

# 美国白蛾 *hcapn3* 基因的克隆及 HcAPN3 蛋白与 Cry1Ac 结合特性分析

王翠苹<sup>1</sup>, 赵丹<sup>1</sup>, 李少雅<sup>1</sup>, 郭家萍<sup>1</sup>, 郭巍<sup>1,2\*</sup>, 陆秀君<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心, 保定 071001;

2. 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206)

**摘要** 通过比对分析已知昆虫氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 氨基酸序列并结合本实验室的美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 中肠 iTRAQ 结果, 设计了 *hcapn3* 基因特异引物, 获得 *hcapn3* 基因片段。通过 RACE-PCR 技术获得美国白蛾中肠氨肽酶 N 基因 (*hcapn3*) 全长序列 (GenBank 登录号为 KJ013598)。Blastp 分析表明, 获得的氨肽酶属于氨肽酶 N3 家族, 命名为 HcAPN3。序列分析显示 HcAPN3 包括 952 个氨基酸残基, 具有典型的谷氨酸锌化氨肽酶 (Gluzincin) 结构域和羧基端 (ERAP1\_C) 结构域。利用 Bac to Bac 表达系统在昆虫细胞中表达 108 kDa 的 HcAPN3 蛋白。在原核表达系统中表达 58 kDa 的 Gluzincin 结构域和 49 kDa ERAP1\_C 的结构域蛋白。Ligand Blot 分析结果显示, HcAPN3 蛋白及 Gluzincin 结构域可与 Cry1Ac 蛋白特异性结合, 但 ERAP1\_C 结构域未能与 Cry1Ac 结合。本研究首次克隆了美国白蛾氨肽酶基因并分析了 HcAPN3 与 Cry1Ac 的结合特性, 为下一步功能研究提供基础。

**关键词** 美国白蛾; 氨肽酶 N; HcAPN3; Gluzincin 结构域; Ligand Blot 分析

**中图分类号:** S 433.4; S 763.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.02.010

## Cloning of midgut aminopeptidase *hcapn3* gene from *Hyphantria cunea* and binding to Cry1Ac toxin of HcAPN3

Wang Cuiping<sup>1</sup>, Zhao Dan<sup>1</sup>, Li Shaoya<sup>1</sup>, Guo Jiaping<sup>1</sup>, Guo Wei<sup>1,2</sup>, Lu Xiujun<sup>1</sup>

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Centre of Plant Diseases and Pests of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract** The specific primers of aminopeptidase N gene were designed, and a fragment of *hcapn3* was obtained by PCR method. A full-length gene (GenBank accession no. KJ013598) encoding APN of *Hyphantria cunea* was obtained by RACE-PCR method based on the sequences of published APNs from insects and iTRAQ of *Hyphantria cunea* midgut. Analysis of the protein sequences by NCBI Blastp revealed that it belonged to aminopeptidase N gene family 3, named HcAPN3. The primary structure of HcAPN3 contained 952 amino acids residues, a typical Gluzincin aminopeptidase family domain and ERAP1\_C domain. The *hcapn3* gene was successfully expressed in insect cells as secreted proteins (108 kDa) using recombinant baculoviruses (Bac to Bac system). Further, the Gluzincin aminopeptidase family domain and ERAP1\_C-like C-terminal domain were expressed in *E. coli* as 58 kDa and 49 kDa proteins by SDS-PAGE analysis, respectively. *In vivo* Ligand-Blotting study demonstrated binding of Cry1Ac toxin to both HcAPN3 and peptidase Gluzincin family domain, not to ERAP1\_C domain. The first identified aminopeptidase N from *H. cunea* may be a candidate receptor for Cry1Ac toxin.

