

谢雅晶, 杨立应, 胡晓丹, 等. 小菜蛾杀虫抗体的对靶设计及验证[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(7): 1212-1219.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.07.007

小菜蛾杀虫抗体的对靶设计及验证

谢雅晶^{1,2}, 杨立应¹, 胡晓丹³, 徐重新^{1,2}, 张 霄², 高美静², 卢莉娜², 仲建锋², 朱 庆^{1,2}, 刘 媛^{1,2}, 刘贤金^{1,2}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业农村部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

摘要: 本研究拟通过模拟 Cry 毒素创制新型杀虫蛋白质用于小菜蛾防治, 主要利用三维结构模拟及分子对接技术, 以前期获得的抗 Cry1Ab 抗体为模板设计 2 个基因工程抗体(GEAb)。其中, 具有杀虫活性的 GEAb-GGCC 与小菜蛾中肠刷状边缘膜囊泡(BBMV)具有较高结合活性, 并与 Cry1A 和 Cry1B 具有重叠的 BBMV 结合位点。BBMV 免疫沉淀分析鉴定结果显示, 与 GEAb-GGCC 结合的中肠蛋白质包括氨肽酶 N(APN)、V-ATP 酶 B 亚基和 polycalin。由于 GEAb-GGCC 缺乏 Cry1A 类蛋白质中负责成孔的 α -螺旋结构, 推测 GEAb-GGCC 或通过结合小菜蛾中肠受体激活下游信号通路, 引起中肠损伤, 导致虫体死亡。

关键词: 对靶设计; 杀虫基因工程抗体; 分子对接; 小菜蛾; Cry 毒素

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)07-1212-08

Target design and verification of insecticidal antibody against *Plutella xylostella*

XIE Yajing^{1,2}, YANG Liying¹, HU Xiaodan³, XU Chongxin^{1,2}, ZHANG Xiao², GAO Meijing², LU Lina², ZHONG Jianfeng², ZHU Qing^{1,2}, LIU Yuan^{1,2}, LIU Xianjin^{1,2}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base of Ministry of Science and Technology/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory for Agro-product Safety Risk Evaluation (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: To generate new insecticidal proteins against *Plutella xylostella* by mimicking Cry toxins, two genetically engineered antibodies (GEAb) were designed by using previously obtained anti-Cry1Ab idiotype-antibody as template, mainly by three-dimensional structure modeling and molecular docking technology. The insecticidal GEAb-GGCC of GEAb was found to show high affinity to *P. xylostella* brush border membrane vesicles (BBMV), and had superposed BBMVs binding

收稿日期: 2023-06-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31301703); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)1009]; 江苏现代农业产业技术体系建设专项[JATS(2023)403]; 江苏省自然科学基金面上项目(BK20231384)

作者简介: 谢雅晶(1983-), 女, 江苏南京人, 硕士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为农产品质量安全控制。(E-mail) maria_xie@163.com

通讯作者: 刘贤金, (E-mail) jaasliu@163.com

sites with Cry1A and Cry1B. Identification results of BBMVs immunoprecipitation analysis showed that the midgut proteins bonded with GEAb-GGCC included aminopeptidases N (APN), B subunit of V-ATPase and polycalin. Because the GEAb-GGCC is lack of α -helix structure which is responsible for pore forming in Cry1A proteins, it is speculated that GEAb-GGCC may activate the downstream signal pathway by binding with the midgut receptors to cause midgut injury, which leads to the death of *P. xylostella* larva.

Key words: target design; insecticidal genetically engineered antibody; molecular docking; *Plutella xylostella*; Cry toxin

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前应用最广泛的微生物杀虫剂^[1]。随着转 Bt 基因作物在全球的大量种植,Bt 抗性风险也引起人们的广泛关注^[2]。传统的蛋白质工程手段主要通过构建随机突变体库筛选改良的突变体^[3],还可以通过定向进化等手段来提高酶(蛋白质)的生物活性和特异性等^[4-5],如哈佛大学^[6]以类钙黏蛋白作为靶标,对 Bt 蛋白 Cry1Ac 进行多轮定向进化,获得对抗性粉纹夜蛾具有高毒力的突变体。随着计算机技术的应用,人们借助计算机模拟对蛋白质结合关键位点进行理性分析,从而对蛋白质进行计算机设计、分子改造,以改善其生物活性^[7-8]。Tinberg 等^[8]使用计算机对接技术分析洋地黄毒苷与靶标结合界面的关键位点,通过突变极大地提高了靶标与配体的亲和力。

小菜蛾(*Plutella xylostella*)属于鳞翅目害虫,主要对十字花科蔬菜产生较重危害^[9-10]。随着长期种植转 Bt 基因作物和施用 Bt 农药(以 Cry1Ac 为主),导致小菜蛾产生广泛抗性,目前小菜蛾已成为世界上抗药性最强的农业害虫之一^[11]。据报道,小菜蛾对 Cry1Ac 的抗性主要与其受体 ATP 结合盒亚家族 C 成员 2 (ABCC2)和碱性磷酸酶(ALP)的表达减少有关^[12]。

