小菜蛾中肠氨肽酶 N3 基因片断克隆技巧及其表达量*

常晓丽** 吴青君 王少丽 徐宝云 张友军***

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要 本研究通过设计简并引物,并且进行温度梯度 PCR 和二次 PCR,最终筛选出适合扩增小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)中肠 APN3(氨肽酶 N3,Aminopeptidase N3)片段的引物和温度,这为研究 APN3 的基因功能、APN3 同 APN 其他同工酶之间的亲缘关系奠定了基础。通过比较电泳图谱,发现 APN3 在小菜蛾中肠中的表达量远远低于 APN1、APN2 和 APN5 的表达量。小菜蛾中肠 APN 同工酶氨基酸序列分析发现,APN3 同 APN1 的亲缘关系最近,同 APN2 的亲缘关系最远。以上结果对于揭示 Bt 毒素作用于小菜蛾的机理以及小菜蛾对 Bt 毒素的抗性分子机制具有重要理论意义。

关键词 小菜蛾,APN3,克隆技巧,表达量,亲缘关系

Clone technique and expression level of partial APN3 cDNA originated from *Plutella xylostella* midgut

CHANG Xiao-Li** WU Qing-Jun WANG Shao-Li XU Bao-Yun ZHANG You-Jun***

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract The APN3 gene from the midgut of *Plutella xylostella*(L.) was amplified using temperature gradient PCR with degenerate primers. Two weak bands were apparent after electrophoresis of the first PCR products. Therefore, a second PCR was performed with the first PCR product as the template and original primer. The optimal primer was finally selected, which can be used to amplify partial APN3 cDNA at an annealing temperature of 48℃. These results provide techniques to study the gene function of APN3 and phylogenesis among APN isoforms. After comparing electrophoresis bands we speculate that the expression of APN3 is far lower than that of APN1, APN2 and APN5. We conclude that APN3 is most closely related to APN1 and most distantly related to APN2. These results are important to understanding how Bt toxins are toxic to *P. xylostella* and the molecular resistance mechanism of *P. xylostella* to these toxins.

Key words *Plutella xylostella*, APN3, clone technique, expression level, phylogenesis

小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)作为十字花科蔬菜的重要害虫,对多种化学杀虫剂产生了高度抗药性,近年来对环境友好型微生物杀虫剂—Bt 毒素也产生了抗药性。要持续利用 Bt 杀虫剂高效低毒的特性,研究小菜蛾的 Bt 毒素靶标受体意义重大。

APN3(氨肽酶 N3,Aminopeptidase N3)作为 Bt 毒素靶标受体研究对象之一,是已知鳞翅目昆虫 APNs 中研究最多的类群。将棉铃虫 APN3 基因在粉纹夜蛾细胞中表达(Rajagopal *et al.*, 2003),表达的蛋白 120 ku、糖基化,具有酶催化活性,配体印迹表明 APN3 同 Cry1Ac 结合但是同 Cry1Ab 或 Cry1Aa 不结合。舞毒蛾的 APN3 基因已经被克隆(Garner *et al.*, 1999),并且在 Sf9 细胞中进行了表达,表达的蛋白被 APN3 特异性的抗体识别,然而,配体印迹分析表明表达的蛋白同 Cry1Ac 结合

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803001)、国家自然科学基金(30871659 和 30900957)、中国博士后科学基金(20080440460 和 200902155)。

** E-mail: xlchang981@126.com

*** 通讯作者, E-mail: zhangyj@mail.caas.net.cn

收稿日期:2010-06-27,接受日期:2011-02-18

力很弱。浅棕苹果蛾 APN3 已经以原有的蛋白形式和异质表达的形式被研究(Simpson and Newcomb, 2000),通过配体印迹分析表明,Cry1Ac 和 Cry1Ba 能够同两种形式的 APN3 蛋白结合,但是竞争结合分析表明,两种毒素都不能特异性地同 Sf9 细胞中表达的 APN 结合。Nakanishi 等(2002)通过配体印迹分析证实了在大肠杆菌中表达的家蚕和小菜蛾的 APN3 能够同 Cry1Aa 和 Cry1Ab 结合。配体印迹分析表明 Cry1Ac 同从烟蚜夜蛾纯化的 APN3 的结合被竞争性的 GalNAc 所抑制(Gill *et al.*, 1995)。

