

# 烟夜蛾幼虫中肠 Bt Cry1Ac 毒素受体蛋白 cDNA 片段的克隆和序列测定

安世恒, 郭线茹, 罗梅浩, 蒋金炜, 马继盛

(河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**利用 RT-PCR 技术扩增烟夜蛾 (*Helicoverpa assulta* Guenée) 幼虫中肠 Bt 毒素 Cry1Ac 受体蛋白 APN(N-氨基肽酶, aminopeptidase N, APN) 基因片段, 克隆和测序结果表明, 测序得到的 812 bp 的片段编码 270 个氨基酸残基, 且该片段在阅读框内。通过同源性分析发现, 其核苷酸序列与棉铃虫 (*H. armigera*)、澳洲棉铃虫 (*H. punctigera*)、烟芽夜蛾 (*H. virescens*)、舞毒蛾 (*Lymantria dispar*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) RC688 品系和 HD198 品系、烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的 Cry1Ac 受体蛋白基因的同源性分别为 97.0%, 90.0%, 78.0%, 63.5%, 55.0%, 60.3%, 61.2%, 55.0% 和 59.0%。推导的烟夜蛾 Cry1Ac 受体蛋白基因的氨基酸序列与棉铃虫、烟芽夜蛾、斑实夜蛾、舞毒蛾的氨基酸序列同源性分别为 95.6%, 81.0%, 82.7% 和 55.7%。该片段编码的氨基酸属于氨肽酶家族, 与烟夜蛾对 Bt Cry1Ac 毒素的抗性有关。

**关键词:** 烟夜蛾; Bt; 受体蛋白; cDNA; 克隆

**中图分类号:** S433 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2005)02-0084-05

## Molecular Cloning and Sequencing of cDNA Fragment Encoding Bt Cry1Ac Toxin Binding Protein from the Midgut of *Helicoverpa assulta* Guenée Larva

AN Shi-heng, GUO Xian-ru, LUO Mei-hao, JIANG Jin-wei, MA Ji-sheng

(Plant Protection College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The cDNA fragment of Bt Cry1Ac toxin binding protein from the midgut of *Helicoverpa assulta* larva was reamplified using RT-PCR technique. This fragment was further cloned and sequenced. The sequenced result showed that the 812 bp nucleotide sequence that encodes 270 amino acid residues were in the encoding frame. Compared with APN gene sequences of *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa punctigera*, *Heliothis virescens*, *Lymantria dispar*, *Plutella xylostella*, *Plodia interpunctella* Rc688, *Plodia interpunctella* HD198, *Manduca sexta* and *Bombyx mori*, the identity were 97.0%, 90.0%, 78.0%, 63.5%, 55.0%, 60.3%, 61.2%, 55.0% and 59.0% respectively. Compared with Bt Cry1Ac binding protein amino acid sequence of *Helicoverpa armigera*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa punctigera*, *Lymantria dispar*, the homology of the reduced amino acid sequence of *Helicoverpa assulta* APN the gene were 95.6%, 81.0%, 82.7% and 55.7% respectively. Moreover the encoding amino acid sequence belongs to the aminopeptidase N (APN) family which is associated with insect resistance to Bt.

**Key words:** *Helicoverpa assulta* Guenée; Bt; Binding-protein; cDNA; Cloning

自 1915 年 Berliner 从德国地中海粉蛾 (*Anagasta kuhniella*) 上分离出一种后来被命名为苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的细菌以来,

Bt 制剂成为当前应用最广、最有效的微生物杀虫剂。随着分子生物学技术和基因工程的发展, 把 Bt 的杀虫基因转入植物中的研究, 为害虫防治开辟了

新的途径。但自从 McCallghey 1985 年报道印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 对 Bt 产生抗性以来<sup>[1]</sup>, Bt 制剂的应用面临着新的挑战, 因为尽管在田间仅有小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 对 Bt 产生抗性, 但在实验室已发现多种昆虫对 Bt 制剂产生了抗性<sup>[2]</sup>。因此如何遏止和延缓昆虫对 Bt 的抗性已成为当前 Bt 研究的热点之一。

据报道, 昆虫对 Bt 毒素的抗性与其中肠的受体蛋白直接相关。如果毒蛋白不与受体结合, 则毒蛋白就不会产生毒性作用, 而且受体数目、结合位点和亲和力的改变也与抗性的形成密切相关<sup>[3~20]</sup>。

