

甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析*

王 玲 江幸福** 罗礼智 胡 毅 张 蕾

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要 昆虫中肠膜上的类钙粘蛋白(cadherin-like protein)是 Bt 毒素的一类重要受体,它与 Bt 毒素对昆虫的杀虫作用机制以及昆虫对 Bt 毒素的抗性密切相关。本研究根据已报道的其它昆虫的类钙粘蛋白基因的保守区设计简并引物,应用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了迁飞性重要害虫甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 类钙粘蛋白基因全长 cDNA 序列(命名为 *SeCAD*, GenBank 登录号为 HQ647122),全长 5 582 bp,编码 1 739 个氨基酸,推导的氨基酸序列包括 1 个信号肽、1 个前蛋白区、11 个钙粘蛋白重复、1 个近膜区、1 个跨膜区和 1 个胞质区。预测的分子量和等电点分别为 196.447 ku 和 4.47。该蛋白与同科的大螟 *Sesamia inferens*、蛀茎夜蛾 *S. nonagrioides*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 亲缘关系更近,氨基酸序列一致性分别为 61.28%、60.34%、60.14%、60.08%。这些结果对于揭示转 Bt 基因作物对非靶标、迁飞性甜菜夜蛾的杀虫作用机制以及评价其潜在的对 Bt 毒素抗性机制等奠定了基础。

关键词 甜菜夜蛾, 类钙粘蛋白, 基因克隆, 序列分析

Cloning and sequence analysis of the cadherin-like protein gene in beet armyworm, *Spodoptera exigua*

WANG Ling JIANG Xing-Fu** LUO Li-Zhi HU Yi ZHANG Lei

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The cadherin-like proteins, located in the brush border membrane vesicles (BBMV) of the insect midgut, are major receptors of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. The complete cDNA sequence of the cadherin-like protein gene in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) was amplified using RT-PCR and RACE techniques. The full cDNA sequence (named as *SeCAD*, GenBank accession no. HQ647122) is 5 582 bp in length, encoding 1 739 amino acid residues. The deduced amino acid sequence shows typical characteristics of the known insect cadherin proteins, including a signal peptide, a proprotein region, eleven cadherin repeats, a membrane-proximal region, a transmembrane region and a cytoplasmic region. The predicted molecular weight and isoelectric point are 196.447 ku and 4.47, respectively. The cadherin-like protein from *S. exigua* shows a close relationship to cadherin proteins from *Sesamia inferens*, *S. nonagrioides*, *Heliothis virescens* and *Helicoverpa assulta*, with amino acid identity of 61.28%, 60.34%, 60.14% and 60.08%, respectively. These results can provide a basis for revealing the insecticidal mechanism of Bt in *S. exigua*, and the resistance mechanism of *S. exigua* to Bt.

Key words *Spodoptera exigua*, cadherin-like protein, gene cloning, sequence analysis

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种有效的病原微生物,现已广泛应用于害虫防

治领域。新的 Bt 转基因抗虫植物仍在不断增多,并逐渐推广(王继磊等,2010)。Bt 毒素通过与相

* 资助项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX0811-018B)、国家自然科学基金(31000850;31071641;30871641)和农业行业科技专项(200803007)。

**通讯作者, E-mail: xfjiang@ippcaas.cn

收稿日期:2011-12-23, 接受日期:2012-05-02

关受体结合,引起细胞膜发生变化,进而发挥杀虫作用。昆虫体内现已基本明确的 Bt 毒素蛋白受体主要有类钙粘蛋白(cadherin-like protein)、氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, Alp) 及糖脂类(glycolipids)。目前有 2 种比较公认的 Cry 类毒素作用模式,即孔洞模式和信号转导模式。这 2 种模式都有着相似的起始步骤,即毒素在中肠溶解,被中肠蛋白酶激活并结合在类钙粘蛋白受体上。在孔洞模式中,开始诱导 α 螺旋的剪切并引起毒素寡聚化,然后毒素低聚体结合到第二受体上,如氨肽酶 N 或者碱性磷酸酶,并通过甘油磷酸肌醇锚定在膜上,最后毒素插入膜上形成孔洞从而杀死昆虫细胞。而在信号转导模式中,Cry 类毒素与类钙粘蛋白受体相互作用引起了细胞内由 G 蛋白介导的级联途径,随后激活腺苷酸环化酶,环腺苷酸的水平增加,进而激活了蛋白激酶 A 并导致细胞死亡(Bravo and Soberon, 2008)。可见,无论哪种模式,类钙粘蛋白都是毒素发挥作用必不可少的基础环节。目前,烟草天蛾 *Maduca sexta*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (王桂荣等, 2004)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (杨峰山等, 2005)、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (李卫华等, 2007)、粘虫 *Mythimna separata* (王玲等, 2011) 等多种鳞翅目昆虫的类钙粘蛋白基因 cDNA 全长已被克隆和测序,但在甜菜夜蛾中却未见报道。随着转 Bt 作物的增长及 Bt 使用量的增加,害虫持续受到 Bt 毒素的高压选择,害虫对 Bt 的抗性已不容忽视(李怡萍等, 2010)。而类钙粘蛋白基因的突变,是昆虫对 Bt 毒蛋白产生抗性的重要原因之一(韩岚岚等, 2009)。

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 是我国典型的迁飞性多食性农业害虫,但并不是目前所开发的转 Bt 基因玉米和棉花的主要靶标害虫。种植转基因抗虫作物的大田中由于杀虫剂施用量和施用次数的减少而导致靶标害虫以外的其它害虫种群数量的增加(Naranjo, 2010)。近年来随着转基因棉花的大面积商业化种植,甜菜夜蛾在转基因棉田的为害逐渐加重(李瑞奇, 2005; 苏宏华, 2010),甚至在许多地区造成大面积暴发为害(郑霞林等, 2010)。甜菜夜蛾对 Bt 逐渐产生抗性,现已成为转基因棉田为害十分严重的重要害虫之一(Tabashnik *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011)。然

而, Bt 毒素对甜菜夜蛾的作用机制尚不明确。类钙粘蛋白作为鳞翅目害虫最重要的 Bt 毒素受体之一,克隆分析甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因,为进一步研究 Bt 毒素对甜菜夜蛾的作用机制以及甜菜夜蛾对 Bt 毒素的反应机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