到目前为止,关于小菜蛾 APN3 的研究仅有 Nakanishi 等(1999, 2002)的报道,本文作者试图根据 GenBank 中登陆序列扩增 APN3 基因片段,但是扩增产物始终没有电泳条带,因此,作者设计了简并引物,并且采用其他 PCR 技巧最终使得 APN3 部分片段成功扩增并克隆,在此基础上分析了 APN3 在小菜蛾中肠的表达水平以及 APN3 同小菜蛾其他 APN 同工酶之间的关系。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

Cry1Ac 敏感和抗性品系小菜蛾(Zhao *et al.*, 2003)由美国康奈尔大学赵建周教授 2005 年提供,目前已在本实验室连续饲养 5 年。敏感品系不接触任何杀虫剂,抗性品系使用 Cry1Ac 连续筛选。小菜蛾幼虫取食甘蓝幼苗,饲养温度为 26℃,光周期比 L: D = 12: 12。本实验中使用的抗性小菜蛾对 Cry1Ac 的抗性倍数达 320 倍。

1.2　引物设计与合成

根据 GenBank 中已登陆的 APN3 蛋白序列设计引物,所用软件为 Primer Premier 5.0。以小菜蛾 APN3 氨基酸序列登陆号进行蛋白 Blast,选取同源性较高的包括小菜蛾在内共计 13 种昆虫,使用 DNAMAN 对它们的氨基酸序列同源性进行比对,确定氨基酸保守序列,设计简并引物。参照序列的登陆号依次为:印度谷螟 AAC36147、烟芽夜蛾 AAC46929、舞毒蛾 AAD31183、小菜蛾 AAF01259、澳洲棉铃虫 AAF37560、苹浅褐卷蛾 AAF99701、烟草天蛾 AAM13691、棉铃虫 AAP37952、甜菜夜蛾 AAP44966、粉纹夜蛾 AAX39865、欧洲玉米螟 ABL01483、亚洲玉米螟 ABQ51393、家蚕 NP_001104835。共设计 7 对简并引物,仅下面的 2 对简并引物扩增产物电泳有条带:

P3　APN3S1:　5′GCNTTYCCNTGYTAYGAYGA3′
　　APN3A1:　5′RTCRTTNACDATYTGNGC3′
P6　APN3S2:　5′GNGCNGGNGCNATGGARAA3′
　　APN3A2:　5′RTCRTTNACDATYTGNGC3′

1.3　小菜蛾中肠总 RNA 的提取与反转录

使用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA,cDNA 第一链的合成按照 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒(Invitrogen)说明进行。

1.4　APNs 的 PCR 扩增

使用 BIO-RAD S1000 PCR 仪对敏感品系小菜蛾 APN3 基因进行温度梯度 PCR(40 ~ 50℃),筛选出能够扩出最长片段的最佳温度和引物。之后对敏感、抗 Cry1Ac 品系小菜蛾同时进行 PCR 扩增,PCR 反应体系各成分的含量和反应参数见表 1。取 5 μL PCR 产物电泳(1% 琼脂糖凝胶,180V 电压)检测。所用 DNA Marker 为天根生化科技有限公司生产。

表 1　PCR 反应体系和反应参数

Table 1　Reaction system and parameters of PCR

PCR 反应体系 PCR reaction system		PCR 反应参数 PCR reaction parameters		
10 × PCR Buffer	5 μL	Step 1	94 ℃	3min
dNTP(2.5mM)	4 μL	Step 2	94 ℃	1min
APNS(10mM)	1 μL	Step 3	T ℃*	1min
APNA(10mM)	1 μL	Step 4	72 ℃	3.5 min
cDNA	1 μL	Step 5	Go to step 2	32 cycles
TaKaRaEx Taq™HS	0.25 μL	Step 6	72 ℃	10 min
ddH_2O	37.75 μL	Step 7	12 ℃	10 h
总体积 Total volume	50.00 μL	Step 8		End

注:T 表示退火温度。

T denotes anneal temperature.

