

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2018.04.004

二化螟钙黏蛋白 CAD1 的原核表达及与 Cry1Ac、Cry2Aa 蛋白的结合

周浩^{1,2}, 李博³, 牛林⁴, 邱林⁵, 王永^{1,2*}

¹湖北工程学院生命科学技术学院/特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验,湖北 孝感 432000; ²华中农业大学植物科学技术学院/昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室,湖北 武汉 430070; ³广州海关隶属南沙海关,广东 广州 511400; ⁴中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室,河南 安阳 455000; ⁵湖南农业大学植物保护学院,湖南 长沙 410128

摘要:【目的】二化螟是水稻的重要害虫之一,钙黏蛋白(cadherin,CAD)是一类重要的Bt杀虫蛋白受体,在获得二化螟钙黏蛋白基因(*CsCAD1*)的基础上,明确*CsCAD1*蛋白与Cry1Ac和Cry2Aa蛋白的结合能力。【方法】利用PCR技术克隆*CsCAD1*基因片段,将构建的pET-28a(+)-*CsCAD1*重组质粒转入原核表达菌株BL21(DE3)中,IPTG诱导表达。目的蛋白经Ni柱亲和纯化后SDS-PAGE电泳检测,利用western blot和ligand blot技术分析其与Cry1Ac和Cry2Aa蛋白的结合能力。【结果】重组载体可在表达菌株BL21中表达一个约44 ku的蛋白,原核表达载体构建成功。SDS-PAGE显示该蛋白条带单一,且纯度较好。Ni柱亲和层析纯化该目的蛋白后进行Ligand blot分析,结果显示*CsCAD1*重组蛋白可以与Cry1Ac和Cry2Aa蛋白结合。【结论】*CsCAD1*蛋白可以与Cry1Ac和Cry2Aa蛋白结合,是潜在的Cry蛋白受体,所得结果有助于阐明Cry1Ac和Cry2Aa蛋白对二化螟的作用机制。

关键词: 二化螟; 钙黏蛋白; 原核表达; 蛋白结合

Prokaryotic expression of the cadherin gene in *Chilo suppressalis* and binding analysis with Cry1Ac and Cry2Aa proteins

ZHOU Hao^{1,2}, LI Bo³, NIU Lin⁴, QIU Lin⁵, WANG Yong^{1,2*}

¹Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000, China; ²Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China;

³Guangzhou Customs Attached to Nansha Customs, Guangzhou, Guangdong 511400, China; ⁴Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China;

⁵College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China

Abstract: 【Aim】 *Chilo suppressalis* is one of the most important insect pests in rice, and is sensitive to Bt insecticidal proteins through its cadherin (CAD) receptor. To clarify the role of the receptor in toxicity, the binding ability of *CsCAD1* protein to Cry1Ac and Cry2Aa was clarified. 【Method】 The *CsCAD1* gene fragment was cloned by PCR. The constructed pET-28a(+) *CsCAD1* recombinant plasmid was transferred into the prokaryotic expression strain BL21 (DE3) and the protein was induced by IPTG. The binding ability of the recombinant protein to Cry1Ac and Cry2Aa was analyzed by western blot and ligand blot. 【Result】 The recombinant vector could express a 44 ku protein in the BL21 strain, which indicated that the prokaryotic expression vector was successfully constructed. SDS-PAGE showed a single protein band, indicating purity. Ligand blot results showed that *CsCAD1* recombinant protein could bind to Cry1Ac and Cry2Aa. 【Conclusion】 The *CsCAD1* protein can bind to Cry1Ac and Cry2Aa proteins, and proved to be a potential Cry protein receptor. These results may help to elucidate the mechanism of Cry1Ac and Cry2Aa proteins on *C. suppressalis*.

Key words: *Chilo suppressalis*; cadherin; prokaryotic expression; protein binding

收稿日期(Received): 2018-09-15 接受日期(Accepted): 2018-10-27

基金项目: 湖北省教育厅科研项目(Q20162707)

作者简介: 周浩,男。研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: 475820212@qq.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: wangyong@hbeu.edu.cn