烟夜蛾 (*Helicoverpa assulta* Guenée) 为辣椒、烟草等的主要害虫, 喷施 Bt 制剂是防治其幼虫的主要措施之一, 因此, 研究烟夜蛾对 Bt 可能产生抗性的分子机制, 对于科学使用 Bt 制剂, 探究昆虫对 Bt 的抗性机制具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 供试昆虫 烟夜蛾采自河南宜阳烟田, 在实验室用人工饲料饲养 6 代, 取其第 7 代五龄幼虫作为材料。

1.1.2 引物 聚合酶链式反应 (PCR) 上游引物 P<sub>1</sub>: 5' - ACGGTCACCTCTGTGGTCT - 3', 下游引物 P<sub>2</sub>: 5' - TGC GCGATCTCATGGGA GA GA - 3'。引物的设计参考烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 和烟芽夜蛾 (*H. virescens*) *Cry1Ac* 受体蛋白基因的保守序列, 并由上海生物工程公司合成。

1.1.3 菌种与质粒 菌种为大肠杆菌 JM109, 质粒为 pGEM-Easy-T 质粒, 购自 Promega 公司。

1.1.4 主要试剂及工具酶 TRIzol 试剂 (Gibco 公司生产), AMV 反转录酶 (MBI 公司生产), Taq DNA 聚合酶 (Sangon 公司生产), dNTP (Sangon 公司生产), T4DNA 连接酶 (Promega 生产), 核酸内切酶 Not (TaKaRa 生产), 琼脂糖 (Spanish 公司生产), DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司。其他为国产或进口分析纯试剂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成 解剖供试材料, 将幼虫中肠组织移入到无 RNAase 的 1.5 mL 离心管中, 匀浆后加入 1 mL TRIzol 试剂, 按照 Gibco-BRL 说明提取总 RNA。RNA 沉淀溶解于 50  $\mu$ L 无 RNAase 的去离子水中, -70  $^{\circ}$ C 保

存。取总 RNA (2  $\mu$ g/ $\mu$ L) 6  $\mu$ L 和 oligo (dT)<sub>18</sub> 1  $\mu$ L 与无 RNAase 的去离子水 6  $\mu$ L 混合, 70  $^{\circ}$ C 温育 5 min, 轻微离心后收集沉淀物, 加入稀释 5 倍的反转录缓冲液 4  $\mu$ L、dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L、RNA 酶抑制剂和 AMV 各 1  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 合成第一链 cDNA。

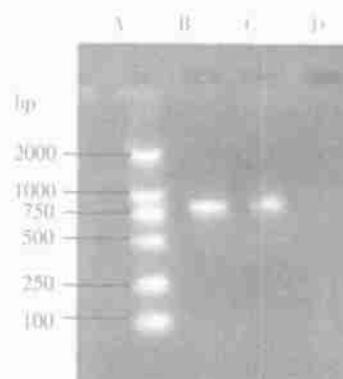
1.2.2 PCR 取 3  $\mu$ L 第一链 cDNA 为模板, 加入引物 P<sub>1</sub> (6.6 ng/ $\mu$ L) 和 P<sub>2</sub> (6.6 ng/ $\mu$ L) 各 2  $\mu$ L, 10 倍的 PCR 反应缓冲液 2.5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (5 u/ $\mu$ L) 0.3  $\mu$ L 进行扩增反应, 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min; 54  $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后 4  $^{\circ}$ C 保存备用。扩增后对 PCR 产物进行纯化。扩增产物在 0.7 % (W/V) 的琼脂糖凝胶中电泳, 鉴定扩增成功与否。

1.2.3 PCR 产物的克隆和序列测定 取纯化后的 PCR 产物, 在 T4 连接酶作用下与 pGEM-Easy-T 质粒进行连接。然后用重组质粒转化大肠杆菌 JM109。37  $^{\circ}$ C 过夜培养后筛选具有插入片段的重组质粒, 提取重组质粒 DNA, 限制性内切酶 Not 进行酶切, 酶切产物在 0.7 % (W/V) 的琼脂糖凝胶中电泳, 从质粒和特异性片段大小鉴定克隆是否成功。克隆成功后进行序列测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Cry1Ac* 受体蛋白基因的 RT-PCR

以 cDNA 为模板, 用设计的一组引物进行 PCR 扩增, 得到约 810 bp 长的特异性 DNA 片段 (图 1 - B, C)。以蒸馏水代替模板 cDNA 的对照没有出现任何条带, 说明反应中不存在交叉污染 (图 1 - D)。