1.5　PCR 产物回收纯化、连接、转化

采用多功能 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型,北京百泰克生物技术有限公司)对 PCR 产物进行纯化,试验操作按说明书进行。将 PCR 纯化产物与 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司)连接,转化感受态细胞 TOP10(北京全式金生物技术有限公司),PCR 检测菌液。

1.6 序列测定

将鉴定好的阳性克隆斑的菌液送诺赛、英骏、三博三家生物公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 APN3 部分片段的扩增

通过做温度梯度 PCR(40 ~ 50℃),作者发现在退火温度为 42.3℃ 时引物 P6 能够扩出约 1 000 bp的产物,而引物 P3 在退火温度为 46.3℃ 时能够扩出 1 365 bp 的产物,但是琼脂糖凝胶电泳条带都很弱(图 1)。因此,作者对引物 P3 的扩增产物进行了二次 PCR 扩增,退火温度 48℃,经琼脂糖凝胶电泳分析,1 365 bp 的条带很清晰(图 1)。

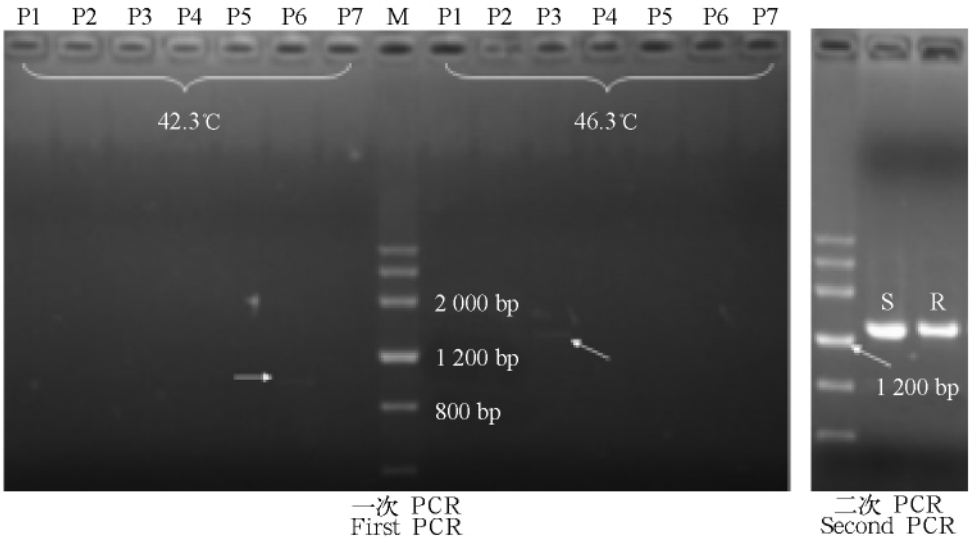

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析小菜蛾氨肽酶 N3 基因的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of APN3s gene from susceptible strain (S) and resistant strain (R) of *Plutella xylostella* larvae

P1 – P7 表示引物;S 表示敏感品系;R 表示抗性品系。DNA Marker 为 Marker III,从上到下依次为:4 500、3 000、2 000、1 200、800、500、200 bp。

P1-P7 represents primer 1 – 7. DNA Marker denotes 4 500, 3 000, 2 000, 1200, 800, 500 and 200 bp of bands from the top down.