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 是水稻的重要害虫,对水稻产量造成重大损失 (Qiu *et al.*, 2017)。长期以来二化螟的防治一直以化学农药为主,但大量长期使用化学农药使得二化螟产生抗药性,同时造成环境污染,危害人类健康 (徐秀秀等, 2013)。因此,寻找新型有效的防治方法刻不容缓 (曹明章等, 2004)。转基因抗虫水稻为防治二化螟提供了新思路,被认为是一种新的、可替代化学农药的、环境友好的控制害虫危害的策略 (Tang *et al.*, 2018)。利用转基因技术将苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫基因作为外源基因导入农作物中,可以对标靶害虫起到良好的防治效果 (Hu *et al.*, 2018)。

Bt 伴孢晶体产生的 Cry 蛋白杀虫活性物质是目前主要应用的转基因蛋白 (Bravo *et al.*, 2011)。Cry 蛋白对鳞翅目害虫的作用机制已有许多报道 (Hu *et al.*, 2018)。Cry 蛋白被害虫摄取后首先在昆虫消化道内溶解,在敏感害虫中肠蛋白酶的作用下被激活,活化的 Cry 蛋白转运至围食膜,与中肠上皮细胞刷状缘膜囊 (brush border membrane vesicle, BBMVs) 膜上特异性蛋白受体相结合,通过一系列蛋白质相互作用,使中肠细胞裂解或细胞凋亡而导致虫体死亡 (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017)。目前公认的 2 种模型即成孔模型和信号转导模型 (Melo *et al.*, 2016)。成孔模型中,蛋白与受体蛋白相结合,导致蛋白的寡聚化,进而形成穿孔,引起细胞渗漏裂解,虫体死亡 (Bravo *et al.*, 2004); 信号转导模型中, Cry 蛋白与钙黏蛋白 (cadherin, CAD) 相互作用后激发了依赖 Mg^{2+} 的信号级联途径,导致细胞凋亡而引起昆虫死亡 (Zhang *et al.*, 2005)。Jurat-Fuentes & Adang (2006) 提出了成孔和信号转导共同作用的模型。无论是哪种模型, Cry 蛋白与受体蛋白的结合是 Cry 蛋白杀虫活性的前提 (Tanaka *et al.*, 2013)。目前已有许多 Cry 蛋白受体蛋白得到鉴定,包括钙黏蛋白 CAD、氨肽酶、碱性磷酸酶和 ABC 转运蛋白等 (Bravo *et al.*, 2011; Pardo-Lopez *et al.*, 2013; Pigott & Ellar, 2007; Qiu *et al.*, 2017; Soberon *et al.*, 2018)。

CAD 是一类依赖于钙离子的细胞表面跨膜糖蛋白,在细胞裂解、细胞增殖与分化过程中起到重要作用,并能调控细胞外与胞质内的信号传导途径 (Angst *et al.*, 2001)。Vadlamudi *et al.* (1993) 首次在烟草天蛾 *Manduca sexta* L. 中发现 CAD 是 Cry1Ab 蛋白的结合蛋白。此后,在不同类别的昆虫和不同种类的 Cry

蛋白相互作用中,许多昆虫的 CAD 作为 Cry 蛋白的结合或受体蛋白得到证实,如棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) 和欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Flannagan *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2003)。此外, CAD 的突变可导致 CAD 与 Cry 蛋白的蛋白质互作发生改变,进而导致昆虫产生抗性 (Hu *et al.*, 2018)。破坏棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的 CAD 基因与棉铃虫对 Cry1Ac 蛋白的遗传抗性相关 (Wang *et al.*, 2016)。

不同的 Cry 蛋白对不同的昆虫具有特异性,即使同一类别的昆虫也具有差异性 (Park *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2016)。与对 Cry1Ac 敏感的棉铃虫品系相比,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 *HaCad* 基因,棉铃虫对 Cry1Ac 抗性增加 549 倍,但是 Cry2Ab 的敏感性无显著改变 (Wang *et al.*, 2016)。Cry 蛋白在不同的细胞系中同样能够引起不同的细胞死亡反应。在 Cry1Ac 蛋白作用下,转染 *MsCAD* 的 TnH5 细胞能够激活 PKA/AC 通路引起的死亡反应,但是 CF1 细胞中 Cry1Ac 并不激活 PKA/AC 通路,而是引起细胞凋亡 (Soberon *et al.*, 2018)。CAD 与 Cry 蛋白的互作随着鳞翅目昆虫种类的不同而变化 (Stevens *et al.*, 2017)。因此,不同类别的 Cry 蛋白与不同种类昆虫的 CAD 互作需要进行具体研究。

