

刘媛, 林洁茹, 林曼曼, 等. Cry2Aa 毒素对小菜蛾的杀虫机理[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 762-768.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.007

## Cry2Aa 毒素对小菜蛾的杀虫机理

刘媛<sup>1</sup>, 林洁茹<sup>1</sup>, 林曼曼<sup>1</sup>, 张霄<sup>1</sup>, 徐重新<sup>1</sup>, 陈蔚<sup>1</sup>, 罗楚平<sup>2</sup>, 刘贤金<sup>1</sup>

(1. 江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 淮阴工学院, 江苏 淮安 223003)

**摘要:** 为研究苏云金杆菌 Cry2Aa 毒素的生物活性及杀虫机理, 先利用浸叶法测定了商品化的 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的杀虫活性, 并用石蜡包埋切片后进行免疫组化分析, 再用 ELISA 法测定了 Cry2Aa 毒素与小菜蛾刷状缘膜囊泡 (BBMV) 的结合曲线, 最后通过 Ligand blot 法和肽指纹质谱对小菜蛾 BBMV 与 Cry2Aa 毒素的结合蛋白进行了分离与鉴定。结果表明, Cry2Aa 毒素对小菜蛾的半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 为 27.90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Cry2Aa 毒素与小菜蛾中肠上皮细胞存在结合, 与小菜蛾 BBMV 的表观结合亲和力为 266.6 nmol/L。小菜蛾 BBMV 与 Cry2Aa 毒素存在 5 条主要结合条带, 其中分子量  $2.45 \times 10^5$  上方的主结合条带酶解后得到 ATYSEGPNGSVR 片段, 通过数据库比对分析, 匹配到一个分子量为  $3.32 \times 10^5$  的小菜蛾未鉴定蛋白, 其功能注释为脂质运载蛋白。

**关键词:** Cry2Aa; 小菜蛾; 杀虫活性; 刷状缘膜囊泡 (BBMV); 免疫组化分析

**中图分类号:** S482.3<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0762-07

## Insecticidal mechanism of Cry2Aa toxin against *Plutella xylostella*

LIU Yuan<sup>1</sup>, LIN Jie-ru<sup>1</sup>, LIN Man-man<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, XU Chong-xin<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>,  
LUO Chu-ping<sup>2</sup>, LIU Xian-jin<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Nanjing 210014, China; 2. Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

**Abstract:** To study biological activity and insecticidal mechanism of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa toxin, the insecticidal activity of commercial Cry2Aa toxin against *Plutella xylostella* was determined by the leaf dipping method, and its paraffin embedded sections were used to perform immunohistochemical analysis. In addition, the binding curve of Cry2Aa toxin with brush border membrane vesicle (BBMV) of *P. xylostella* was determined by ELISA method. Finally, the binding proteins in BBMV with Cry2Aa were separated and identified by ligand blot and peptide mass fingerprinting. The results showed the half lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of Cry2Aa toxin against *P. xylostella* was 27.90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cry2Aa toxin bound to the midgut epithelial cells and the apparent binding affinity of Cry2Aa to BBMV was 266.6 nmol/L. There were five Cry2Aa-binding bands in *P. xylostella* BBMV. The band on the top of  $2.45 \times 10^5$  were digested. A peptide ATYSEGPNGSVR from the band matched to a  $3.32 \times 10^5$  uncharacterized *P. xylostella* protein from the database, the functional annotation for the protein was lipocalin.

**Key words:** Cry2Aa; *Plutella xylostella*; insecticidal activity; brush border membrane vesicle (BBMV); immunohistochemical analysis

收稿日期: 2017-12-18

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31630061); 江苏省社会发展项目 (BE2017706); 江苏省农业自主创新基金项目 [CX (17)3018]

作者简介: 刘媛 (1980-), 女, 安徽合肥人, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品污染物生物控制技术研究。 (Tel) 025-84390401; (E-mail) zeranol@163.com

通讯作者: 刘贤金, (Tel) 025-84390401; (E-mail) jaasliu@jaas.ac.cn

1981 年 Yamamoto 等从苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 (*Bacillus thuringiensis*, subsp. *kurstaki*) 的伴孢晶体中分离得到一个分子量为  $6.6 \times 10^4$  的杀虫蛋