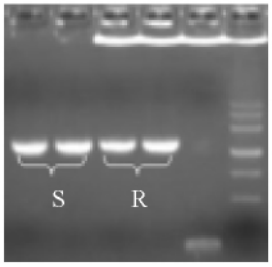

图 2 琼脂糖凝胶电泳分析小菜蛾氨肽酶 APN3 的 PCR 扩增菌液产物

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of culture medium containing recombitant plasmids (APN3 + T1)

S 表示敏感品系;R 表示抗性品系。DNA Marker 为 Marker III,从上到下依次为:4 500、3 000、2 000、1 200、800、500、200 bp。

APN3 are from susceptible strain (S) and resistant strain (R) of *Plutella xylostella* larvae. DNA Marker denotes 4 500, 3 000, 2 000, 1 200, 800, 500 and 200 bp of bands from the top down.

2.2 PCR 检测菌液中质粒构建情况

对单克隆菌液进行 PCR 扩增检测重组质粒构建情况,经琼脂糖凝胶电泳分析发现,目的基因 APN3 成功插入 pEASY – T1 载体中(图 2)。

2.3 测序结果与分析

测序结果表明 APN3 片段长 1 365 bp,翻译氨基酸 455 个,敏感、抗性小菜蛾 APN3 核酸相似度为 97.44%,蛋白相似度为 98.24%。APN3S 核酸序列同其它昆虫的核酸序列经 NCBI 比对总分值大于 500 分的包括浅棕苹果蛾(AF276241)、烟草天蛾(AY193789)和棉铃虫(AF535166)。APN3S 和 APN3R 的序列已在 GenBank 登陆(登陆号分别为 GU213042 和 GU213041)。锌指结构基元 HEXXHX18E(氨基酸残基 173 ~ 196)和 GAMEN(137 ~ 141)证实此受体为氨肽酶家族成员之一(图 3)。

```
1     GCTTTTCCTTGTTATGACGAGCCCAGTTTCAAAGCTACCTTTGACATAACCCTGAGGCGGCCAAAAGCGTATAGGAGCTGGTCTAACACGAAACTTAAGAGCTCTGATGCAACTGTGAAT
1      A  F  P  C  Y  D  E  P  S  F  K  A  T  F  D  I  T  L  R  R  P  K  A  Y  R  S  W  S  N  T  K  L  K  S  S  D  A  T  V  N

121   ATAGAGAATTACATGGACGACGTGTTTTATACAACTCCAGTAATGTCTACATACTTAATAGCAATTATTGTTGCTGAGTACAAGTCTCTTGAAGATAATGCTATCCCTCAACAGTTAAAA
41     I  E  N  Y  M  D  D  V  F  Y  T  T  P  V  M  S  T  Y  L  I  A  I  I  V  A  E  Y  K  S  L  E  D  N  A  I  P  Q  Q  L  K

241   TACGAAGTGATTGCTAGACCTGATGCTATCGACAATGGCCAAGGACAATATGCTTATGACGTTGGACAGAAACTCCTTGCAGAAATGAGCGACCACACGGGTCTTGATTTCTATGAAGTT
81     Y  E  V  I  A  R  P  D  A  I  D  N  G  Q  G  Q  Y  A  Y  D  V  G  Q  K  L  L  A  E  M  S  D  H  T  G  L  D  F  Y  E  V

361   GATGCTAACCTTAAAATGACTCAAGCTGCTATTCCTGATTTTTCTGCCGGTGCTATGGAAAACTGGGGACTGTTGACCTACAGAGAAGCGTACTTGATGTACGACGAGAAACAAACTAAT
121    D  A  N  L  K  M  T  Q  A  A  I  P  D  F  S  A  G  A  M  E  N  W  G  L  L  T  Y  R  E  A  Y  L  M  Y  D  E  K  Q  T  N

481   TACAACTCGAAACAACTTATAGCGTACATATTGTCCCATGAGATCGCGCACATGTGGTTCGGAAACCTGGTCACCTGCGACTGGTGGGACGTCTTGTGGCTCAACGAGGGCTTCGCCAGA
