

# 棉铃虫中肠氨肽酶 APN4 与 Cry1Ac、Cry2Aa 结合能力的比较\*

袁向东<sup>1\*\*</sup> 葛朝虹<sup>2\*\*</sup> 肖玉涛<sup>1</sup> 梁革梅<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 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;

2. 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

**摘要** 【目的】 Bt 杀虫蛋白 (*Bacillus thuringiensis*) 具有高度的靶标特异性, 已经被广泛用于农业害虫防治。Bt 杀虫蛋白要发挥杀虫活性, 必须首先与其受体蛋白结合, 氨肽酶 N (Aminopeptidase N) 是一类重要的 Bt 受体蛋白。因此, 分析该受体与 Bt 杀虫蛋白的结合能力, 可为进一步明确不同 Bt 的分子作用机制、Bt 的抗性治理以及新 Bt 的开发应用等提供借鉴。【方法】 本文利用 Ligand blot 和 Elisa 方法比较了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠 APN4 (Aminopeptidase N4, APN4) 与 Cry1Ac、Cry2Aa 的结合能力。

【结果】 原核表达的 APN4 片段与活化的 Cry1Ac、Cry2Aa 都可以结合, 解离常数 ( $K_d$ ) 分别是 48.59 nmol/L 和 21.73 nmol/L。【结论】 APN4 片段与 Cry1Ac、Cry2Aa 的结合能力在数量级上不存在显著性差异。

**关键词** 棉铃虫, *Bacillus thuringiensis*, 氨肽酶 N (aminopeptidase N), 结合动力学

## Comparison of the binding affinity of the APN4 receptor in *Helicoverpa armigera* (Hübner) to the Cry1Ac and Cry2Aa insecticidal proteins

YUAN Xiang-Dong<sup>1\*\*</sup> GE Zhao-Hong<sup>2\*\*</sup> XIAO Yu-Tao<sup>1</sup> LIANG Ge-Mei<sup>1\*\*\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Insect Pests and Plant Diseases, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract** [Objectives] Bt (*Bacillus thuringiensis*) insecticidal proteins have been widely adopted to control agricultural pests because of their high target specificity. The binding of a Bt insecticidal protein to its specific receptor in the insect midgut plays a key role in the insecticidal action process. Aminopeptidase N (APN) is one of the major Bt protein receptors. To better characterize the molecular mechanism underlying the insecticidal activity of different Bt insecticidal proteins, and lay the foundation for Bt resistance management and novel Bt insecticidal protein development, we analyzed the binding affinity of aminopeptidase N4 (APN4) to the Cry1Ac and Cry2Aa insecticidal proteins in *Helicoverpa armigera*. [Methods] The binding affinity of aminopeptidase N4 (APN4) was assessed using ligand blot analysis and an ELISA binding assay, respectively. [Results] The results show that recombinant APN4 could bind to both Cry1Ac and Cry2Aa; their respective dissociation constants were 46.7 nmol/L and 26.5 nmol/L. [Conclusion] The results suggest that there was no significant difference in the binding affinity of APN4 to Cry1Ac and Cry2Aa in *H. armigera*.

**Key words** *Helicoverpa armigera*, *Bacillus thuringiensis*, aminopeptidase N, binding dynamics

\* 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: 447193089@qq.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: gmliang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2015-01-28, 接受日期 Accepted: 2015-03-30

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性菌, 在形成芽孢时产生具有杀虫活性的伴孢晶体蛋白 (Bulla *et al.*, 1980), 即 Bt 杀虫蛋白。Bt 杀虫蛋白因其具有高效的杀虫活性、较高的靶标特异性以及相对安全的生态属性, 长期以来一直被大规模开发并广泛应用于重要农林害虫的综合防治。然而大面积单一模式的转基因抗虫作物的种植, 增加了害虫对 Bt 杀虫蛋白的耐抗性, 使得大规模的抗性暴发成为可能。自 McGaughey 等 (1985) 报道印度谷螟 *Plodia interpunctella* 对 Bt 产生抗性以来, 目前发现至少有 15 种鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白产生了不同程度的抗性 (Ferre *et al.*, 1991)。种植转基因 Bt 棉 (主要表达 Bt Cry1A 杀虫蛋白) 一直以来都是防治棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的最重要措施, 然而报道显示持续大面积种 Bt 棉的种植加大了棉铃虫等靶标害虫的选择压, 增加了其对 Bt 杀虫蛋白抗性暴发的风险性 (Wu and Guo, 2005)。因此, 研究 Bt 杀虫蛋白的杀虫机理, 开发具有高效杀虫活性的新型 Bt 杀虫蛋白对持续利用 Bt 作物防控重要农林害虫至关重要。

