

棉铃虫 Polycalin 基因的克隆及其表达分析*

王亚楠^{1,2**} 钟 丰¹ 魏纪珍¹ 谢丙堂¹ 张万娜¹ 陈利珍^{2***} 梁草梅^{1***}

(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 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 【目的】通过对棉铃虫 Polycalin 基因的克隆及其表达谱分析, 进一步明确 Polycalin 基因在抗性中发挥的作用, 为棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的抗性治理提供理论依据。【方法】通过 RACE 结合 PCR 技术克隆获得了棉铃虫 Polycalin 基因的全长序列, 利用实时荧光定量 PCR 技术测定了在棉铃虫不同发育时期、幼虫肠道不同部位的 Polycalin 基因表达量, 比较了棉铃虫取食含 Cry1Ac 蛋白的饲料后, Polycalin 基因表达量的变化。【结果】该基因全长序列为 2 955 bp, 开放阅读框为 2 781 bp, 编码 926 个氨基酸 (GenBank 登录号为 KP100652); 预测蛋白的分子量为 101.68 ku, 等电点为 4.57。推导的氨基酸序列中, N 末端含有 20 个氨基酸组成的信号肽, 含有 8 个 O-糖基化位点, 3 个 N-糖基化位点, C 末端存在 2 个 GPI 结合位点。Polycalin 在棉铃虫所有发育阶段都可以表达, 幼虫期表达量较高, 尤其在 1~3 龄幼虫体内表达量最高, 在卵、成虫和蛹中的表达量较低。棉铃虫 4 龄幼虫取食含活化 Cry1Ac 蛋白的人工饲料后, Polycalin 基因的表达受到抑制。【结论】研究结果可以为进一步揭示 Polycalin 基因的功能及其在 Bt 杀虫机制中的作用奠定基础。

关键词 棉铃虫, Polycalin 基因, 表达, Bt

Cloning and expression analysis of the polycalin gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

WANG Ya-Nan^{1,2**} ZHONG Feng¹ WEI Ji-Zhen¹ XIE Bing-Tang¹
ZHANG Wan-Na¹ CHEN Li-Zhen^{2***} LIANG Ge-Mei^{1***}

(1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100193, China)

Abstract [Objectives] To further define the role of Polycalin in the Cry1Ac resistance mechanism of *Helicoverpa armigera* in and thereby develop a feasible resistance management strategy for this pest. [Methods] The full-length sequence of the polycalin coding gene was obtained using RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and RACE (rapid amplification of cDNA ends) technology. The expression levels of polycalin in different development stages and different tissues of the larval digestive tract were analyzed using real-time quantitative PCR. Changes in the expression of polycalin in the larval midgut in 4th instar larvae fed on an artificial diet containing the Bt insecticide protein Cry1Ac were also compared. [Results] The results indicate that the full-length of the polycalin from *H. armigera* coding gene was 2 955 bp (GenBank accession number KP100652), the open reading frame was 2 781 bp in length, encoding 926 amino acid residues. The predicted molecular weight was 101.68 ku and the isoelectric point was 4.95. The putative protein sequence contained a N-terminal signal peptide of 20 amino acids, three N-linked and eight O-linked glycosylation sites, and a GPI anchor signal peptide with 2 amino acids at the C-terminus. Polycalin was expressed in all growth stages of *H. armigera*, and expression in larvae was higher than that in other stages, especially in 1st-3rd instar larvae. The lowest expression levels occurred in eggs, adults and pupae. The expression of the polycalin gene was dramatically suppressed after larvae were fed on food containing the Cry1Ac toxin. [Conclusion] These results provide a basis for further clarifying the function of polycalin with respect to the Bt toxin.

* 资助项目 Supported projects: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2014ZX08011-007)

**第一作者 First author, E-mail: wangyananjiayou1@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzchen@hzau.edu.cn; gmliang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2015-03-19, 接受日期 Accepted: 2015-03-25

Key words *Helicoverpa armigera*, polycalin gene, expressin, Bt toxin

在 Bt 的杀虫过程中, Bt 与昆虫中肠受体蛋白的结合起着至关重要的作用, 结合能力的下降或丧失导致昆虫对 Bt 抗性的产生 (Arenas *et al.*, 2010; Bagla, 2010; Storer *et al.*, 2012; Vachon *et al.*, 2012; Tabashnik *et al.*, 2013; Gassmann *et al.*, 2014)。已经报道的昆虫中肠上 Bt 毒素的主要受体蛋白有: 钙粘蛋白 (Cadherin)、氨肽酶 N (Aminopeptidase N)、碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、糖脂 (Glycolipids) 等, 这些受体蛋白的突变或表达量的变化与昆虫对 Bt 的抗性密切相关 (Heckel *et al.*, 2007; Pigott and Ellar, 2007; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011; Tabashnik *et al.*, 2011; Tiewisiri and Wang, 2011; Pardo-López *et al.*, 2013)。随着蛋白组学等新技术的发展, 陆续又有一些新的 Bt 受体蛋白或结合蛋白被发现, 如 V-ATP 合成酶亚基 A (V-ATP synthase subunit A) (Krishnamoorthy *et al.*, 2006)、肌动蛋白 (Actin) (Bayyareddy *et al.*, 2009)、polycalin 及 ATP-binding cassette transporter protein (ABCC2) (Xiao *et al.*, 2014) 等。