**Key words** *Hyphantria cunea*; aminopeptidase N; HcAPN3; Gluzincin domain; Ligand Blot analysis

收稿日期: 2015-02-05 修订日期: 2015-04-16

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-14); 国家自然科学基金 (34711775); 北京农学院促进人才培养综合改革专项计划 (BNRC-CC201404)

\* 通信作者 E-mail: guowei@hebau.edu.cn

美国白蛾 [*Hyphantria cunea* (Drury)] 是一种重要的世界性检疫害虫。适应性强,食性广,繁殖能力强的特点为其大范围传播和为害提供了条件。该虫现已从北美传播至 18 个欧亚国家和地区<sup>[1]</sup>。1979 年传入我国以来,已迅速扩展至长江以南地区,每年给我国农林生产造成巨大的损失<sup>[1-2]</sup>。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是目前世界范围内产量最大、应用范围最广的环境友好型微生物杀虫剂,其杀虫蛋白基因也是目前应用得最为广泛和最有潜力的一类杀虫基因<sup>[2-5]</sup>。目前研究者已筛选分离出多种对美国白蛾高毒力的 Bt 菌株,并对其杀虫晶体蛋白以及基因类型进行了研究,结果表明,对美国白蛾高毒力的 Bt 菌株中均鉴定出 Cry1Ac 基因型<sup>[2,6]</sup>,本研究前期工作证明 Cry1Ac 蛋白是对美国白蛾高毒力的杀虫晶体蛋白。

Bt Cry 蛋白可与昆虫中肠上皮刷状缘膜 (BBMV) 特异性结合,从而引起昆虫中肠结构及生理发生变化,使昆虫死亡<sup>[7]</sup>。其在 BBMV 上的受体主要有 4 类,分别是类钙黏蛋白 (cadherin-like protein)、氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN)、碱性磷酸脂酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和糖脂 (glycolipids)<sup>[7-11]</sup>。其中氨肽酶 N 是研究最多的一种重要的受体蛋白。

氨肽酶 N 是一种依赖于  $Zn^{2+}$  的 N-端水解酶类<sup>[9-10]</sup>,存在于中肠的 BBMV 上<sup>[11]</sup>,是 Bt 毒素的重要受体之一。Knight 等 1994 年首次从烟草天蛾中分离得到 APN1,并证实其为 Bt 毒素的受体<sup>[12]</sup>,此后,相继从舞毒蛾<sup>[13]</sup>、烟芽夜蛾<sup>[14]</sup>、家蚕<sup>[15]</sup>、欧洲玉米螟及亚洲玉米螟<sup>[16-17]</sup>、甜菜夜蛾<sup>[18]</sup>、埃及伊蚊<sup>[19]</sup>等昆虫中克隆了 APN 基因,并证实其蛋白为 Bt 毒素的受体。目前在 GenBank 中已登记 50 多种 APN 基因,关于美国白蛾中肠受体蛋白的研究尚未有报道。本研究首次分离鉴定了美国白蛾中肠 APN3 蛋白,与 Cry1Ac 蛋白进行了配体印迹分析,为进一步研究美国白蛾中肠氨肽酶功能,及与 Bt 杀虫蛋白相互作用机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试昆虫及细胞

美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 幼虫采集自河北

省保定市,在室内进行饲养。粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞系 BTI-Tn-5B1-4 (High Five 细胞),由青岛农业大学李国勋教授惠赠。

#### 1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit) 购自 QIAGEN 公司;反转录试剂盒购自 Promega;凝胶回收试剂盒购自天根有限公司;限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;T4 快速连接酶购自 Thermo 公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 和 DH10Bac 菌株由本实验室保存并用于制备感受态细胞;Bt (Cry1Ac) 菌株由本实验室保存,Cry1Ac 蛋白抗体由河北省生物研究所制备;蛋白质定量检测试剂盒购自上海生工生物工程(上海)有限公司;胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司;昆虫细胞培养基 TNM-FH insect medium 购自 Sigma 公司;杆状病毒表达系统 (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System) 购自美国 Invitrogen 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *hcapn3* 全长基因序列的获得

解剖美国白蛾,提取中肠并将其迅速置于液氮,用研钵研磨至粉末,按试剂盒说明书提取总 RNA,检测 RNA 质量。按反转录试剂盒说明书将 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录为 cDNA。利用美国白蛾中肠 iTRAQ 结果,经序列比对设计 *hcapn3* 基因特异引物,APNF: 5'-GAACTGGGGAATGGTTAACT-3' (NWGMVN); APNR: 5'-AGAACAAAACGTCGTTGAC-3' (VNDVLF)。