A DNA Marker DL2000 (2000, 1000, 750, 500, 250, 100), B, C RT-PCR 产物; D 清水对照;

B, C RT-PCR result of APN partial; D Water control

图 1 烟夜蛾幼虫中肠 APN 基因片段 RT-PCR 结果  
Fig. 1 The result of a APN gene partial RT-PCR of the midgut of *Helicoverpa assulta* larvae

## 2.2 PCR产物克隆的鉴定结果

重组质粒 DNA 酶切产物电泳结果如图 2 所示,泳道 A 为标准分子量参照物,泳道 B 为重组质粒 DNA 酶切带,在其约 810 bp 处出现一个与第一链 cDNA 的扩增产物大小一致的条带,泳道 C 为对照质粒 DNA,以上结果表明克隆成功。



A DNA Marker DL2000(2000,1000,750,500,250,100);

B 重组质粒/Not; C 重组质粒 DNA;

B Recombinant plasmid DNA digested by Not; C Recombinant plasmid DNA

图 2 重组质粒 DNA 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion result of recombinant plasmid DNA

## 2.3 烟夜蛾 Cry1Ac 受体蛋白基因的序列测定结果

对重组质粒进行测序,得到 812 bp 的核苷酸序

列,图 3 是 Cry1Ac 受体蛋白基因的核苷酸和氨基酸序列,划线部分为引物结合区域。

对已测序的烟夜蛾幼虫 Cry1Ac 受体蛋白基因进行核苷酸序列分析,结果表明,烟夜蛾 Cry1Ac 受体蛋白基因与棉铃虫 (*H. armigera*) (AF292109)、澳洲棉铃虫 (*H. punctigera*) (AF217250)、烟芽夜蛾 (U35096)、舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) (AF126442)、小菜蛾 (AF109692)、印度谷螟 RC688 品系 (AF034483) 和 HD198 品系 (AF034484)、烟草天蛾 (X89081)、家蚕 (*Bombyx mori*) (AF084257) 的 Cry1Ac 受体蛋白基因的同源性分别是 97.0%, 90.0%, 78.0%, 63.5%, 55.0%, 60.3%, 61.2%, 55.0% 和 59.0%。推导的烟夜蛾幼虫 Cry1Ac 受体蛋白基因的氨基酸序列与棉铃虫、烟芽夜蛾、澳洲棉铃虫和舞毒蛾的氨基酸序列的同源性分别为 95.6%, 81.0%, 82.7% 和 55.7%, 并且它们都属于氨肽酶家族。同源分析结果表明, Cry1Ac 受体蛋白基因在不同的科之间有一定的变异,但受体蛋白作为一种重要的功能蛋白质,仍然具有高度的序列保守性。特别是在受体蛋白的一些区域,从高等的脊椎动物到低等的微生物,氨基酸都是十分保守的,在 P, A, T, D, H 等氨基酸及附近区域尤其如此 (表 1)。

```

1  ACG GTC ACC TCT GTG GTC TTG AGG CAA GGA ACG GGA ACG CAA GGA ACA TTG ATC CCC ACC
   T V T S V V L R Q G T G T Q G T L I P T
61  ACC CCT ACA CGT CAA CCT CAA TAC CAC TTC TTG AGG GTC GCA CTT AAT GAT GGC GTT CTC
   T P T R Q P Q Y H F L R V A L N D G V L
121 TCC TAT AAT GAA AAT GTC CCC GTG CAA TAT ACC CTT TCC ATT GAA TTC AAC GCC GAC ATG
   S Y N E N V P V Q Y T L S I E F N A D M
181 CGT GAT GAC ATG TAC GGT ATC TAC AGA AGT TGG TAC AGG AAC TTA CCC ACA GAT AAC AAT
   R D D M Y G I Y R S W Y R N N L P T D N N
241 ATC AAG TGG ATG GCA ACG ACT CAG TTC CAA GCC ACA GCT GCT CGC TAC GCA CTC CCT TGC
   I K W M A T T Q F Q A T A A R Y A L P C
301 TAC GAC GAG CCA GGG TAC AAG GCC AGG TTT GAC GTC ACG ATC AGA CGC CCC TTA GGC TAC
   Y D E P G Y K A R F D V T I R R P L G Y
361 AAA AGT TGG TTC TGT ACC AGA CAG CGG ATC ACG AGG CCA TCA ACC ACT GGT TAC GAA GAA
   K S W F C T R Q R I T R P S T T G Y E E
421 GAT GAG TAT CAC ACG ACC CCG GAA ATG TCT ACC TAC CTT CTG GCT TTA ATT GTT GCT GAA
   D E Y H T T P E M S T Y L L A L I V A E
481 TAC GAC TCT CTT CCA GCT GTC GAT GCT AAC AAT AGA GTT CTG CAT GAA GTT ATT GCA AGG
   Y D S L P A V D A N N R V L H E V I A R
541 CCT GGA GCA ATT AGC AAT GGA CAA GCA GCC TAT GCT CAA AGA GCT GGA CAA GAT CTT CTA
   P G A I S N G Q A A Y A Q R A G Q D L L
601 GGA AAT ATG AGC GAC CAC ACG GGC TTT GAC TTT TAC CTA CAG GAC GAA AAC CTT AAA ATG
   G N M S D H T G F D F Y L Q D E N L K M
661 ACT CAA GCT GCT ATT CCC GAC TTC GGT GCA GGC GCT ATG GAA AAC TGG GGC TTG CTG ACT
   T Q A A I P D F G A G A M E N W G L L T
721 TAC AGG GAA GCT TAC ATT TTG TAT GAC GAA CAA CAC ACG AGC AGC AAC TTC AAG CAA ATC
   Y R E A Y I L Y D E Q H T S S N P F K Q I
781 ATC GCT TAT AT TCT CTT CAT GAG ATC GCG CA
   I A Y I L S H E I A