前期的研究表明,利用 RNAi 沉默二化螟 *CAD1* 基因后,二化螟对于 Cry 蛋白的敏感性下降,猜想二化螟 *CAD1* 是 Cry2A 和 Cry1C 的潜在受体 (Zhang *et al.*, 2017)。本研究构建原核表达载体获得二化螟 *CAD1* 蛋白,利用 Ligand blot 技术分析二化螟 *CAD1* 蛋白与 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白的结合能力,初步验证二化螟 CAD 的功能,为进一步阐明二化螟钙黏蛋白 CAD1 的 Cry 蛋白受体功能提供理论支持,也起到丰富和完善 Bt 蛋白杀虫机理的作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试昆虫为二化螟敏感品系,由本课题组室内培养 20 代以上。二化螟幼虫用人工饲料饲养,成虫喂以 10% 蔗糖水。培养条件: 温度 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光周期 16 L : 8 D, 相对湿度 (65 ± 10) %。

1.2 主要试剂

TaqDNA 聚合酶 (Takara 公司)、胶回收试剂盒 (Axygen 公司)、peasy-T1 载体和 Trans BL21 (DE3) 表达感受态细胞 (全式金公司)、限制性内切酶 (Fer-

mentas 公司)、T4 DNA 连接酶(Promega 公司)、10% SDS-PAGE 凝胶配制所用的 TEMED 和 Tris-base(武汉鼎国生物技术有限公司)、硝酸纤维素膜(NC 膜)(Bio-rad 公司)、ECL 试剂盒(Thermo Scientific 公司)、活化的 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白(美国一龙公司 Envirologix Inc.)。Trans1-T1 感受态细胞为本实验室保存,PBS、PBST 缓冲液和蛋白纯化时所使用的 Inclusion binding buffer 为本实验室配制,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 原核表达载体的构建与鉴定

根据已发表的二化螟 CAD1 基因序列(GenBank: DQ821523.2),采用 Primer3web 在线设计特异性引物,正向引物 5'-TGGGGATCCATGCTAGCGGACAGCAGCCTGG-3',反向引物 5'-TCCCTCGAGTAGCCGGAATTGCTTGTGTTGTTGAAC-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 NotI 和 XhoI 酶切位点(下划线表示)。以二化螟中肠 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系为 20 μ L:上下游引物各 0.4 μ L,模板 1 μ L,RNase-free Water 12.8 μ L,LA TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L,LA Buffer 2.0 μ L,dNTP 3.2 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化,连接到 peasy-T1 载体上,转化到 Trans1-T1 感受态细胞,培养后挑取阳性单克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序。

NotI 和 XhoI 双酶切含有 CsCAD1 的 peasy-T1 载体,经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化并回收酶切产物,用 T4 DNA 连接酶连接同样经过双酶切并回收的 pET-28a-(+)载体,转化到 Trans1-T1 感受态细胞,培养后挑取阳性单克隆对其进行测序鉴定。

1.4 目的蛋白的诱导表达和鉴定

将测序正确的 pET-28a-(+)-CsCAD1 重组质粒 1 μ L 加入 100 μ L Trans BL21 感受态细菌中,加入 800 μ L 的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h,4000 g 离心 2 min 后,弃上清,留 100 μ L 菌液重旋沉淀使其均匀,全部涂于含 50 mg $\cdot$ L⁻¹卡那霉素(Kana)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。第 2 天进行 PCR 验证,取 10 μ L 单克隆正确的菌液,于 10 mL Kana 液体培养基中扩大培养至 D₆₀₀ 值达到 0.5~0.8 时,加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol $\cdot$ L⁻¹,于 37 $^{\circ}$ C 继续诱导 4 h,以不加 IPTG 诱导作为阴性对照。诱导结束后,取该表

达菌株,12000 g 离心 1 min,弃上清,向沉淀加 100 μ L 1 $\times$ SDS 缓冲液重悬菌体,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 使蛋白变性,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。之后进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.5 目的蛋白的 Ni 柱亲和纯化

由于二化螟 CAD 是以包涵体形式表达,需用 10 mL 含有 8 mol $\cdot$ L⁻¹尿素的 Binding buffer 平衡层析柱,另用含尿素的 Binding buffer 重悬沉淀,充分混匀,使包涵体溶解,4 $^{\circ}$ C、12000 g 离心 15 min,取上清液作为上样样品。往层析柱加入样品,盖紧盖子,封口膜封好,待其与层析柱充分结合,先用 10 mL Binding Buffer 洗脱杂蛋白,再用不同质量的咪唑和 Binding Buffer 配制不同浓度的洗脱液(pH 调至 7.9),依次洗脱目的蛋白并收集,从每管收集的纯化蛋白中取出 10 μ L 作为样品,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 Cry 蛋白的定量制备

