

小菜蛾中肠氨肽酶基因 *PxAPN5* 的克隆、原核表达及蛋白质同源建模分析

许炼², 高焕娟², 潘志针¹, 朱育菁¹, 陈清西^{2,*}, 刘波^{1,*}

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要: 【目的】克隆和表达小菜蛾 *Plutella xylostella* 氨肽酶基因, 并进行基因序列分析和同源建模分析。【方法】以小菜蛾中肠 cDNA 为模板克隆分析氨肽酶基因序列, 原核表达氨肽酶蛋白并进行酶活性测定, 应用配体印迹分析氨肽酶与 Cry2Ab 蛋白的结合, 通过蛋白质建模对突变位点进行分析。【结果】从小菜蛾中肠 cDNA 扩增出氨肽酶基因, 该基因全长 2 853 bp, 编码 950 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 107.3871 kDa, 等电点为 5.24; 进化树分析显示, 克隆得到的氨肽酶基因属于 APN 家族 5, 将其命名为 *PxAPN5* (GenBank 登录号: KM034756)。PxAPN5 蛋白具有鳞翅目昆虫氨肽酶蛋白的保守性特征, 即含有 N-糖基化位点、O-糖基化位点和 GPI 锚定位点, 具有“HEXXH”锌蛋白酶结构域和 C 端跨膜区域。在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中原核表达 *PxAPN5*, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳, 在 110 kDa 附近出现特异性条带; 酶活性测试显示菌体破碎上清液具有氨肽酶活性, 比活力为 1 047.2 U/g。配体印迹结果显示表达的 *PxAPN5* 能与 Cry2Ab 蛋白特异性结合。多序列比对结果表明, 与其他已报道的小菜蛾氨肽酶相比, *PxAPN5* 氨基酸序列有 3 个保守性位点发生了突变, 并通过蛋白质建模的方式表征突变位点。【结论】本研究成功克隆和表达了具有氨肽酶活性的小菜蛾氨肽酶, 并发现其能与 Cry2Ab 蛋白特异性结合; 通过蛋白质建模对氨肽酶突变位点的特征及功能进行了预测。这些结果对小菜蛾氨肽酶的功能性研究提供了理论基础。

关键词: 小菜蛾; 氨肽酶基因; 基因分析; 原核表达; 酶活性; 配体印迹; 同源建模

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2014)11-1272-09

Cloning, prokaryotic expression and homology modeling analysis of midgut aminopeptidase gene *PxAPN5* in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

XU Lian², GAO Huan-Juan², PAN Zhi-Zhen¹, ZHU Yu-Jing¹, CHEN Qing-Xi^{2,*}, LIU Bo^{1,*} (1. Agricultural Bio-Resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract 【Aim】The aim of this study is to analyze the cloning, expression and homology modeling of midgut aminopeptidase gene *PxAPN5* in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. 【Methods】A aminopeptidase (APN) gene was cloned from the *P. xylostella* midgut, and bioinformatics analysis of the gene was performed. The APN protein was expressed using prokaryotic expression system, and its enzymatic activity was assayed. The interaction between APN and Cry2Ab was determined by using ligand blot analysis. Homology modeling of APN gene was conducted for the prediction of characteristics and functions of mutation sites. 【Results】The sequencing results showed that the cloned APN gene (NCBI accession no.: KM034756) is 2 853 bp in length and encodes 950 amino acids with the predicted molecular weight of 107.3871 kDa and isoelectric point of 5.24. Phylogenetic tree analysis indicated that this APN gene belongs to class 5 of APN family, and it was named as *PxAPN5*. *PxAPN5* has the conservative features of the APN proteins in lepidopteran insects including N-glycosylation and O-glycosylation sites, GPI anchor point, C-transmembrane domains and zinc-metalloprotease domain (³⁶¹HEXXH³⁶⁵). A 110 kDa specific protein band appeared when APN protein was inducibly expressed in *Escherichia coli*. Aminopeptidase activity assay showed that the supernatant of broken bacteria possessed

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371999, 31370059)

作者简介: 许炼, 男, 1990 年生, 福建漳州人, 硕士研究生, 主要从事微生物技术研究, E-mail: xulian2014@sina.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: fzliubo@163.com; chenqx@xmu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-08-01; 接受日期 Accepted: 2014-10-17

aminopeptidase activity and its specific activity was 1 047. 2 U/g. The ligand blot result indicated that *PxAPN5* could bind to Cry2Ab specially. Multiple alignment of amino acid sequences demonstrated that there are three mutations in *PxAPN5* when compared to other known APN proteins from *P. xylostella*. 【Conclusion】 The *PxAPN5* protein with aminopeptidase activity was successfully cloned and expressed, and it could bind to Cry2Ab. Prediction of characteristics and functions of mutation sites in *PxAPN5* was carried out by homology modeling. These results laid the foundation for the functional research of *PxAPN*.