Polycalin 最早是在家蚕 *Bombyx mori* 的中肠中被发现的, 是一种能够与叶绿素辅基相结合的荧光蛋白, 含有 15 个脂质运载蛋白结构域, 因此被命名为 poly-lipocalin 或者 polycalin (Mauchamp *et al.*, 2006); 这个 polycalin 序列后来经对比, 与 2 个以前未鉴定的高分子量、在异源竞争结合试验中能与 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 结合的蛋白多肽匹配 (Hossain *et al.*, 2004; Pigott and Ellar, 2007)。Angelucci 等 (2008) 首次证实 polycalin 是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠上结合 Cry1Ac 的蛋白, 他们利用亲和色谱柱纯化了棉铃虫中肠上结合 Cry1Ac 的蛋白, 发现了源于同一基因的可选择性剪切为 3 种形式、同源性>98%的 polycalin 基因。随后, 人们又发现在大蒜植物血凝素发挥杀虫作用的关键步骤中, Polycalin 是昆虫中肠上一种结合大

蒜植物血凝素的关键蛋白 (Upadhyay and Singh, 2012)。Chen 等 (2014) 还发现 polycalin 可能与昆虫的抗菌和免疫相关。

转基因抗虫棉自 1997 年在我国种植以来, 种植面积逐年上升 (刘晨曦和吴孔明, 2011), 已经成为防治棉铃虫的一种重要手段 (Wu *et al.*, 2008)。近年来田间棉铃虫对抗虫棉表达的蛋白 Cry1Ac 的耐受性有所提高, 有初步的抗性个体出现 (Tabashnik *et al.*, 2013), 通过室内筛选, 棉铃虫对 Bt 杀虫剂、Bt 毒蛋白和转 Bt 基因棉也都可以产生抗性 (梁革梅等, 2000)。因此, 棉铃虫的抗性已成为制约我国抗虫棉持续发展的关键。本文通过 RACE 结合 PCR 技术克隆获得了棉铃虫 Polycalin 基因的全长序列, 利用实时荧光定量 PCR 技术测定了在棉铃虫不同发育时期、幼虫肠道不同部位的 Polycalin 基因表达量, 比较了棉铃虫取食含 Cry1Ac 蛋白的饲料后, Polycalin 基因表达量的变化。以期进一步揭示 Polycalin 基因的功能及其在 Bt 杀虫机制中可能的作用, 为更好的研究治理棉铃虫抗性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本试验中使用的棉铃虫为 2005 年采自河北廊坊棉田、在实验室用人工饲料饲养至今、一直未接触过任何含 Bt 制剂的种群。棉铃虫在温度 (27 ± 2) °C, 相对湿度 (75 ± 10) %, 光周期 14L:10D 的条件下饲养。幼虫用人工饲料饲养 (梁革梅等, 2000), 成虫在产卵笼内用 10%糖水补充营养。

1.2 试剂

RNA 提取试剂 Trizol 购自上海英潍捷基 (Invitrogen 公司), SMATRer® RACE cDNA Amplification Kit、(r, Ex, Easy, LA) Taq DNA polymerase、dNTP、IPTG、X-gal、Amp 购自大

连宝生物 (TaKaRa 公司), pEASY-T1/3 vector、Trans1-T1 感受态细胞购自北京全式金 (TransGen 公司), Fast Quant RT kit、SuperReal PreMix (probe) 购自天根 (Tiangen 公司), AMP⁺、IPTG、X-gal、DNA Marker 均购自北京博迈德科技发展有限公司。引物合成由北京博迈德科技发展有限公司完成。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

收集棉铃虫卵 150 粒、1 龄幼虫 30 头, 2 龄幼虫 20 头, 3 龄幼虫 10 头, 4 龄、5 龄幼虫、蛹和成虫各 5 头, 备用, 比较不同发育时期 Polycalin 基因的表达量。在冰上解剖 5 龄幼虫 25 头, 去除食物后分别截取其前肠、中肠、后肠及围食膜, 用 4℃预冷的 0.7% NaCl 溶液将内含物冲洗干净, 再用滤纸吸干水分保存备用, 比较不同组织中 Polycalin 基因的表达量。将饥饿 12 h 后的棉铃虫 4 龄幼虫分别接入含 20 μg/mL 和 60 μg /mL 活化 Cry1Ac 毒素的人工饲料中, 24、36、48 和 60 h 后分别截取各处理棉铃虫的中肠, 保存备用; 同时以在正常饲料上生长的棉铃虫作为对照, 每个处理各取 5 头棉铃虫幼虫中肠, 比较棉铃虫取食 Cry1Ac 蛋白后 Polycalin 基因表达量的变化。所有样品都设 3 次生物学重复。