甜菜夜蛾为采自辽宁省葫芦岛市,经本实验室用人工饲料饲养 17 代的敏感种群。饲养条件为温度 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度 70% 左右,光周期 L:D = 14:10。其间没有接触任何药剂。以 5 龄幼虫为材料,在处理好生理盐水中解剖幼虫,取出中肠并除去饲料,迅速放入液氮中冷冻,然后置于 -70°C 保存备用。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司。反转录试剂盒购自天根生物科技有限公司。ExTaq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、3'RACE 和 5'RACE 试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司。胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自加拿大新产业科技公司。Trans-T1、pEASY-T3 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取 按试剂盒说明书,用 TRIzol 从甜菜夜蛾 5 龄幼虫中肠中提取总 RNA。取解剖的中肠适量,加入 1 mL TRIzol,用经 1% DEPC 处理并高温灭活 RNA 酶的小型研磨棒直接研磨。中肠组织悬浮液用氯仿抽提后加入等体积的异丙醇于 -20°C 沉淀总 RNA,75% 乙醇洗涤 2 次,溶于适量的 DEPC 处理的水中。酶标仪测 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值,并结合电泳对总 RNA 的含量和纯度进行精确测定。

1.3.2 第一链 cDNA 的合成 按 Quantscript 反转录试剂盒说明书进行。取 1 μg 总 RNA,10 $\times$ RT mix 2 μL , dNTP mixture (2.5 mmol/L each) 2 μL , Quant reverse transcriptase 1 μL , Oligo-dT15 或 Random (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , 补充 RNase-free ddH_2O 至 20 μL 。混匀,点动离心。 37°C 孵育 60 min。反转成功的 cDNA 样品 -20°C 保存备用。

1.3.3 引物设计与合成 用 DNAMAN 软件比较已报道的鳞翅目幼虫中肠类钙粘蛋白的氨基酸序

列,根据保守区结合密码子偏好特性用 Primer premier 5.0 设计了 2 对简并引物 (F_1 与 R_1 、 F_2 与 R_2) 分别用于 PCR 扩增。由于甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因较大,又根据测序结果设计了一对特异引物 (F_3 与 R_3) 扩增中间序列。

根据 PCR 产物测序结果,设计了 2 条特异性引物 (R_{out} , R_{in}) 结合 5'RACE 试剂盒中的 5'Outer 与 5'Inner 引物用于 5'RACE 反应,设计了 2 条特

异性引物 (F_{out} , F_{in}) 结合 3'RACE 试剂盒中的 3'Outer 与 3'Inner 引物用于 3'RACE 反应。将所有序列用 DNAMAN 软件拼接。最后,设计了一对特异性引物 (BAWF, BAWR) 用于扩增甜菜夜蛾中肠类钙粘蛋白基因的全长阅读框。以上引物合成及测序均在北京奥科鼎盛生物科技有限公司。引物序列见表 1,相对位置见图 1。

表 1 RT-PCR 和 RACE 反应引物

Table 1 Oligonucleotide primers designed for RT-PCR and RACE reaction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	位 置 Position
F_1	GACTGGCATCTBGTYATTACRC	397 - 418
R_1	CARTGTCATCGCAGYTTCTC	1 258 - 1 278
F_2	GHTATTGGGGCACTTATGMW	3 299 - 3 318
R_2	AACTGCGGCADGTCTTCDAT	5 059 - 5 078
F_3	GGTGACAATGACGAAGAAGGT	1 135 - 1 155
R_3	TGGGAAGACAACTCTGGTG	3 407 - 3 426
5'Outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	—
5'Inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	—
R_{out}	CCTGACTGTGAACGACATCTCT	921 - 942
R_{in}	GGCTCTAACATCTCAATGACAGG	535 - 557
3'Outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	—
3'Inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	—
F_{out}	CTGTTCTACAACCTCGGAGGCTG	4 450 - 4 471
F_{in}	CTTCATCAGGAACCGAACACTA	4 842 - 4 863
BAWF	ATGGCGGTCGACGTGCGAATACTG	1 - 24
BAWR	TTATCTTCTAAACTGGGAGTTTCGCG	5 196 - 5 220

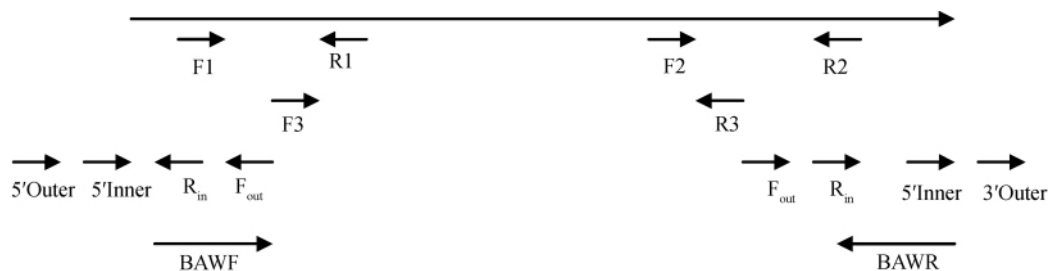


图 1 RT-PCR 和 RACE 反应中引物的相对位置

Fig. 1 The relative position of the primer in RT-PCR and RACE

1.3.4 PCR 及 RACE 反应 (1) PCR 反应: 50 μ L 体系中,以合成的 cDNA 为模板,加入 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer (Mg^{2+} Plus) 5 μ L,上下游引物 4 μ L (10 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$), dNTP mixture (2.5 mmol/L each) 4

μ L, *Ex Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,补水至 50 μ L,混匀,点动离心。放入 PCR 仪扩增,反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;接着 30 个循环,循环条件为 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 50 ~ 56 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 ~ 5 min 20 s;

72℃ 保温 10 min。

(2) RACE 反应: 3'RACE 和 5'RACE 试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司, 按照试剂盒说明进行。3'RACE 和 5'RACE 均用特异性引物与试剂盒中的引物配对进行嵌套式 PCR 扩增(3'RACE 第 1 次扩增引物为 F_{out} 和 3'RACE Outer Primer, 第 2 次扩增引物为 F_{in} 和 3'RACE Inner Primer; 5'RACE 第 1 次扩增引物为 R_{out} 和 5'RACE Outer Primer, 第 2 次扩增引物为 R_{in} 和 5'RACE Inner Primer)。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 接着 20~30 个循环, 循环条件为 94℃, 30 s, 55~56℃, 30 s, 72℃, 60~90 s; 72℃ 保温 10 min。扩增完毕后, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查, 1.5% 琼脂糖凝胶回收目的片断。