在 Bt 的杀虫过程中, Bt 与昆虫中肠受体蛋白的结合起着非常重要的作用。由于不同类型 Bt 杀虫蛋白, 如 Cry2A、Vip3A 等存在杀虫特异性, 因此可能存在与 Cry1A 结合的不同昆虫中肠受体蛋白 (Masson *et al.*, 1995)。许多研究表明, Bt 与昆虫中肠受体蛋白具有高度的亲和性, 昆虫对 Bt 抗性的产生与结合能力的下降密切相关, 即结合能力的改变被认为是昆虫对 Bt 产生抗性的一种重要机制 (Hofmann *et al.*, 1988; Xie *et al.*, 2005; Arenas *et al.*, 2010)。已经报道的在昆虫中肠上 Cry1A 的主要受体有钙粘蛋白、氨肽酶、碱性磷酸酶等, 这些受体在 Bt 抗性中发挥着重要的作用 (Nagamatsu *et al.*, 1999; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011; Tiewisiri and Wang, 2011)。

同时表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 蛋白的转基因抗虫棉花, 已经在美国、澳大利亚、墨西哥等国已开始商业化种植。Cry2A 类蛋白被作为二代抗虫棉的首选, 不仅因为 Cry2A 类蛋白具有高效的杀虫效果, 还因为 Cry2A 存在与 Cry1A 蛋白

不同的作用机制, 与 Cry1A 蛋白不容易产生交互抗性 (Wei *et al.*, 2015)。Hernández-Rodríguez 等 (2008) 对 Cry2Aa、Cry2Ab 和 Cry2Ae 蛋白的同源竞争分析实验表明, 它们的同源性很高, 而且具有共同的结合位点, 但是这些结合位点不能被 Cry1Ac 识别。Tabashnik 等 (2009) 也报道了 Cry1Ac 和 Cry2Ab 对红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 存在“不对称交互抗性”, 即对 Cry2Ab 产生抗性的红铃虫导致了对 Cry1Ac 的交互抗性, 而对 Cry1Ac 具有抗性的红铃虫对 Cry2Ab 不产生交互抗性。由于目前 Cry2A 类蛋白的具体的受体和作用机制目前还没有报道, 因此产生这种不对称交互抗性现象是否意味着在昆虫中肠上存在部分与 Cry1A 类相同的受体等内在机制也不明确。

本文选择了一类棉铃虫中肠上 Cry1A 的重要受体蛋白—氨肽酶 APN4 作为靶标受体, 通过比较重组表达的 APN4 功能结合区与 Cry1Ac、Cry2Aa 的结合能力, 分析棉铃虫 APN4 是否也是 Cry2A 的潜在受体蛋白, 该方法体系的建立可为进一步明确不同 Bt 的作用机制、新 Bt 的开发应用等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试昆虫: 棉铃虫为作者实验室用人工饲料饲养的敏感种群, 1996 年采自河南新乡棉田, 在室内用人工饲料饲养至今, 未接触任何杀虫剂 (Liang *et al.*, 1999)。待幼虫生长至 5 龄, 将其放置冰上切取中肠, 去除饲料, 用预冷的 0.7% NaCl 冲洗并用吸水纸将其吸干, 立即放入液氮中冷冻, 收集的中肠样品放入 -80℃ 保存备用。

供试药剂: 活化的 Cry1Ac 和 Cry2Aa 杀虫蛋白蛋白购买于美国 Envirologix 公司。

### 1.2 重组 APN4 受体蛋白的原核表达

1.2.1 总 RNA 的提取 取 10 头 5 龄棉铃虫幼虫的中肠, 放入无 RNAase 的 1.5 mL 离心管中, 加入 600  $\mu$ L 的 Trizol reagent 充分匀浆, 按照