本团队在前期基于噬菌体库筛选获得 2 个模拟 Bt 蛋白 Cry1Ab 对稻纵卷叶螟具有杀虫活性的抗独特型抗体(B12 和 G1),本研究主要针对 B12 和 G1 抗独特型抗体进行同源建模并对靶小菜蛾(碱性磷酸酶, ALP)进行分子对接分析,根据对接预测结果进行靶标设计及改造获得基因工程抗体(GEAb)-GGCC 和 GEAb-CCGG,并通过筛选获得对小菜蛾中肠刷状边缘膜囊泡(BBMV)具有高结合活性的新型杀虫基因工程抗体 GEAb-GGCC。

1 材料与方法

1.1 三维建模

利用 B12、G1、GEAb-GGCC、GEAb-CCGG、Cry1Ab 和小菜蛾 ALP 的蛋白质氨基酸序列在 swissmodel 网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)分别进行同源建模。B12、G1、GEAb-GGCC、GEAb-CCGG 的模板分别为 1f3r、6g8r、4q9r 和 6g8r, Cry1Ab 和 ALP 的模板分别为 1ciy 和 1zef。选取最优结构用于下一步分子对接。

1.2 与小菜蛾 ALP 分子对接分析

用 ZDOCK 软件(<https://zdock.umassmed.edu/>)对配体(Cry1Ab、B12、G1、GEAb-GGCC 和 GEAb-CCGG)和受体(ALP)进行分子对接预测,选取最优对接复合物,利用蛋白质结合热点预测软件 KFC2(https://mitchell-web.ornl.gov/KFC_Server)^[13]进行配体/受体的结合热点区域预测分析。

1.3 GEAb 的表达及纯化

人工合成 GEAb-GGCC 和 GEAb-CCGG 的核酸序列,利用 Nco I 和 Not I 酶切位点将人工合成的核酸序列连接至 pET-26b 载体中,在大肠杆菌 BL21 (DE3)中表达。表达蛋白质经组氨酸(His)标签纯化及脱盐,利用 Easy Protein Quantitative Kit 进行蛋白质浓度测定,并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.4 Cry 蛋白的准备

Cry1Ac、Cry1Ab 和 Cry1Ba 蛋白用碳酸钠缓冲液(0.05 mol/L NaHCO₃, pH 9.6)溶解后分装,-80 ℃保存。

1.5 小菜蛾 BBMV 的制备

选取四龄小菜蛾的中肠,用匀浆缓冲液[7 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl), 5 mmol/L 乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA), 300 mmol/L 甘露醇, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), pH 7.5]洗涤后,置于匀浆缓冲液中匀浆 2~3 次;加入 MgCl₂溶液,4 ℃、6 000 g 离心 10 min;取上清液至超速离心管中,4 ℃、24 000 g 离心 30 min;BBMV 用 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液溶解,分装后于-80 ℃保存。BBMV 浓度用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。

1.6 Cry 毒素和 GEAb 与 BBMV 的结合酶联免疫吸附测定(ELISA)试验

在 96 孔板中加入 100 μL 小菜蛾 BBMV (50 μg/mL), 37 ℃孵育 2 h(包被),封闭。加入 100 μL (4 μmol/L)抗体(B12、G1、GEAb-GGCC 和 GEAb-CCGG)或 Cry 毒素(Cry1Ab 和 Cry1B)孵育。GEAb 等抗体组加入 100 μL 抗组氨酸(HIS)二抗 37 ℃孵育;Cry 蛋白组加入 100 μL 抗 Cry1A 或 Cry1B 的兔抗血清孵育,再加入 100 μL 羊抗兔二抗孵育。用四

甲基联苯胺(TMB)显色,测定 450 nm 波长的吸光度(OD_{450})值。每组 3 个重复,重复 3 次。

1.7 Cry 毒素和 GEAb 与 BBMV 的结合生物膜干涉技术(BLI)试验

氨基丙基硅烷(APS)传感器平衡后,在小菜蛾 BBMV(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶液中进行 5 min(包被)固化,在封闭液中封闭 1 min,分别在不同稀释浓度(0.5~4.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的 Cry1B、GEAb-GGCC 和 Cry1Ab 溶液中进行 10 min 结合,在封闭液中解离 10 min。

1.8 GEAb 对小菜蛾的生物活性测定

用磷酸盐溶液(PBS)分别对纯化的 B12、G1、GEAb-GGCC、GEAb-CCGG 和 Cry1Ab 溶液进行 2 倍梯度稀释。每个皿中加入 1 mL 上述稀释的蛋白质溶液,晾干后,挑入 30 只小菜蛾 2 龄幼虫。在饲喂 3 d、5 d 后,进行观察并记录试虫死亡数。每组 3 个重复,重复 3 次。死亡率=死亡数/小菜蛾总数 $\times 100\%$ 。

1.9 Cry1 类毒素与 GEAb-GGCC 的 BBMV 竞争 ELISA 试验

对 Cry1 类毒素(Cry1Ab、Cry1B 和 Cry1Ac)(500 mg/mL)进行 2 倍梯度稀释后,与等体积的 GEAb-GGCC(终浓度 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。在 96 孔板上用 100 μL 小菜蛾 BBMV 包被,封闭过夜。分别加入 100 μL 上述 Cry1 类毒素与 GEAb-GGCC 的混合物孵育 2 h;加入 100 μL 抗 His 二抗孵育 2 h;用四甲基联苯胺显色,测定 OD_{450} 。每组 3 个重复,重复 3 次。