Key words: *Plutella xylostella*; aminopeptidase (APN) gene; gene analysis; prokaryotic expression; enzyme activity; ligand blot; homology modeling

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是一种世界性害虫, 主要为害甘蓝、萝卜、白菜、油菜等十字花科植物(胡奇和刘玉冬, 2003)。由于小菜蛾繁殖能力强, 寄主范围广, 抗药性发展快, 导致防治十分困难(黄剑和吴文君, 2003)。Bt 毒素是一类具有种属特异性、环境可降解性和高毒力作用的杀虫毒蛋白, 已广泛应用于多种害虫防治和转基因抗虫作物, 早期防治小菜蛾也有极显著的效果(Bravo *et al.*, 2007; Vachon *et al.*, 2012)。但随着 Bt 杀虫剂的长期使用, 小菜蛾对 Bt 杀虫剂也产生了抗性(罗雁婕等, 2008)。因此, 揭示小菜蛾对 Bt 毒素的抗性机制, 延缓其对 Bt 毒素的抗性产生, 成为 Bt 杀虫剂持续应用急需解决的难题。

近年来研究表明, 昆虫对 Bt 抗性产生的主要原因是 Bt 毒素与昆虫中肠刷状缘膜囊泡(brushborder membrane vesicles, BBMV) 上受体结合能力的下降(Park *et al.*, 2009)。目前, 已经明确的 Bt 毒素受体有氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN)(Ren *et al.*, 2014)、类钙粘蛋白(cadherin-like protein)(Hua *et al.*, 2014)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)(Jiménez *et al.*, 2012)等。其中氨肽酶是目前研究最多、机理研究最深入的 Bt 受体蛋白之一。从 1994 年首次鉴定出烟草天蛾 *Manduca sexta* 的氨肽酶为 Bt 毒素 Cry1A 的受体以来(Knight *et al.*, 1994), 通过 far-Western Blot 和 RNAi 等方法对 Bt 毒素与氨肽酶的结合进行了大量研究(Contreras *et al.*, 2013), 发现氨肽酶基因的沉默(Rajagopal *et al.*, 2002)、突变或缺失(Zhang *et al.*, 2009)均可引起害虫对 Bt 毒素产生抗性。目前已有小菜蛾(Chang *et al.*, 2012)、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*(Xu *et al.*, 2014)、甜菜夜蛾 *Spodoptera litura*(Ren *et al.*, 2014)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(Contreras *et al.*, 2013)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Sivakumar *et al.*, 2007)等 10

余种昆虫的氨肽酶被鉴定为 Cry 蛋白的受体。

鳞翅目氨肽酶属于锌结合的金属蛋白酶超家族(Pigott and Ellar, 2007), 对已经发现的鳞翅目氨肽酶进行分类, 发现氨肽酶主要分为五大类以及其他 APNs, 其中前面五大类占总的氨肽酶的 95% 以上(马文静等, 2011)。生物信息学结果显示鳞翅目氨肽酶主要含有 GPI 锚定位点、N-糖基化位点和 O-糖基化位点(王兴云等, 2012), 这些位点均与 Bt 毒素与受体相互作用相关, 而这些位点的突变则可能导致氨肽酶与受体结合能力的下降(Crava *et al.*, 2013)。

不同地理种群小菜蛾对不同杀虫剂的抗药性存在差异。如不同地区小菜蛾对不同杀虫剂的敏感性不同(陈之浩等, 1992), 测定福建不同地区和生境小菜蛾种群的脂酶同工酶 EST, 发现存在种群异质现象(余德亿等, 2002)。福州位于欧亚大陆东南边缘, 东临太平洋, 地处中国东南沿海, 属于典型的河口盆地, 盆地四周被群山峻岭环抱, 海拔高度多在 600~1 000 m 之间, 属于亚热带季风气候。福州独特的生境赋予了当地小菜蛾的特异性及对 Bt 毒素不同的敏感性。氨肽酶作为 Bt 毒素的主要受体之一, 与 Bt 毒素的毒力及害虫的抗药性息息相关。为此, 本研究采用从福建福州地区(26.08°N, 119.28°E)获得的小菜蛾敏感品系为模板, 克隆和表达了小菜蛾的 *APN5* 基因, 并进行基因序列分析和蛋白质建模研究, 以期小菜蛾氨肽酶的功能性研究及其对 Bt 毒素杀虫机制的影响提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

小菜蛾由福建农林大学应用生态研究所馈赠, 为采用萝卜苗连续饲养 5 年, 100 代以上的敏感种群。感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 均

为本实验室保存; 原核表达载体 pET30a 购自 Novagen 公司。

1.2 主要试剂

扩增氨肽酶基因的引物由上海生工生物工程公司合成; 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 *Bgl* II 及 *Xho* I、高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、T4 DNA ligase、pMD18-T Vector、RNA 提取试剂盒 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 和反转录试剂盒 PrimeScript[™] II High Fidelity RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司; 酵母提取物和胰化蛋白胨购自 OXOID 公司; Cry2Ab 蛋白鼠单抗购自上海鹭隆生物有限公司。

1.3 小菜蛾氨肽酶基因的克隆

选取 4 龄末期小菜蛾幼虫 30 头, 抽取其中肠, 按照 RNA 提取试剂盒 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 操作说明提取小菜蛾中肠 RNA, 总 RNA 反转录为 cDNA 的方法按反转录试剂盒 PrimeScript[™] II High Fidelity RT-PCR Kit 操作说明进行。根据 NCBI 小菜蛾氨肽酶基因保守序列设计一对特异性引物:

APN F: 5'-GCAGATCTGATGGCTCTTCTTCTGA-3' (下划线为 *Bgl* II 酶切位点);

APN R: 5'-GCCTCGAGTTACTTCATCAATAGCG-3' (下划线为 *Xho*I 酶切位点)。

以小菜蛾中肠 cDNA 为模板, PCR 扩增得到氨肽酶基因, 连接 pMD18-T 载体后测序, 并将序列提交到 NCBI。

1.4 氨肽酶基因序列分析

利用 MEGA 软件, 构建不同鳞翅目昆虫氨肽酶的氨基酸序列系统发育树, 利用 ExPASy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测小菜蛾氨肽酶的等电点和分子量; 利用 GPI Prediction Server (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) 分析氨肽酶 C 端 GPI 结合位点; 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行结构域分析; 利用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>) 分别预测氨肽酶的 N-糖基化结合位点和 O-糖基化结合位点。