TaKaRa 公司使用说明提取总 RNA, 将提取的 RNA 按照 TIANGEN FastQuant RT Kit (with gDNase) 说明合成第一链 cDNA。

**1.2.2 引物设计** 根据 GenBank 中棉铃虫 APN4 (AY181026) 的序列, 在 Cry1A 蛋白结合区设计引物: APN4 正向引物 5'-GGATCCAACCTC-GTCACCTGCTTCTGG-3', 反向引物 5'-CTCG-AGAGTAATCGGTCTCATCCCTCA-3' 为了便于将目的基因克隆到表达载体上, 在正向、反向引物中分别设计了 *Bam*H I、*Xho*I 酶切位点 (以下划线表示)。

**1.2.3 PCR 产物的克隆和鉴定** 以合成的 cDNA 第一链为模板, 反应体系为 cDNA 1  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, ExTaq 0.25  $\mu$ L, 正向引物和反向引物各 0.5  $\mu$ L, 加水至 25  $\mu$ L, 混匀、离心后, 放入 PCR 仪扩增。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 接着进行 35 个循环, 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增电泳完毕后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定、纯化, 并回收目的片段。按使用说明将回收的 PCR 产物克隆到 pEASY-T3 克隆载体, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选, 随机挑取 10 个白色菌落, 培养后进行菌液 PCR 鉴定, 将鉴定的阳性克隆进行测序鉴定。

**1.2.4 重组表达载体的构建** 将重组的 pEASY-T3/APN 经 *Bam*H I 和 *Xho*I 工双酶切后切胶回收 900 bp 左右的片段, 在 T4 连接酶的作用下与原核表达载体 pET30a 于 22 $^{\circ}$ C 连接 10 min。同时转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 过夜培养, 然后进行菌液 PCR 的鉴定及重组质粒的测序鉴定。

**1.2.5 外源基因的诱导表达** 提取经鉴定正确的质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 然后涂平板过夜培养。挑取单菌落于 10 mL 含有卡那抗生素的 LB 培养基中, 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达 0.6 左右, 加入 IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷), 25 $^{\circ}$ C 220 r/min 诱导过夜。8 000 r/min 离心 15 min 收集菌液, 去除上清, 用 PBS 溶液在 50 mL 离心管中重悬浮菌体, 将离心管置于冰上超声破碎后, 18 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 分别取上清和包涵体进行 SDS-PAGE 电泳检测。

### 1.3 Western blot 分析

首先将表达的 APN4 蛋白片段从 SDS-PAGE 胶上转移到 PVDF 膜上 (200 mA, 1 h), 然后用封闭液 (PBST+5% 脱脂奶粉) 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 接着用封闭液稀释一抗 (小鼠抗 His 标签抗体), 以 1:10 000 的比例, 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的二抗, 以 1:10 000 的比例, 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 最后将膜置于 ECL 化学发光液中, 用 ImageQuant LAS4000mini 发光成像分析仪进行检测拍照。

### 1.4 Ligand blot 分析

将 Western blot 鉴定正确的目的蛋白进行大量表达, 通过镍离子柱亲和层析将所表达的目的蛋白进行分离纯化。将表达纯化的 APN4 多肽片段进行 Ligand blot 分析, 将表达的 APN4 蛋白片段从 SDS-PAGE 胶上转移到 PVDF 膜上, 接着用封闭液稀释活化的 Cry1Ac、Cry2Aa (均为 10  $\mu$ g/mL), 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入封闭液稀释的抗 Cry1Ac、Cry2Aa 的一抗, 以 1:10 000 的比例, 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的二抗, 以 1:10 000 的比例, 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 最后将膜置于 ECL 化学发光液中, 用 ImageQuant LAS4000mini 发光成像分析仪进行检测拍照。