1.4 PCR 的克隆与测序

PCR 和 RACE 反应产物经 1.5% 的凝胶电泳分离, 切下目的片断, 用胶回收试剂盒回收纯化。纯化产物连接到 pEASY-T3 载体, 并转化到 Trans-T1 感受态大肠杆菌 *Escherichia coli*。通过蓝白斑筛选, 挑取白色菌落扩大培养, 培养后用试剂盒提取质粒, 用 *EcoR* I 酶切鉴定阳性克隆。每次选择 2~3 个阳性克隆, 菌液送往北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

1.5 序列分析

利用 DNAMAN (Version 6.0) 软件进行序列拼接和比对分析, 并利用 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析。信号肽预测使用 SignalP 3.0 Server 程序, 跨膜结构预测使用 TMHMM Server v. 2.0 程序, 结构分析使用 Hits 软件。

2 结果与分析

2.1 甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因核苷酸及推导的氨基酸序列分析

以甜菜夜蛾中肠 cDNA 为模板, 用简并引物 F_1 和 R_1 , F_2 和 R_2 分别扩增得到了分子量为 882 bp、1 779 bp 的条带。中间引物 F_3 和 R_3 扩增得到了 2 291 bp 的条带。5'RACE 和 3'RACE 反应分别得到了甜菜夜蛾类钙粘蛋白 cDNA 的 5'末端和 3'末端大小为 755 bp 和 543 bp 的片断。

用 DNAMAN 软件对 PCR 和 RACE 产物测序结果进行分析, 去除 PCR, 5'RACE 和 3'RACE 序列中的重复区域, 获得了编码甜菜夜蛾中肠钙粘

蛋白的 cDNA 全长序列, 该序列已经在 GenBank 中登录, 序列号为 HQ647122。该 cDNA 全长 5 582 bp, 其中碱基 A 占 30%, C 占 23.2%, G 占 23.6%, T 占 23.2%, 图 2 即为甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因的完整序列。该基因蛋白编码区长 5 217 bp, 5'端非编码区长 198 bp, 3'端非编码区长 164 bp, 具有真核生物典型的 polyA 加尾(图 2)。

根据以上所得序列设计了一对特异性引物 BAWF 和 BAWR 从起始密码子到终止密码子扩增甜菜夜蛾类钙粘蛋白阅读框, 它编码 1 739 个氨基酸, 用 ProtParam 预测该蛋白分子量和等电点分别为 196.447 ku 和 4.47。

推导的甜菜夜蛾类钙粘蛋白氨基酸序列包括一个信号肽(signal peptide, SIG)、一个前蛋白区(proprotein region, PRO)、11 个钙粘蛋白重复(cadherin repeat, CR_{1-11})、一个靠近细胞膜的区域, 即近膜区(membrane-proximal region, MPR)、一个跨膜区(transmembrane region, TM) 和胞质区(cytoplasmic region, CYT), 这些都具有昆虫类钙粘蛋白的结构特征(图 3)。

信号肽结构分析结果表明, 推导的甜菜夜蛾类钙粘蛋白 N 端 21 个氨基酸为信号肽序列, 第 21 和 22 个氨基酸之间为剪切位点。跨膜结构分析表明, 第 1 593~1 615 位氨基酸是类钙粘蛋白锚定到细胞膜上的区域, 将该蛋白分为细胞膜外和细胞质内两部分。其中第 1 615~1 739 位于细胞质内, 而 1~1 592 位于细胞膜外。

2.2 同源性分析

将甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因 cDNA 推导出的 1 739 个氨基酸序列, 与已知全长的昆虫类钙粘蛋白氨基酸序列用 DNAMAN Version 6.0 进行同源性分析。结果表明, 所得氨基酸序列与 GenBank 登录的大螟 *Sesamia inferens*、蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、家蚕 *Bombyx mori*、烟草天蛾 *Maduca sexta*、舞毒蛾 *Lymantria dispar*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 均有较高的一致性, 分别为 61.28%、60.34%、60.14%、60.08%、59.06%、57.96%、56.01%、56.72%、51.51%、51.45%、51.17%, 表明得到的是类钙粘蛋白基因。使用 DNAMAN

Version 6.0 对不同鳞翅目昆虫类钙粘蛋白完整序列做系统发育树,从图 4 中可以看出甜菜夜蛾与同科的大螟、蛀茎夜蛾、烟芽夜蛾、烟夜蛾亲缘关系更近,一致性均达 60% 以上。

3 讨论

甜菜夜蛾是一种抗药性很强的害虫,该虫目

前已对多种杀虫剂产生了较强的抗性(王光锋, 2003;姜艳杰和谭伟明, 2007;张彬等, 2008;周利琳等, 2008),因而化学防治越来越困难。为缓解甜菜夜蛾抗药性问题,生物防治倍受关注(张悦丽和高兴祥, 2004;张小丽等, 2006;杨宝山等, 2006)。苏云金芽胞杆菌是一种昆虫病原细菌,它作为一种有效的微生物杀虫剂,现已广泛应用于