白组分,当时命名为 P2 蛋白(即后来的 Cry2A 毒素),该蛋白质对鳞翅目(Lepidoptera)和双翅目(Diptera)害虫均有毒性<sup>[1]</sup>。1989 年 Widner 等克隆和测序了 *cry2Aa* 和 *cry2Ab* 基因,这 2 个基因均编码 633 个氨基酸,序列相似度达到 87%,但其杀虫谱存在差异<sup>[2]</sup>。由于 Cry2A 毒素与 Cry1A 毒素的交互抗性较低<sup>[3]</sup>,2003 年 *cry2Ab* 与 *cry1Ac* 基因被联合开发为双价抗虫基因应用于第 2 代 *Bt* 抗虫棉,用于延缓昆虫的抗性发生,Cry2A 毒素的生物活性及杀虫机理引起了人们的普遍关注<sup>[4-13]</sup>。

但是由于 Cry2A 毒素对多种靶标害虫的毒性弱于 Cry1A 毒素<sup>[14]</sup>,且其商品化进程较晚,目前国内外对 Cry2A 毒素与靶标昆虫的结合受体的报道较少,其毒理机制尚不完全明确<sup>[15]</sup>。1994 年 English 等报道了 Cry2A 毒素与谷实夜蛾(*Helicoverpa zea*)的刷状缘膜囊泡(BBMV)呈现非饱和性结合特性,这与 Cry1Ac 的饱和性结合现象截然不同,作者推测 Cry2A 毒素可能与 Cry1Ac 具有不同的作用模式<sup>[16]</sup>。但到 2008 年 Hernandez-Rodriguez 则报道了 Cry2Ab 毒素与棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)和谷实夜蛾 BBMV 呈现饱和性结合特征,Cry2Ab 与两种昆虫 BBMV 的解离常数分别是 Cry1Ac 的 38 倍和 35 倍,亲和力偏低。通过与 BBMV 竞争性结合试验发现 Cry2Ab 与 Cry1Ac 没有共同结合位点,这解释了 Cry2A 和 Cry1A 毒素少有发生交互抗性的现象<sup>[17]</sup>。Qiu 等用双向电泳和液相色谱-质谱联用(LC-MS)测定了 Cry2Aa 毒素与甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的结合受体,预测得到的结合受体包括 polycalin、V-Type ATPase subunit A、V-Type ATPase subunit B、肌动蛋白、4-羟基丁酸辅酶 A-转移酶和活化蛋白激酶 C,作者发现甜菜夜蛾的 V-Type ATPase subunit B 基因敲除后对 Cry2Aa 的敏感度显著降低,证明该蛋白质为 Cry2Aa 毒素的结合受体<sup>[18]</sup>。Onofre 等用 Ligand blot 鉴定了 Cry2Ab 与烟草天蛾(*Manduca sexta*)BBMV 在分子量  $1.1 \times 10^5$  左右有结合条带,随后通过质谱分析推测为氨肽酶-N2,并通过对该蛋白质的基因克隆和表达验证,证明氨肽酶-N2 是 Cry2Ab 的结合受体<sup>[19]</sup>。

小菜蛾(*Plutella xylostella*)是全球重要的鳞翅目农业害虫,也是最早报道对 Cry 毒素产生抗性的昆虫。目前国内外尚无 Cry2Aa 毒素对小菜蛾免疫组化分析、BBMV 结合分析及其中肠结合蛋白的报道。

本研究将采用浸叶法测定美国 Envirologix 公司生产的活化 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的杀虫活性,并对喂食 Cry2Aa 毒素的小菜蛾进行免疫组化分析,确定其结合区域,利用 ELISA 法测定小菜蛾 BBMV 与 Cry2Aa 毒素的表观结合亲和力,用 Ligand blot、肽指纹质谱对小菜蛾 BBMV 中的结合蛋白进行分离与鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

敏感品系小菜蛾引进自南京农业大学植物保护学院,用无农药污染的青菜叶片(实验室内种植)续代饲养。活化 Cry2Aa 毒素(分子量  $6.8 \times 10^4$ ,纯度为 94%~96%),购自美国 Envirologix 公司,该毒素由美国 Case Western Reserve 大学用 *Bt* 菌株生产。Cry2Aa 毒素用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)溶解,配制成 1 mg/ml 的母液,分装后于 -80 ℃ 保存。Cry2Aa 多克隆抗体由本实验室通过免疫新西兰大白兔自制获得。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自美国 KPL 公司。四甲基联苯胺(TMB)购自美国 Sigma 公司。脱脂奶粉购自索莱宝生物科技有限公司。胰蛋白酶购自美国 Promega 公司。Western 试剂盒 ONE-HOUR Western™ Standard Kit Using TMB (Rabbit) 购自金斯瑞生物科技有限公司。试验所用其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

