

利用噬菌体展示技术筛选 Cry2Ab 毒素受体表位的方法^{*}

齐 佳 刘晨曦 吴孔明^{**}

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 产生的内毒素具有杀虫活性, Cry2Ab 毒素作为 Bt 棉花的杀虫活性蛋白, 其在靶标昆虫体内的结合受体及作用位点尚不清楚, 本研究采用噬菌体展示 (phage display) 的方法, 经 4 轮的“吸附—洗脱—扩繁”筛选, 并对阳性克隆所携带的外源 DNA 片段进行序列测定后, 得到 2 段能够与活化 Cry2Ab 毒素相互作用的多肽序列, 通过酶联免疫结合试验 (ELISA) 进一步证明, 这 2 段多肽序列与活化 Cry2Ab 毒素具有较高的亲和力和特异性, 结果表明, 利用该方法能够由噬菌体随机肽库中高效捕获亲和序列, 筛选到与活化 Cry2Ab 毒素具有高亲和力的多肽, 该序列可以模拟 Cry2Ab 毒素的受体表位, 为进一步研究 Cry2Ab 毒素作用机制奠定了基础, 并为今后田间抗性基因频率检测, 以及毒素—受体作用机制研究工作提供更有力的技术支持。

关键词 噬菌体展示, 表位筛选, Cry2Ab

Using phage display to map the binding epitope of the *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab toxin

QI Jia LIU Chen-Xi WU Kong-Ming^{**}

(State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The insecticidal Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* are highly specific to different insects. Various proteins, such as cadherin, aminopeptidase-N (APN) and alkaline phosphatase (ALP) are characterized as potential Cry-receptors. However, little is known about the mode of Cry2Ab action, such as its receptors and binding sites. We used phage display to characterize the binding epitope of the Cry2Ab toxin *in vitro*. A two peptide sequence was identified after four-rounds of screening. ELISA analysis showed that activated Cry2Ab toxin could bind these two peptides with high affinity. The results indicate that employing this method can efficiently screen out target peptides with high affinity and specificity. The method also provides a valuable platform to discover the mode of other Bt toxins.

Key words phage display, epitope mapping, Cry2Ab

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是目前全世界产量最大、使用最广的生物杀虫剂。它的主要活性成分是一种或数种杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 又称 δ 内毒素 (δ -endotoxin), 当敏感昆虫取食晶体毒素后, 毒素溶解于昆虫中肠的碱性环境, 原毒素蛋白被酶解为小分子的, 有杀虫活性的 Cry 毒素 (Gill *et al.*,

1992)。

随着 Bt 使用量和 Bt 作物种植面积的迅速增长, 杀虫基因在作物体内的持续表达, 使得害虫在整个生长周期都受到 Bt 杀虫蛋白的高压选择, 因而害虫对 Bt 的抗性已成为一个不容忽视的问题。抗性监测数据表明田间小菜蛾 *Plutella xylostella* 种群及粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 种群已对 Bt 产生

^{*} 资助项目: 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2007CB109204)。

^{**} 通讯作者, E-mail: wkm@caas.cba.net.cn

收稿日期: 2011-01-22, 接受日期: 2011-09-29

抗性 (Tabashnik *et al.*, 1990; Janmaat and Myers, 2003), 使得 Bt 毒素的抗性机制研究更加紧迫, 为了预防长期使用单价 (Cry1Ac) 抗虫棉引起的靶标害虫的潜在抗性进化问题, 很多国家采用了双价 (Cry1Ac/Cry2Ab) 抗虫棉来规避单价抗虫棉的潜在风险。尽管如此, 在澳大利亚发现了田间棉铃虫对 Cry2Ab 的抗性种群 (Mahon *et al.*, 2007; Caccia *et al.*, 2010), 这表明害虫能够对 Cry2Ab 毒素产生抗性。