1.5 氨肽酶基因的克隆及原核表达载体的构建

氨肽酶基因和 pET30a 载体经 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下形成表达载体

pET30a-APN。采用热击法将 pET30a-APN 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆。将测序正确无突变的重组质粒 pET30a-APN 转化感受态 BL21。载体构建过程中所涉及的 PCR 技术和质粒提取、纯化、酶切、连接、转化等基本操作均参考分子克隆实验指南和试剂盒说明书。

1.6 氨肽酶基因的原核表达及表达产物的酶活性测定

吸取含有 pET30a-APN 重组质粒的 BL21 菌液, 接种到 LB 液体培养基(Kanamycin 终浓度为 35 μ g/mL), 160 r/min 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日按 1% 重新接种到 LB 液体培养基(Kanamycin 终浓度为 35 μ g/mL), 220 r/min 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h, 此时菌液的 OD 值约在 0.5 ~ 0.8 之间。加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 转数、温度和时间分别设为 180 r/min, 30 $^{\circ}$ C 和 3 h, 诱导氨肽酶表达, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

酶活力定义: 在 40 $^{\circ}$ C pH 8.0 的条件下, 每分钟分解 L-亮氨酸-4-硝基苯胺生成 1 μ mol 对硝基苯胺所需的酶量为一个酶活力单位; 氨肽酶酶活力测定参照张洁等(2013)的方法并加以改进。取 600 μ L Tris-HCl(0.25 mol/L, pH 8.0), 加入 50 μ L L-亮氨酸-4-硝基苯胺(0.05 mol/L) 和 10 μ L 含有原核表达的氨肽酶蛋白的细胞破碎上清液, 40 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后, 冰浴终止反应, 5 min 后于 405 nm 波长测定吸光值。以未加 IPTG 诱导的细胞破碎上清液和敏感型小菜蛾氨肽酶分别作为阴性对照和阳性对照。

1.7 配体印迹分析

原核表达的氨肽酶细胞破碎上清液经 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 湿转到 PVDF 膜; 含有氨肽酶蛋白的 PVDF 膜与 Cry2Ab 蛋白(终浓度 5 μ g/mL) 孵育过夜, 利用 Cry2A 鼠单抗、通过配体印迹(ligand blot) 检测氨肽酶和 Cry2Ab 蛋白的相互作用。Cry2Ab 蛋白的表达纯化参照 Pan 等(2014), 配体印迹参照 Contreras 等(2013)。

1.8 氨肽酶基因突变位点及蛋白建模分析

利用 DNAMAN 比对克隆得到的氨肽酶与 NCBI 上小菜蛾其他氨肽酶氨基酸序列, Swiss-Model 对氨肽酶进行同源建模并对突变的位点进行分析。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾氨肽酶基因的克隆与序列分析

提取的小菜蛾中肠总 RNA 经 1% 的琼脂糖凝

胶电泳, 可以看到在 1 000 bp 附近有两个明显浅条带(图 1: A), 说明总 RNA 没有发生明显降解。以总 RNA 为模板, 反转录得到 cDNA; 以小菜蛾中肠 cDNA 为模板, PCR 扩增氨肽酶基因, 得到一条大小为 2 900 bp 左右的 PCR 片段(图 1: B), 连接 pMD18-T 载体后进行测序。

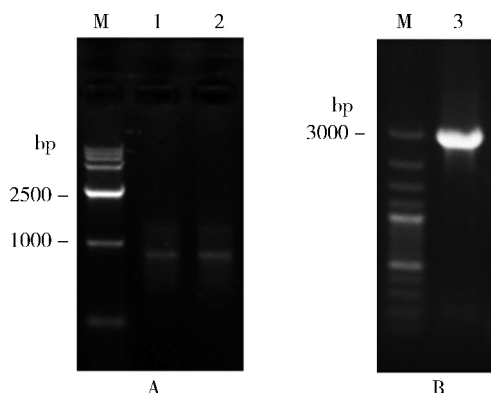


图 1 小菜蛾 4 龄幼虫中肠氨肽酶基因 *PxAPN5* 的克隆

Fig. 1 Cloning of the APN gene *PxAPN5* from the midgut of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella*

M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker; 1, 2: 中肠总 RNA Total RNA of the midgut; 3: 目的基因 PCR 产物 PCR product of the target gene.

测序结果表明, 克隆获得的氨肽酶基因全长 2 853 bp, 该基因编码 950 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 107.3871 kDa, 等电点为 5.24。将该基因的氨基酸序列与已在 GenBank 上登录的其他鳞翅目昆虫氨肽酶基因的氨基酸序列进行系统发育分析(图 2), 发现该基因属于 APN 家族 class 5, 因此将其命名为 *PxAPN5* (GenBank 登录号: KM034756)。

序列分析显示, 氨肽酶 *PxAPN5* 含有 3 个潜在 N-糖基化位点 (N^{115} , N^{508} 和 N^{583})、5 个 O-糖基化位点 (S^{422} , S^{424} , T^{425} , T^{431} 和 T^{436}), 具有锌蛋白酶结构域 ($^{361}HEXXH^{365}$ 和 E^{384}), C 端含有 GPI 锚定位点 ($^{928}GS^{929}$) 及跨膜结构域 ($^{929}SAAMVLPTALLLIASLFA^{948}$), 这些均是鳞翅目昆虫氨肽酶的典型特征(图 3)。