### 1.5 重组 APN4 蛋白的纯化

为了获得大量的 APN4 蛋白, 将 50 mL pET32a-APN4 转化的 BL21 (DE3) 菌液重新加到 5 L 新鲜的 LB 液体培养基, 在 1 mmol/L IPTG 诱导浓度, 25 $^{\circ}$ C 条件下诱导 10 h。诱导完成后 4 $^{\circ}$ C 7 000 r/min 离心 30 min 收集菌体, 然后用 PBS 缓冲液 (135 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 8 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) 重新悬浮。将悬浮起来的菌液放置在冰上进行超声破碎 15 min (5 s 超声, 5 s 暂停) 和 4 $^{\circ}$ C 18 000 r/min 高速离心 30 min。分别收集上清和

包涵体。将包涵体用 LE Buffer (100 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L urea, pH 8.0) 溶解, 接着  $4^\circ\text{C}$  18 000 r/min 离心 30 min。取上清至 His-tag 亲和层析柱, 用 Wash Buffer (100 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L Imidazole, 8 mol/L urea, pH 8.0) 进行冲洗柱子。接着用 Elution Buffer (100 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L Imidazole, 8 mmol/L urea, pH 8.0) 洗脱目的蛋白。将收集到的纯化蛋白用 12% 的 SDS-PAGE 进行检测, 并用于后期的 ELISA 结合实验。

### 1.6 Elisa 结合分析

**包被蛋白:**将 0.5  $\mu\text{g}$  原核表达的 APN4 片段悬浮在重碳酸盐包被液中, 在 96 孔 ELISA 板中加入 100  $\mu\text{L}$  含有蛋白的包被液,  $4^\circ\text{C}$  过夜封闭, 接着用 250  $\mu\text{L}$  的 PBST 洗去未结合的蛋白, 重复 2 次。封闭: 然后用 250  $\mu\text{L}$  封闭液 (含有 2% 脱脂牛奶的 PBST)  $37^\circ\text{C}$  封闭 2 h, 接着用 250  $\mu\text{L}$  的 PBST 洗涤 3 次。孵育 Bt 杀虫蛋白: 用封闭液将 Bt 杀虫蛋白稀释成不同浓度的梯度, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 接着用 250  $\mu\text{L}$  的 PBST 洗去未结合的 Bt 杀虫蛋白, 重复 3 次。孵育一抗: 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  对应杀虫蛋白的 (Cry1Ac、Cry2Aa) 一抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 接着用 250  $\mu\text{L}$  的 PBST 洗去未结合的一抗, 重复 3 次。孵育二抗: 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  带有 HRP 标记的羊抗兔二抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 接着用 250  $\mu\text{L}$  的 PBST 洗去未结合的二抗, 重复 3 次。显色: 在酶标板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液, 室温避光孵育 25~30 min, 反应产物呈蓝色, 接着每孔加入 50  $\mu\text{L}$  0.5 mmol/L 硫酸终止显色, 此时蓝色产物变为亮黄色, 然后将酶标板置于酶标仪中, 450 nm 波长下读取数据, 并使用 Sigma Plot 12.5 版本进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫中肠 APN4 基因的克隆及表达载体的构建

根据蓝白斑筛选阳性重组子, 然后用自设引

物进行菌液 PCR 检测, 检测结果 APN4 目的片段长度约为 900 bp, 与预期结果一致 (图 1:A)。选取棉铃虫中肠 APN4 能与 Bt 结合的区域进行原核表达, 所选 APN4 基因片段为 897 bp, 编码 299 个氨基酸残基, 预测分子量为 32 ku。该片段含有 4 个典型的 N-糖基化位点, 即 NXS/T (X 是除了脯氨酸以外的其他氨基酸)。克隆载体 pEASY-T3-APN 经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 切胶回收 900 bp 大小的片段, 与经同样酶切的原核表达载体 PET30a 连接。转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$ , 提取质粒 DNA, 测序鉴定结果与目的基因片段比对结果一致, 说明原核表达载体构建成功 (图 1:B)。

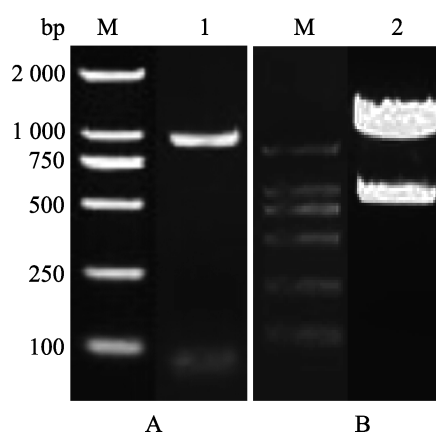


图 1 棉铃虫中肠 APN4 基因片段 PCR 扩增结果 (A) 及阳性克隆酶切鉴定 (B)