按照 Invitrogen 操作说明分别提取各样品总 RNA, RACE 所用 cDNA 模板的合成参照 TaKaRa 公司 SMATRer® RACE cDNA Amplification Kit 说明书, RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 所用的 cDNA 模板的合成参照 Tiangen 公司 Fast Quant RT kit 说明书和 SuperReal PreMix (Probe) 说明书。

1.4 RACE 及 RT-PCR 反应

根据 Genbank 中登录的棉铃虫 Polycalin 的氨基酸序列, ACB54957, ACB54956 和 ACB54951, 用 Primer 5.0 软件分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物 (表 1), 以棉铃虫中肠合成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 分别扩增出其 3'端和 5'端序列。按下列程序启动降落 PCR: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 72℃

延伸 3 min, 共 5 个循环; 94℃变性 30 s, 70℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min, 共 5 个循环; 94℃变性 30 s, 62℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min; 72℃保温 10 min。扩增完成后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 AxygenDNA 回收试剂盒回收目的条带, 然后把回收产物克隆到 Peasy-T3 载体上, 转化入 Trans1-T1 感受态细胞中, 挑取阳性单克隆送北京博迈德 (Biomed) 进行序列测定。RACE 获得基因全长并经 blast 序列比对确认为 Polycalin 后, 根据其序列设计一对特异性引物 (表 1 中的 F 和 R), 以棉铃虫中肠 cDNA 为模板, 验证 Polycalin 基因的开放阅读框, PCR 反应条件如下: 94℃预变性 4 min; 接着进行 35 个循环, 循环条件为 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 3 min; 然后 72℃保温 10 min。PCR 产物的克隆和鉴定同 RACE 反应。

1.5 序列分析和系统发育树的构建

在 NCBI 上搜索同源物种的 Polycalin 基因, 与本次新扩增出来的 Polycalin 基因相比较, 利用 DNAMAN 软件对不同物种 Polycalin 氨基酸序列进行多重序列比对和一致性分析, 利用 Mega 5 构建已知物种 Polycalin 氨基酸的系统发育树。利用基因探索者软件翻译已知核苷酸序列成氨基酸序列, 并找出保守结构域。利用 http://web.expasy.org/compute_pi/ 分析氨基酸序列的分子量和等电点; 利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析氨基酸序列的信号肽; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 分析这个蛋白是否是跨膜蛋白; 利用 NetNGlyc 1.0 Server 分析氨基酸序列 N-糖基化位点; 利用 NetOGlyc 4.0 Server 分析氨基酸序列 O-糖基化位点; 利用 http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred.cgi 分析氨基酸序列的 GPI 结合位点。

1.6 荧光定量 RT-PCR

利用 TaqMan 技术进行荧光定量 PCR, 根据棉铃虫 polycalin 的 cDNA 序列设计、合成用于荧光定量 RT-PCR 的特异性引物和探针, 以棉铃

表 1 RACE、RT-PCR 及 qRT-PCR 的反应引物
Table 1 Listing of primers used in RACE, RT-PCR
and qRT-PCR reactions

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences
3'-RACE-1	GCGTAGCCAGAGTCATAAGCACAGAT
5'-RACE-1	AGTGAGGTGTCGCAGGTGAAGGGT AA
5'-RACE-2	TTTGCTTCATTGACCACTTGGCTGTT
F	CGGGCCATAACGCTACAAG
R	AAACCGGCTCAGTCACTC
Polycalin-F	AGTGGAATCCCGTCCTTCAA
Polycalin-R	CCCTGAACTGGGTCGTATCTTT
Polycalin-Probe	TAAGTGCATTCGCACGCACCTGGTA
β -actin-F	GGCCCCGTCCACAATGA
β -actin-R	CCGATCCATACGGAGTACTTCTT
β -actin-Probe	ATCAAGATCATCGCGCCCCCAGA
GAPDH-F	CATTGAAGGTCTGATGACCACTGT
GAPDH-R	CAGAGGGTCCATCCACTGTCTT
GAPDH-Probe	CACGCCACCATTCGCCACCCA

虫 GAPDH (GenBank : JF417983.1) 和 β -Actin (GenBank : EU527017.1) 基因作为双内参基因, 合成特异性引物和探针, 探针 5'端采用 FAM 标记, 3'端采用 BHQ 标记。引物和探针在上海 Invitrogen 公司合成见表 1。在 20 μ L 实时荧光定量 PCR 反应体系中含有: 2 $\times$ SuperReal Premix 10 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, 荧光探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye $\times$ 3 0.2 μ L, RNase-Free ddH₂O 7.2 μ L。混匀离心后在 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪上按照如下条件反应: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环。反应中以水作为阴性对照, 每个处理 3 个技术重复。

1.7 数据分析

反应结束后, 对定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 方法参照 Kenneth 和 Thomas (2001), 用 SPSS 软件对处理数据进行分析, 处理间比较采

用单因素方差分析检测, 用 Turkey 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 Polycalin 基因的克隆与序列分析