2.2 原核表达载体 pET30a-*PxAPN5* 的构建

将 *PxAPN5* 基因经酶切、连接形成重组质粒 pET30a-*PxAPN5*, 并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 提取质粒并进行双酶切验证, 得到一条 2 900 bp 左右的酶切片段和 5 000 bp 左右的 pET30a 载体片段(图 4: A), 说明重组质粒 pET30a-*PxAPN5* 构建完成。重新提取重组质粒 pET30a-*PxAPN5*, 转化原核表达菌株 BL21 (DE3)

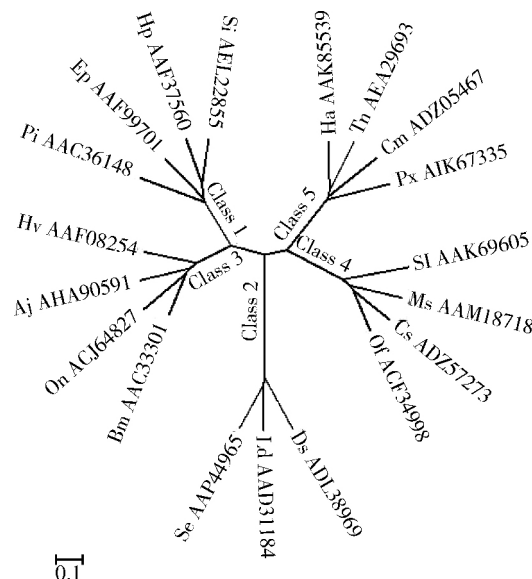


图 2 *PxAPN5* 与鳞翅目昆虫其他氨肽酶氨基酸序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PxAPN5* and other known APN proteins from Lepidopteran insects based on amino acid sequences APN 来源及 GenBank 登录号 Origin of APN proteins and their GenBank accession numbers: Px: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, AAK67332; Cm: 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*, ADZ05467; Tn: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, AEA29693; Ha: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AAK85539; On: 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*, ACJ64827; Bm: 家蚕 *Bombyx mori*, AAC33301; Aj: 飞扬阿夜蛾 *Achaea janata*, AHA90591; Hv: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AAF08254; Pi: 印度谷螟 *Plodia interpunctella*, AAC36148; Ep: 苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana*, AAF99701; Si: 大螟 *Sesamia inferens*, AEL22855; Hp: 斑实夜蛾 *Helicoverpa punctigera*, AAF37560; Se: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, AAP44965; Ld: 舞毒蛾 *Lymantria dispar*, AAD31184; Ds: 小蔗螟 *Diatraea saccharalis*, ADL38969; Of: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, ACF34998; Cs: 二化螟 *Chilo suppressalis*, ADZ57273; Ms: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AAM18718; Sl: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*, AAK69605.

Rosetta, 进行菌液 PCR, 发现在 2 900 bp 左右有特异性条带(图 4: B), 说明重组质粒 pET30a-*PxAPN5* 已经转入 BL21 (DE3) Rosetta, 表达菌株构建完成。

2.3 *PxAPN5* 基因的原核表达及表达产物的酶活性测定

在 0.2 mmol/L IPTG, 180 r/min 30 $^{\circ}$ C 3 h 的诱导条件下, 诱导 *PxAPN5* 蛋白表达。经 SDS-PAGE 电泳, 发现实验组在 110 kDa 附近有特异性条带(图 5)。而对照组(未加 IPTG 诱导)没有, 初步确定 *PxAPN5* 蛋白已经表达。