以合成的 cDNA 第一链为模板,用引物 APNF 和 APNR 进行 PCR 扩增,其扩增参数为:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,51  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,25 个循环;72  $^{\circ}$ C 保温 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,纯化回收,回收产物送北京华大基因测序。根据测序结果分别设计 5' RACE 及 3' RACE 引物,APN5F: 5'-CTAGTG-GAGAAGTGGGCAGTGATTGAAGGGAGA-3'; APN3R: 5'-CGCTATACAATCTCCGGGGTTAG-GCCAGCTG-3'。按照 RACE 反转录试剂盒说明合成 5' RACE 和 3' RACE 模板,并分别进行 PCR 扩增。扩增参数如下:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min,74  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,5 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 3 min,72  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,5 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 3 min,72  $^{\circ}$ C 退火 45 s,70  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,25 个循环;4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后按照凝胶回收试剂盒说明书进行纯化回收,回收产物送北京华大

基因公司测序。

### 1.2.2 *hcapn3* 序列分析

通过 CBS Prediction Server 预测信号肽序列,糖基化位点,通过 GPI Prediction Server 分析 GPI 锚定位点,利用 Blastp 进行结构域分析,通过 DNAMAN 分析开放阅读框,等电点及蛋白分子量。

### 1.2.3 *hcapn3* 在昆虫细胞系中的表达

设计扩增 *hcapn3* 的上下游引物,并引入 *NotI* 和 *XhoI* 酶切位点。F: 5'-AAATAT GCGGCCGC TAC-CAACGCCATGATTCATCGATC -3'(下画线部分为 *NotI* 酶切位点); R: 5'-CCGCTCGAG ATGGAACAAC-TGGCGAATAGTACTGC-3'(下画线部分为 *XhoI* 酶切位点)。

PCR 产物经纯化、酶切后与载体连接。将 10  $\mu$ L 连接产物转化至 100  $\mu$ L DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含有 100 mg/L Amp 的 LB 平板上。PCR 及酶切方法鉴定阳性重组子,取 1 mL 菌液送至北京华大基因测序。

鉴定正确的重组子转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,37  $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养 4 h,涂布于含 IPTG (40  $\mu$ g/mL), X-gal (100  $\mu$ g/mL), Kan (50  $\mu$ g/mL), Gen (7  $\mu$ g/mL), Tet (10  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 培养 48 h,挑取白色单克隆菌落,提取重组 Bacmid DNA,进行 PCR 鉴定。鉴定正确的重组 Bacmid DNA 按照 Bac to Bac 试剂盒说明,利用脂质体 Cellfectin II reagent 转染昆虫 High Five 细胞,27  $^{\circ}$ C 培养 72 h,收集上清为第一代病毒株(P<sub>1</sub>),取 P<sub>1</sub> 病毒上清液感染对数生长期的 High Five 细胞,出现感染迹象后,500 g 离心 5 min 收集上清液,即为扩增后的 P<sub>2</sub> 病毒,按此方法扩增 P<sub>3</sub> 病毒,病毒滴度达到 1 $\times$ 10<sup>8</sup> pfu/mL 后,收集蛋白进行 SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 分析。

### 1.2.4 HcAPN3 结构域的克隆与表达

将获得的 *hcapn3* 全长序列进行 Blastp 分析,分别设计扩增 Gluzincin(16~524 aa)和 ERAPI\_C (517~952 aa)结构域 cDNA 序列特异引物,并分别在上游和下游引物中引入 *NotI* 和 *XhoI* 酶切位点, GluF1: 5'-AAATATGCGGCCGC GCCTTCCCCGAT-GAAGACTACAGGT-3'(下画线部分为 *NotI* 酶切位点); GluR1: 5'-CCGCTCGAG TACAGGATCCAGGAAG-CAAAAACAA-3'(下画线部分为 *XhoI* 酶切位点); ERAPI\_C F2: 5'-AAATATGCGGCCGC GTTTTTGCTTC-

CCTGGATCCTGTA-3'(下画线部分为 *NotI* 酶切位点); ERAPI\_C R2: 5'-CCG CTCGAG ATGGAACAAC-TGGCGCA-ATAGTACTGC-3'(下画线部分为 *XhoI* 酶切位点)。

以合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,参数如下:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 保温 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后纯化回收,纯化的 PCR 产物和 pET30a 载体经 *NotI* 和 *XhoI* 同时双酶切,回收酶切产物,进行连接。将 10  $\mu$ L 连接产物转化至 100  $\mu$ L BL21 感受态细胞,涂布于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上。PCR 及酶切方法鉴定阳性重组子。