161    Y  N  S  K  Q  L  I  A  Y  I  L  S  H  E  I  A  H  M  W  F  G  N  L  V  T  C  D  W  W  D  V  L  W  L  N  E  G  F  A  R

601   TACTACCAGTATTTCCTCACGAACGCGGTCGAAACCGAAATGGGATTCGAAACCCGTTTCATCACCGAGCAAGTCCACACCGCGTTGTTGGCCGACGCTGCCAACAACCCGCACCCGCTC
201    Y  Y  Q  Y  F  L  T  N  A  V  E  T  E  M  G  F  E  T  R  F  I  T  E  Q  V  H  T  A  L  L  A  D  A  A  N  N  P  H  P  L

721   ACCAACCCCGGCGTCGGCAGCCCCGCGCAGGTCAGCGGCATGTTCTCCACACTCAGCTACAACAAGGGAGCCTCCCTCATCAGGATGACGGAGCACCTGCTCGGCTACAACGTTCATAGA
241    T  N  P  G  V  G  S  P  A  Q  V  S  G  M  F  S  T  L  S  Y  N  K  G  A  S  L  I  R  M  T  E  H  L  L  G  Y  N  V  H  R

841   GAAGGCTTGCGGAAATACATTTCGGACTTCAAATTCAAAACTGCACTGCCAATCAATCTGTTTGAATCTTTGGAGGCGGCGGCCAAGGAGGCCGGTGCGCTGGCTGAGTATGGACCCAAC
281    E  G  L  R  K  Y  I  S  D  F  K  F  K  T  A  L  P  I  N  L  F  E  S  L  E  A  A  A  K  E  A  G  A  L  A  E  Y  G  P  N

961   TTCTCCCTGGTTGAGTATTACAAGAGCTGGACAGAGCAGGGAAGTGCGCCGGTCCTGTTCGTTGAAGTGAACCACCAAACTGGGGACATGACTGTCACTCAGCAACGTTTCAACATCAAC
321    F  S  L  V  E  Y  Y  K  S  W  T  E  Q  G  S  A  P  V  L  F  V  E  V  N  H  Q  T  G  D  M  T  V  T  Q  Q  R  F  N  I  N

1081  ACTGGCATGTCTACCTCCAACTCGCTGTGGATCGTGCCGGTGTCGTTCGCCACCGCGAGCAAGCCCGACTTCACTAACACCAAGCCCACGCACATCCTGTCTGCAACCGCCAACGTCATC
361    T  G  M  S  T  S  N  S  L  W  I  V  P  V  S  F  A  T  A  S  K  P  D  F  T  N  T  K  P  T  H  I  L  S  A  T  A  N  V  I

1201  CCCCGCGGTTCTCAGGGCGACGAATGGGTCATCTTCAACATCCAACAAACTGGTTACTACCGAGTCAACTACGATTCCTACACATGGGACTTGATCATCAGAGCGTTGAGAGGCGAAGAC
401    P  R  G  S  Q  G  D  E  W  V  I  F  N  I  Q  Q  T  G  Y  Y  R  V  N  Y  D  S  Y  T  W  D  L  I  I  R  A  L  R  G  E  D

1321  AGGATCAAAATTCATCCTTACAACAGAGCGCAAATTGTCAACGAT
441    R  I  K  I  H  P  Y  N  R  A  Q  I  V  N  D
```

图 3　PxAPN3S cDNA 片段的核苷酸及其推导的氨基酸序列(GenBank 登录号 GU213042)

Fig. 3　Nucleotide and deduced amino acid sequences of partial PxAPN3S cDNA (GenBank accession number GU213042)

方框中字母 HEXXH 和 GAMEN 表示金属肽酶保守序列,特异性引物用虚下划线表示。

The metallopeptidase signal HEXXH and GAMEN sequences are boxed.

The specific primers is denoted with dotted dash underline.