1.10 GEAb-GGCC 的小菜蛾 BBMV 结合蛋白质的鉴定

BBMV 免疫沉淀:将 GEAb-GGCC 与小菜蛾 BBMV 在冰上孵育 12 h;将混合物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 g 离心 1 h,沉淀用 1 mL 溶解缓冲液[50 mmol/L PBS, pH 7.4;1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 7.4;1 mmol/L MgSO_4 ;10% 甘油;2% 3-(3-(胆酰胺丙基)二甲基氨基丙基)-1-丙磺酸内盐(CHAPS);1 mmol/L PMSF]重悬后,冰上孵育 1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 g 离心 1 h,取上清液,加入 Dynabeads[®] His-Tag 磁珠,冰上孵育过夜。混匀后,将装有磁珠的离心管置于磁力架上,吸去上清液。用 Binding/Wash buffer (50 mmol/L PBS, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)重悬后,清洗 4 次。将磁珠重悬于 50 μL 电泳加样缓冲液中,煮沸后用于 SDS-PAGE。

肽指纹质谱(PMF)分析:将相应条带切胶后用胰酶消化,用超高效液相色谱法/串联质谱分析,使用 Mascot

v2.3 搜索引擎在美国国家生物技术信息中心(NCBI)小菜蛾数据库(plutella_db.fa)中进行搜索及注释。

2 结果与分析

2.1 GEAb 的设计以及与 ALP 的分子对接分析

在 BLAST 网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上将母本 B12 和 G1 分别与 Cry1 类毒素(Cry1Ab、Cry1Aa 和 Cry1Ac)进行序列比对,发现 B12 的重链 CDR 1 区与 Cry1 类毒素的保守结构域 Endotoxin N 结构域的序列相似,B12 的轻链 CDR 1 和轻链 CDR 2 区与保守结构域 Endotoxin C 结构域的序列相似;G1 的轻链 CDR 1' 区与保守结构域 Endotoxin C 结构域的序列相似(表 1)。基于上述结果,我们设计了 2 个 GEAb(图 1A),并进行了蛋白质序列同源 BLAST 分析(表 1)。

表 1 蛋白质序列同源性分析结果

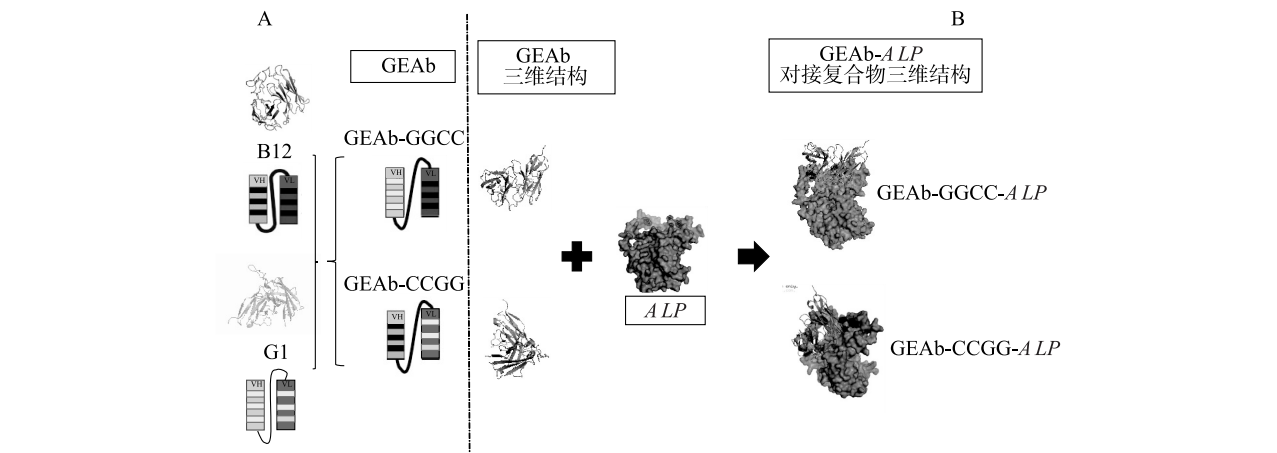
Table 1 Protein homologous sequences by BLAST analysis

抗体	抗体结构域	同源的 Cry1A 类蛋白质结构域
B12	重链 CDR 1	Endotoxin N(结构域I)
	轻链 CDR 3	
	轻链 CDR 1、轻链 CDR 2	Endotoxin C(结构域III)
	GS 连接肽	Endotoxin C(结构域III)
G1	重链 CDR 1'	
	重链 CDR 3'	
	轻链 CDR 1'	Endotoxin C(结构域III)
	轻链 CDR 2'	
	GS 连接肽	Endotoxin C(结构域III)
GEAb-GGCC	重链 CDR 1'	
	重链 CDR 3'	
	轻链 CDR 1、轻链 CDR 2	Endotoxin C(结构域III)
	GS 连接肽	Endotoxin C(结构域III)
GEAb-CCGG	重链 CDR 1	Endotoxin N(结构域I)
	重链 CDR 3	
	轻链 CDR 1'	Endotoxin C(结构域III)
	轻链 CDR 2'	
	GS 连接肽	Endotoxin C(结构域III)