鉴定正确的重组子经 1 mmol/L IPTG, 37  $^{\circ}$ C, 220 r/min 诱导蛋白表达,参照《分子克隆实验指南》<sup>[20]</sup> 进行 SDS-PAGE 电泳, Western Blot 分析。

### 1.2.5 重组蛋白与 Cry1Ac 的配体印迹分析

参照 Bravo 等的方法<sup>[10]</sup> 提取 Cry1Ac 蛋白,利用蛋白质定量检测试剂盒测定 Cry1Ac 蛋白浓度。按照 Cry1Ac 与胰蛋白酶质量比为 40:1,于 26  $^{\circ}$ C 处理 4 h,获得有活性的毒素片段。

HcAPN3 重组蛋白及结构域蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,以 1% BSA 封闭 1 h,与胰蛋白酶消化后的 Cry1Ac 毒蛋白孵育 1 h,洗膜,以 Cry1Ac 抗体为一抗,以 AP 偶联的羊抗兔 IgG 抗体为二抗,进行 Ligand Blot 分析。

## 2 结果与分析

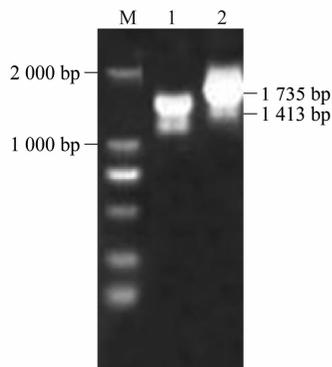
### 2.1 *hcapn3* 基因的克隆

PCR 扩增获得 922 bp 的目的 *hcapn3* 基因片段。5'RACE 和 3'RACE 反应分别获得约 1.4 kb 和 1.7 kb 的片段(图 1), RACE 反应产物测序后序列拼接,获得 *hcapn3* 的全长序列。设计特异引物进行 PCR 扩增得到 2.9 kb 的全长基因片段(图 2)。经 Blastp 分析可知,获得的全长基因编码美国白蛾氨肽酶 N3,命名为 *hcapn3*,推导的氨基酸序列与舞毒蛾 APN3 (GenBank 登录号: AAL26894.1) 相似性最高,达 65.13%。

### 2.2 *hcapn3* 序列分析

*hcapn3* 基因 GenBank 登录号为 KJ013598,开放阅读框为 2 859 bp,编码 952 个氨基酸残基,预测分子量大小为 108.2 kDa,等电点为 4.84。推导的氨基酸序列 N-端具有 15 个氨基酸的信号肽序列,C

末端 930,931 位氨基酸残基为预测的 GPI 锚定位点,含有 Gluzincin 和 ERAP1\_C 保守结构域,谷氨酸锌化氨肽酶的保守氨基酸序列 GAMEN。糖基化位点预测结果显示 HcAPN3 含有 2 个 O-糖基化位点,分别位于 414 和 566 位,6 个 N-糖基化位点分别位于 133,373,419,641,654,930 位。预测的跨膜片段位于 227~245 位氨基酸残基。



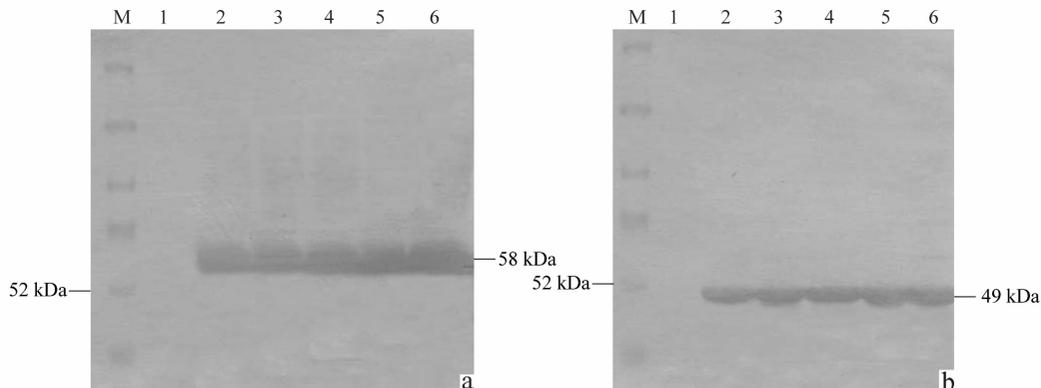
M: DL2000; 1: 5' RACE产物; 2: 3' RACE产物  
M: DL2000; 1: Product of 5' RACE; 2: Product of 3' RACE