Fig. 1 PCR product of APN4 gene from the larvae midgut of *Helicoverpa armigera* (A) and identification of positive clones by enzymatic digestion (B)

M: 标准分子量; 泳道 1: APN4 的 PCR 产物; 泳道 2: 重组载体 pEASY-T3-APN 的 *Bam*HI、*Xho*I 酶切酶切。

M: Molecular weight marker DL2000; Lane 1: PCR product of APN4 gene; Lane 2: pEASY-T3/APN digested by *Bam*HI and *Xho*I.

### 2.2 棉铃虫 APN4 基因片段在大肠杆菌中的表达及可溶性检测

将鉴定好的重组质粒 pET30a-APN4 转化的 BL21 (DE3) 菌, 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导后, 可产生 40 ku 左右的特异性蛋白质条带。将菌液超声波破碎后, 18 000 r/min,  $4^\circ\text{C}$ , 离心 30 min, 分别将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果

表明所表达的 APN4 受体蛋白主要在包涵体表达, 只有极少的一部分在上清表达 (图 2)。

### 2.3 Western blot 分析

以 HIS 标签的鼠抗为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠为二抗, 对表达产物进行 Western blot 分析, 结果表明 pET30a-APN4 经 IPTG 诱导产生的 40 ku 的蛋白条带与 His 抗体发生很强的免疫反应, 表明融合蛋白 APN4 得到了很好的表达, 即目的蛋白表达成功 (图 2)。

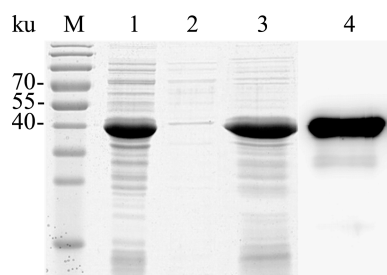


图 2 APN4 表达产物的 SDS-PAGE 分析及 Western 印迹杂交鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed APN4 product and western blot analysis

M: 标准分子量; 1: pET30a-APN 转化 BL21 (DE3) 的表达产物; 2: 经超声波处理过的上清; 3: 经超声波处理过的包涵体; 4: Western blot 检测 pET30a-APN4 转化 BL21 (DE3) 的表达产物。

M: Molecular weight marker; Lane 1: Expressed product of pET30a-APN; Lane 2: Soluble protein of APN treated with ultrasound; Lane 3: Insoluble protein of APN treated with ultrasound; Lane 4: Western blot analysis expressed product of pET30a-APN4.

### 2.4 重组 APN4 蛋白的纯化

为使 APN4 受体蛋白高效表达, 我们对 APN4 的表达条件进行了优化, 在最优条件下进行 APN4 的大量表达, 经过 His-tag 亲和层析柱纯化后, SDS-PAGE 电泳结果显示在 40 ku 左右有特异性蛋白条带, 和预期结果一致。将纯化后的 APN4 进行透析、超滤浓缩蛋白浓度为 1 mg/mL, 为后期的 ELISA 结合做准备 (图 3)。

### 2.5 Ligand blot 分析

Ligand blot 分析结果表明, 活化的 Cry1Ac、

Cry2Aa 分别能与表达的约 40 ku 蛋白结合, 说明表达的 APN4 多肽片段可以结合活化的 Cry1Ac、Cry2Aa 杀虫蛋白 (图 3)。

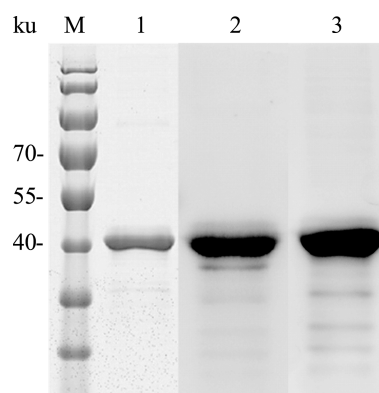


图 3 棉铃虫 APN4 表达产物的纯化及 Ligand blot 检测活化 Cry1Ac、Cry2Aa 杀虫蛋白与纯化的 APN4 受体结合

Fig. 3 The expressed and purified product of pet30a-APN4 of *Helicoverpa armigera* and binding assays of the activated Cry1Ac、Cry2Aa insecticidal protein binding to purified APN4 receptor by Ligand blot analysis