Cry1Ac 的受体蛋白小菜蛾 ALP,与 ABCC2 相比,具有较小的相对分子量以及较为可信的结构模型,被选为 GEAb 分子对接的靶标,用于分子对接(图 1B)。经分子对接预测,Cry1Ab 和 GEAb 分别与小菜蛾 ALP 上的 2 个结合区结合,分别为 ALP 受体结合区 I(W_{53})和 ALP 受体结合区 II(A_{409} 、 Y_{411} 、

Y_{433})(图2)。经预测,GEAb-GGCC与ALP受体结合的热点部位较母体(B12、G1)有所增加,包括重链

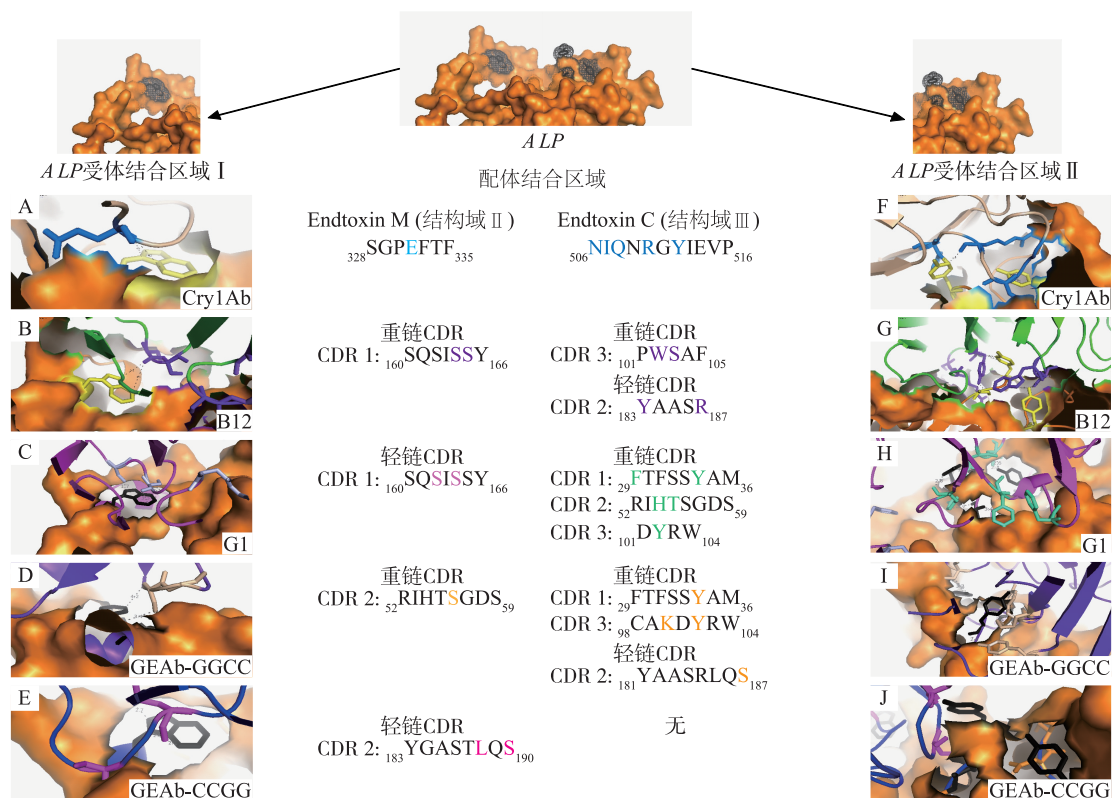
CDR 1、重链 CDR 2、重链 CDR 3 和轻链 CDR 2(图2),推测GEAb-GGCC与ALP的结合活性更高。



A:GEAb 重组设计;B:与ALP的分子对接分析。B12;B12蛋白;G1;G1蛋白质;GEAb-GGCC;GEAb-GGCC蛋白;GEAb-CCGG;GEAb-CCGG蛋白;ALP;碱性磷酸酯酶;GEAb-GGCC-ALP;GEAb-GGCC与ALP的对接复合体;GEAb-CCGG-ALP;GEAb-CCGG与ALP的对接复合体。

图1 基因工程抗体(GEAb)-GGCC的计算机(In silico)设计

Fig.1 In silico design of genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC



橙色、黑色分别为ALP(Surface模式)与ALP结合区I(W₅₃)和结合区II(A₄₀₉、Y₄₁₁、Y₄₃₃)。A和F:Cry1Ab与ALP的结合位点,蓝色为预测的热点氨基酸,并在配体结合区域中显示;B和G:B12与ALP的结合位点,紫色为预测的热点氨基酸,并在配体结合区域中显示;C和H:G1与ALP的结合位点,浅蓝色为预测的热点氨基酸,并在配体结合区域中显示;D和I:GEAb-GGCC与ALP的结合位点,米色为预测的热点氨基酸,并在配体结合区域中显示;E和J:GEAb-CCGG与ALP的结合位点,红色为预测的热点氨基酸,并在配体结合区域中显示。