酶活性测定结果表明, 原核表达的 *PxAPN5* 菌

```

1-60    MALLLKLAIL PALLALAWAD FPIDADFLSD IVDTRNDDDV KYRLPESLDP VHCEIEITPH
61-120  FDDTADRPAP SFDGIVTIYV IAKEDGINSL ILQENVREIG AITVTEENGR LIDLNPSSPV
                                         ▲

121-180 ERLTEYQFLK INLRSGVTLS KNGKYTIRIE YVGHMNETPL SRGMFRGSYV GKDGKTHWYA
181-240 ATHLQPTHSR QLFPSFDEPG FKSTFKIIVN RPFANFADTHS NMYAESRSEP INGLVKEVFY
241-300 TTPRMSAYLV TIHISDEFTI IADNGDAKRP YRILARPDAA NQGQYALEVG PPLTKWLEEY
301-360 LGKPPYEMAE NMKNDQIASP FWASGATENW GLVTYRELRL LYEEGETNAV DKMSIGTITA
361-420 HELGHKWFGN LVTARWWDNV WINEGYASYF EYFAMDAVDK SMDLADQFNI MYTQSALATD

421-480 SSASTRALQH TVNTPTQVSG HFSGISYSKG AALLNMLKHF LGENTFKKSL NYYLDEMKEYE
      ● ● ● ● ● ●
481-540 YANPDDVFRG FARAVQEDGA LTQFTNVNIT DFLSDWVYEP GYPVINVDIN MNTGNIYIEQ
                                         ▲

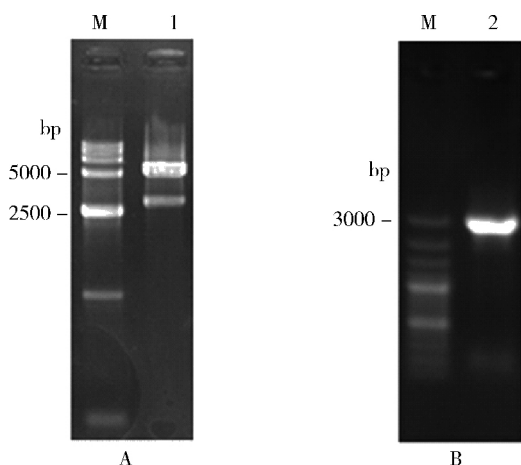
541-600 ERFFTTTGSS NQWVPLPTY TSASSPDWSN TKASHVMTGK SYNITKTPAH EWTIFNVKQN
                                         ▲

601-660 GYYRVNYDTH NWELIAEALQ KDVNAIHLYN RAQIVDDVFA LMRSGRMTHA LGFQILDFLK
661-720 KDVSYSYWYP AISGFNWLRL RFLHLPDVLA EFDEILYKYL DAVVTNLGYE AADSNEPLTR
721-780 TLNRFYVMSF ACNIGHEGCV QHATQKYTEM VNGGKVDPI RRHVYCTGLR QGSLAQWQVL
781-840 QVLYLASNNQ ADEVVKLRGL GCTSDEQAVK EYLEMVLTA VKAQDRVNAF TYLYMGDRGN
841-900 AQKALQFIKT NHNQIREAVV GSVRFNTVLA NLAAYTDEEG LQDMESWLEE NKDSIPEYSV
901-960 GVSASASARA NMAWGTQAD SILKAARGSA AMVLPALLL IASLFALLMK
                                         ★★

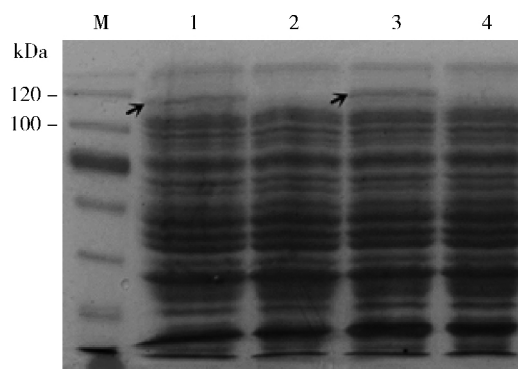
```

图3 *PxAPN5* 基因的氨基酸序列分析Fig. 3 Analysis of amino acid sequence of *PxAPN5* gene

锌蛋白酶结构域(³⁶¹HEXXH³⁶⁵和E³⁸⁴)用双下划线标出; N-糖基化位点用实心三角标出; O-糖基化位点用实心圆标出; GPI 锚定位点用星号标出; C 端跨膜结构域用单下划线标出。Zinc-metalloprotease domain (³⁶¹HEXXH³⁶⁵ and E³⁸⁴) are marked with a double underline. Putative N-glycosylation and O-glycosylation sites are indicated by solid triangles and circles, respectively. The GPI anchor points are showed by solid asterisk. The C-terminal transmembrane domains are marked by a single underline.

图4 *PxAPN5* 基因原核表达载体的构建Fig. 4 Construction of prokaryotic expression vector of *PxAPN5* gene

A: 重组载体 pET30a-*PxAPN5* 酶切验证 Enzymatic digestion verification of recombinant plasmid pET30a-*PxAPN5*; B: 菌液 PCR 验证重组质粒 pET30a-*PxAPN5* 转入 BL21 (DE3) 细胞 Colony PCR to verify the transformation of recombinant plasmid pET30a-*PxAPN5* into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells.

图5 SDS-PAGE 分析 *PxAPN5* 基因的原核表达Fig. 5 Prokaryotic expression of *PxAPN5* gene analyzed by SDS-PAGE

M: 蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1, 3: 0.2 mmol/L IPTG 诱导 Induced with 0.2 mmol/L IPTG; 2, 4: 未经 IPTG 诱导 Not induced with IPTG.

体破碎上清液的比活力为 1 047.2 U/g, 而未加 IPTG 诱导的菌体破碎上清液和敏感型小菜蛾氨肽酶的比活力分别为 83.4 U/g 和 6 230.3 U/g(表

1)。说明已经成功克隆和表达了酶活水平较高的氨肽酶, 其比活力接近敏感型小菜蛾氨肽酶比活力。

表 1 重组表达的 *PxAPN5* 氨肽酶活性测定

Table 1 Aminopeptidase assay of recombinant *PxAPN5* protein

氨肽酶 Aminopeptidase	比活性 Specific activity (U/g)
菌体破碎上清液(未经 IPTG 诱导) Supernatant not induced with IPTG	83.4
菌体破碎上清液(0.2 mmol/L IPTG 诱导) Supernatant induced with 0.2 mmol/L IPTG	1 047.2
野生型 <i>PxAPN</i> Wild type <i>PxAPN</i>	6 230.3

2.4 重组蛋白与 *Cry2Ab* 相互作用的配体印迹分析

含有重组质粒的 BL21 菌体破碎上清经 SDS-PAGE 电泳并转移到 PVDF 膜。配体印迹分析(图 6) 结果显示, 实验组(0.2 mmol/L IPTG 诱导) 经 *Cry2Ab* 蛋白孵育、配体印迹检测后, 在 110 kDa 附近出现明显的单一条带, 表明原核表达的 *PxAPN5* 能和 *Cry2Ab* 蛋白特异性结合, 而未加 IPTG 诱导的则在该区域没有条带, 可以排除 BL21 菌体自身蛋白和 *Cry2Ab* 蛋白结合。配体印迹结果说明原核表