M: 标准分子量; 1: 纯化后的 pET30a-APN4 融合蛋白; 2: 活化的 Cry1Ac+纯化的 APN4; 3: 活化的 Cry2Aa+纯化的 APN4。

M: Molecular weight marker; Lane 1: The purified protein pet30a-APN4; Lane 2: The activated Cry1Ac+the purified APN4; Lane 3: The activated Cry2Aa+the purified APN4.

### 2.6 Elisa 结合分析

经 Elisa 检测发现, 活化的 Cry1Ac、Cry2Aa 可以与表达的 APN4 结合, 结合能力随着 Cry 蛋白浓度的增加而增加, 两种蛋白与 APN4 的结合能力相似,  $K_d$  值分别是 48.59 nmol/L 和 21.73 nmol/L (图 4)。

## 3 讨论

虽然具有杀虫特异性的 Bt 蛋白与昆虫中肠的受体蛋白具有高度亲和力, 但也有报道证明 Bt 杀虫蛋白与受体结合力能力的高低与杀虫蛋白的毒力并没有线性关系 (Wu and Aronson, 1992; Chen *et al.*, 1995; Jime'nez-Jua'rez *et al.*, 2007)。Gajendra 等 (2002) 比较了 Cry1Ac 和

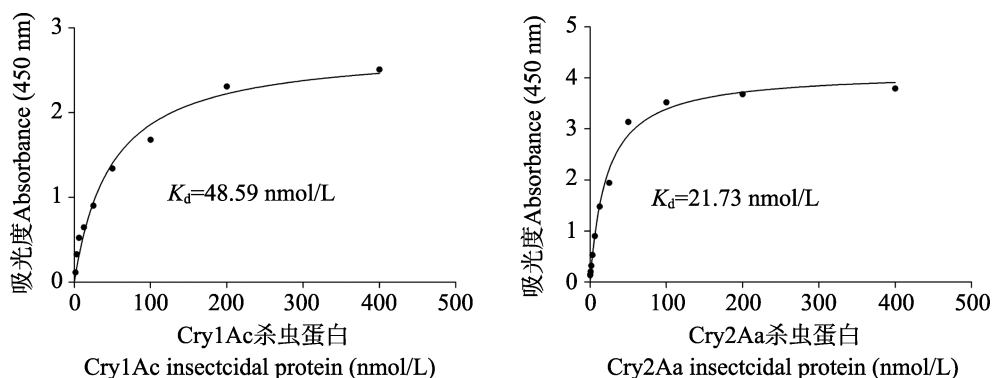


图4 Elisa分析表达的APN4受体蛋白与活化杀虫蛋白Cry1Ac、Cry2Aa的结合能力  
Fig. 4 The binding affinity comparison of APN4 receptor in *Helicoverpa armigera* with Cry1Ac and Cry2Aa insecticidal proteins

Cry2Aa对棉铃虫的毒力效果,发现Cry2Aa的 $LC_{50}$  (1.57  $\mu\text{g/mL}$ )值低于Cry1Ac (0.24  $\mu\text{g/mL}$ ),但本文测定的Cry1Ac、Cry2Aa与APN受体的结合能力在数量级没有显著差异。我们推测,Cry1Ac和Cry2Aa的毒力效果不同,主要是由于在棉铃虫中肠上存在多种受体蛋白,因此,可能其他受体蛋白与Cry1Ac或Cry2Aa结合能力不同,或存在不同类型的受体蛋白。另外,本文是在体外进行的结合试验,与在体内的结合有一定的差异,昆虫中肠内碱性环境中各种蛋白酶、水解酶等都会对Bt毒力造成影响 (Gould *et al.*, 1992; Escriche *et al.*, 1995)。如Cry1Ac原杀虫蛋白在被活化的过程中,被蛋白酶水解掉C末端的疏水区域,从而使Cry1Ac更容易形成寡聚体,但是Cry2Aa的活化过程中不存在C末端水解现象 (Bravo *et al.*, 2004; Adang *et al.*, 2014)。