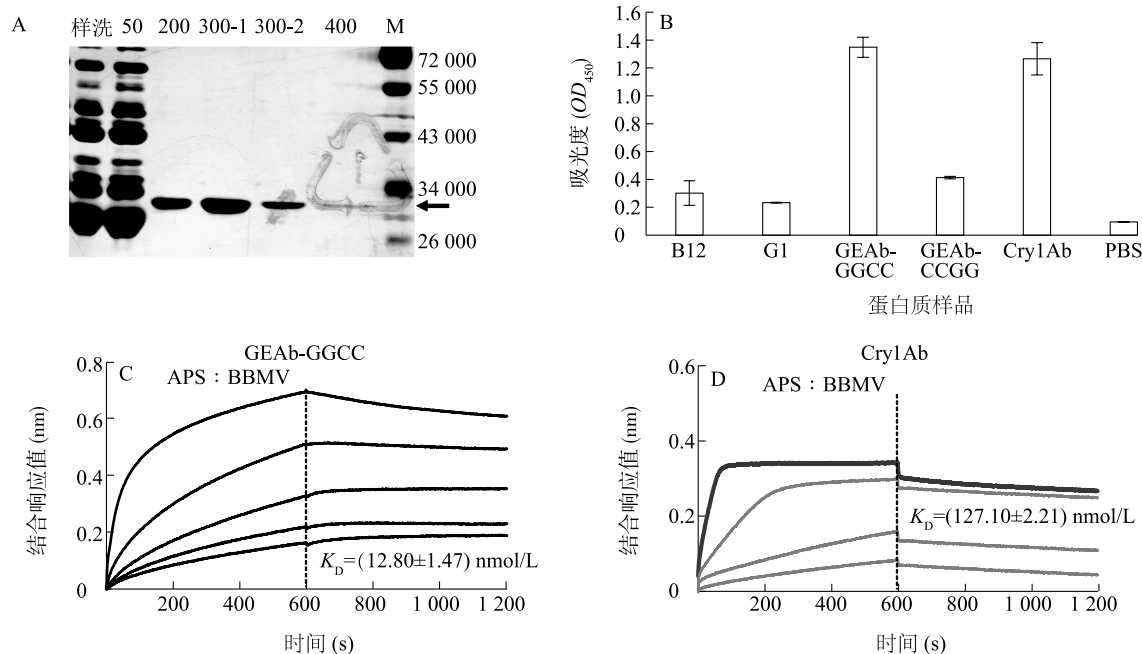
图2 Cry1Ab、B12、G1和基因工程抗体(GEAb)与ALP分子对接的结合位点分析

Fig.2 Binding sites analysis for molecular docking of Cry1Ab、B12、G1 and genetically engineered antibodies (GEAbs) to ALP

2.2 GEAb 对小菜蛾的 BBMV 结合活性验证

GEAb-GGCC 和 GEAb-CCGG 与小菜蛾 BBMV 的结合力利用 ELISA 筛选,结果表明,GEAb-GGCC 具有较高的 BBMV 结合活性(图 3B)。用小菜蛾 BBMV 结合 BLI 的试验对 GEAb-GGCC 进行亲和力测定,确定 GEAb-GGCC 对 BBMV 具有较高亲和力

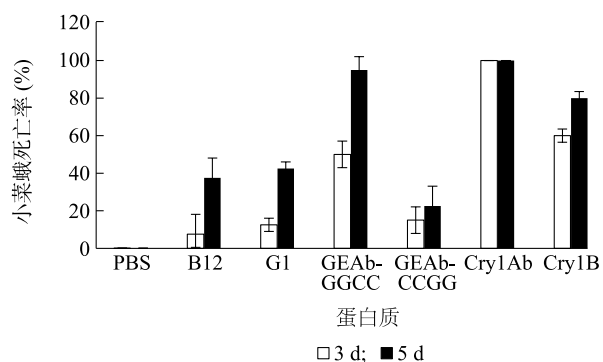
[亲和力常数(K_D)= 12.8 nmol/L],且与 Cry1Ab (K_D = 127.10 nmol/L)相比,GEAb-GGCC 对 BBMV 的亲和力高(图 3C、图 3D)。GEAb 对小菜蛾的生物活性测定结果显示,3 d 时 GEAb-GGCC 对小菜蛾的致死率较母本 B12、G1 高,5 d 时 GEAb-GGCC 的致死率可达 95%(图 4)。



A: 利用组氨酸(His)标签纯化 GEAb-GGCC 的电泳结果(样洗;磷酸盐溶液的洗脱液;50;50 mmol/L咪唑的洗脱液;200;200 mmol/L咪唑的洗脱液;300-1 和 300-2: 300 mmol/L咪唑的洗脱液;400;400 mmol/L咪唑的洗脱液;M: marker;箭头表示纯化的 GEAb-GGCC);B: 各蛋白质 Cry1Ab、B12、G1、GEAb-GGCC、GEAb-CCGG 与小菜蛾 BBMV 结合的酶联免疫吸附试验(ELISA)结果(OD_{450});C: GEAb-GGCC 与小菜蛾 BBMV 结合的 BLI 结合响应曲线(APS: BBMV;APS 探针包被 BBMV;曲线为 APS 探针包被 BBMV 后,分别与不同浓度的 GEAb-GGCC 结合 600 s,并在缓冲液中解离 600 s 的实时结合响应曲线), K_D : 亲和力常数;D: Cry1Ab 与小菜蛾 BBMV 结合的 BLI 结合响应曲线(APS: BBMV;APS 探针包被 BBMV;曲线为 APS 探针包被 BBMV 后,分别与不同浓度的 Cry1Ab 结合 600 s,并在缓冲液中解离 600 s 的实时结合响应曲线)。