用 PBS 缓冲液溶解 Cry1Ac、Cry2Aa 的蛋白干粉,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,采用分光光度计法制作其标准曲线并测定样品浓度,配好的 Cry 蛋白置-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 目的蛋白 CsCAD1 与 Cry1Ac、Cry2Aa 的结合分析

将纯化后的 CsCAD1 蛋白转移至 NC 膜,用含 5%脱脂牛奶的 PBST 在室温下封闭 2 h;分别转移至含有蛋白量 4、2、1 μ g 的 Cry1Ac、Cry2Aa 的 PBST 中,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;用 PBST 洗涤 NC 膜 6 次,每次 5 min;然后与 Cry1Ac、Cry2Aa 的抗体(1:3500)孵育 2 h,再用 PBST 洗涤 NC 膜 6 次,每次 5 min;之后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3500)孵育 2 h,待 NC 膜晾干,采用 ECL 试剂盒发光显色,显影液观察结果。

2 结果与分析

2.1 CsCAD1 蛋白的诱导表达及纯化

将带有重组质粒 CAD1—pET-28a-(+)的 BL21 菌株进行诱导表达,将目的蛋白进行 SDS-PAGE 检测,并以未加 IPTG 进行诱导作为阴性对照,从染色结果中可以看到,目的蛋白为一分子质量 44 Ku 左右的蛋白条带(图 1A),其分子质量与目的片段通过 DNAMAN 软件预测的蛋白分子质量相符合,初步表明目的蛋白成功表达。

将表达成功的目的蛋白经 Ni 柱纯化后,SDS-PAGE 电泳显示其条带单一(图 1B),表明纯度较好,可用于后续 Ligand blot 分析与 Cry 蛋白的结合实验。

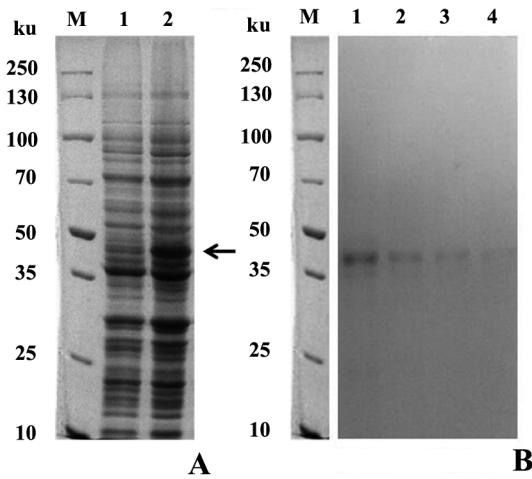


图 1 二化螟 CAD1 蛋白的原核表达和纯化
Fig.1 The prokaryotic expression and purification of *C. suppressalis* CAD1

A: 二化螟 CAD1 蛋白的原核表达。M, 蛋白质标准品, 未加 IPTG 诱导的总蛋白。2, IPTG 诱导的总蛋白, 箭头所示为诱导蛋白所在位置;
B: 二化螟 CAD1 蛋白的纯化, 1~4 分别为不同上样量的纯化蛋白。
A: The prokaryotic expression of *C. suppressalis* CAD1. M, Protein standard. 1, Total protein induced without IPTG. 2, Total protein induced by IPTG. The arrow showed the location of the induced protein; B: The purification of *C. suppressalis* CAD1. 1~4, Purified proteins with different amounts.

2.2 CsCAD1 蛋白与 Cry1Ac、Cry2Aa 的结合

为了检测 CsCAD1 蛋白能否与 Cry1Ac、Cry2Aa 蛋白结合,进行了 Ligand blot 实验。先在 NC 膜上封闭 CsCAD1 蛋白,将蛋白量分别为 4、2 和 1 μg 的 Cry1Ac 或 Cry2Aa 蛋白与 NC 膜结合,再分别与 Cry1Ac 或 Cry2Aa 的抗体结合,加入辣根过氧化物酶标记的二抗与一抗结合,最后进行显色反应。结果表明,Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白均能够与 CsCAD1 蛋白结合,并且随着 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白量的增加,CsCAD1 蛋白与二者结合的条带更亮(图 2),表明在二化螟中 CAD 蛋白具有与 Cry 蛋白结合的能力,CAD1 蛋白可能是 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白的潜在受体。