2.4　APN3 在小菜蛾中肠中的表达量分析

在同样的 PCR 反应体系,同样的 cDNA 模板条件下,氨肽酶 N 同工酶 PCR 产物电泳条带存在显著差异。APN3 的电泳条带亮度显著地弱于 APN1、APN2、APN5 的条带亮度。如果以 APN3 一次 PCR 产物为模板进行二次 PCR,APN3 的电泳条带亮度才能与 APN1、APN2、APN5 的条带亮度相当,因此作者推测,APN3 在小菜蛾中肠中的含量要远远地低于其他 3 种氨肽酶同工酶的含量。

2.5　小菜蛾 APN 同工酶系统发育树构建

所用软件为 DNAMAN6.0。图 4 是小菜蛾 APN 同工酶的系统发育树,从图 4 中可以看出,目前小菜蛾的氨肽酶可分为 4 个类群,其中 APN1 同 APN3 的亲缘关系最近,其次是 APN5,APN2 离其他同工酶亲缘关系最远。

3　讨论

通过设计简并引物,成功克隆出小菜蛾中肠受体 APN3 基因部分片段,要研究基因的功能,还需要通过 RACE 技术进一步扩增出基因全长。Pigott 和 Ellar (2007)将小菜蛾(AAF01259)、浅棕苹果蛾(AAF99701)、家蚕(AAL83943)、烟草天蛾(AAM13691)、舞毒蛾(AAD31183)、烟芽夜蛾

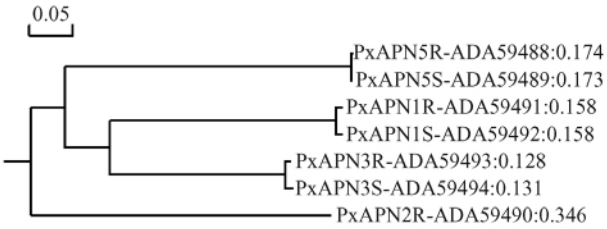

图 4 小菜蛾氨肽酶 N 同工酶系统发育树
(右边数字表示氨基酸序列权重系数)
Fig. 4 Phylogenetic tree describing the amino acid sequence similarity of PxAPNs
(Right numbers represent sequence weight)

(Q11000)、棉铃虫(AAN04900)、印度谷螟(AAC36147)、澳洲棉铃虫(AAF37560)、粉纹夜蛾(AAX39865)、甜菜夜蛾(AAP44966)的 APN3 全部归类于 Class 3,并且 APN3 同 APN1 亲缘关系最近。但是同 APN1 相比,APN3 具有较少的 O 糖基化位点。本文研究结果同以上归类和系统发育关系分析结果一致。关于 APN3 在各种昆虫中的基因功能还需大量的试验数据来验证,本研究为揭示昆虫 APN3 的基因功能奠定了基础。另外,APN3 在小菜蛾中肠中的含量要远远低于其他 3 种氨肽酶同工酶的含量,APN3 基因的克隆对于研究氨肽酶 N 同工酶在 Bt 毒素作用于小菜蛾及小菜蛾对 Bt 毒素的抗药性中的作用具有重要理论意义。

参考文献(References)

Garner KJ, Hiremath S, Lehtoma K, Valaitis AP, 1999. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 527—535.

Gill SS, Cowles EA, Francis V, 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, 270: 27277—27282.

Nakanishi K, Yaoi K, Nagino Y, Hara H, Kitami M, Atsumi S, Muira N, Sato R, 2002. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*—their classification and the factors that determine their binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *FEBS Lett.*, 519: 215—220.

Nakanishi K, Yaoi K, Shimada N, Kadotani T, Sato R, 1999. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. *Biochim. Biophys. Acta*, 1432: 57—63.

Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 71 (2): 255—281.

Rajagopal R, Agrawal N, Selvapandiyan A, Sivakumar S, Ahmad S, Bhatnagar RK, 2003. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochem. J.*, 370: 971—978.

Simpson RM, Newcomb RD, 2000. Binding of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins Cry1Ac and Cry1Ba to a 120 kDa aminopeptidase N of *Epiphyas postvittana* purified from both brush border membrane vesicles and baculovirus infected Sf9 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 1069—1078.

Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM, 2003. Plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnol.*, 21: 1493—1497.