图 3 基因工程抗体(GEAb)-GGCC 对小菜蛾中肠刷状边缘膜囊泡(BBMV)的结合活性

Fig.3 Binding activity of genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC to *Plutella xylostella* brush border membrane vesicles (BBMV)



PBS: 磷酸盐溶液, 阴性对照; B12、G1、GEAb-GGCC、GEAb-CCGG、Cry1Ab、Cry1Ba 为抗体蛋白。

图 4 基因工程抗体(GEAb)-GGCC 对小菜蛾的生物活性测定

Fig.4 Bioactivity of genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC against *Plutella xylostella* larvae

2.3 GEAb-GGCC 与 Cry1 类蛋白质有重叠的 BBMV 结合位点

采用间接竞争 ELISA 验证 GEAb-GGCC 是否与 Cry1 类蛋白质有重叠的 BBMV 结合位点。随着 Cry1 类蛋白质(Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry1Ba)的添加浓度的增高,小菜蛾 BBMV 与 GEAb-GGCC 的结合被逐步抑制(图 5),即 GEAb-GGCC 与 Cry1 类蛋白质有重叠的 BBMV 结合位点,初步确定 GEAb-GGCC 通过模拟 Cry1Ba、Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素与 BBMV 结合。在添加 Cry1Ac 和 Cry1Ba 至高浓度(125 μ g/mL)时,对 GEAb-GGCC 与 BBMV 结合的抑制率分别可达 69.8% 和 73.6%;在使用 Cry1Ab 作为竞争对象时,有着相似的抑制率,但需要大约 2

倍的蛋白质浓度。Cry1Ab、Cry1Ba 与 Cry1Ac 对 GEAb-GGCC 的半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 89.6 g/mL、37.99 g/mL和 49.18 g/mL。

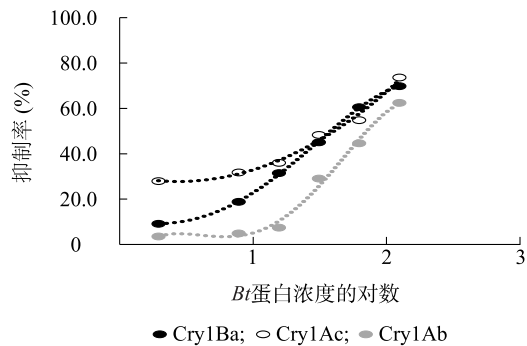


图 5 基因工程抗体 (GEAb)-GGCC 与 Cry1 类蛋白的间接竞争酶联免疫吸附试验 (ELISA) 结果

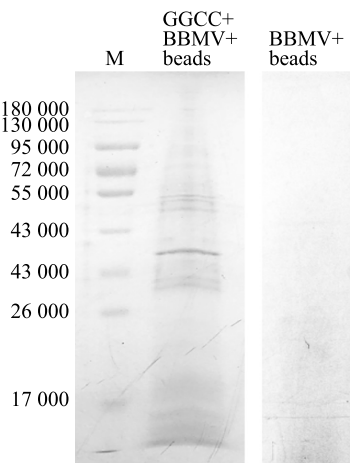
Fig.5 Results of indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) between genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC and Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1B

2.4 与 GEAb-GGCC 结合的小菜蛾 BBMV 蛋白

利用 BBMV-pulldown 和 PMF 分析鉴定出 18 个 GEAb-GGCC 的 BBMV 结合蛋白(图 6、表 2),其中包括常见的 Cry1Ac 受体氨肽酶 N(APN)和 Cry1Ac 结合蛋白 V-ATP 酶 B 亚基、polycalin,未鉴定到 Cry1Ac 的常见受体如钙黏蛋白(CAD)或 ABCC2。通过比对,发现与我们前期筛选获得的 GEAb-dVL 存在相同的 BBMV 结合蛋白,如 polycalin、肌球蛋白、肌动蛋白和 ATP 合酶亚基。分析后发现多个线粒体中的蛋白质也与 GEAb-GGCC 结合,这与前期获得的关于 GEAb-dVL^[14]的研究结果类似,即多个线粒体中的蛋白质与 GEAb-dVL 结合。

2.5 GEAb-GGCC 与小菜蛾 APN3 和 APN5 的分子对接预测分析

小菜蛾 APN3 经验证为 Cry1Ac 的中肠功能受体,且与 Cry1Ac 抗性相关^[12]。在 Cry1Ac 抗性小菜蛾品系(如 DBM1Ac-R、NIL-R、SZ-R 和 SH-R 等品系)中,APN3 等 Bt 受体的相对表达量下调,但同时上调了 APN5 等同源非 Bt 受体基因的相对表达量。分子对接预测结果显示,GEAb-GGCC 分别可与小菜蛾 APN3 和 APN5 结合,但 GEAb-GGCC 与小菜蛾 APN3 的结合区与 Cry1Ac 不同,Cry1Ac 仅与 APN3 结合(图 7)。