Arenas等(2010)发现Cry1Ab杀虫蛋白分别以 $K_d=101$  nmol/L、 $K_d=267$  nmol/L的低亲和力与烟草天蛾 *Manduca sexta* 的APN、碱性磷酸酶ALP受体结合,提升杀虫蛋白单体在中肠质膜表面的浓度以便传递给类钙粘蛋白,随后类钙粘蛋白以 $K_d=3.3$  nmol/L的高亲和力与杀虫蛋白单体结合 (Vadlamudi *et al.*, 1995),并催化杀虫蛋白进一步酶切而促进寡聚化;寡聚化的杀虫蛋白以 $K_d=0.5$  nmol/L、 $K_d=0.6$  nmol/L的高亲和力与ALP及APN再次结合,促进穿孔形成,最终导致靶标昆虫死亡 (Arenas *et al.*, 2010)。在此过程中,APN有着重要的作用。我们研究发现原核表达

的APN4片段与Cry1Ac、Cry2Aa在体外都可以结合,是两种杀虫蛋白共同的结合受体。这可能是Cry1Ac、Cry2Aa间存在不对称交互抗性现象的原因之一。但具体机制还需要进一步验证。

#### 参考文献 (References)

- Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL, 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology*, 47: 39–87.
- Arenas I, Bravo A, Soberon M, Gomez I, 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J. Biol. Chem.*, 285(17): 12497–12503.
- Bulla JLA, Bechtel DB, Kramer KJ, Shethna YI, Aronson AI, Fitz-James PC, 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 8(2): 147–204.
- Bravo A, Gomez I, Conde J, Munoz-Garay C, Sanchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberon M, 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1667(1): 38–46.
- Chen XJ, Curtiss A, Alcantara E, Dean DH, 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin Cry1Ab reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 270 (11): 6412–6419.
- Escriche B, Tabashnik B, Finson N, Ferre J, 1995. Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212(2): 388–395.

- Ferre J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen, M, 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(12): 5119–5123.
- Gajendra B, Udayasuriyan V, Asia Mariam M, Sivakumar NC, Bharathi M, Balasubramanian G, 2002. Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *Crop Protection*, 21(9): 817–822.
- Gould F, Martinez-Ramirez A, Anderson A, Ferre J, Silva FJ, Moar WJ, 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(17): 7986–7990.
- Hernández-Rodríguez CS, Van Vliet A, Bautsoens N, Van Rie J, Ferre J, 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(24): 7654–7659.
- Hofmann C, Luthy P, Hutter R, Pliska V, 1988. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.*, 173(1): 85–91.
- Jime'nez-Jua'rez N, Mun-oz-Garay C, Gomez I, Saab-Rincon G, Damian-Almazo JY, Gill SS, Sobero'n M, Bravo A, 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.*, 282 (29): 21222–21229.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SR, Ning C, Liu C, Wu K, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, Perera O, Adang 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.
- Liang G, Tan W, Guo Y, 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25 (2): 15–17.
- Masson L, Lu YJ, Mazza A, Brousseau R, Adang MJ, 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.*, 270(35): 20309–20315.
- McGaughey WH, 1985. Insect resistance to the biological insecticidal *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229 (4709): 193–195.
- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y, 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.*, 460(2): 385–390.
- Tabashnik BE, Unnithan GC, Masson L, Crowder DW, Li X, Carriere Y, 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(29): 11889–11894.
- Tiewisiri K, Wang P, 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(34): 14037–14042.
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270 (10): 5490–5494.
- Wei J, Guo Y, Liang G, Wu K, Zhang J, Tabashnik BE, Li X, 2015. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Sci. Rep.*, 5: 7714.
- Wu D, Aronson AI, 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.*, 267 (4): 2311–2317.
- Wu KM, Guo YY, 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 31–52.
- Xie R, Zhuang M, Ross LS, Gomez I, Oltean DI, Bravo A, Soberon M, Gill SS, 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.*, 280(9): 8416–8425.