通过 RACE 技术分别获得两段 937 bp 和 1 310 bp 的 5'端序列以及 928 bp 的 3'端序列, 通过 DNAMAN 软件对 3 段序列进行拼接, 得到全长序列。再利用 Primer 5.0 设计一对特异性引物来验证全长, 得到的 Polycalin 全长序列为 2 955 bp (图 1)。经序列分析, 1~36 bp 为 5'非编码区, 2 818~2 955 bp 为 3'非编码区, 中间的 37~2 817 bp 为 Polycalin 基因的开放阅读框, 编码 926 个氨基酸。预测的蛋白的分子量为 101.68 ku, 等电点为 4.57, 前 20 个氨基酸为 N 末端信号肽序列, 没有发现跨膜区, 说明这个蛋白为非跨膜蛋白。用软件对推导的氨基酸序列进行分析, 该序列存在 8 个 O-糖基化位点, 3 个 N-糖基化位点, 在 C-末端存在 2 个 GPI (Glycosyl phosphatidyl inositol) 结合位点。

2.2 氨基酸序列同源性分析

系统进化树聚类分析结果表明 (图 2), Polycalin 跟棉铃虫的同类基因展示很高的一致性; 而与鳞翅目其它物种的同源基因一致性不高, 与家蚕的同源性 14.9%, 与大红斑蝶 *Danaus plexippus* 同源性 17.1%, 粘虫 *Mamestra configurata* 同源性 40.3%; 与双翅目的中华按蚊 *Anopheles sinensis* 的同源性仅有 12.0%。

2.3 Polycalin 基因在棉铃虫不同发育时期、幼虫肠道不同部位的表达谱分析

Polycalin 在棉铃虫所有发育阶段都有表达 (图 3), 在卵、蛹、成虫期的表达量比较低, 尤其在成虫体内的表达量最低, 但卵、蛹、成虫间 Polycalin 的表达量差异不显著 ($P>0.05$); Polycalin 在幼虫期表达量较高, 尤其是 1~3 龄基因表达量最高, 4 龄及 5 龄表达量有所降低 ($P>0.05$)。

ATGCGGAAATTAATAGTATTAGTGTAACTATTCTGTATTTAGTGCAAGTGTGGCAGTAATACAAACGGGACAATGTGATCAGAGTATTGCAAGTGTAACTCAATCTTGTAT 36
M A K L I V L V F N L F C I F S A S V A V I Q T G Q C D Q S I A V V T N F N L D 40

GCCTTTGGTGGAGATCCATGGTACGACATAGAATCCTACGCCAATACTACCAAGTGGTACTTGAACACGGCTAGATACACTATAAATGCAGACAGATCTATTACAGTACAAAAATCT 276
A F G G D P W Y D I E S Y A N T H Q S G T C N T A R Y T I N A D R S I T V Q N S 80
CAAGTTGTTAAACCAAGCTCTGGCTGTGGCAATGGAGAAGCAACTATTGCCACAGAATCCATCGTAACTCAAGTGAGGATCGGCGGTCAACTGTTCCGATAGATTATTGGGCTCTG 396
Q V V N Q A L A V A N G E A T I A T E S I G K L Q V R I G G S T V P I D Y W V L 120
AGCACTGATTACTGGATACGCGTTGATTTATCTTCCGCAATGTGATGCAACACAGAGAAGTTTCAGTTGGAAGCTGAGCAGAACTCAGTCAGGTTTCACACCGGCAGCTACA 516
S T D Y T G Y A L I Y S C R N V D A N T R E V F S W K L S R T Q S G F T P A A T 160

CAGACTATGACCGGTATTATTATAGTATCGTGCAGTACAAATGACTACATACAGAGACACAGCGCAACGGATGTTTCTACTACCCAGCAATGATCCATCTGCAACTTAT 636
Q T M T G I I N S I A A L S Q N D Y I T R D H S A N G C F Y Y P A N D P S A T Y 200
ATCGATCTGCCTGGCAGCTGCAAACTATTCCAGGACTTACAACTTCAATACGGAGGCTTATCTTGAACATGGTACGAGATCGCCAGATACCCGCAACCAACAGCAAGGCCAGTGT 756
I D L P G T C E T I P G L T N F N T E A Y L G T W Y E I A R Y P P N Q Q G Q C 240
AACAGGGCTACGATGGCGATGCTGGGAACGAATGTCTCGTCTAAACGAACAAGTACTCTGAGTCTTTGGCTTCAATATCTGGCTCAGCGACCTCGGACAATACCGGAAGAATA 876
N R A T Y G D A G N G I V S V L N E Q V L S E S L A S I S G S A T S D N T G R I 280
ACAGTTACTTTTAACTCGGTGGACGCCAAGCCAGGACCTATTCTGACTCGCAACGGACTATCTCAACTATGCTCTGTATACTCTGTACCAATCTTGACAATGGATGGAGAAGA 996
T V T F N I G G Q P Q S Q D L F V L A T D Y L N Y A L V Y S C T N L D N G W R R 320
GTTGCAAGCTGGAACTGAGTAGAACGAAAGCACTAAGCGCAATGCCTTAGAATCATGGATCTTGAATGCTAATACCAAGCACTCCACCCACAGTATACCGGGATACACAACAG 1116
V A S W K L S R T K A L S A N A L E I M D L V I A N T Q A L H P Q Y Y R D T Q Q 360
ACTGATAACGCTTGCTTATCTATCTGTACTGTATGATACCGAAACCACTATCGATTGCTGGAAGCTTGGCGTACGAGCGATAGTTGGCATGCCCACTTTAACAATAAATCTCTAT 1236
T D N A C F Y P V L D G T E T T I D L P G T C A S A A I V G M P N F N I N S Y 400