3 讨论

Cry 蛋白与昆虫中肠 BBMVs 上的蛋白相结合是其发挥杀虫活性的基础,也是 Cry 杀虫特异性的关键 (Bravo *et al.*, 2004)。2 种公认的 Cry 蛋白作用机制中,CAD 作为结合蛋白均参与 Cry 蛋白的杀虫活性。CAD 是研究比较深入的受体蛋白,在不同的昆虫中,被鉴定为不同 Cry 蛋白的结合蛋白或受体,或者同一昆虫体内多个结合蛋白参与 Cry 的活性功能,已报道 CAD 和 APN 是二化螟体内 Cry1Ad 毒素的结合蛋白 (Qiu *et al.*, 2017)。本研究证实 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋

白可以与二化螟中肠的 BBMVs 结合,并能与原核表达的 CsCAD1 蛋白结合,这可能是 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白对二化螟起作用的重要机制。

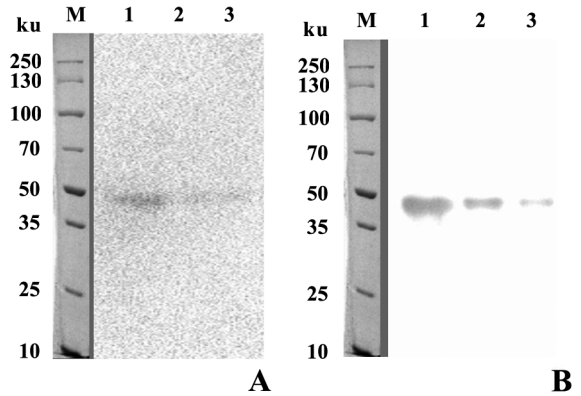


图 2 二化螟 CAD1 与 Cry1Ac、Cry2Aa 蛋白的结合
Fig.2 Binding reaction of *C. suppressalis* CAD1 with Cry1Ac and Cry2Aa protein

A: 二化螟 CAD1 蛋白与 Cry1Ac 蛋白的结合, M: 蛋白质标准品; 1~3 依次为 4、2 和 1 μg 的 Cry1Ac 蛋白。B: 二化螟 CAD1 蛋白与 Cry2Aa 蛋白的结合, M: 蛋白质标准品; 1~3 依次为 4、2 和 1 μg 的 Cry2Aa 蛋白。
A: Binding reaction of *C. suppressalis* CAD1 and the Cry1Ac protein. M, Protein Standard. 1~3, Cry1Ac toxin of 4, 2 and 1 μg , respectively; B: Binding reaction of *C. suppressalis* CAD1 and the Cry2Aa protein. M, Protein Standard. 1~3, Cry1Ac toxin of 4, 2 and 1 μg , respectively.

CAD 定位于中肠上皮细胞,不同物种中 CAD 作为结合蛋白的功能并不相同,这已在部分鳞翅目、鞘翅目和双翅目昆虫中得到验证 (Park *et al.*, 2014)。一些鳞翅目昆虫体内 CAD 已经被鉴定为 Cry1A 蛋白的受体,如棉铃虫、棉红铃虫、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner 和欧洲玉米螟等 (Flanagan *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2016)。由于昆虫物种的丰富性和 Cry 毒性的多样性,不同物种中 CAD 蛋白的作用差异较大 (Ren *et al.*, 2016; Stevens *et al.*, 2017)。甜菜夜蛾 CAD 蛋白报道作为 Cry1Ca 受体 (Gong *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2016),然而,基因沉默其 80% CAD 基因表达仅导致其对 Cry1Ca 的敏感性降低 50%,表明甜菜夜蛾体内还存在其他的 Cry1Ca 结合蛋白或受体 (Gong *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2016)。表达 HvCAD (*Heliothis virescens* CAD)的细胞可与 Cry1A 蛋白结合,但不能与 Cry1Fa 结合 (Jurat-Fuentes & Adang, 2006; Soberon *et al.*, 2018)。相反,有报道 Cry1A 和 Cry1Fa 在 *H. virescens* 中肠膜上具有共同的结合位点,并且 Cry1Ac 抗性的 *Heliothis virescens* 与 Cry1Fa 存在交互抗

