coli</i> Hematopoietic embryonic kidney Tabacco	Rat ^[14]	5% endosome protein	250 U/mg (purified)	Malathion
	Bovine ^[15]	15 mg/L	Not indicated	
	Human ^[16]	>0.4% soluble protein	3 841U/mg (purified)	Paraoxon

实际应用,因此已有研究人员通过转基因植物技术可从植物的组织中成功地获得较纯的重组 AChE^[16],其活性和生物提取的 AChE 没有差异,但目前这项技术还不成熟,表达的重组 AChE 的稳定性差,有待进一步研究。

3 重组 AChE 酶的分子进化及其在农药残留检测中的应用

近年来,随着分子生物学及计算机模拟等新技术、新方法的出现,酶与其抑制剂相互作用机制研究正在不断深入。1993 年 Sussman 等首先通过 X-ray 晶体衍射技术获取电鳗 AChE 的三维晶体结构信息^[17],随后,许多学者通过对 AChE 与抑制剂复合物的晶体结构分析,已经初步揭示了 AChE 的催化能力和底物选择性的分子机制。利用分子动力学等模拟手段, AChE 在结合抑制剂的过程中存在诱导效应以及催化位点和活性口袋的柔性特性也得到证实。对于有机磷类农药和 AChE 之间的结构活性关系,已有科研人员基于 3D-QSAR 方法进行系统分析^[18]。利用分子对接手段,对于单一农药和 AChE 的识别机制也已有较多论述,而且,两种农药对映异构体对 AChE 的抑制能力差异机制也得到很好的阐明^[19]。随着重组 AChE 酶的蛋白质工程改造技术日益强大,科研人员在 AChE 结构和功能相互关系的研究成果的基础上,获取了一系列灵敏度更高、识别性能更加广泛、性能稳定的优异重组酶制剂。

3.1 蛋白质工程改造提高酶对农药的灵敏度

野生型重组酶对农药的识别能力大多和天然生物提取酶相似,都存在一定程度的局限性,对某些农药抑制剂的灵敏度过低导致酶抑制检

测系统出现漏检情况,从而降低检测结果的可信度。目前,学者们在野生型重组酶的基础上,设计了各种 AChE 的突变体,并从中筛选到与农药抑制剂灵敏度较高的突变体。Boublik 等分析了果蝇 AChE 的三维结构当中 AChE 活性催化位点的临近相关氨基残基分布情况(图 1),根据分子模拟的结果设计几十种单突变和多突变 AChE 的突变体,发现双突变体(DmE69Y-DmY71D)对敌敌畏的灵敏度比野生型的提高了 300 倍,检测限可低至 10^{-17} mol/L^[20]。Tan 等利用分子模拟的技术手段,预测若干突变位点对家蝇重组 AChE 活性的影响。利用反向 PCR 法对家蝇 AChE 基因进行定点突变,经毕赤酵母表达筛选得到 3 个突变体,与野生型 AChE 相比,突变体 AChE 对灭多虫的灵敏度提高了 16 倍,对卡巴呋喃和毒死蜱的灵敏度提高了 14 倍以及对对硫磷的灵敏度提高了 10 倍^[21]。由此可见,在分子模拟的辅助下,经过蛋白质工程改造,重组改造酶对检测目标农药的灵敏度可提高至痕量检测水平,有力地促进酶抑制检测法的应用推广。

3.2 蛋白质工程改造提高酶对农药的广谱识别能力

由于每种有机磷和氨基甲酸酯农药对生物体 AChE 的抑制常数是不同的,使用一种 AChE 进行抑制分析通常难以覆盖所有常用的杀虫剂。若解决此问题,除了采用多种识别范围不同的酶进行组合应用外,还可以通过定点突变手段拓宽单一 AChE 对农药的广谱识别能力。Pleiss 等根据鼠 AChE 的结构模拟结果,用亮氨酸替换了鼠 AChE 酰基口袋 295 的苯基丙氨酸,结果显示突变体 RbF295L 对用于测试的 5 种有机磷和 5 种