ACTGGCGTATGGTACGAAATCGAAAGATACCCGCAACCACTCAGCAAGGGCAGTACCAACCGTCTATATACAGAGAAATGAAGCGCTATAACAGTTATGAACAGCAAGTGGTCAAT 1356
T G V W Y E I E R Y P Q P T Q Q G Q C N R A I Y T E N E G V I T V M N S Q V V N 440
GAAGCAATGCTAGTATTTCAGGCGTAGCCAGAGTACATAGCAGAGATAATTCGGAGTATTGCAAGTTACTTCACTATTGGCGGCCAGCAACCAACAGGACCTATACGTAATCTCA 1476
E A N A S I S G V A V I S T D N S G V L Q V T F T I G G Q P T N Q D L Y V L S 480
ACGGATTATATCAGTACTCTATTGTGTACGCTGTACTGATCTAAATAATGGATGGAGAAGAGTGGCAGTTGGAACTTAGTAGAAGTCAGACTGGCGTACCACTAACGACATTAGC 1596
T D Y I S Y S I V Y A C T D L N N G W R R V G S W K L S R S Q T G L T T N D I S 520
GCCATCAACAGCTATCGTATACCGGCTTAAACCAAAATCTTCCGATCCCAAGTCAGACCAACCAAGCTTGTCTTACTATCTGTGTCCCAACACTCCGACAGCACTATC 1716
A I N N V I A T T Q G L N Q N Y F R S T S Q T N Q A C F Y Y P V F P T L P D T I 560

GACCTGCTGGACCTTGCAGAACTACAACGCTCTCTCTATGCCCACTTAAATATAAATACTACCAAGGATTGTGGTACGAAAGTGTCTAGATACCCGCAACCAACAGCAGGAGACAA 1836
D L P G P C E T T T V S P M P N F N I N N Y Q G L W Y E V A R Y P Q P T Q Q G Q 600

TGTAACCGCGCAACGTACGGTGCCAACTGTACCAACAGGCAAGTGTGAATCAGGGTCTGCTATCGATAGATGGTACAATGCTCTTCCGGATAGCAGCGGAAGATTGCAAGTTACA 1956
C N R A T Y G A N T V T N R Q V L N Q G G A L S I D G T I A L P D S S G R L Q V T 640
TTCAACATTGGTGGCAGCCCAACTACCGCACTATTAGTACTGTCAACGGACTACGAGAACTATTCTATTGTATACACTTGTCAAAATATAGATGGAGAAAGACGAGTGGCAGT 2076
F N I G G T P Q T T E L V L S T D Y E N Y S I V Y T C Q N I D G G K R R V G S 680

TGGAAGCTGAGTAGAACCCCACTGACTCCGCAAGCCATTTCACACATAAACAATGTATGATACCACTCAAGGTCTAAAGAAAGAGTATTACCAATCCACAAGTCAGAGTAAACGAG 2196
W K L S R T P T L T P Q A I S N I N N V I D T T Q G L K E E Y Y Q S T S Q S N E 720
GCATGCTTCTACTACCTACCGGACTACTGAGAAATGAAATCAGATTACCTTACCTGCGACACCGCACTCGTGAATCTCGTCTTAACTCACTGATTCGACGACCTGGTAC 2316
A C F Y Y P T G P T E N E I R L P F T C D T A L R G I S S F N L T A F A R T W Y 760

CACATTCAAAGATACGACCCAGTTTCAGGCATAACCTGCAGTGGTACTAGATTACAGTGAATCTGGTAATACGCTAAATGTCGTTGACTTCGAAGTTGTTGGCGAAGAAATGGTAACC 2436
H I Q R Y D P V G I T C S G T R F T V N S G N T L N V V D F E V V G E E L V T 800
GTTGAAGTACCGCCGAATTAATCTACTGATGGCAGCGGACAGTATTGTTGACTACTACAAATGGTAGCAAACTCTGAGATTGCTCTACATATTGGCTACTGACTACACTGGA 2556
V E G T A R I N S T D G S G Q L L L T T T N G D E T S E I V L Y I L A T D Y T G 840