M;marker;GGCC+BBMV+beads;GEAb-GGCC 与小菜蛾 BBMV 孵育后再用 His-Tag 磁珠免疫沉淀;BBMV+beads;阴性对照,小菜蛾 BBMV 直接用 His-Tag 磁珠免疫沉淀。

图 6 通过中肠刷状边缘膜囊泡 (BBMV) 免疫沉淀 pull-down 获得与基因工程抗体 (GEAb)-GGCC 结合的小菜蛾 BBMV 蛋白电泳结果

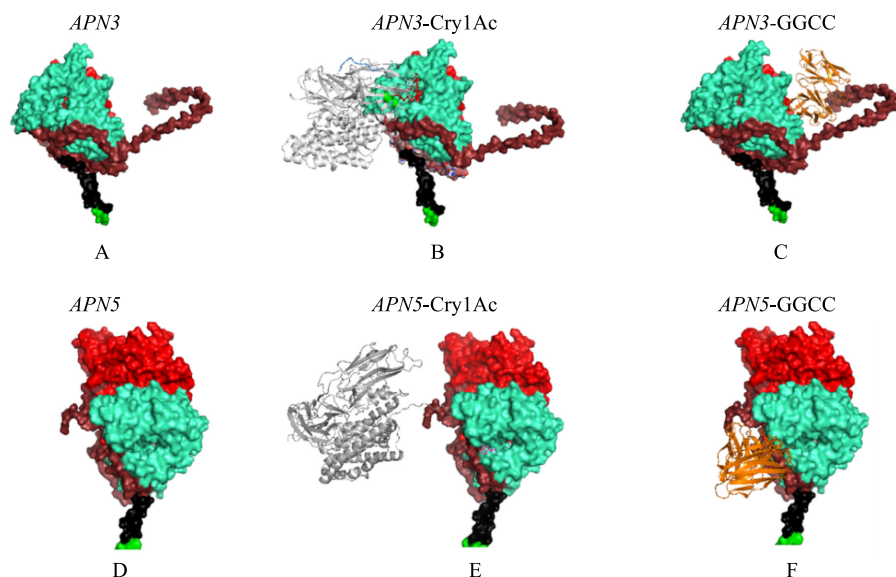
Fig.6 Electrophoretic results of *Plutella xylostella* brush border membrane vesicles (BBMV) proteins bound with genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC in immunoprecipitation pull-down assays

表 2 从中肠刷状边缘膜囊泡 (BBMV)-pulldown 中检测的并通过肽指纹质谱 (PMF) 鉴定的小菜蛾 BBMV 蛋白

Table 2 *Plutella xylostella* brush border membrane vesicles (BBMV) proteins detected from pulldown assays and identified by peptide mass finger printing (PMF)

序号	NCBI 编号	蛋白质相对分子量	匹配多肽数(条)	蛋白质注释
1	gi-AVV48151	326	16	polycalin
2	gi-768433450	225	9	肌球蛋白重链
3	gi-768408046	115	5	氨肽酶 N3a
4	gi-48526296	107	7	氨肽酶 N5
5	gi-768438247	108	6	氨肽酶 N4a
6	gi-1870064	106	3	氨肽酶 N2
7	gi-205361527	60	1	细胞色素 p450
8	gi-768451008	46	5	异磷酸脱氢酶亚基
9	gi-768408000	55	4	ATP 合酶亚基
10	gi-768420669	57	3	醛脱氢酶
11	gi-768413458	57	2	类过氧化氢酶
12	gi-671871185	59	1	P450 CYP6 家族蛋白 10
13	gi-768410410	57	1	类 V-ATP 酶 B 亚基
14	gi-768438971	53	1	Transportin-3-like, 部分
15	gi-768429125	37	1	跨膜蛋白 177
16	gi-117970202	42	4	肌动蛋白
17	gi-768448508	24	1	琥珀酸辅酶 A 连接酶亚基
18	gi-672012377	60	1	热激蛋白 60

NCBI:美国国家生物技术信息中心。



A:小菜蛾 *APN3*;B:小菜蛾 *APN3* 与 Cry1Ac 复合体;C:小菜蛾 *APN3* 与基因工程抗体 (GEAb)-GGCC 复合体;D:小菜蛾 *APN5*;E:小菜蛾 *APN5* 与 Cry1Ac 复合体;F:小菜蛾 *APN5* 与 GEAb-GGCC 复合体。*APN*:氨肽酶 N;红色:*APN* 的 M1-*APN*-Q 保守区结构;蓝绿色:*APN* 的 ER-API_C 保守区;黑色:*APN* 穿膜区;绿色:*APN* 胞内区;咖啡色:*APN* 的其他区域;银色:Cry1Ac;橙色:GEAb-GGCC。

图 7 基因工程抗体 (GEAb)-GGCC 与小菜蛾 *APN3* 和 *APN5* 的分子对接预测结果

Fig.7 Results of molecular docking prediction of genetically engineered antibody (GEAb)-GGCC to *Plutella xylostella* *APN3* and *APN5*