EC 350-1 型一体化包埋机和 EC HM 325 切片机,美国 Thermo Microm 公司产品。PHY-III 型病理组织漂烘机,常州中威电子仪器有限公司产品。EXCELSIOR ES 型自动脱水机,美国 Thermo 公司产品。Eclipse Ci 正置显微镜,日本 Nikon 公司产品。JFMV500SC CCD 显微镜摄像头和 JIFEI Version 6.0.054 图片分析软件,北京天龙科技有限公司产品。JY-SCZ2+型电泳槽、JY600E 型电泳仪电源、JY-ZY5 型 Western blot 转膜电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司产品。5200S 型凝胶成像分析仪,上海天能科技有限公司产品。LC-20AB 型 LC-MS/MS、LTQ Orbitrap Velos 质谱仪,日本岛津公司产品。ZORBAX SB-C18 色谱柱,美国安捷伦公司产品。Direct-Q 3UV 超纯水机,美国 Millipore 公司产品。

### 1.3 生物测定

采用浸叶法测定 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的杀虫活性。具体步骤如下:(1)采集实验室自行种植、未

被农药污染新鲜青菜叶片。(2)将 Cry2Aa 毒素母液用 PBS 缓冲液进行 2 倍梯度稀释,将叶片浸入其中,10 s 后取出自然晾干。设置无 Cry2Aa 毒素的 PBS 缓冲液处理作为阴性对照。(3)将晾干后的叶片放入垫有滤纸的平皿中,每个平皿接入 30 头二龄小菜蛾幼虫,每个质量浓度处理 3 次重复。(4)放置 25 ℃ 光照培养箱中培养,光周期为 16 h : 8 h (昼 : 夜)。培养箱中放置水盆以调节湿度。72 h 后记录死、活虫数,计算矫正死亡率。用 SPSS 软件进行概率分析,计算半数致死质量浓度 ( $LC_{50}$ ) 和 95% 置信区间。

#### 1.4 免疫组化分析

用 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cry2Aa 毒素 (PBS 溶解) 浸叶法 (同方法 1.3) 处理青菜叶片后,接入 2 龄小菜蛾幼虫,另外设置 PBS 处理组作为阴性对照。接虫后 24 h,将 2 组小菜蛾幼虫,分别浸泡于 4% 多聚甲醛中,4 ℃ 固定 24 h。采用常规方法对小菜蛾幼虫进行石蜡包埋、切片及免疫组化分析 (DAB 染色)<sup>[20]</sup>。一抗为 Cry2Aa 兔多克隆抗体 (1 : 1 000 倍 PBS 稀释),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 1 000 倍 PBS 稀释),DAB 显色及苏木素复染后中性树脂封片,采用正置显微镜观察、拍照,棕色部分为阳性细胞。

#### 1.5 Cry2Aa 毒素与小菜蛾 BBMV 的结合分析

采用 4 龄小菜蛾幼虫提取 BBMV,提取方法参照 Wolfersberger 的报道<sup>[21]</sup>。以牛血清白蛋白为参照,用蛋白质定量试剂盒测定 BBMV 浓度。采用 ELISA 法测定 Cry2Aa 毒素与 BBMV 的结合曲线<sup>[19]</sup>。具体方法为:10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 BBMV 用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 溶解,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,4 ℃ 包被过夜。次日用含有 0.05 % Tween 20 的 PBS 溶液 (PBST) 洗板 3 次,每孔加入 200  $\mu\text{l}$  2% 脱脂奶粉 (PBS 溶液配制),室温孵育 2 h。PBST 洗板 3 次后,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  1~300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (14.71~4 411.77 nmol/L) 不同质量浓度的 Cry2Aa 毒素,设 PBS 空白对照,每个样品设 3 个重复。室温孵育 1 h 后,PBST 洗板 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  1 : 1 000 倍稀释的 Cry2Aa 多克隆抗体,室温孵育 1 h 后,PBST 洗板 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  1 : 5 000 倍 PBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h 后,PBST 洗板 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  TMB 显色液 (100  $\mu\text{l}$  二甲亚砜溶解的 10 mg/ml TMB 和 25  $\mu\text{l}$  0.65% 的