达的 *PxAPN5* 能和 *Cry2Ab* 蛋白特异性结合。

2.5 *PxAPN5* 基因突变位点及蛋白建模分析

结构域分析表明, *PxAPN5* 氨肽酶含有 GluZincin superfamily Aminopeptidase N domain(第 51 - 523 位氨基酸) 和 ERAP1-like C-terminal domain(第 592 - 903 位氨基酸) 2 个保守结构域(图 7)。其中 GluZincin superfamily Aminopeptidase N domain 由一个富含 α 螺旋和一个富含 β 折叠两个结构域组成, 是酶催化中心所在。ERAP1-like C-terminal domain 主要由 16 个 α 螺旋组成 8 个 HEAT-like repeat domain, 形成凹槽状, 而氨肽酶的活性区域³⁶¹HEXXH³⁶⁵ 则靠近这个凹槽中心, 可以推断该结构域可能与酶催化底物的特异性相关。

将 *PxAPN5* 和其他小菜蛾氨肽酶基因的氨基酸序列进行多序列比对, 结果显示氨肽酶 *PxAPN5* 存在 3 个保守性位点突变, 分别在第 63, 120 和 806 位突变为天冬氨酸、缬氨酸和谷氨酸, 而其他小菜蛾氨肽酶位点为丙氨酸、苯丙氨酸和天冬氨酸(图 8)。

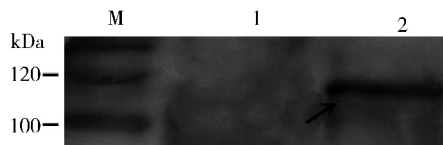


图 6 配体印迹分析体外 *Cry2Ab* 与 *PxAPN5* 蛋白的结合

Fig. 6 In vitro binding analysis between *Cry2Ab* and *PxAPN5* with ligand blot

M: 蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1: 未经 IPTG 诱导 Not induced with IPTG; 2: 0.2 mmol/L IPTG 诱导 Induced with 0.2 mmol/L IPTG.



图 7 *PxAPN* 蛋白保守结构域

Fig. 7 The conserved domains of *PxAPN* protein

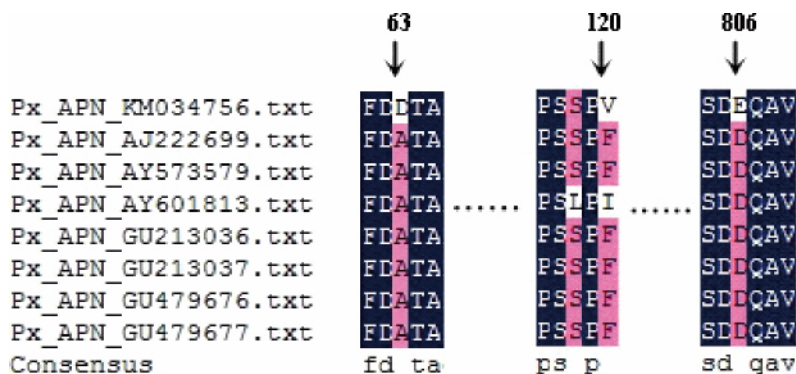


图 8 *PxAPN5* 氨基酸序列与小菜蛾其他氨肽酶氨基酸序列多序列比对

Fig. 8 Multiple alignment of amino acid sequences of *PxAPN5* with other known APN proteins from *Plutella xylostella*

对 PxAPN5 蛋白 3 个保守性位点突变的蛋白质建模分析(图 9),可见 Asp-63 和 Val-120 均位于 GluZincin domain 中连接两个 β 折叠的短回环(发