图 1 *hcapn3* 的 RACE 扩增产物

Fig. 1 Amplified products of *hcapn3* by RACE-PCR

### 2.3 *hcapn3* 在昆虫细胞系中的表达

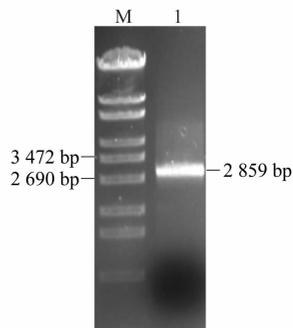
重组病毒作为分泌蛋白存在于培养基中,转染 High Five 细胞后 48 h 收集培养基,离心取上清,作为 P<sub>1</sub> 原代病毒,继续感染对数生长期的 High Five 细胞,出现感染迹象后,离心收集上清,即为扩增后的 P<sub>2</sub> 病毒,继续扩增获取 P<sub>3</sub> 病毒,离心取上清进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析,结果显示 HcAPN3 在昆虫细胞系中成功表达 108 kDa 的蛋白(图 3)。



M: 预染蛋白marker; 1~6为1 mmol/L IPTG诱导0、2、4、6、8、10 h重组蛋白的表达  
M: Multicolor broad range protein ladder; 1-6: Expression of recombinant proteins induced by 1mmol/L IPTG at 0, 2, 4, 6, 8, 10 hour

图 4 Gluzincin (a)和 ERAP1\_C (b)结构域原核表达的 Western Blot 分析

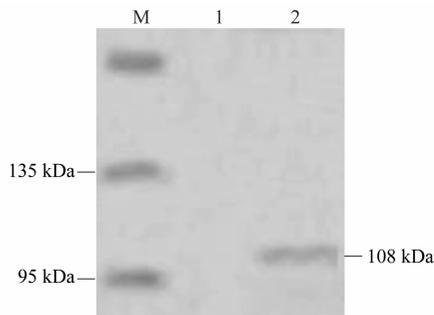
Fig. 4 Western Blot analysis of expressed recombination proteins at different induction time points



M:  $\lambda$ -EcoT14 DNA marker; 1: *hcapn3* PCR产物  
M:  $\lambda$ -EcoT14 DNA marker; 1: PCR products of *hcapn3*

图 2 *hcapn3* 全长基因 PCR 扩增产物鉴定

Fig. 2 Identification of *hcapn3* PCR products



M: 预染蛋白marker; 1: 对照,未感染的细胞; 2: 重组病毒感染的细胞  
M: Multicolor broad range protein ladder; 1: CK, cells not infected; 2: Cells infected by recombinant virus

图 3 HcAPN3 蛋白在昆虫细胞中表达的 Western Blot 分析

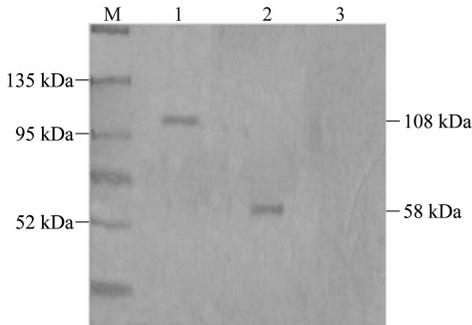
Fig. 3 Western Blot analysis of HcAPN3 proteins in insect cells

### 2.4 HcAPN3 结构域在大肠杆菌中的表达

HcAPN3 结构域表达分析结果表明,37 °C,以 1 mmol/L IPTG 进行诱导,Gluzincin 和 ERAP1\_C 两个结构域重组蛋白得到成功表达,分别表达约 58 kDa和 49 kDa 的目的蛋白(图 4a~b)。

## 2.5 重组蛋白与 Cry1Ac 蛋白的配体印迹 (Ligand Blot) 分析

配体印迹分析结果显示, HcAPN3 重组蛋白和 Gluzincin 结构域能分别与 Cry1Ac 蛋白结合产生 108 kDa 和 58 kDa 条带(图 5), 表明 HcAPN3 重组蛋白和 Gluzincin 结构域可与 Cry1Ac 结合, 而 ERAP1\_C 结构域重组蛋白未能与 Cry1Ac 发生结合(图 5)。