$\text{H}_2\text{O}_2$  溶解于 9.875 ml 100 mmol/L pH 5.5 的柠檬酸盐缓冲液)。室温显色 15 min,用酶标仪在 450 nm 波长处读数。各质量浓度毒素对应的吸光值扣除空白值后,用 GraphPad Prism 6 软件 Scatchard 法作图,计算表观结合亲和力 ( $K_d$ )。

#### 1.6 Ligand blot 分析

SDS-PAGE 试验参照 Burgess 等<sup>[22]</sup>的方法,10% SDS-PAGE 胶分离后,银染显色。Ligand blot 试验参照 Onofre 等<sup>[20]</sup>的方法。具体方法为:10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  小菜蛾 BBMV 用 10% SDS-PAGE 胶进行分离,按照金斯瑞 ONE-HOUR Western™ Standard Kit Using TMB (Rabbit) 试剂盒说明书进行转膜、封闭、毒素孵育、一抗孵育和显色等步骤,包括毒素孵育采用 PBS 溶解的 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cry2Aa 毒素与转膜后的 BBMV 室温孵育 1 h,设立 PBS 孵育的对照组。一抗采用本实验室自制的 1 : 1000 倍 PBS 稀释的 Cry2Aa 兔多克隆抗体,二抗为试剂盒自带。最后用试剂盒中的 ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate 工作液显色,直到出现清晰条带,将膜放在 20 ml 去离子水中浸泡 3 次,每次 30 s,终止反应,吸干多余水分,干燥拍照。

#### 1.7 肽指纹质谱鉴定

从 SDS-PAGE 胶上切下的凝胶用 1 ml 超纯水清洗 3 次。清洗后的胶点加入 500  $\mu\text{l}$  乙腈脱水。56 ℃ 条件下用 10 mmol/L 二硫苏糖醇处理胶点 1 h,还原打开二硫键。在暗室中使用 55 mmol/L 碘乙酰胺处理胶点 45 min,进行半胱氨酸的烷基化封闭。用 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  胰蛋白酶溶液覆盖胶点。冰上放置 30 min 后,补加 25 mmol/L 碳酸氢钠溶液直至覆盖胶点,37 ℃ 消化过夜。转移胶点外面存留的液体,用 50% 乙腈-水从胶点中萃取肽段 1 次,再用 100% 乙腈萃取 1 次。2 次萃取的溶液和胶点外存留液合并,冷冻抽干。

将抽干后的肽段干粉离心,用 LC 流动相的水相溶解干粉,振荡离心后取上清液上机测定。LC 条件设置:流动相为含有 2.0% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液,流速 0.3 ml/min。MS 设置:ESI 源,正离子扫描模式,二级质谱分辨率 7 500,裂解方式 HCD。LC-MS/MS 获得的原始数据转换为 \*.mgf 格式,利用 Mascot 2.3.02 作为搜索引擎,对建立好的蛋白质数据库进行检索。鉴定结果解析后进行显著性过滤,最后生成鉴定肽段列表和蛋白质列表。



## 2 结果与分析

### 2.1 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的生物活性

生物测定结果(图 1)显示,在 0~100  $\mu\text{g/ml}$ ,随着 Cry2Aa 质量浓度的加大,小菜蛾的 72 h 死亡率呈现增加趋势。其中 100  $\mu\text{g/ml}$  处理组,72 h 矫正死亡率为 81.67%。将 72 h 的矫正死亡率通过 SPSS 软件进行概率分析,计算得到 Cry2Aa 对小菜蛾  $\text{LC}_{50}$  为 27.90  $\mu\text{g/ml}$ ,95% 置信区间在 19.53~40.58  $\mu\text{g/ml}$ 。另外在生物测定过程中,观察到 Cry2Aa 毒素处理组的小菜蛾具有明显的拒食现象。由此可见 Cry2Aa 对小菜蛾具有毒杀作用。