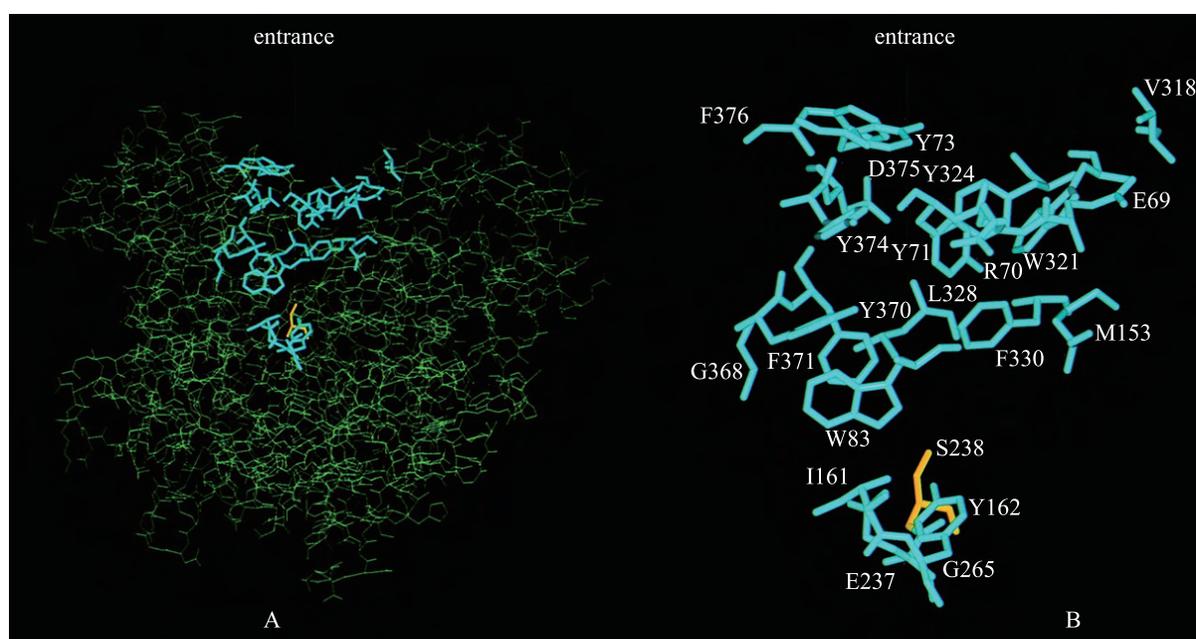


图1 果蝇 AChE 三维结构图^[20]

Fig.1 3-D structure of *Drosophila melanogaster* AChE^[20]. (A) General view of the AChE monomer structure. (B) Detail of the different amino acids lining the AChE active site.

氨基甲酸酯等常用农药的检测灵敏度均有提高^[22]。Schulze 等对巴西线虫 AChE 基因进行了定点突变, 基于重组 AChE 突变体构建的酶抑制检测法, 可以实现 14 种农药的多残留检测, 检测限低至 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 满足欧盟对婴儿食品的最大残留要求^[23]。由此可见, 通过改造可以提高乙酰胆碱酯酶的广谱识别能力, 更好地实现农药多残留检测。

3.3 蛋白质工程改造提高酶对农药的定量检测能力

一般来说, 酶抑制检测系统检测的结果只能给出 AChE 抑制的总量, 而没有任何有关分析组分的定性或定量信息, 这限制了酶抑制检测系统在精确定量领域的应用。近年来, 已有学者利用改造后的重组 AChE 突变体, 实现了对农药抑制

剂的选择性。Bucur 等制备了对氧化乐果敏感的果蝇重组 AChE 突变体, 与对氧化乐果有抗性的电鳗 AChE 进行配对, 构建特异双组分酶传感器实现特异定量检测氧化乐果^[24]。Bachmann 等组合了多种对不同农药特异识别的突变体, 在人工神经网络数据辅助下可实现多种农药同时定量检测^[25]。Istamboulie 等同样基于神经网络数据辅助, 利用重组果蝇 AChE 突变体和电鳗 AChE 进行组合, 实现毒死蜱和毒虫畏两种农药的区别定量检测^[26]。在获取一系列性能特异的重组突变酶基础上, 通过合理设计, 将可能构建用于组分定性或定量的酶抑制检测系统。

3.4 蛋白质工程改造提高酶的稳定性

大多数研究是通过改善表达系统和纯化手段等外部条件来提高重组 AChE 的稳定性, 效果

甚微, 现已有研究者通过定点突变技术来提高重组酶的稳定性。Isabelle 等发现果蝇重组酶突变体 C290V 对重组酶的稳定性有贡献, 通过定点突变敲除该位点的半胱氨酸, 防止该位点的自由硫醇质子化作用影响其他正确配对的二硫键的形成, 并提高了侧链的疏水性^[27], 从而提高了重组酶的稳定性。Strub 等考察了 AChE 表面的 14 个疏水性氨基酸突变成为精氨酸对重组 AChE 稳定性的影响, 发现半数突变体都表现出稳定性的提高^[28]。Siadat 等尝试通过突变 7 个位点的残基为半胱氨酸, 为重组 AChE 增加二硫键, 结果发现其中一个二硫键将 N 端区域和 C 端区域连接起来, 从而显著提高了重组酶对温度、尿素、有机溶剂和蛋白酶等不利因素的稳定性^[29]。这些稳定性高的改造重组酶, 不仅可以降低表达系统的优化成本, 而且高稳定性重组酶在多次复活使用过程中依然保持活性, 可更进一步降低酶抑制检测产品的制造成本。