M: 蛋白预染marker; 1: HcAPN3蛋白与Cry1Ac的结合; 2: Gluzincin 结构域与Cry1Ac的结合; 3: ERAP1\_C结构域与Cry1Ac的结合  
M: Multicolor broad range protein ladder; 1: Cry1Ac toxin binding to HcAPN3 proteins; 2: Cry1Ac toxin binding to the peptidase Gluzincin family region; 3: Cry1Ac toxin binding to ERAP1\_C-like C-terminal domain region

图 5 重组蛋白与 Cry1Ac 的配体印迹分析

Fig. 5 Ligand Blot analysis of Cry1Ac toxin binding to recombinant proteins

## 3 讨论

APN 目前已被确认为是 Bt 毒素的受体<sup>[15-17]</sup>, 其作为受体的功能已被广泛研究。然而 APN 同工酶家族种类较多, 其结构特点也不尽相同<sup>[17]</sup>, 尤其在不同的物种中差异较大, 不同的 Bt Cry 蛋白通过与不同种类的 APN 互作, 从而起到杀虫作用<sup>[21]</sup>。目前研究认为各类 APN 在昆虫体内同时表达, 并且分子量、酶活性、糖基化特征等相似度高, 使其难以分离和纯化<sup>[22]</sup>, 因而分离鉴定 APN 同工酶的种类对于研究 Bt Cry 蛋白的杀虫机理以及为 APN 的分类提供依据等都有着重要的意义。本研究通过 PCR 及 RACE-PCR 技术首次成功分离鉴定了美国白蛾 APN3 全长基因序列, 并在昆虫细胞系中成功表达 HcAPN3 全长蛋白。序列分析表明 HcAPN3 具有的典型氨肽酶结构特征, 即属于锌金属肽酶, N-末端具有信号肽, C-末端含有糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定信号序列, 锌结合位点 HEXXH, 谷氨酸锌化氨肽酶的保守结构 GAMEN, 含有 Gluzincin 和 ERAP1\_C 保守结构域。

闫志利等研制的唐海 1 号 Bt 制剂 2 万 IU/mg

500~1 500 倍液对美国白蛾防效接近 100%<sup>[5]</sup>。徐明等利用 Bt 悬浮剂与灭幼脲的混剂对美国白蛾进行防治, 结果显示混剂对第 2~3 代幼虫的毒力指数均高于 100, 防治效果好<sup>[3]</sup>。陈颖等利用 Bt-15A3 对美国白蛾的防治试验表明 Bt-15A3 水悬剂防治 2~3 龄、4~5 龄幼虫, 200 倍液用药后 3 d 校正防效分别达到 100%、98.00%<sup>[23]</sup>。陈月华等从 Bt-15A3 中鉴定出 Cry1Ac 基因型<sup>[24]</sup>, 于涛等<sup>[2]</sup>和赵焕丽等<sup>[6]</sup>在筛选对美国白蛾高毒力的 Bt 菌株中均鉴定出 Cry1Ac 基因型, 本试验前期研究证明 Cry1Ac 蛋白是对美国白蛾高毒力的杀虫晶体蛋白。Wang 等发现通过原核表达的棉铃虫 APN3 蛋白可与 Cry1Ac 发生结合<sup>[25]</sup>。本研究通过 Ligand Blot 分析发现昆虫细胞系表达的 HcAPN3 重组蛋白可以与 Cry1Ac 发生特异性结合, 推测其可能为 Cry1Ac 蛋白的结合蛋白。为了进一步验证 Cry1Ac 蛋白与 APN 蛋白结合区域, 在大肠杆菌中分别克隆和表达了 *hcapn3* 保守的 Gluzincin 和 ERAP1\_C 结构域。由于昆虫细胞系表达蛋白周期较长, 所以我们利用周期较短的原核表达系统对结构域蛋白进行表达。结果显示 Gluzincin 结构域可与 Cry1Ac 特异结合, 而 ERAP1\_C 结构域则不能与 Cry1Ac 发生结合, 推测 Cry1Ac 与 HcAPN3 的结合区域位于 Gluzincin 保守结构域, 但 HcAPN3 是否为 Cry1Ac 蛋白的受体蛋白以及与 Cry1Ac 的具体结合位点还需进一步研究。本研究通过分离鉴定新的 *hcapn3* 基因, 为研究美国白蛾氨肽酶基因的功能, 阐明 Bt Cry 蛋白与受体蛋白的作用机理奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] 梅丽娟, 尤德康, 苏宏钧, 等. 美国白蛾国家级工程进展及治理对策[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(2): 42-44.
- [2] 于涛, 郑桂玲, 矫晋本, 等. 对美国白蛾高毒 Bt 的筛选和杀虫蛋白基因鉴定[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(2): 1-3.
- [3] 徐明, 刘冬梅, 徐福元, 等. Bt 与灭幼脲混剂对美国白蛾第 2, 3 代幼虫的联合毒力及防治效果[J]. 林业科学, 2013, 49(12): 171-174.
- [4] 段彦丽, 陶万强, 曲良建, 等. HcNPV 和 Bt 复配对美国白蛾的致病性[J]. 中国生物防治, 2008, 24(3): 223-238.
- [5] 闫志利, 魏兴彬, 杨柳, 等. 苏云金杆菌(Bt)——唐海 1 号对美国白蛾的毒力测定[J]. 河北林业科技, 2000(1): 3-4.
- [6] 赵焕丽. 美国白蛾优良 Bt 菌株筛选及其与高效氯氰菊酯的相容性[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.