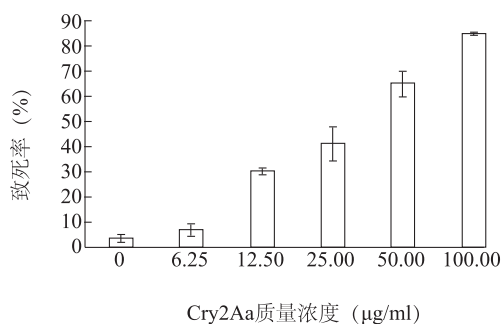


图 1 不同质量浓度 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的生物活性

Fig.1 Biological activity of different doses of Cry2Aa on *Plutella xylostella* larvae

### 2.2 Cry2Aa 毒素在小菜蛾中的免疫组化定位

免疫组化分析结果(图 2)显示,PBS 对照组小菜蛾幼虫中肠区域可观察到柱状细胞(CC)及杯状细胞(GC),未见棕色着色区域;而 Cry2Aa 处理组小菜蛾幼虫中肠细胞形态发生明显变化,出现变性和坏死现象,且柱状细胞的微绒毛(MV)附近有大量棕色着色区,说明 Cry2Aa 与小菜蛾中肠上皮细胞存在结合。

### 2.3 Cry2Aa 毒素与小菜蛾 BBMV 的结合曲线

采用 ELISA 法测定了 Cry2Aa 毒素与小菜蛾 BBMV 的结合曲线(图 3)。在 1~300  $\mu\text{g/ml}$  (14.71~4 411.77 nmol/L),随着 Cry2Aa 质量浓度加大,ELISA 信号值逐渐增大并趋于平衡,呈现饱和现象。采用 GraphPad Prism 软件的 Scatchard 作图法对数据进行回归分析,计算得到 Cry2Aa 与小菜蛾 BBMV 的表观结合亲和力( $K_d$ )为  $(266.60 \pm 0.06)$  nmol/L。

### 2.4 Cry2Aa 毒素与小菜蛾 BBMV 的 Ligand blot 分析

Ligand blot 试验结果(图 4)显示,在 100  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 存在下,从分子量  $8.00 \times 10^4$  附近到  $2.45 \times 10^5$  上方共有 5 条主要结合条带,分别用 a、b、c、d、e 标注,而用 PBS 替代 Cry2Aa 的空白对照中未见任何结合条带。在 5 条主要结合条带中, $2.45 \times 10^5$  上方的结合条带(条带 a)最为清晰,从 BBMV 的 SDS-PAGE 凝胶上也可以看到对应的清晰条带。从 SDS-PAGE 凝胶上,切下该条带(条带 a)用肽指纹质谱进行鉴定。

### 2.5 Cry2Aa 毒素与小菜蛾 BBMV 结合蛋白的肽指纹质谱

通过对条带 a(图 4)的肽指纹质谱分析,共获得 IDNTIK、ENRVLK、QIEQLK、SPATDNIK、IEEASRIR、ATYSEGPNGSVR 6 个酶解肽段。经数据库比对,ATYSEGPNGSVR 肽段(图 5)在 NCBI 数据库中匹配到一个符合分子量预期的蛋白质。该蛋白质编号为 gi|768418593|ref|XP\_011549989\_1|,是一个小菜蛾的未鉴定蛋白质,分子量为  $33.2 \times 10^4$ ,等电点为 4.15,NCBI 对该蛋白质的注释为脂质运载蛋白。

## 3 讨论

目前关于 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的致死率存在差异。李海涛等报道 Cry2Aa9 基因的原核表达产物对小菜蛾的  $\text{LC}_{50}$  为 4.6  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[23]</sup>。Liu 等指出在大肠杆菌中表达的 100 mg/L Cry2A 对敏感品系小菜蛾的致死率为 8.8%<sup>[24]</sup>。本试验测定的美国 Envirologix 公司生产的活化 Cry2Aa 毒素对小菜蛾的  $\text{LC}_{50}$  值为 27.90  $\mu\text{g/ml}$ 。由于 Cry2Aa 毒素的基因型、表达方式、溶解方式、是否活化等方面均存在差异,而且试验使用的小菜蛾敏感度及用药方式也存在不同,这些因素可能造成了杀虫活性测定结果的差异。另外本试验也同时测定了美国 Envirologix 公司生产的活化 Cry1Ab 毒素对小菜蛾的 72 h 致死率,结果表明 Cry1Ab 毒素对小菜蛾的  $\text{LC}_{50}$  值为 0.38  $\mu\text{g/ml}$ ,说明 Cry2Aa 毒素虽然对小菜蛾存在毒杀作用,但毒性比 Cry1Ab 低 73 倍。