```

图 3 烟夜蛾 Cry1Ac 受体蛋白基因的核苷酸序列和氨基酸序列

Fig. 3 The deduced nucleotide and amino acid sequence of Cry1Ac receptor protein cDNA

表 1 推导的烟夜蛾幼虫 Cry1Ac 受体蛋白基因氨基酸片段与其他生物的比较

Tab.1 Comparison of deduced amino acid segment of Cry1Ac receptor protein of *Helicoverpa assulta* larvae with other organism

昆虫名称 Name	氨基酸片段 Amino acid
烟夜蛾 ( <i>Helicoverpa assulta</i> )	M T Q A A I P D F G A G A M E N W G L L T Y R E A Y -
澳洲棉铃虫 ( <i>Helicoverpa punctigera</i> )	M T Q A A I P D F G A G A M E N W G L L T Y R E A Y -
舞毒蛾 ( <i>Lymantria dispar</i> )	M T Q A S I P D F G A G A M E N W G L L T Y R E A Y -
烟芽夜蛾 ( <i>Helicoverpa virescens</i> )	M T Q A A I P D F G A G A M E N W G L L T Y R E A Y -
烟草天蛾 ( <i>Manduca sexta</i> )	M K Q A A I P D F S A G A M E N W G L L T Y R E A L -
人 (Human being)	L P D F N A G A M E N W G L V T Y R E N S -
老鼠 (Rat)	L P D F N A G A M E N W G L V T Y R E S A -
酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	V H E F S A G A M E N W G L V T Y R V V D -
兔 (Rabbit)	L P D F S A G A M E N W G L V T Y R E S A -
烟夜蛾 ( <i>Helicoverpa assulta</i> )	- I L Y D E Q H T S S N F K Q I I A Y I L S H E I A
澳洲棉铃虫 ( <i>Helicoverpa punctigera</i> )	- L L Y D E Q H T S S N F K Q I I A Y I L S H E I A
舞毒蛾 ( <i>Lymantria dispar</i> )	- L M Y D E D N T N S H F K Q I I A Y I L S H E I A
烟芽夜蛾 ( <i>Helicoverpa virescens</i> )	- L L Y D E Q H T N S Y F K C Q I I A Y I L S H E I A
烟草天蛾 ( <i>Manduca sexta</i> )	- I L Y D P L N S N H H Y R Q R V A N I V S H E I A
人 (Human being)	- L L F D P L S S S S S N K E R V V T V I A H E L A
老鼠 (Rat)	- L V F D P Q S S S I S N K E R V V T V I A H E I A
酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	- L L L D K D A N S T L D R I Q R V A E V V Q H E I A
兔 (Rabbit)	- L L F D P L V S S I S N K E R V V T V V A H E L A