4 重组 AChE 的纯化及细胞表面展示技术

重组 AChE 另一大优势还包括了为重组 AChE 加上纯化标签和固定元件等特性。Estrada-mondaca 等通过 PCR 技术在野生型重组酶尾部接上多聚组氨酸标签, 利用金属螯合亲和色谱柱进行亲和色谱纯化^[30]。而且, 重组 AChE 多聚组氨酸末端标签还被应用为酶抑制检测系统的固定元件, 相比于传统的化学交联或者物理吸附酶固定法, 组氨酸标签固定法可以保持酶在固定过程中构象和活性不受影响。近来, Uccelletti 等报道一种新颖的重组酶展示方式, 将鼠 AChE 与糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白融合表

达, 实现重组 AChE 在两种酵母表面固定, 从而通过固定细胞将 AChE 直接固定于传感器上^[31]。本课题组采用该策略, 将从家蚕中克隆得到 AChE 基因通过锚定蛋白将其展示在酵母表面, 活性鉴定显示该酵母展示 AChE 能识别 10 多种有机磷及氨基甲酸酯类农药 (结果尚未发表)。下一阶段研究的重点将构建 AChE 酵母表面展示突变文库, 并采用定向进化的策略从中筛选性能更优异的重组 AChE。

5 存在问题与展望

AChE 的基因供体虽然来源广泛, 但是高灵敏度生物 AChE 基因的筛选工作进展缓慢。目前许多从海洋鱼类及植物中提取的 AChE 在酶抑制法检测中已经显示出较高的灵敏度, 但是大多 AChE 基因克隆工作集中于昆虫, 海洋鱼类及植物的 AChE 基因克隆报道不多。

虽然, 目前昆虫杆状病毒与酵母表达系统广泛应用于重组 AChE 的制备, 但绝大多数研究依然使用摇瓶培养, 大规模培养体系如生物反应器的应用报道极少。此外, 有报道指出应用新型的表达系统如转基因动植物等制备重组 AChE, 但是重组 AChE 的产量和稳定性都有待提高。

基于 AChE 的结构和活性机制研究, 在分子模拟辅助下进行重组酶定点突变改造, 已经取得了一系列可喜的进展, 但有一些氨基酸的变化是在蛋白质模型预测的区域之外的, 此时便无法有效使用定点突变策略了。近年来学者已将注意力转移至定向进化酶改造技术。酶定向进化策略与表面展示技术结合, 可实现 AChE 突变体表型和基因型的统一, 为酶库体外筛选提供了便利条件, 是重组 AChE 活性改造的未来趋势。