TACGCTGTGGCATTATCATGCGAAATGTTGATGACGACTGGAGACGAGTTCGTGATGCGAGTTGAGTAGTGGCAGGACACTGCCAGCGCTGCGGTCCCTGTATCACCAGCTTGATA 2676
Y A V A L S C E N V D D W R R V R A W Q L S G R T L P A A A V P V I T T L I 880
AACAACCACTGGAGCTGCTTCTCTACTTCAACGCGGTGACGCAAAACGAAGATTGTGAGAACCCAGCTCAGCTATGCTCTTCAAGAGCAGTATTATTGTGATATTGTATGACT 2796
N N Q L E L H S P Y F N A V T Q N E D C Q E P S S A M L F K S S I I V I F V C T 920

GTATTGCACGCCCTATGGAATTCAAACCATAGGATTAAGTTTGAAGTACTGAGCGGTTTGAACICTTTCAGTTGCTTAAATTCGTGTCAAAATATGTAATTTTATATAAATAAAT 2916
V L H A L W * 926
TATTGTATTATGAATACATTATTTAAGTTCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2981

图1 棉铃虫 Polycalin 基因的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of Polycalin gene of *Helicoverpa armigera*

起始密码子和终止密码子加粗标出；潜在的 O-糖基化位点用空心三角在下方标出；N-糖基化位点用实心的方框标出；

GPI 结合位点用实心的三角标出；信号肽用双划线画出；阴影部分为保守区域。

Start and terminal codons are shown as bold. Potential O-glycosylation sites are marked by hollow triangles. N-glycosylation sites are marked by hollow box. The GPI anchor point is showed as a solid triangles. The C-terminal signal peptide sequences is double underlined. The consensus sequence are marked in shadow.

在 5 龄棉铃虫的肠道组织中, Polycalin 在中肠中的表达量最高, 围食膜、前肠、后肠的表达量较低; 中肠与围食膜、前肠、后肠的表达量差异显著 ($P < 0.05$), 但围食膜、前肠、后肠间表达量的差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.4 棉铃虫取食 Bt 蛋白后中肠 Polycalin 的表达量变化

棉铃虫幼虫取食活化的 Cry1Ac 毒素 24 h 后, 中肠 Polycalin 表达量总体降低 (图 5), 取食含 20 $\mu\text{g/mL}$ 活化蛋白的棉铃虫中肠 Polycalin

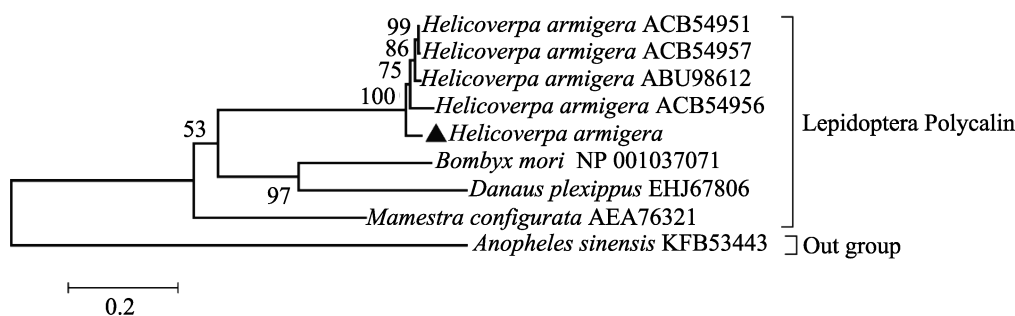


图 2 不同物种 Polycalin 间同源性进化树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic trees among Polycalin from different species

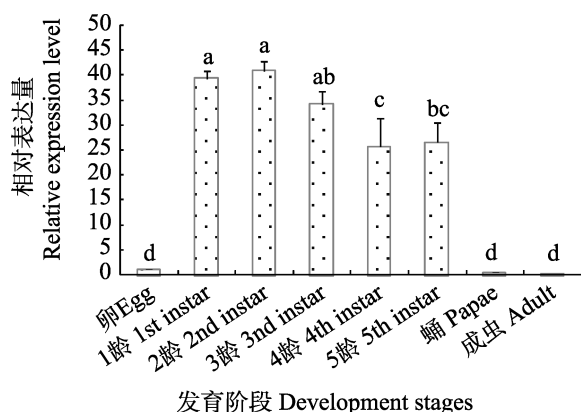


图 3 棉铃虫 Polycalin 在不同发育阶段中的表达量

Fig. 3 The expression level of Polycalin in different development stages of *Helicoverpa armigera*

不同字母表示 $P < 0.05$ 水平显著差异。下图同。

Histograms with different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

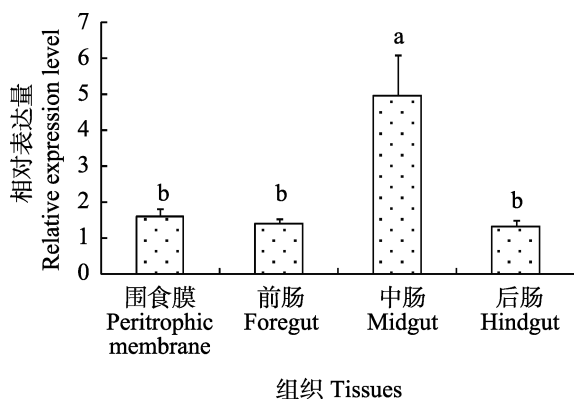


图 4 棉铃虫 Polycalin 基因在不同组织中的表达量

Fig. 4 The expression level of Polycalin in different tissues of *Helicoverpa armigera*