性(Gould *et al.*, 1995; Soberon *et al.*, 2018)。后来研究表明, HvCAD 是 Cry1A 类蛋白而不是 Cry1Fa 蛋白的唯一受体, 交互抗性可能是与 CAD 不同的其他结合蛋白的突变引起的(Jurat-Fuentes & Adang, 2006; Soberon *et al.*, 2018)。小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 体内 Cry1Ac 的功能受体是 ABCC2 而不是 CAD 蛋白, CAD 蛋白起辅助作用, 其 CAD 在 Bt 作用机理中的重要性随着鳞翅目昆虫种类的不同而变化(Stevens *et al.*, 2017)。小粉虫 *Alphitobius diaperinus* (Panzer) 体内一个 185 ku AdCad1 蛋白被鉴定为 Cry3Bb 蛋白的受体, 沉默 *AdCad1* 基因导致小粉虫对 Cry3Bb 的敏感性明显降低(Hua *et al.*, 2014)。双翅目昆虫中, CAD 调节埃及伊蚊 *Aedes Aegypti* (L.) Cry11Aa 对其幼虫的毒性, 沉默其 *CAD* 基因导致其对 Cry11Aa 的敏感性降低(Lee *et al.*, 2015; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015)。研究显示, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles 体内 2 个 *CAD* 基因中, AgCad1 蛋白不是 Cry11Ba 的受体, AgCad2 蛋白可能是 Cry11Ba 的功能受体(Hua *et al.*, 2013)。同样, 埃及伊蚊中, 沉默 *CAD* 基因并不影响 Cry4Ba 的毒性, 而沉默 *CAD* 基因导致幼虫对 Cry11Aa 展现较高的抗性(Rodriguez-Almazan *et al.*, 2012; Soberon *et al.*, 2018)。相反, 转染 *SeCAD* 细胞并没有增加对 Cry1Ac 的敏感性, 但却导致了 Cry1C 蛋白的敏感(Ren *et al.*, 2016; Soberon *et al.*, 2018)。

许多昆虫对 Cry 蛋白的作用机制和抗性机制存在明显差异, 只有深入研究每个物种的具体情况才能更好地应用 Cry 蛋白进行害虫防治(Fabrick & Wu, 2015)。对二化螟 CAD 蛋白最新研究发现, siRNA 干扰 *CAD1* 或 *CAD2* 基因后二化螟幼虫具有低死亡率和高存活率, 表明 *CAD1* 或 *CAD2* 基因的表达与 Cry2A 和 Cry1C 蛋白在二化螟体内的毒性相关(Zhang *et al.*, 2017)。本研究结果进一步证实 *CAD1* 蛋白可与 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白相结合, 是它们潜在的受体蛋白, 为二化螟体内 Cry 蛋白的结合蛋白和/或潜在的受体蛋白的研究提供基础。

参考文献

曹明章, 沈晋良, 张金振, 吕梅, 刘晓宇, 周威君, 2004. 二化螟抗药性监测和对三唑磷抗性的遗传分析. 中国水稻科学, 18(1): 73-79.

徐秀秀, 韩兰芝, 彭于发, 侯茂林, 2013. 转基因抗虫水稻的研发与应用及在我国的发展策略. 环境昆虫学报, 35

(2): 242-252.

- ANGST B, MARCOZZI C, MAGEE A I, 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(4): 629-641.
- BRAVO A, GOMEZ I, CONDE J, MUNOZ-GARAY C, SANCHEZ J, MIRANDA R, ZHUANG M, GILL S S, SOBERON M, 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667(1): 38-46.
- BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, SOBERON M, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423-431.
- FABRICK J A, WU Y D, 2015. Roles of insect midgut cadherin in Bt intoxication and resistance//SOBERON M, GAO Y L, BRAVO A. *Bt Resistance: characterization and strategies for GM crops producing Bacillus thuringiensis toxins*. London: CABI: 69-86.
- FLANNAGAN R D, YU C G, MATHIS J P, MEYER T E, SHI X, SIQUEIRA H A, SIEGFRIED B D, 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1): 33-40.
- GONG L, WANG H, QI J, HAN L, HU M, JURAT-FUENTES J L, 2015. Homologs to Cry toxin receptor genes in a de novo transcriptome and their altered expression in resistant *Spodoptera litura* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 129: 1-6.
- GOULD F, ANDERSON A, REYNOLDS A, BUMGARNER L, MOAR W, 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*, 88(6): 1545-1559.
- HU X, ZHANG X, ZHONG J, LIU Y, ZHANG C, XIE Y, LIN M, XU C, LU L, ZHU Q, LIU X, 2018. Expression of Cry1Ac toxin-binding region in *Plutella xylostella* cadherin-like receptor and studying their interaction mode by molecular docking and site-directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 822-831.
- HUA G, PARK Y, ADANG M J, 2014. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 11-17.
- HUA G, ZHANG Q, ZHANG R, ABDULLAH A M, LINSER P J, ADANG M J, 2013. AgCad2 cadherin in *Anopheles*