-198					GAAAAGTC	GCATTAAATA
-180	TAGTGAAACA	AAGTTACGTG	TACTTGAGTG	TATTTTATTA	GATCTCCTTT	TATTTGTCTA
-120	GATTTTGTG	TGGATTTTGT	GTTTAGTGCA	TACATTTTCGG	AACATTGTTA	AAGTACTCTT
-60	GAATATTAAC	AGACTCCAAT	TCTTCTCATA	TCATCGTTAC	TAGCGAAATA	AGATCATGAG
1	ATGCGGTCG	ACGTGCGAAT	ACTGACGGCG	ACATTGCTAC	TACTCGCCGC	TGCCACAACC
61	GGACAACAAG	ATCGCTGTGG	CTATATGGTC	GAAATACCAA	GGCCACCGAG	GCCTGACTTC
121	CCACCACAAA	GTTTGTACGG	ATTGACATGG	GCTCAACGGC	CACTGTTACC	AGCTGAAGAT
181	CGAGAAGAAG	TGTGCCTCAG	CGAGTATTC	CCTGATGTCT	TCAATCCTAA	CATTGGTCAC
241	CAGACTGTCT	ACATGGAGGA	GGAGATCGAA	GAGCACGTGG	CCATTGCCAA	ACTTAACTAT
301	CGAGGTAACA	ACGTTCTCTGA	AGTGAGAATG	CCGTTCAATT	TCGGTGCAGC	CCACATGCTA
361	GGTGCAGTCA	TTCGTAGATA	TCCTGATGAT	GATGGAGACT	GGCACCTTGT	TATTACGCAA
421	AGGCAGGACT	ATGAACTCC	TGAAATGCAG	CTATACATGT	TCGAGGTCAG	AGTGGACGGT
481	GAGCCGCTGG	TTGTAAGGGT	GACTCTGCAT	ATTGTGAACA	TCGATGACAA	CACACCTGTC
541	ATTGAGATGT	TAGAGCCTTG	CAGCATACCG	GAAGTTGGTG	AACCCGGTGT	TACACAGTGC
601	AAATACGTCTG	TGAGGGATGC	AGATGGTAGG	ATTAGTACAA	GTGTGATGAA	ATTTGAAATA
661	GAAAGCGATA	GAGGTGATGA	ACTCACATTC	GAAGTATCA	GAGAGAATAT	CCCAAGCGAG
721	TGGATGTGGG	TGTATATGGT	ACTTGAAGTG	AAAAAGTCTC	TTGATTACAA	AGCGAATCCT
781	CTACACATAT	TCAGAGTTAC	GGCTTTGGAC	TCGTTACCAA	ACAAACGTAC	AGTCACCATG
841	ATGGTTGAAG	TAGAGAATGT	GGAGCACAGA	AACCTGAGT	GGATGGAGAT	TTTTGCCGTG
901	CAACAGTTTG	ATGAGAAACA	AGAGATGTCG	TTCACAGTCA	GGGCTGTAGA	TGGTGACACG
961	GGAATCAATA	AACCTATATT	CTATCGTATA	GAGACTGAAG	AAAGAGACAA	AGAATTTCTT
1021	AGTATTGAGA	CTATTGGGGA	AGGCAGACAA	GGTGCCATCT	TTCACGTAGC	TGCTATAGAC
1081	AGAGACGAAC	TGAAAAGAGA	CATGTTCAAT	GTTGCAATAA	TTGCATACAA	GTATGGTGAC
1141	AATGACGAAG	AAGGTAAACC	ATCATTTCGAG	ACCACAGCAA	ATGTCGTGAT	TATAATTAAC
1201	GATATCAATG	ATCAAAGACC	AGTCCCCTTC	CAAAAAGGAAT	ACACCATTTT	CATAGAGGAA
1261	GAAACTGCTA	TGACACTGCG	TTTAGAAAAC	TTTGGTTTTT	ATGACCCGCA	TATTGGTCCC
1321	CACGCACAGT	ACTCAGTTTCG	CTTAGAGAGC	ATACAACCAG	ACAATGCTCA	TACAGCCTTC
1381	TACATCGCCC	CTACAGAAAGG	TTACCAGGAG	CAGGAGTTTA	TCATAGGTAC	AGTACACCAT
1441	CACATGTTGG	ATTATGAAGA	CGATAACTAC	AGACCTGGAA	TAAAGCTGAG	GGCAATAGCA
1501	ACTGACAAAG	ATGATAACAG	ACACACTGGA	GAAAGCGATTA	TTAACATAAA	TCTGATCAAT
1561	TGGAATGATG	AACTACCTGG	ATTTAAGAAG	GATAGCTACG	ATGCGACATT	TCCGGAGACA
1621	GTTAAAGCTG	GCTTTCACGT	TGGCACATAC	CTGGCTACAG	ACGATGACAT	TGGTGACATA
1681	GTGAGCACA	GGATATTGGG	CAATGCTGGA	AACTTCCTGA	CGATTGATAT	GCTTTCTGGA
1741	GACGTCTTCG	TGACAAAGAA	CGATAGCTTT	GATTACCACA	GACAGGATGA	AATCTTTGTA
1801	CGGATTGAAG	CTGTTGATAC	ACTGGGTTTA	CCTCAAAACA	GGGCTACAAC	ACAGCTGGTG
1861	ATACATTTAG	AAGACATCAA	CAACACACCA	CCTACACTTC	GACTGCCTCG	TCAAAGTCCA
1921	AGCATAGAAG	AAAACGTTAA	AGACGGACAC	TTGATAACCC	AAGGACTAAC	ACGCTCCGAT
1981	CCCGACACCA	CGGCTGATTT	AATGTTTCGAG	ATCGATTGGG	ACGCCTCGTA	CGCTACGAAG
2041	CAAGGCATGA	ATGCACCCCC	CATTGAAGAG	TACCATAATT	GCGTAGAAAT	CCTGACGGTG
2101	TACCCAGATG	CTGATAATCG	CGGGTACGCT	GAGGGACACT	TGGTGGCGCG	TGAGATCAGG
2161	GACGGCGTGA	CGATCGATT	CGAGGAGTTT	GAAAGTTCTGT	ACCTCGTTGT	TAGGGTCATA
2221	GATCGCAACA	CCGTCAATAGG	GGACGATTAT	GACGAAGCAA	TGTTGACAGT	GACAATAATT
2281	GACATGAATG	ACAACCGGCC	ATTATGGGTG	GCGGGCACGC	TGGAGCAAAC	ACTGCGCGTG
2341	CGCGAGATGG	CCGACCAAGG	TGTCGTCATC	GGTTCACCTG	AGGCCACTGA	TATCGACGGC
2401	CCTCTCTACA	ACCGCGTCCG	TTACACCATG	ACCCCATATA	AAGATACACC	AGACGACCTG
2461	GTGGCGATCG	ACTACATCAC	CGGTACAGTG	ACCGTCAACA	AGGGGCAAGC	AATTGTGCA
2521	GACATTCCAC	CACGTTCCCA	TCTGTATTAC	AAGGTTCATCG	CCAGTGACAA	GTGCTCTCTT
2581	GACGAATTCT	TCACACAATG	TCCGGACGAC	CCAATGTTCT	GGAAAACCGA	GGGAGAGATA
2641	GCGATCCAGA	TAACAGATAC	GAACAACAAA	ATCCACACACG	CGGAACTGA	CCAATTTCTT
2701	ACTGAAATTC	GGATTCCCCG	GGATACACCT	AATGGCACCG	AAATCACCAA	GATCATAGCC
2761	AGCGACCTGG	ACAGGGATCG	GCCGAACAAC	GTCGTGACGT	ACAGAATCAA	CTACGCATTTC
2821	AACCATAGGC	TAGAGAACTT	CTTCGCAAGT	GACCCAGACA	CTGGCATCCT	GAGAGTACAC
2881	TTCAACAATA	GTGAAGAGTT	GGACAGGGAT	AGCGGAGAAC	CGGAGCATAG	AATCATCTTC
2941	ACAATCGTTG	ACAACCTGGA	AGGCGCTGGA	GATGGCAATC	AGAATACGAT	CTCAACGGAA
3001	GTGCGTATTA	TATTGCTTGA	TGTAATGAC	AATAAGCCGG	AACTACCACC	TTCTGATGGC
3061	GAATTCTGGA	CCGTTTCTGA	GGGTGAACATA	CAGGGTCGTC	GTATTCCGCC	CGAGATCCAC
3121	GCACATGACA	GAGACGAACC	GTTCAATGAC	AATTCTCGTG	TCGAATACGC	TATCCAATCA
3181	ATCAAAATGA	CCAATAGGAA	CGTAGAATCT	CCCCAAGATC	CATTCAAGAT	TATAACAATT
3241	AATGATTTTCG	AAGAATGGAA	ATTTGTTTGA	GAGCTGGAGA	CTACGATGGA	CCTTAGAGGA
3301	TACTGGGGCA	CGTACGATGT	CGAAATACAT	GCGTTTGACC	ACGGTGTCCC	GAGCCTCAGT
3361	TCATACGAGA	CGTATCAACT	AACCGTCAGA	CCATACAAC	TCCATTACAC	AGAGTTTGTG
3421	TTCCCAACAG	CTAACTCAAA	AATCAGGCTG	TCCAGGGAGC	GTGCTATAGT	CAATGGTATG