表达量明显低于对照, 虽然取食含 60 $\mu\text{g/mL}$ 活化蛋白的棉铃虫 Polycalin 表达量也有所降低,

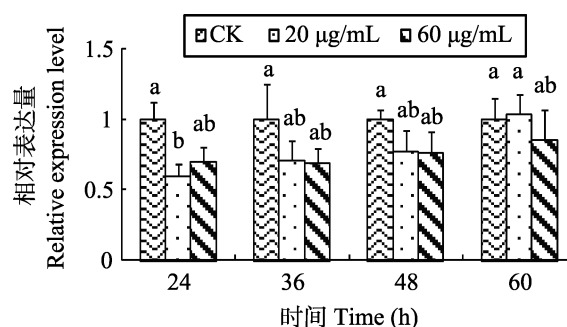


图 5 棉铃虫取食活化的 Cry1Ac 毒素后 Polycalin 的表达量

Fig. 5 The expression level of Polycalin in *Helicoverpa armigera* after larvae fed on artificial diet containing activated Cry1Ac toxin

但与对照差异处理不显著 ($P > 0.05$); 取食 36 h、48 h 后, 处理组棉铃虫中肠 Polycalin 表达量仍低于对照组, 但差异不显著; 随着处理时间的延长, 处理组棉铃虫中肠内的 Polycalin 表达量逐渐恢复, 取食 60 h 后的棉铃虫与对照组差异减少。

3 讨论

我们获得的棉铃虫 Polycalin 的 cDNA 全长序列中, 含有 N-、O-糖基化位点, C 末端存在 2 个 GPI 结合位点。这与已经报道的家蚕和棉铃虫的序列相似 (Mauchamp *et al.*, 2006; Angelucci *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014), 在家蚕和棉铃虫的 Polycalin 序列中都存在着糖基化位点和 GPI-锚定位点。Bt 杀虫作用过程中, 寡聚化的 Cry1Ac 与 GPI 锚定的 N-乙酰氨基半乳糖残基有高度的亲和性, 已经鉴定出的能够与 Cry1Ac 毒素结合的 APN、ALP 受体都是糖蛋白, 钙粘蛋

白也含有糖基化位点 (Krishnamoorthy *et al.*, 2006; Pardo-López *et al.*, 2006)。因此, 根据 Polycalin 的序列特征我们推测 Polycalin 可能与 Cry1A 类蛋白结合, 这有待以后的试验进一步验证。经同源序列比对及系统发育树分析, 我们发现克隆获得的 Polycalin 基因跟棉铃虫的同类基因展示很高的一致性, 而与鳞翅目其它物种的一致性不高, 说明该基因在物种间变异较大。

Chen 等 (2014) 发现家蚕中肠的 Polycalin 蛋白 CHBP (Chlorophyllid α binding protein) 仅在 5 龄幼虫的中肠表达, 在其他部位如睾丸、卵巢、头、脂肪体、表皮、血淋巴、马氏管、丝腺等都不表达, 且在中肠的前部表达量最高, 分别是中肠中部和后部的 3 倍、6 倍。我们的试验结果显示, 棉铃虫 Polycalin 基因也主要是在棉铃虫中肠表达, 在中肠中的表达量显著高于围食膜、前肠、后肠的表达量。而且通过比较我们发现 Polycalin 在棉铃虫所有发育阶段都可以表达, 幼虫期表达量较高, 尤其在 1~3 龄幼虫体内表达量最高, 在卵、成虫和蛹中的表达量较低。因此, Polycalin 可能在棉铃虫、家蚕等昆虫的代谢过程还起到一定的作用。

用家蚕核型多角体病毒 BmNPV (*Bombyx mori* nuclearpolyhedrosis virus) 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 处理家蚕 24 h 后, CHBP 表达量明显下降, 48 h 后表达量逐渐升高, Chen 等 (2014) 推测 CHBP 可能有抗菌活性和先天免疫相关。我们用活化的 Cry1Ac 蛋白饲喂棉铃虫 4 龄幼虫 24 h 后, 中肠 Polycalin 表达量降低; 取食 36 h、48 h 后, 处理组棉铃虫中肠 Polycalin 表达量仍低于对照组, 但差异不显著; 随着处理时间的延长, 处理组棉铃虫中肠内的 Polycalin 表达量逐渐恢复, 取食 60 h 与对照组差异减少。这说明棉铃虫中的 Polycalin 基因的表达量受到活化的 Cry1Ac 的影响, 很有可能在棉铃虫的先天免疫中也发挥了一定的作用。

围食膜存在 Cry1Ac 重要的结合位点 (Rodrigo-Simón *et al.*, 2006), Campbell 等 (2008) 从棉铃虫围食膜基质的 SDS-PAGE 回