3 讨论

我们对小菜蛾 ALP 进行杀虫蛋白的对靶设计,并筛选获得了 1 个新型的杀虫基因工程抗体 GEAb-GGCC,主要由母本(抗 Cry1Ab 的抗独特型抗体)G1 和 B12 的重链、轻链重组而成。对 GEAb-GGCC、Cry1Ac 与小菜蛾 *ALP* 进行分子对接比对,预测结果表明 GEAb-GGCC 与 Cry1Ac 具有相似的受体结合区,GEAb-GGCC 或可与小菜蛾 BBMV 结合。与预测结果相似,GEAb-GGCC 可以识别小菜蛾中肠 BBMV 中 Cry1A/Cry1B 的结合位点,并通过与 BBMV 结合导致虫体的死亡。

在 Cry1A 类蛋白质的结构中,结构域 I 的 α -螺旋结构对杀虫毒性至关重要^[15-16]。因此,结构域 I 中部分氨基酸的替换可导致 Cry 蛋白毒性丧失,并且去除结构域 I 的 Cry1Ab 也丧失了对小菜蛾幼虫的毒性。由于 GEAb-GGCC 缺乏 α -螺旋的穿孔结构,以及 GEAb-GGCC 与 BBMV 受体的结合区和 Cry1Ab 蛋白与 BBMV 受体的结合区的结构相似性,我们推测 GEAb-GGCC 与 BBMV 结合蛋白质的作用,和 Cry1Ab 与钙黏蛋白受体的结合类似,通过与受体结合时激活细胞死亡途径来发挥其杀虫活性。

GEAb-GGCC 可与 Cry1 类蛋白质竞争,印证了其能够识别小菜蛾 BBMV 中 Cry1A 和 Cry1B 的结合位点。GEAb-GGCC 不能完全竞争 Cry1Ac 或 Cry1Ab 的结果,说明在这个 Cry1Ab/Cry1Ac 结合位点群中存在多个结合位点,并且只有其中一部分被 GEAb-GGCC 识别。

GEAb-GGCC 在小菜蛾中肠中的候选受体包含氨肽酶 *APN2*、*APN3*、*APN4a* 和 *APN5*,以及其他已报道的具有 Cry1A 结合位点的 BBMV 蛋白,如 V-ATP 酶 B 亚基、polycalin 和热激蛋白 60。分子对接预测结果显示,GEAb-GGCC 可与小菜蛾 *APN3*、*APN5* 结合。这与前期获得的杀虫蛋白 GEAb-dV_L 的结果类似,经预测 GEAb-dV_L 也可与小菜蛾 *APN3* 和 *APN5* 结合,且 GEAb-dV_L 对表达 *APN5* 的 sf9 昆虫细胞具有细胞毒性(数据未发表),提示 GEAb-GGCC 或与 GEAb-dV_L 类似,通过与多个中肠受体(如 *APN*)结合,诱导中肠损伤、虫体死亡。

参考文献:

- [1] FIUZA L, POLANCZYK R, CRICKMORE N. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*[M]. Switerland:Springer, Cham, 2017.

- [2] TABASHNIK B E, CARRIÈRE Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(10):926-935.
- [3] GUPTA R D, GOLDSMITH M, ASHANI Y, et al. Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(2):120-125.
- [4] WILLIAMS G J, ZHANG C, THORSON J S. Expanding the promiscuity of a natural product glycosyl-transferase by directed evolution[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(10):657-662.
- [5] BADRAN A H, GUZOV V M, HUAI Q, et al. Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance[J]. *Nature*, 2016, 533:58-63.
- [6] LEE C C, PERCHIACCA J M, TESSIER P M. Toward aggregation-resistant antibodies by design[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(11):612-620.
- [7] 吴梧桐. 蛋白质工程技术与新型生物催化剂设计[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(1):1-6.
- [8] TINBERG C E, KHARE S D, DOU J, et al. Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity[J]. *Nature*, 2013, 501(7466):212-216.
- [9] LI Z, ZALUCKI M P, YONOW T, et al. Population dynamics and management of diamondback moth (*Plutella xylostella*) in China: the relative contributions of climate, natural enemies and cropping patterns[J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2016, 106(2):197-214.
- [10] FURLONG M J, WRIGHT D J, DOSDALL L M. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects[J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58:517-541.
- [11] JURAT-FUENTES L, HECKEL F. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Annual Review of Entomology*, 2021, 66:121-140.
- [12] GUO Z, KANG S, SUN D, et al. MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host[J]. *Nature Communication*, 2020, 11:3003.
- [13] ZHU X, MITCHELL J C. KFC2: a knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density and plasticity features[J]. *Proteins*, 2011, 79:2671-2683.
- [14] XIE Y J, XU C X, GAO M J, et al. Docking-based generation of antibodies mimicking Cry1A/1B protein binding sites as potential insecticidal agents against diamondback moth (*Plutella xylostella*) [J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(10):4593-4606.
- [15] CHEN X J, CURTISS A, ALCANTARA E, et al. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270:6412-6419.
- [16] WU D, ARONSON A I. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267:2311-2317.

(责任编辑:陈海霞)