3481	CTGGCTCTGG	CAAATATCGC	GAGCGGAGAG	TTCCTCGACC	GCCTCTCTGC	CACCGATGAA
3541	GATGGATTAC	ACGCAGGCCG	AGTAACTTTC	TCTATAGTTG	GAAACGATGA	AGCGGAGCAG
3601	TACTTCCATG	TGGTGAATGA	TGGTGACAAT	TCACGCGATG	TCACGCTGAA	GCAAGCTTTG
3661	CCCGATGGCG	TCCAGCAGTA	TCAGTTGGTT	ATCCGAGCTA	CTGATGGCGG	TACGGAGCCA
3721	GGGCCCAGGT	TCACCGACTG	CGCTGTCACT	GTGGTGTTTG	TGTTGACACA	GGGAGAACCC
3781	GTGTTCTCGG	AAAACACAGT	CACTATCCGT	TTCTTAGAGA	AGGATGCTGG	TATGGCTGAG
3841	AGGATCCAGC	TGCCCCAAGC	TGTGGACCCC	AAAAACTACG	AGTGCACGGT	AGACTGCCAT
3901	GACGTCTACT	ACAGTATCAC	TGACGGTAAC	GATGATGGCC	ACTTCGCTGT	AGACCCGGAA
3961	ACTAACGAGA	TCTATTTGGA	GAAGGAGCTG	GACCGCAGCG	AACGCGACCA	GCACAGAATA
4021	GTGGTGGCAG	CTGCCAACAC	TCCTGGAGTC	ACCAACGCCA	TGCCATCCTC	ACTTCTCACC
4081	GTCATTATCA	ACGTACGAGA	AGCCAACCCT	AGACCGGTCT	TCAGCAGAGA	ACTTTACACA
4141	GCTGGCATCT	TAAACACAGA	TAATATAAAC	AGGGAACCTG	TTTATCTATC	GGCAACACAC
4201	TCAGAAGGGC	ATCCCATAAC	GTTCTCGATA	GACTGGCAAA	CTATGGTAGT	GGACGAGTCC
4261	TTGCAGAATG	TGGAGGGAGA	TGCCTTCAAC	ATCAACTCTG	AGACCGGAGT	GATATCGCTA
4321	AACTTCCAGC	CAACATCAGC	CATGCATGGC	AATTTCCATT	TCGAAGTGGT	GGTACCGAT
4381	ACAGAGGGAG	CGAGTGATCG	AGCTGAAGTG	ACAATCTTCA	TGATATCAAC	GCCTGTTAGA
4441	GTAGCCTTCC	TGTTCTACAA	CTCGGAGGCT	GAAGTTAACG	CGAGAAGGGA	TTTCGTCGCT
4501	CAAAACCTCT	CCACCGGGTT	CGGTATGACG	TGTAACATAG	ACAGCGTGCT	ACCGGCTACC
4561	GAGGCTAACG	GCGTGATACG	AGAAGGATTC	ACAGAAGTCC	AGGCTCACTT	CATACGAGAC
4621	AATCTGCCGG	TGCCAGCCGA	ATATATTGAC	GAATTGTTTA	CGGATATCAA	CGAAATACGT
4681	GATATCCAGG	AAGTGTTGAG	AACTCAAGAG	TTGTCACTAC	TGGATTTGGC	GGCGGGAGGA
4741	ACAACGGTGC	TGCCCGGAGG	GGAGTATGCC	CTGGCGGTCT	ACATCCTCGC	GGGTATAACG
4801	GCCCTCCTCG	CCGTCATCTG	CCTCTCTCTC	GTCATCGCTT	TCTTTCATCAG	GAACCGAACA
4861	CTAAATCGCG	GCATCGAAGC	CCTTTCAACG	ACCAACCAGG	ATCAGACCAT	GACTCAGAC
4921	CTCAACCACG	CTGCAGTGGC	CGCGCCAAAC	ACCAACAAAC	ACGCTGTAGA	GGGTTCCAAT
4981	CCTATCTGGA	ACGAGAATAT	CAAAGCACCT	GACTTTGACT	CGATTAGCGA	AATGTCCAAT
5041	GACTCGGATC	TGATCGGTAT	TGAAGATTTA	CCGCAGTTCA	GAGACGACTA	CTTCCCAGCC
5101	ACAAACGAGG	CTGCGAATCC	GAATTTTTCG	CCTCGTCATA	TAGCGAACCA	AGAAAACAAC
5161	TTCGGCTCGA	ACTCAACCCC	CTTCAGCCCC	GAGTTCGCGA	ACTCCCAGTT	TAGAAGATAA
5221	ATTATTATAC	CTTTATAAGT	TGCATAGTCT	ATTATACATT	TTATTTATAA	ATCTACCAAA
5281	ATGTACATTA	ATATCAATAT	ATTGTACAAA	ATAATATACT	CGTAATGTAC	CTATAAGTGT
5341	AATATTTTTA	TATAGCAATA	AAAACATTAA	ATATAAAAAA	AAAA	