收物中提取到了 Polycalin 衍生的多肽, Hu 等 (2012) 在家蚕的围食膜上也检测到了 CHBP, 因此他们认为围食膜上 CHBP 在抵御病菌感染的过程中也起到了一定的作用。我们也检测到 Polycalin 在棉铃虫的围食膜上表达, 且表达量仅次于中肠上的表达量, 因此棉铃虫围食膜上的 Polycalin 蛋白很可能也在抵御病菌感染的过程中起了作用。

大蒜植物血凝素 (*Allium sativum* leaf agglutinin, ASAL) 既能防治鳞翅目的咀嚼式害虫又能防治同翅目的刺吸式害虫, 有希望成为未来防治害虫的理想之选, 在大蒜植物血凝素杀虫过程中, 必须要与昆虫中肠上一些蛋白结合才能发挥作用, 如氨肽酶 N (Aminopeptidase N, APN)、碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、Polycalin 等 (Upadhyay *et al.*, 2010; Upadhyay and Singh, 2012)。因此, Polycalin 不仅可能是 Cry1Ac 的结合蛋白, 在 Bt 的杀虫机制中发挥着作用, 而且它还是葱属植物凝集素的重要结合蛋白, 在引起昆虫生理混乱甚至是引起昆虫死亡的过程中发挥着重要作用。

参考文献 (References)

- Angelucci C, Barrett-Wilt GA, Hunt DF, Akhurst RJ, East PD, Gordon KHJ, Campbell PM, 2008. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: Identification of proteins binding the d-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(7): 685–696.
- Arenas I, Bravo A, Soberon M, Gómez I, 2010. Role of alkaline phosphatase from *manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17): 12497–12503.
- Bagla P, 2010. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. *Science*, 327(5972): 1439.
- Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ, 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4): 279–286.
- Chen L, Yang R, Hu XL, Xiang XW, Wu XF, 2014. Expression analysis of chlorophyllid α binding protein, a secretory, red

- fluorescence protein in the midgut of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 21(1): 20–30.
- Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Clifton EH, Dunbar MW, Hoffmann AM, Ingber DA, Keweshan RS, 2014. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14): 5141–5146.
- Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Gould F, Bruce E, 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3): 192–197.
- Hossain DM, Shitomi Y, Moriyama K, Higuchi M, Hayakawa T, Mitsui T, Sato R, Hori H, 2004. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4604–4612.
- Hu X, Chen L, Xiang X, Yang R, Yu S, Wu X, 2012. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 39(4): 3427–3434.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah LJ, Ning CM, Liu CX, Wu KM, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 6(3): e17606.
- Krishnamoorthy M, Jurat-Fuentes JL, McNall RJ, Andacht T, Adang MJ, 2006. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3): 189–201.
- Kenneth JL, Thomas DS, 2011. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Liu CX, Wu KM, 2011. Current progress in research and development of transgenic cotton and a strategic prospect for China. *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(6): 11–17. [刘晨曦, 吴孔明, 2011. 转基因棉花的研发现状与发展策略. 植物保护, 37(6): 11–17.]
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2000. The screening study of *Helicoverpa armigera* resistance and cross-resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 33(4): 46–53. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2000. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学, 33(4): 46–53.]
- Mauchamp B, Royer C, Garel A, Jalabert A, Rocha MD, Grenier AM, Vinh VLJ, Mita K, Kadono K, Chavancy G, 2006. Polycalin (chlorophyllid A binding protein): A novel, very large fluorescent lipocalin from the midgut of the domestic silkworm *Bombyx mori* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 623–633.
- Pardo-López L, Soberon M, Bravo A, 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *Fems Microbiology Reviews*, 37(1): 3–22.
- Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 255–281.
- Rodrigo-Simón A, Maagd RA, Avilla C, Bakker PL, Molthoff J, Gonzalez-Zamora JE, Ferre J, 2006. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2): 1595–1603.
- Storer NP, Kubiszak ME, King JE, Thompson GD, Santos AC, 2012. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3): 294–300.
- Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y, 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6): 510–521.
- Tabashnik BE, Huang F, Ghimire MN, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, Yang YJ, WuYD, Gahan LJ, Heckel DG, Bravo A, Soberón M, 2011. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biology*, 29(12): 1128–1131.
- Tiewsi K, Wang P, 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34): 14037–14042.
- Upadhyay SK, Singh PK, 2012. Receptors of garlic (*Allium sativum*) lectins and their role in insecticidal action. *Protein Journal*, 31(6): 439–446.
- Upadhyay SK, Mishra M, Singh H, Ranjan A, Chandrashekar K, Verma PC, Singh PK, Tuli R, 2010. Interaction of *Allium sativum* leaf agglutinin with midgut brush border membrane vesicles proteins and its stability in *Helicoverpa armigera*. *Proteomics*, 10(24): 4431–4440.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL, 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1): 1–12.
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm, in multiple crops in china in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.
- Xiao YT, Zhang T, Liu CX, Heckel DG, Li XC, Tabashnik BE, Wu KM, 2014. Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, doi:10.1038/srep06184.