本试验采用自制的 Cry2Aa 毒素兔多克隆抗体,对喂食了 Cry2Aa 毒素的小菜蛾进行免疫组化分析。观察到 Cry2Aa 处理的小菜蛾幼虫中肠上皮细胞出

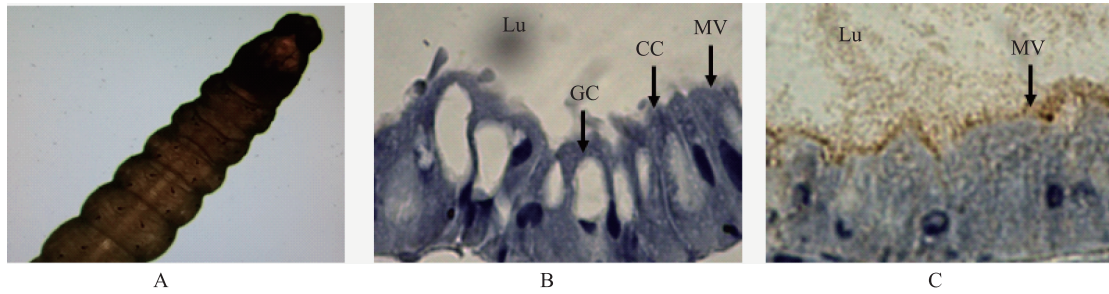


图2 Cry2Aa 毒素在小菜蛾幼虫中的免疫组化定位  
A:二龄小菜蛾头部及躯干(10×4);B:对照小菜蛾幼虫中肠区域(10×40);C:Cry2Aa 处理小菜蛾幼虫中肠区域(10×40)。Lu:肠腔;GC:杯状细胞;CC:柱状细胞;MV:微绒毛。

图2 Cry2Aa 毒素在小菜蛾幼虫中的免疫组化定位

Fig.2 Immunocytochemical localization of Cry2Aa toxin in *P. xylostella* larvae

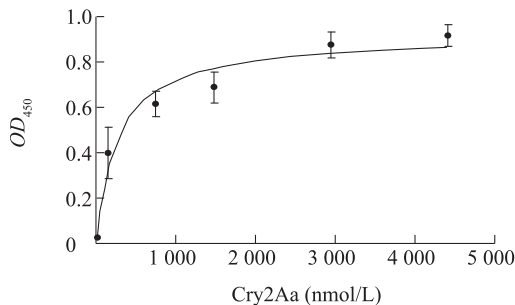


图3 Cry2Aa 毒素与小菜蛾刷状缘膜囊泡(BBMV)的ELISA结合曲线

Fig.3 The ELISA binding curve of Cry2Aa toxin with brush border membrane vesicle(BBMV) of *P. xylostella*

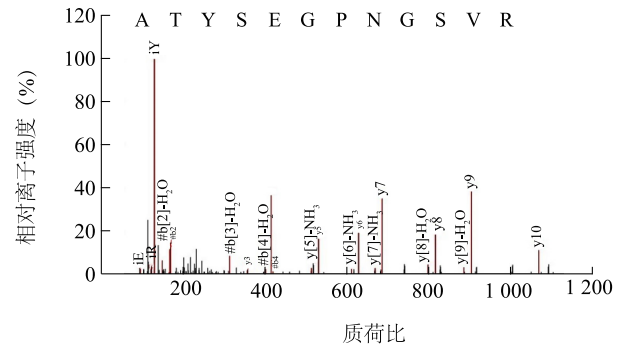
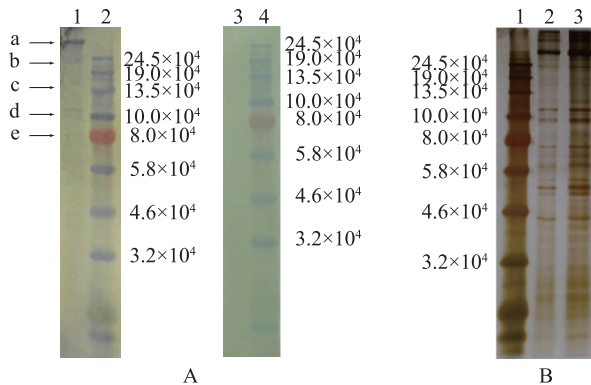