图2 甜菜夜蛾中肠类钙粘蛋白基因的 cDNA 序列

Fig. 2 Nucleotide sequences of cadherin-like cDNA from *Spodoptera exigua*

翻译起始密码子的第一个核苷酸记为 +1, 起始密码子和终止密码子用黑体标出。

The first nucleotide of the initiator codon is marked as +1, and the initiator codon and terminator codon are indicated by bold.

害虫防治, 尤其对鳞翅目害虫有良好的控制作用。但随着 Bt 转基因作物的推广使用, 已发现多种昆虫对 Bt 毒素可以产生抗性 (赵新民等, 2007)。其中, 小菜蛾已在田间表现出高抗性 (Ferre and Van Rie, 2002)。因此, 昆虫对 Bt 毒素的抗性问题的不容忽视。为了延长 Bt 作物的使用, 解决害虫对 Bt 的抗性问题的刻不容缓。目前, 研究不仅仅针对棉铃虫、二化螟、小菜蛾等转基因作物的主要靶标害虫, 研究者们也开始关注对靶标害虫以外的其他生物的影响 (袁一杨和戈峰, 2010)。甜菜夜蛾是转基因作物的一种非靶标害虫, 有报道转 *cryIAb* 基因的 Bt 玉米对甜菜夜蛾初孵幼虫有明显的杀虫活性 (王振营等, 2005), 而转 *cryIAc:cryIF* 棉花也对甜菜夜蛾有较好的杀虫效果 (Tindall et al., 2009)。但也有报道 CryIAc 毒素虽然可以明显的抑制甜菜夜蛾低龄幼虫的发育, 但当转移到无毒条件时, 能迅速恢复生长 (陈建等, 2010)。近年来, 甜菜夜蛾在转基因棉田危害越来越重, 并

没有减缓的趋势, 对转 Bt 作物的长期种植存在很大风险。实验室及田间抗性昆虫品系对 Bt 毒素产生的抗性主要与昆虫中肠上皮细胞膜上 Bt 毒素特异性结合受体的变化有关 (谭声江等, 2001), 而类钙粘蛋白与氨肽酶 N 是昆虫对 Bt 产生抗性密切相关的 2 种最重要的受体 (刘凯于等, 2004; 苗素丽等, 2008; 张应等, 2008), 尤其类钙粘蛋白作为 Cry 类毒素的第一受体, 在毒素对害虫发挥毒杀作用的过程中起着不可或缺的基础作用。因此, 研究甜菜夜蛾类钙粘蛋白将有助于进一步了解 Bt 毒素对甜菜夜蛾的作用机制, 从而为最终明确甜菜夜蛾对 Bt 毒素的抗性机制奠定基础。

目前, 已从烟夜蛾、烟芽夜蛾、棉铃虫、粘虫、舞毒蛾、家蚕、烟草天蛾、亚洲玉米螟、欧洲玉米螟、二化螟、棉红铃虫及小菜蛾等鳞翅目昆虫中获得类钙粘蛋白基因 cDNA 全长, 这些昆虫的类钙粘蛋白都具有典型的特征结构, 包括信号肽、钙粘蛋白重复、跨膜区和胞质区。甜菜夜蛾的类钙粘

1	MAVDVRI LTA TLLLLAAATT	SIG	PRO	QQDRCGYMV EI PRPPRPDF PPQSFDGLTW AQRPLLPAED
61	REEVCLSEYS PDVFNPNIGH	CR1		QTVYMEEEI E EHVAI AKLNY RGNVPEVRM PFI FGAAHML
121	GAVI RRYPPDD DGDWHLVI TQ	CR2		RQDYETPEMQ LYMFVVRVDG EPLVVRVTLH I VNI DDNTPV
181	I EMLEPCSI P ELGEPGVTC	CR3		KYVVRDADGR I STSVMKFEI ESDRGDELTF ELI RENI PSE
241	WMWYMLLEV KKSLDYKANP	CR4		LHI FRVTALD SLPNKRTVTM MVEVENVEHR NPEWMEI FAV
301	QQFDEKQEMS FTVRAVDGDT	CR5		GI NKPI FYRI ETEERDKEFF SI ETI GEGRQ GAI FHVAAI D
361	RDELKRDMFN VAI I AYKYGD	CR6		NDEEGKPSFE TTANVVI I I N DI NDQRPVVF QKEYTI SI EE
421	ETAMFLRLN FGFHDRDI GP	CR7		HAQYS VRLES I QPDNAHTAF YI APTEGYQE QEFI I GTVHH
481	HMLDYEDDNY RPGI KLRAI A	CR8		TDKDDNRHTG EAI I NI NLI N WNDELP GF KK DS YDATFPET
541	VKAGFHVGTY LATDDDI GDI	CR9		VEHRI LGNAG NFLTI DMLSG DVFVTKNDSF DYHRQDEI FV
601	RI EAVDTLGL PQNRATTQLV	CR10		I HLEDI NNTP PTLRLPRQSP SI EENVKDGH LI TQGLTASD
661	PDTTADLMFE I DWDAS YATK	CR11		QGMNAPPI EE YHNCVEI LTV YPDADNRGYA EGHLVAREI R
721	DGVTI DYEEF EVLYLVVRVI	CR12		DRNTVI GDDY DEAMLTVTI I DMNDNRPLWV AGTLEQTLRV
781	REMAQQGVVI GSLQATDI DG	CR13		PLYNRVRYTM TPI KDTDDL VAI DYI TGQL TVNKGQAI DA
841	DI PPRFHLYY KVI ASDKCSL	CR14		DEFFTQCPDD PMFWKTEGEI AI QI TDTNNK I PHAETDQFP
901	TEI RI PEDTP NGTEI TKI I A	CR15		SDLDRDRPNN VVTYRI NYAF NHRLNFFAV DPDTGI LRVH
961	FTTSEELDRD SGEPEHRI I F	CR16		TI VDNLEGAG DGNQNTI STE VRI I LLDVND NKPELPPSDG
1021	EFWTVSEGL QGRRI PPEI H	CR17		AHDRDEPFND NSRVEYAI QS I KLTNRNVEL PQDPFKI I TI
1081	NDFEEWKFGV ELETMDLRG	CR18		YWGTYDVEI H AFDHGVPSLS SYETYQLTVR PYNFHSPEFV
1141	FPTANSKI RL SRERAI VNGM	CR19		LALANI ASGE FLDRLSATDE DGLHAGEVTF SI VGNDEAEQ
1201	YFHVNDGDN SAMLTLKQAL	CR20		PDGVQQYQLV I RATDGGTEP GPRFTDCAVT VVF VLTQGEF
1261	VFSENTVTI R FLEKDAGMAE	CR21		RI QLPEAVDP KNYECTVDCH DVYYSI TDGN DDGHFAVDPE
1321	TNEI YLEKEL DRSERDQHRI	MPR		VVAAANTPGV TNAMPSSLLT VTINVREANP RPVFSRELYT
1381	AGI LNTDNI N RELVYLSATH			SEGHPI TFSI DWQTMVDES LQNVEGDFAFN I NSETGVI SL
1441	NFQPTSAMHG NFHFVAVTD			TEGASDRAEV TI FMI STRVR VAF LFYNSEA EVNARRDFVA
1501	QTLSTGFGMI CNI DS VLPAT			EANGVI REGF TEVQAHFI RD NLPVPAEYI D ELFTDI NRI R
1561	DI QEVLRTQE LSLDLAAGG	TM		TTVLPGGEYA LA VYI LAGI T ALLAVI CLSL VI AFFI RNRT
1621	LNRII EALST TNQDQTMDS			D LNHAAVAAPN TNKHAVEGSN PI WNENI KAP D FDSISE MSN
1681	DSL I GI EDL PQFRDDYFPP			TNEAANPNFS PRHI ANQENN FGSNSTPFSP EFANSQFRR