夹),这类发夹结构主要是作为受体的结合位点存在, Glu-806 的突变位于 ERAP1 domain 的一个 α 螺旋上。

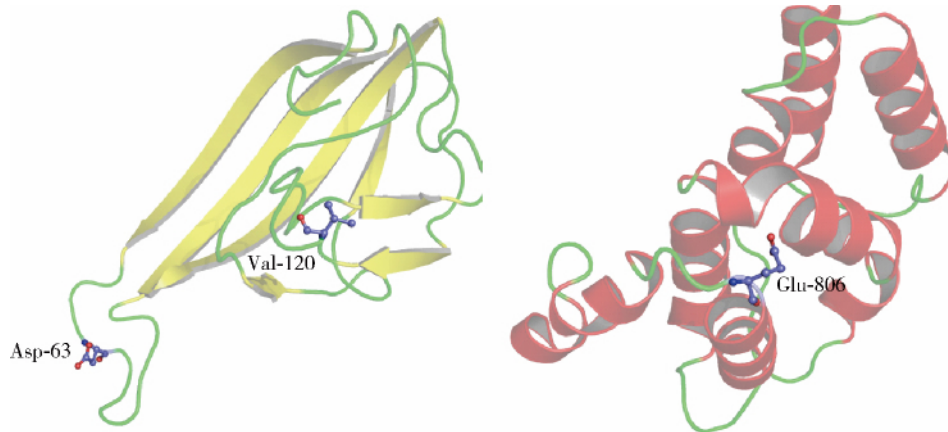


图 9 蛋白建模观察 PxAPN5 的 3 个突变位点

Fig. 9 Close view of the mutation sites of Asp⁶³, Val¹²⁰ and Glu⁸⁰⁶ in PxAPN5

3 讨论

苏云金芽胞杆菌经典杀虫机制认为,细胞膜形成穿孔途径是杀虫蛋白毒杀昆虫的主要途径(Vachon *et al.*, 2012),除此之外,还有钙粘蛋白受体介导的细胞信号转导途径解释 Bt 毒素的杀虫机理(Zhang *et al.*, 2006),无论哪种途径均需阐明 Bt 毒素与昆虫中肠受体的相互作用。氨肽酶是目前研究较多的 Bt 毒素受体,本研究从小菜蛾中肠 cDNA 克隆得到了一个新的氨肽酶基因 PxAPN5 (GenBank 登录号: KM034756),全长 2 853 bp,编码 950 个氨基酸,具有鳞翅目昆虫典型的谷氨酸锌化氨肽酶 N 的典型结构特征,即 C-末端具有跨膜结构域(⁹²⁹S-L⁹⁴⁸)和 GPI 锚定位点(⁹²⁸GS⁹²⁹),其中氨肽酶蛋白可能是通过 GPI 锚定位点结合到 BBMV 上(徐丽娜等, 2011);具有锌结合位点³⁶¹HEXXH³⁶⁵和 E³⁸⁴,其中 H³⁶¹, H³⁶⁵和 E³⁸⁴是锌离子配体,而 E³⁶²可能起催化作用(Chang *et al.*, 2012);PxAPN5 蛋白含有 2 个保守结构域 GluZincin domain 和 ERAP1 domain;含有 3 个 N-糖基化位点(N¹¹⁵, N⁵⁰⁸和 N⁵⁸³),5 个 O-糖基化位点(S⁴²², S⁴²⁴, T⁴²⁵, T⁴³¹和 T⁴³⁶)。进化树显示 PxAPN5 属于 APN 家族 class 5,目前有关 class 5 的氨肽酶作为 Bt 毒素受体的研究较少,该家族典型的特征是保守序列元件 GAMEN 中的 M 被 T 代替(Pigott and Ellar, 2007)。

Chang 等(2012)发现小菜蛾的氨肽酶能与

Cry1Ac 特异性结合;Crava 等(2013)发现并鉴定了一个欧洲玉米螟的氨肽酶作为 Cry1Ab 和 Cry1Fa 的功能性受体。本实验通过配体印迹证明 PxAPN5 能与 Cry2Ab 蛋白特异性结合,但是 PxAPN5 是否作为 Cry2Ab 蛋白的功能性受体,则必须进一步通过 RNAi 等方法进行验证。

氨肽酶基因突变是昆虫对 Bt 毒素产生抗性的主要原因之一,而不同地区的小菜蛾对 Bt 毒素不同敏感性也可能与氨肽酶的基因突变有关。Zhu 等(2000)对比抗性和敏感品系印度谷螟氨肽酶基因序列后发现,抗性品系氨肽酶基因有 4 个碱基发生突变,导致 2 个氨基酸序列发生改变,分别是 D185E 和 V763T;其中 Glu¹⁸⁵降低了氨肽酶与 Bt 毒素的亲合力,而 Thr⁷⁶³则可能是通过改变氨肽酶的空间结构导致抗性产生;与敏感品系相比,Bt 抗性小菜蛾的氨肽酶基因则存在 3 个突变位点(N313S, E541G 和 E881G)(Chang *et al.*, 2012)。王俊华等(2012)克隆比较了敏感品系和抗性品系小菜蛾的 APN2 基因,发现其编码氨基酸序列存在 4 个氨基酸的差异:敏感品系的 Phe¹²⁰, Glu³⁴⁴, Asp⁷⁰⁶和 Phe⁷⁰⁹突变成抗性品系的 Val¹²⁰, Lys³⁴⁴, Glu⁷⁰⁶和 Tyr⁷⁰⁹,这些突变可能与小菜蛾的抗性水平相关。本研究克隆和表达了福建福州的敏感型小菜蛾 PxAPN5,并与 NCBI 上其他的 PxAPN 序列进行多序列比对,发现 3 个保守性突变位点(A63D, F120V 和 D806E),其中第 63 位 Ala 突变成 Asp,可能影响氨肽酶蛋白的折叠,导致三维空间结构产

生变化; F120V 位于氨肽酶和 Cry1Ac 毒素的结合区内, 且是位于连接 2 个 β 折叠的发夹结构上, 这种结构一般是作为受体结合位点而被报道, 因此, 该位点有可能参与氨肽酶和 Bt 毒素的结合; 第 806 位 Asp 突变为 Glu, 虽然不会改变氨肽酶的 α 螺旋结构, 但是可能影响氨肽酶与其受体蛋白结合的亲和力。这些突变可能是小菜蛾对不同环境的适应而产生的, 或者是小菜蛾对 Bt 毒素不同敏感性的体现。

参考文献 (References)