图5 酶解肽段(ATYSEGPNGSVR)的LC-MS/MS分析谱图

Fig.5 Spectrum of digested peptide (ATYSEGPNGSVR) by LC-MS/MS



A图中,1为100  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 毒素处理,2、4为蛋白质分子量Marker,3为PBS空白对照;B图中,1为蛋白质分子量Marker,2为8倍稀释的小菜蛾BBMV,3为4倍稀释的小菜蛾BBMV。

图4 小菜蛾刷状缘膜囊泡(BBMV)的Ligand blot(A)及SDS-PAGE分析(B)

Fig.4 Ligand blot (A) and SDS-PAGE(B) analysis for BBMV of *P. xylostella*

现变性和坏死现象,且Cry2Aa与小菜蛾中肠上皮细

胞存在结合,这与Bravo等<sup>[20]</sup>报道的Cry1A类毒素对小菜蛾的免疫组化测定结果<sup>[20]</sup>一致。另外用ELISA法测定的Cry2Aa与小菜蛾BBMV的结合曲线表明,Cry2Aa与小菜蛾BBMV的结合呈现饱和特性。这与Hernandez-Rodriguez等<sup>[17]</sup>报道的Cry2Ab毒素与棉铃虫BBMV呈现饱和性结合特征的结果一致。本试验计算的Cry2Aa对小菜蛾BBMV的表现结合亲和力为266 nmol/L,数值接近于Onofre等<sup>[19]</sup>报道的Cry2Ab与烟草天蛾中肠受体氨基酸-N2的表现亲和力( $K_d=123$  nmol/L)。

Ligand blot分析结果显示,Cry2Aa与小菜蛾BBMV有个5个主要结合条带。对最为清晰的分子量大于 $2.45 \times 10^5$ 的结合条带(条带a)进行了肽指纹质谱鉴定。该条带的一个酶解肽段ATYSEGPNGSVR在NCBI数据库中匹配得到一个分子量为 $3.32 \times 10^5$ 的小菜蛾未鉴定蛋白质,其注释为脂质运载蛋白。通过对Cry2A毒素的结合受体文献检索发现,Onofre等<sup>[19]</sup>在鉴定Cry2Ab、Cry1Ab与烟草天蛾

BBMV 结合时发现 2 种毒素均在  $2.50 \times 10^5$  分子量上方存在一个结合条带,但是由于试验主要研究的是 Cry2Ab 和 Cry1Ab 的差异结合条带,因此未对该条带做进一步鉴定。另外通过对脂质运载蛋白与 Cry 毒素的相关文献检索发现,Hossain 等<sup>[25]</sup>在 2004 年报道了家蚕 BBMV 中存在  $2.52 \times 10^5$  左右的结合蛋白,当时对该蛋白酶解片段 ATYLAGSGGVVPVCN 和 ATYTLNSDNTITVFN 在蛋白质数据库中未匹配到任何蛋白质,因此命名为 P252。直到 2008 年,Mauchanp 等报道了一种  $3.02 \times 10^5$  叶绿素酸脂结合蛋白,而该蛋白质属于脂质运载蛋白家族,命名为 polycalin<sup>[26]</sup>。Pandlan 等<sup>[27]</sup>随即发现 P252 的 2 个酶解片段与 polycalin 有 94% 和 100% 的序列相似性。后来 Pandlan 等<sup>[27-28]</sup>分别在 2008 年和 2010 年验证了 P252 确实是位于家蚕中肠的脂质运载蛋白,明确了该受体蛋白具有抗菌活性,并推测该受体蛋白可能通过昆虫免疫调节作用参与到 Cry 毒素的作用机制中。而西北农林科技大学的杜潇等<sup>[29]</sup>也报道了小菜蛾中存在 *polycalin* 基因。这一系列的文献报道,对我们进一步开展小菜蛾 BBMV  $2.45 \times 10^5$  上方结合条带的进一步鉴定及其功能分析起到启发作用。本研究结果为 Cry2Aa 毒素结合受体鉴定和作用机理的进一步阐明提供了有益数据。