图 3 甜菜夜蛾中肠类钙粘蛋白 cDNA 序列推导的氨基酸序列

Fig. 3 The deduced amino acid sequences of cadherin-like cDNA from *Spodoptera exigua*

箭头处为推导的结构域起始点。the arrows indicate the starting point of the deduced structure domain; SIG: 信号肽序列 signal peptide; PRO: 前蛋白区 proprotein region; CR: 钙粘蛋白重复 cadherin repeat; MPR: 近膜区 membrane-proximal region; TM: 跨膜区 transmembrane region; CYT: 胞质区 cytoplasmic region.

蛋白也具有这些特征结构,这表明鳞翅目不同昆虫的类钙粘蛋白结构很保守。甜菜夜蛾类钙粘蛋白氨基酸序列与上述鳞翅目昆虫均具有较高一致性,达 50% 左右。尤其与同科的大螟、蛀茎夜蛾、烟芽夜蛾、烟夜蛾亲缘关系更近,一致性均达 60% 以上,这进一步说明类钙粘蛋白在进化上的保守性。这种功能区域的保守性有助于阐明 Bt 毒素与甜菜夜蛾类钙粘蛋白的相互作用机制。然而,本实验仅克隆获得了甜菜夜蛾类钙粘蛋白基因

cDNA 全长并进行了序列分析,尚未涉及该蛋白的功能研究。鉴于 Bt 毒素与受体在不同昆虫体内的相互作用机制并不完全相同,因此还需进一步深入研究甜菜夜蛾类钙粘蛋白与 Bt 毒素的结合机制,从而进一步了解 Bt 对甜菜夜蛾的作用机制以及甜菜夜蛾对 Bt 的反应机制,从而更好地对转基因作物进行安全性评价。

参考文献 (References)

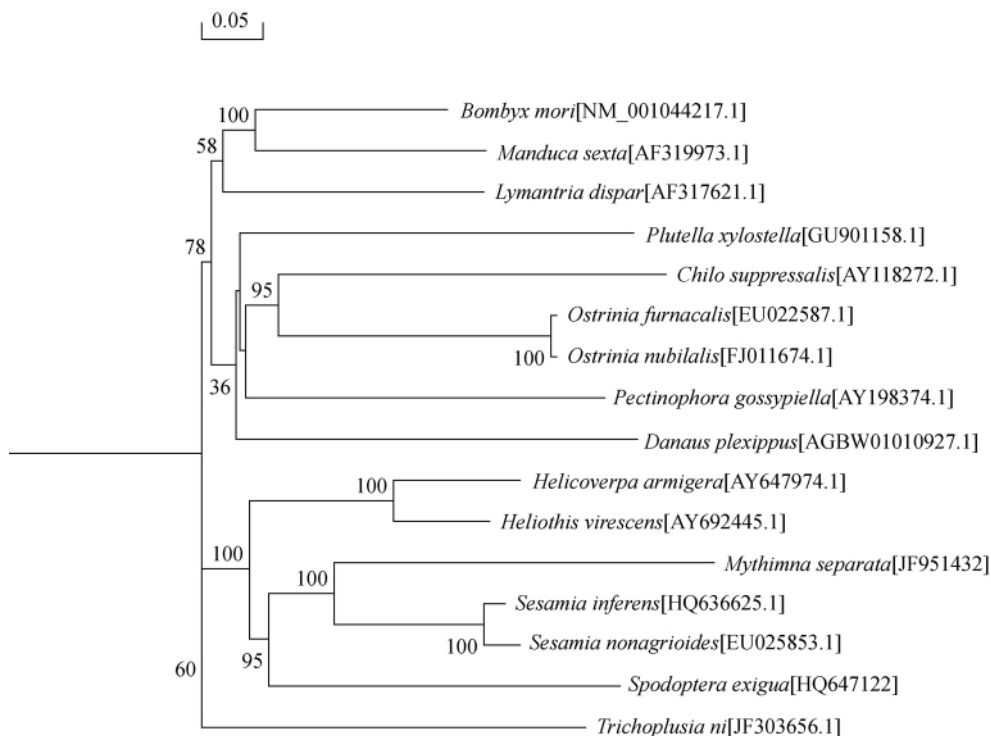


图 4 甜菜夜蛾与其他鳞翅目昆虫类钙粘蛋白的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of cadherin-like protein from *Spodoptera exigua* and other lepidopteran insects based on amino acid sequence

分支上的数字是 500 次自展后的数据支持率。

Bootstrap values are expressed as percentages of 500 replications.