- gambiae* larvae is a putative receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(2): 153–161.
- JURAT-FUENTES J L, ADANG M J, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3): 166–171.
- JURAT-FUENTES J L, CRICKMORE N, 2017. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. *Journal of Invertebrate Pathology*, 142: 5–10.
- LEE S B, CHEN J, AIMANOVA K G, GILL S S, 2015. Aedes cadherin mediates the in vivo toxicity of the Cry11Aa toxin to *Aedes aegypti*. *Peptides*, 68: 140–147.
- MELO A L, SOCCOL V T, SOCCOL C R, 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2): 317–326.
- MORIN S, BIGGS R W, SISTERTON M S, SHRIVER L, ELLERS-KIRK C, HIGGINSON D, HOLLEY D, GAHAN L J, HECKEL D G, CARRIERE Y, DENNEHY T J, BROWN J K, TABASHNIK B E, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9): 5004–5009.
- PARDO-LOPEZ 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.
- PARK Y, HUA G, TAYLOR M D, ADANG M J, 2014. A coleopteran cadherin fragment synergizes toxicity of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry3Aa, Cry3Bb, and Cry8Ca against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 123: 1–5.
- PIGOTT C R, ELLAR D J, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 255–281.
- QIU L, FAN J, ZHANG B, LIU L, WANG X, LEI C, LIN Y, MA W, 2017. RNA interference knockdown of aminopeptidase N genes decrease the susceptibility of *Chilo suppressalis* larvae to Cry1Ab/Cry1Ac and Cry1Ca-expressing transgenic rice. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145: 9–12.
- REN X L, JIANG W L, MA Y J, HU H Y, MA X Y, MA Y, LI G Q, 2016. The *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) ABCC2 mediates Cry1Ac cytotoxicity and, in conjunction with cadherin, contributes to enhance Cry1Ca toxicity in Sf9 cells. *Journal of Economic Entomology*, 109(6): 2281–2289.
- RODRIGUEZ-ALMAZAN C, REYES E Z, ZUNIGA-NAVARRETE F, MUNOZ-GARAY C, GOMEZ I, EVANS A M, LIKITVIVATANAVONG S, BRAVO A, GILL S S, SOBERON M, 2012. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*, 443(3): 711–717.
- SOBERON M, PORTUGAL L, GARCIA-GOMEZ B I, SANCHEZ J, ONOFRE J, GOMEZ I, PACHECO S, BRAVO A, 2018. Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 66–78.
- STEVENS T, SONG S, BRUNING J B, CHOO A, BAXTER S W, 2017. Expressing a moth *abcc2* gene in transgenic *Drosophila* causes susceptibility to Bt Cry1Ac without requiring a cadherin-like protein receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80: 61–70.
- TANAKA S, MIYAMOTO K, NODA H, JURAT-FUENTES J L, YOSHIZAWA Y, ENDO H, SATO R, 2013. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, 280(8): 1782–1794.
- TANG H, CHEN G, CHEN F, HAN L, PENG Y, 2018. Development and relative fitness of Cry1C resistance in *Chilo suppressalis*. *Pest Management Science*, 74(3): 590–597.
- VADLAMUDI R K, JI T H, BULLA L A, 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17): 12334–12340.
- WANG J, ZHANG H, WANG H, ZHAO S, ZUO Y, YANG Y, WU Y, 2016. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 11–17.
- ZHANG Q, HUA G, ADANG M J, 2015. Chitosan/DsiRNA nanoparticle targeting identifies AgCad1 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae as an in vivo receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60: 33–38.
- ZHANG X, CANDAS M, GRIKO N B, ROSE-YOUNG L, BULLA L A, 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12(11): 1407–1416.
- ZHANG Z, TENG X, MA W, LI F, 2017. Knockdown of two cadherin genes confers resistance to Cry2A and Cry1C in *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*, 7(1): 5992.