REFERENCES

- [1] Amine A, Mohammadi H, Bourais I, et al. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(8): 1405–1423.
- [2] Mionetto N, Morel N, Massoulié J, et al. Biochemical determination of insecticides via cholinesterases. 1. Acetylcholinesterase from rat brain: functional expression using a baculovirus system, and biochemical characterization. *Biotechnol Tech*, 1997, 11(11): 805–812.
- [3] Sato R, Matsumoto T, Hidaka N, et al. Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expres Purif*, 2009, 64(2): 205–212.
- [4] Yamamoto K, Momonoki Y S, et al. Molecular cloning of *acetylcholinesterase* gene from *Salicornia europaea* L. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(5): 361–366.
- [5] Li B, Wang YH, Wang JM, et al. Cloning and expression analysis of acetylcholinesterase gene (*Bm-ace1*, *Bm-ace2*) from domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Adv Mat Res*, 2011, 175-176: 13–18.
- [6] Combes D, Fedon Y, Grauso M, et al. Four genes encode acetylcholinesterases in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. cDNA sequences, genomic structures, mutations and *in vivo* expression. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 727–742.
- [7] Massoulié J, Bon S, Perrier N, et al. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact*, 2005, 157-158: 3–14.
- [8] Jiang HB, Liu SW, Zhao PC, et al. Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-I from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, 39(9): 646–653.
- [9] Lang GJ, Shang JY, Chen YX, et al. Expression of the housefly acetylcholinesterase in a bioreactor and its potential application in the detection of pesticide residues. *World J Microb Biot*, 2010, 26(10): 1795–1801.
- [10] Zhao PC, Zhu KY, Jiang HB. Heterologous expression, purification, and biochemical characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) acetylcholinesterase encoded by a paralogous gene (*ace-1*). *J Biochem Mol Toxicol*, 2010, 24(1): 51–59.
- [11] Richter S, Nieveler J, Schulze H, et al. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(5): 1017–1022.
- [12] Xu SC, Wu AB, Chen HD, et al. Production of a novel recombinant *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticide residues. *Biomol Eng*, 2007, 24(2): 253–261.
- [13] Ma XY, Tan JH, Wei DZ, et al. High-level secretion and purification of recombinant acetylcholinesterase from human cerebral tissue in *P. pastoris* and identification by chromogenic reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(2): 316–322.
- [14] Heim J, Schmidt-Dannert C, Atomi H, et al. Functional expression of a mammalian acetylcholinesterase in *Pichia pastoris*: comparison to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from *Escherichia coli*. *BBA-Gene Struct Expr*, 1998, 1396(3): 306–319.
- [15] Mendelson I, Kronman C, Ariel N, et al. Bovine acetylcholinesterase: cloning, expression and characterization. *Biochem J*, 1998, 334(Pt 1): 251–259.
- [16] Geyer BC, Muralidharan M, Cherni I, et al. Purification of transgenic plant-derived recombinant human acetylcholinesterase-R. *Chem-Biol Interact*, 2005, 157-158: 331–334.
- [17] Sussman J, Harel M, Silman I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem*

- Biol Interact, 1993, 87(1/3): 187–197.
- [18] Yazal JE, Rao SN, Mehl A, et al. Prediction of organophosphorus acetylcholinesterase inhibition using three-dimensional quantitative structure activity relationship (3D-QSAR) methods. *Toxicol Sci*, 2001, 63(2): 223–232.
- [19] Wang C, Zhang N, Li L, et al. Enantioselective interaction with acetylcholinesterase of an organophosphate insecticide fenamiphos. *Chirality*, 2010, 22(6): 612–617.
- [20] Boublik Y, Saint-Aguet P, Lougarre A, et al. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng Des Sel*, 2002, 15(1): 43–50.
- [21] Tan FR, Wang LG, Wang JB, et al. Enhanced pesticide sensitivity of novel housefly acetylcholinesterases: a new tool for the detection of residual pesticide contamination. *Bioproc Biosyst Eng*, 2011, 34(3): 305–314.
- [22] Pleiss J, Mionetto N, Schmid RD. Probing the acyl binding site of acetylcholinesterase by protein engineering. *J Mol Catal B-Enzym*, 1999, 6(3): 287–296.
- [23] Schulze H, Muench SB, Villatte F, et al. Insecticide detection through protein engineering of *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase B. *Anal Chem*, 2005, 77(18): 5823–5830.
- [24] Bucur B, Dondoi M, Danet A, et al. Insecticide identification using a flow injection analysis system with biosensors based on various cholinesterases. *Anal Chim Acta*, 2005, 539(1/2): 195–201.
- [25] Bachmann TT, Leca B, Vilatte F, et al. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosens Bioelectron*, 2000, 15(3/4): 193–201.
- [26] Istamboulie G, Cortina-Puig M, Marty JL, et al. The use of Artificial Neural Networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorfenvinfos. *Talanta*, 2009, 79(2): 507–511.
- [27] Isabelle Fremaux SM, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, et al. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem*, 2002, 3(1): 21–25.
- [28] Strub C, Alies C, Lougarre A, et al. Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability. *BMC Biochem*, 2004, 5(1): 9–14.
- [29] Siadat OR, Lougarre A, Lamouroux L, et al. The effect of engineered disulfide bonds on the stability of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *BMC Biochem*, 2006, 7(1): 12–18.
- [30] Estrada-Mondaca S, Fournier D. Stabilization of recombinant *Drosophila* acetylcholinesterase. *Protein Expres Purif*, 1998, 12(2): 166–172.
- [31] Uccelletti D, De Jaco A, Farina F, et al. Cell surface expression of a GPI-anchored form of mouse acetylcholinesterase in *Klpmr1Δ* cells of *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Bioph Res Commun*, 2002, 298(4): 559–565.