3 讨论

昆虫对 Bt 抗性的产生有多种途径。Heckel 对抗性发育鉴别出 10 种潜在的机制,但从目前的研究看,细胞膜上受体与毒素的结合的改变和毒素晶状体在中肠中的水解变化是抗性产生的主要环节,对鳞翅目许多种类的大量试验也证实了这一点,如在对印度谷螟、小菜蛾、烟芽夜蛾、棉铃虫、舞毒蛾、家蚕、班实夜蛾和烟草天蛾等昆虫的研究中,大量试验表明对 Bt 毒素的抗性更多的与中肠细胞膜上的受体有关<sup>[5,10,11,13,21]</sup>。

本研究利用分子生物学技术扩增了烟夜蛾 APN 基因的一个片段,核酸和氨基酸分析的结果表明,所克隆的 cDNA 片段为 Cry1Ac 毒蛋白在烟夜蛾幼虫中肠上特异性受体 APN 基因的一段。但由于 APN 基因的全长都在 3.0 kb 以上<sup>[2]</sup>,本研究只得到一个片段,今后应在此基础上研究该基因的全序列的克隆和相关分析。

新近的研究表明,一些昆虫中肠膜上的钙粘蛋白是 Bt 毒素 Cry1A 的受体,它的变异与昆虫对 Bt 产生抗性有关<sup>[22]</sup>。烟夜蛾是否如此,有待研究。

参考文献：

[1] McCaughey W H. Insect resistance to the biological in-

secticide *Bacillus thuringiensis* [J]. Science, 1985, 229: 193 - 195.

[2] Stone T B, Sims S R, Marron P G J. Field performance of transgenic cotton containing the Bt gene[J]. Proc Invertebr Pathol, 1989, 53: 228 - 234.

[3] 冷欣夫,唐振华,王荫长. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[4] Hofte H H de Greve, Seurinck J. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berlinen 1715 [J]. Eur J Biochem, 1986, 161: 273 - 280.

[5] Masson L, Mazza A, Brousseau B, et al. Kinetic of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*[J]. J Biol Chemistry, 1995, 270 (20): 11887 - 11896.

[6] Lee M K, You T H, Young B A, et al. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. Appl Env Microbiol, 1996, 62 (8): 2845 - 2849.

[7] Garczynski S F, Crim J W, Adang M J. Identification of putative insect brush border membrane banding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* endotoxin by protein blot analysis[J]. Appl Env Microbiol, 1991, 57 (10): 2816 - 2820.

- [8] Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H, *et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins correlated with presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(21): 7 844 - 7 848.
- [9] Oddou P, Hartmann H, Radecke F, *et al.* Immunologically unrelated *Heliothis* sp and *Spodoptera* sp midgut membrane proteins bind *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) delta endotoxin[J]. *Eur J Biochem*, 1993, 212: 145 - 150.
- [10] Van Rie J, McCaughey W H, Johnson De, *et al.* Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. *Science*, 1990, 247: 72 - 74.
- [11] Knight P J K, Knowles B H, Ellar D J. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin[J]. *J Biol Chemistry*, 1995, 270(30): 17765 - 17770.
- [12] Gill S S, Cowles E A, Francis V. Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the Lepidopteran insect *Heliothis virescens*[J]. *J Biol Chemistry*, 1995, 270(45): 27277 - 27282.
- [13] Vanlamudi R K, Weber E, Ji I, *et al.* Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of Bt[J]. *J Biol Chemistry*, 1995, 270(10): 5490 - 5494.
- [14] Bruce E. Tabashnick. Evolution of resistance to Bt[J]. *Ann Rev Entomol*, 1994, 39: 47 - 79.
- [15] Ferre J, Escriche B, Bel Y, *et al.* Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal Crystal proteins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132: 1 - 7.
- [16] Gould F, Anderson A, Landis D. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxic adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Environ Entomol*, 1991, 20: 30 - 38.
- [17] Oppert B, Kramer K J, Beeman R W, *et al.* Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins[J]. *J Biol Chemistry*, 1997, 272(38): 23473 - 23476.
- [18] Zhu Y C H, Oppert B, Kramer K J, *et al.* cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains on *Plodia interpunctella* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27(12): 1027 - 1037.
- [19] Schwartz J M, Tabashnik B E, Johnson M W. Behavioral and physiological responses of susceptible and resistant diamondback moth larvae to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Entomol Exp Appl*, 1991, 61(1): 179 - 187.
- [20] Macintosh S C, Stone T B, Jokerst R S, *et al.* Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(20): 8930 - 8933.
- [21] Heckel G D. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 1994, 4: 405 - 417.
- [22] Gahan L J, Gould F, Heckel D J. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Helicoverpa virescens* [J]. *Science*, 2001, 293: 857 - 860