- [7] Lin Ping, Cheng Tingcai, Jin Shengkai, et al. Structural evolutionary and functional analysis of APN genes in the Lepidoptera *Bombyx mori* [J]. *Gene*, 2014, 535(2):303-311.
- [8] Griffiths J S, Haslam S M, Yang T, et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin [J]. *Science*, 2005, 307(5711): 922-925.
- [9] Lee S B, Aimanova K G, Gill S S. Alkaline phosphatases and aminopeptidases are altered in a Cry11Aa resistant strain of *Aedes aegypti* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 54: 112-121.
- [10] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423-431.
- [11] Zhang Haonan, Du Bing, Yang Yihua, et al. Cadherin mutation linked to resistance to Cry1Ac affects male paternity and sperm competition in *Helicoverpa armigera* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 70: 67-72.
- [12] Knight P J, Crickmore N, Ellar D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N [J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 11(3): 429-436.
- [13] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2845-2849.
- [14] Luo K, Sangadala S, Masson L, et al. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27(8/9): 735-743.
- [15] Yao K, Kadotani T, Kuwana H, et al. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 246(3): 652-657.
- [16] Crava C M, Bel Y, Jakubowska A K, et al. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(10): 924-935.
- [17] Tan S Y, Cayabyab B F, Alcantara E P, et al. Comparative binding of Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* toxins to brush border membrane proteins from *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) midgut tissue [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 114(3): 234-240.
- [18] Ren Xiangliang, Ma Yan, Cui Jinjie, et al. RNA interference-mediated knockdown of three putative aminopeptidases N affects susceptibility of *Spodoptera exigua* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 67: 28-36.
- [19] Chen Jianwu, Likitvivanavong S, Aimanova K G, et al. A 104 kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(12): 1201-1208.
- [20] 莎姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南(第二版)[M]//黄培堂,译. 北京: 科学出版社, 2005:880-997.
- [21] Tajne S, Sanam R, Gundla R, et al. Molecular modeling of *Bt* Cry1Ac (DI-DII)-ASAL (*Allium sativum* lectin)-fusion protein and its interaction with aminopeptidase N (APN) receptor of *Manduca sexta* [J]. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2012, 33: 61-76.
- [22] Xu Lina, Wang Zhenying, Zhang Jie, et al. Characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from *Ostrinia furnacalis* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2014, 115:95-98.
- [23] 陈颖,但汉斌,魏雪生,等. Bt-15A3 防治美国白蛾的试验[J]. 天津农学院学报, 2003, 10(1):24-26.
- [24] 陈月华,任改新,吴卫辉,等. 苏云金芽孢杆菌科默尔亚种 15A3 株的 cry 基因分析及杀虫特性[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 170-174.
- [25] Wang Guirong, Liang Gemei, Wu Kongming, et al. Gene cloning and sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *European Journal of Entomology*, 2005, 102(1): 13-19.

(责任编辑: 杨明丽)