## 参考文献:

- [1] YAMAMOTO T, MCLAUGHLIN R E. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus* [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 1981, 103: 414-421.
- [2] WIDNER W R, WHITELEY H R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities [J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171: 965-974.
- [3] KOTA M, DANIELL H, VARMA S, et al. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96: 1840-1845.
- [4] TOUNSI S, JAOUA S. Characterization of a novel cry2Aa-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 1219-1223.
- [5] KUMAR S, UDAYASURIYAN V. Cloning of cry2Aa and cry2Ab genes from new isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* strains [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2004, 20: 11-17.
- [6] KUMAR S, UDAYASURIYAN V, SANGEETHA P, et al. Analysis, of Cry2A proteins encoded by genes cloned from indigenous isolates of *Bacillus thuringiensis* for toxicity against *Helicoverpa armigera* [J]. Current Science, 2004, 86: 566-570.
- [7] 武爱华,王 耘,刘 媛,等. 磁珠筛选抗 Cry2Aa 人源化单链抗体及检测方法的建立 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 945-950.
- [8] LIMA G M S, AGUIAR R W S, CORREA R F T, et al. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24: 2941-2948.
- [9] CACCIA S, HERNANDEZ-RODRIGUEZ C S, MAHON R J, et al. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa Species* [J]. PLoS ONE, 2010, 5(4): e99751-7.
- [10] PARK H W, DEVERA J A, PRINS B A, et al. The dual-activity insecticidal protein, Cry2Aa, does not enhance the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2011, 14: 429-431.
- [11] SHU C L, ZHANG J T, CHEN G H, et al. Use of a pooled clone method to isolate a novel *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin with activity against *Ostrinia furnacalis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 114, 31-33.
- [12] YANG Y, CHEN X P, CHENG L S, et al. Toxicological and biochemical analyses demonstrate no toxic effect of Cry1C and Cry2A to *Folsomia candida* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 1-9.
- [13] 安百伟,赵 亮,狄佳春,等. 陆地棉 *Bt* 抗虫基因类型鉴定与染色体定位 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 262-266.
- [14] VAN FRANKENHUYZEN K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 101: 1-16.
- [15] PARDO-LOPEZ L, SOBERON M, BRAVO A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37: 3-22.
- [16] ENGLISH L, ROBBINS H L, VONTESCH M A, et al. Mode of action of CryIIA-a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 24: 1025-1035.
- [17] HERNANDEZ-RODRIGUEZ C S, VAN VLIET A, BAUTSOENS N, et al. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 7654-7659.
- [18] QIU L, ZHANG B, LIU L, et al. Proteomic analysis of Cry2Aa-binding proteins and their receptor function in *Spodoptera exigua* [J]. Scientific Report, 2017, 7: 40222.
- [19] ONOFRE J, GAYTAN M O, PENA-CARDENA A, et al. Identification of aminopeptidase-N2 as a Cry2Ab binding protein in *Manduca sexta* [J]. Peptides, 2017, 98: 93-98.

- [20] BRAVO A, JANSENS S, PEFEROEN M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 60: 237-246.
- [21] WOLFERSBERGER M G. Preparation and partial characterization of amino-acid transporting brush-border membrane-vesicles from the larval midgut of the gypsy-moth (*Lymantria-Dispar*) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1993, 24: 139-147.
- [22] BURGESS R R, DEUTSCHER M P. Guide to protein purification [M]. 2nd ed. London: Academic Press, 2009.
- [23] 李海涛,姚江,郭巍,等. 苏云金芽孢杆菌 cry2Aa 基因的克隆、表达与活性[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13 (6):787-791.
- [24] LIU Y B, TABASHNIK B E, MOAR W J, et al. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 1385-1389.
- [25] HOSSAIN D M, SHTITOMI Y, MORIYAMA K, et al. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 4604-4612.
- [26] MAUCHAMP B, ROYER C, GAREL A, et al. Polycalin (chlorophyllid A binding protein): A novel, very large fluorescent lipocalin from the midgut of the domestic silkworm *Bombyx mori* L. [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36: 623-633.
- [27] PANDLAN G N, ISHIKAWA T, TOGASHI M, et al. *Bombyx mori* midgut membrane protein P252, which binds to *Bacillus thuringiensis* Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 1324-1331.
- [28] PANDLAN G N, ISHIKAWA T, VAIJAYANTHI T, et al. Formation of macromolecule complex with *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins and chlorophyllide binding 252-kDa lipocalin-like protein locating on *Bombyx mori* midgut membrane [J]. *Journal of Membrane Biology*, 2010, 237: 125-136.
- [29] 杜潇. 小菜蛾中肠 Polycalin 基因克隆及其功能分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.

(责任编辑:张震林)