- Bravo A, Soberon M, 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.*, 26 (10) :573—579.
- Ferre J, Van Rie J, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 47:501—533.
- Naranjo SE, 2010. Impacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. *J. Agricult. Food Chem.*, 59 (11) :5842—5851.
- Tabashnik B, Gassmann A, Crowder D, Carrière Y, 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.*, 26 (2) :199—202.
- Tindall KV, Siebert MW, Leonard BR, All J, Haile FJ, 2009. Efficacy of Cry1Ac: Cry1F proteins in cotton leaf tissue against fall armyworm, beet armyworm, and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 102 (4) :1497—1505.
- Zhao JH, Ho P, Azadi H, 2011. Benefits of Bt cotton counterbalanced by secondary pests? Perceptions of ecological change in China. *Environ. Monit. Assess.*, 173

(1/4) :985—994.

- 陈建, 江幸福, 罗礼智, 胡毅, 2010. 甜菜夜蛾低龄幼虫取食含 Cry1Ac 毒素的人工饲料对其生长发育和成虫繁殖的影响. *昆虫学报*, 53 (10) :1119—1126.
- 韩岚岚, 赵奎军, 张杰, 2009. 昆虫类钙粘蛋白与 Bt Cry1A 蛋白之间的相互作用. *昆虫知识*, 46 (2) :203—209.
- 姜艳杰, 谭伟明, 2007. 甜菜夜蛾抗性研究进展. *安徽化工*, 33 (5) :1—4.
- 李瑞奇, 马峙英, 王勤英, 王省芬, 张桂寅, 李喜焕, 2005. 转 Bt/CpTI 基因棉花抗虫性鉴定与筛选. *植物遗传资源学报*, 6 (4) :409—413.
- 李卫华, 苗雪霞, 黄勇平, 安世恒, 郭线茹, 2007. 烟夜蛾幼虫中肠类钙粘蛋白基因 cDNA 片段的克隆与序列分析. *华北农学报*, 22 (1) :152—155.
- 李怡萍, 梁革梅, 仵均祥, 陈豪, 马康生, 吴孔明, 郭予元, 2010. 苏云金芽孢杆菌杀虫机理及害虫对其抗性机制的研究进展. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 39 (9) :118—128.
- 刘凯于, 姚汉超, 杨红, 洪华珠, 2004. 昆虫中肠 Bt 杀虫

- 晶体蛋白毒素受体氨肽酶 N 的研究进展. 昆虫知识, 41 (3):203—207.
- 苗素丽, 张少平, 程红梅, 2008. 氨肽酶 N (APN) 与鳞翅目昆虫对 Bt 抗性的关系. 中国农业科技导报, 10 (S1): 12—17.
- 苏宏华, 范娜, 李达, 杨益众, 2010. 甜菜夜蛾幼虫对常规棉和转基因棉的取食选择行为. 中国生物防治, 26 (4):421—427.
- 谭声江, 陈晓峰, 李典谟, 2001. 昆虫对 Bt 毒素的抗性机理研究进展. 昆虫知识, 38 (1):12—17.
- 王光锋, 张友军, 柏连阳, 吴青君, 2003. 甜菜夜蛾抗药性的研究进展. 农药科学与管理, 24 (3):21—24.
- 王桂荣, 吴孔明, 梁革梅, 郭予元, 2004. 棉铃虫中肠钙粘蛋白基因的克隆、表达及 Cry1A 结合区定位. 中国科学 C 辑, 34 (6):537—546.
- 王继磊, 刘迪秋, 丁元明, 葛锋, 李文娴, 田荣欢, 2010. Bt 转基因抗虫植物研究进展. 生物学杂志, 27 (4): 75—78.
- 王玲, 江幸福, 罗礼智, 胡毅, 张蕾, 2011. 粘虫类钙粘蛋白基因的克隆、序列分析及时空表达. 昆虫学报, 54 (10):1094—1103.
- 王振营, 王冬妍, 何康来, 白树雄, 丛斌, 2005. 转 Bt 基因玉米对甜菜夜蛾幼虫存活和发育的影响. 昆虫学报, 32 (2):153—157.
- 杨宝山, 曹兰娟, 李俊, 李敏, 秦利, 2006. 甜菜夜蛾及其防治的研究进展. 安徽农业科学, 34 (14):3418—3419 转 3438.
- 杨峰山, 张友军, 张文吉, 吴青君, 徐宝云, 邱德文, 2005. 小菜蛾类钙粘蛋白 cDNA 片段的克隆和序列分析. 农业生物技术学报, 13 (3):396—397.
- 袁一杨, 戈峰, 2010. 转 Bt 基因作物对非靶标土壤动物的影响. 应用生态学报, 21 (5):1339—1345.
- 张彬, 刘怀, 王进军, 周旭, 2008. 甜菜夜蛾研究进展. 中国农学通报, 24 (10):427—433.
- 张小丽, 陆佩玲, 杨益众, 2006. 甜菜夜蛾的生物防治及其展望. 昆虫天敌, 28 (4):168—172.
- 张应, 梁革梅, 雷朝亮, 吴孔明, 2008. 昆虫 Bt 作物抗性与中肠类钙粘蛋白的关系. 中国农业科技导报, 10 (1): 28—33.
- 张悦丽, 高兴祥, 2004. 甜菜夜蛾生物防治研究进展. 农药, 43 (5):209—211.
- 赵新民, 夏立秋, 王发祥, 丁学知, 2007. 昆虫对 Bt 毒素产生抗性的分子机制. 生命的化学, 27 (5):421—424.
- 郑霞林, 王攀, 王小平, 雷朝亮, 2010. 转基因棉甜菜夜蛾的为害现状、暴发成因及防治现状. 植物保护, 36 (3):34—38.
- 周利琳, 司升云, 望勇, 刘小明, 2008. 甜菜夜蛾对昆虫生长调节剂的抗药性研究进展. 世界农药, 30 (5):16—22.