- Bravo A, Gill SS, Soberón M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423–435.
- Chang XL, Wu QJ, Wang SL, Wang R, Yang ZX, Chen DF, Jiao XG, Mao ZC, Zhang YJ, 2012. Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance of *Plutella xylostella* to the Bt toxin Cry1Ac: cloning and study of in vitro function. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(2): 60–70.
- Chen ZH, Liu CX, Li FL, Han ZJ, 1992. Investigation on resistance of diamond-back moth to insecticides in Guizhou. *Journal of Guizhou Agricultural Science*, (2): 15–18. [陈之浩, 刘传秀, 李凤良, 韩招久, 1992. 贵州主要菜区小菜蛾抗药性调查. 贵州农业科学, (2): 15–18]
- Contreras E, Schoppmeier M, Real MD, Rausell C, 2013. Sodium solute symporter and cadherin proteins act as *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxin functional receptors in *Tribolium castaneum*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25): 18013–18021.
- Crava CM, Bel Y, Jakubowska AK, Ferré J, Escriche B, 2013. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(10): 924–935.
- Hu Q, Liu YD, 2003. Progress and summarization of study on diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *Journal of Tianjin Agricultural College*, 10(1): 33–36. [胡奇, 刘玉冬, 2003. 小菜蛾研究的概况与进展. 天津农学院学报, 10(1): 33–36]
- Hua G, Park Y, Adang MJ, 2014. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 11–17.
- Huang J, Wu WJ, 2003. Advance of studies on insecticide resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *Journal of Guizhou University (Natural Sciences)*, 20(1): 97–104. [黄剑, 吴文君, 2003. 小菜蛾抗药性研究进展. 贵州大学学报(自然科学版), 20(1): 97–104]
- Jiménez AI, Reyes EZ, Cancino-Rodezno A, Bedoya-Pérez LP, Caballero-Flores GG, Muriel-Millan LF, Likitvatanavong S, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2012. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9): 683–689.
- Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11(3): 429–436.
- Luo YJ, Wu WW, Yang ZB, Pu ET, Guo ZX, Yin KS, He CX, 2008. Advances in insecticide resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) in Yunnan. *Journal of Yunnan University*, 30(S1): 178–182. [罗雁婕, 吴文伟, 杨祚斌, 浦恩堂, 郭志祥, 尹可锁, 何成兴, 2008. 小菜蛾抗药性及治理的研究进展. 云南大学学报, 30(S1): 178–182]
- Ma WJ, Han LZ, Yin XM, Cao GC, Su LJ, 2011. Binding of Bt Cry toxins to lepidopteran midgut aminopeptidase N and the relationship between their interactions with Bt resistance. *Journal of Environmental Entomology*, 33(3): 378–387. [马文静, 韩兰芝, 尹新明, 曹广春, 苏丽娟, 2011. 鳞翅目昆虫氨肽酶 N 与 Bt 毒素的结合及其与 Bt 抗性的关系. 环境昆虫学报, 33(3): 378–387]
- Pan ZZ, Xu L, Zhu YJ, Shi H, Chen Z, Chen MC, Chen QX, Liu B, 2014. Characterization of a new cry2Ab gene of *Bacillus thuringiensis* with high insecticidal activity against *Plutella xylostella* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(10): 2655–2662.
- Park Y, Abdullah MA, Taylor MD, Rahman K, Adang MJ, 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10): 3086–3092.
- Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71(2): 255–281.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49): 46849–46851.
- Ren XL, Ma Y, Cui JJ, Li GQ, 2014. RNA interference-mediated knockdown of three putative aminopeptidases N affects susceptibility of *Spodoptera exigua* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca. *Journal of Insect Physiology*, 13(67): 28–36.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10): 7312–7319.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL, 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1): 1–12.
- Wang JH, Zhou XM, Wu QJ, Wang SL, Xie W, Chen DF, Xu BY, Zhang YJ, 2012. Expression of aminopeptidase N (APN2) from *Plutella xylostella* larval midgut in Sf9 cells. *Chinese Journal of*

- Pesticide Science*, 14(2): 151–157. [王俊华, 周小毛, 吴青君, 王少丽, 谢文, 陈得峰, 徐宝云, 张友军, 2012. 小菜蛾中肠氨肽酶 N2 在昆虫细胞中的表达. *农药学报*, 14(2): 151–157]
- Wang XY, Ma WJ, Han LZ, Hou ML, 2012. Cloning and expression profiling of aminopeptidase N encoding gene in the larval midgut of *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(9): 1022–1030. [王兴云, 马文静, 韩兰芝, 侯茂林, 2012. 大螟中肠氨肽酶 N 基因的克隆及表达谱分析. *昆虫学报*, 55(9): 1022–1030]
- Xu L, Wang Z, Zhang J, Ferry N, Edwards MG, Gatehouse AM, He K, 2014. Characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from *Ostrinia furnacalis* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115: 95–98.
- Xu LN, Chang XY, He KL, Wang ZY, Bai SX, 2011. Cloning and sequencing of aminopeptidase N genes from Asian corn borer susceptible and resistant to Cry1Ab toxin. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(1): 164–170. [徐丽娜, 常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄, 2011. Cry1Ab 敏感和抗性亚洲玉米螟氨肽酶 N 基因的克隆及序列差异分析. *农业生物技术学报*, 19(1): 164–170]
- Yu DY, Tang BS, Fu JW, Zhan ZX, 2002. A preliminary study on the population heterogeneity of *Plutella xylostella* in different areas and various living environments. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 24(2): 227–231. [余德亿, 汤葆莎, 傅建伟, 占志雄, 2002. 不同地区与生境的小菜蛾种群异质性研究初报. *江西农业大学学报*, 24(2): 227–231]
- Zhang J, Zhang L, Huang WN, Shi GY, 2013. A comparative study of recombinant expression of three aminopeptidases in *Escherichia coli*. *Food Science*, 34(23): 200–205. [张洁, 张梁, 黄武宁, 石贵阳, 2013. 3 种氨肽酶基因在大肠杆菌中的重组表达与比较研究. *食品科学*, 34(23): 200–205]
- Zhang S, Cheng H, Gao Y, Wang G, Liang G, Wu K, 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 421–429.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LAJr, 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9897–9902.
- Zhu YC, Kramer KJ, Oppert B, Dowdy AK, 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3): 215–224.

(责任编辑: 赵利辉)