目前, 对 Cry1A 类蛋白的受体结合位点已经有了较深入的研究。特别是利用 phage display 的方法, Gómez 等 (2001, 2002) 确定了 Cry1Ab 在烟草天蛾 *Manduca sexta* 钙粘蛋白上的 3 个结合区域之一, 即⁸⁶⁵NITIHITDTNN⁸⁷⁵, 这个多肽序列能与 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的 loop 2 结合。将烟草天蛾的钙粘蛋白缺失表达后, 发现在临近跨膜区上, 存在一段连续的氨基酸序列 1296 ~ 1362 能够结合 Cry1Ab (Dorsch *et al.*, 2002), 后来这个区域被确定为¹³³¹IPLPASILT¹³⁴²TV¹³⁴², 结合于 Cry1Ab 的 loop α -8 上 (Gómez *et al.*, 2003)。烟草天蛾中, 第 3 个结合区位于钙粘蛋白 1363 ~ 1464 的氨基酸序列上, 并且这段序列与 Cry1Ab 的毒性相关 (Hua *et al.*, 2004)。而在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的钙粘蛋白上, Cry1Ac 的结合区确定在 1422 ~ 1440 的氨基酸序列上, 这段序列与烟草天蛾钙粘蛋白的 Cry1Ab 毒素的第 3 个结合区域具有较高相似性, 同时, 对这段氨基酸序列上的 Leu¹⁴²⁵ 和 Phe¹⁴²⁹ 突变后, 发现其与 Cry1Ac 毒素的结合能力丧失 (Xie *et al.*, 2005)。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠钙粘蛋白的氨基酸序列中, Cry1Ac 毒素能够结合到位于 1217 ~ 1461 区域的连续的 244 个氨基酸序列上 (Wang *et al.*, 2004)。在家蚕 *Bombyx mori* 中肠上皮的 APN 氨基酸序列中, Cry1Aa 毒素只结合 135-Ile 和 198-Pro 之间的 63 个氨基酸 (Yaoi *et al.*, 1999)。此外, Cry1Aa 毒素也只结合小菜蛾 *Plutella xylostella* 的相同的氨基酸序列 (Nakanishi *et al.*, 1999)。通过限制性内切酶切除家蚕钙粘蛋白 cDNA 内的不同多肽序列, 经免疫共沉淀分析, 确定了 Cry1Aa 结合在 1245 ~ 1390 之间的氨基酸残基上 (Nagamatsu *et al.*, 1999)。

首次报道的有关 Cry2A 类蛋白作用机制的研究是 English 等 (1994) 使用 Cry2Aa 与 *Helicoverpa zea* 的 BBMV 结合, 结果显示 Cry2Aa 的结合是不

饱和的且亲和力较低, 而 Hernández-Rodríguez 等 (2008) 采用同位素标记的 Cry2Ab 结合棉铃虫 BBMV, 证明 Cry2Ab 对其中肠具有高亲和力, 并且这种结合是一种具有饱和性的特异结合, 同时, 对 Cry2Aa、Cry2Ab 和 Cry2Ae 蛋白的同源竞争分析实验显示, 这 3 种 Cry2A 毒素具有共同的结合位点, 并且这个位点不能被 Cry1Ac 识别。Cry1Ac 和 Cry2A 毒素蛋白在 *H. armigera* 和 *H. zea* 2 种棉铃虫 (双价棉的主要靶标害虫) 的 BBMV 上, 不存在明显的亲和竞争, 同时也没有在 Cry1A 毒素中找到具有亲和竞争性的毒素蛋白 (Karim *et al.*, 2000; Estela *et al.*, 2004)。研究表明, Cry1Ac 和 Cry2Ab 之间存在不对称的交互抗性 (Tabashnik *et al.*, 2009)。Cry1A 毒素和 Cry2A 毒素的杀虫机理不同, 它们具有各自独立的受体结合机制 (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008)。在 Cry2A 毒素的 Domain II 中存在与受体结合的表位 (Morse *et al.*, 2001), 但此类毒素在昆虫体内的特异性受体种类以及在受体上的特异性结合位点目前尚不清楚。

噬菌体展示技术是一种基因表达产物与亲和选择相结合的技术, 它是将外源多肽或蛋白的 DNA 序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置, 使外源基因随外壳蛋白的表达而表达, 外源多肽或蛋白随噬菌体的重新组装而展示到噬菌体表面的生物技术, 并且被展示的多肽或蛋白仍能保持相对独立的空间结构和生物活性。自 1990 年 Scott 和 Smith 将随机序列肽与丝状噬菌体外壳蛋白融合展示在噬菌体表面, 建立了噬菌体展示随机肽库后, 该技术在抗原表位筛选, 蛋白质功能位点分析和疫苗研制等众多领域得到了广泛应用。在研究 Cry 毒素与其受体的相互作用中, 采用该技术进行的实验表明, 在不同昆虫中 Cry 毒素有不同的受体蛋白, 如: 钙粘蛋白、氨肽酶-N 和碱性磷酸酯酶, 在鳞翅目烟草天蛾中 Cry1Ab 毒素的受体结合表位位于钙粘蛋白和氨肽酶上 (Gómez *et al.*, 2001), 而在双翅目埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中碱性磷酸酯酶是 Cry11Aa 毒素的受体 (Fernández *et al.*, 2006)。由于这种方法可以找到 Cry 毒素在受体上的结合位点, Gómez 等 (2001) 利用该技术研究了与 Cry1A 相互作用的钙粘蛋白受体表位, Fernández 等 (2006) 通过该技术开发埃及伊蚊幼虫中肠上的 Cry11Aa 功能受体是

一种 GPI 锚定的碱性磷酸酯酶。

本实验以噬菌体展示随机肽库技术为手段,采用随机线性 12 肽文库,对活化 Cry2Ab 毒素在昆虫体内的受体结合位点进行体外模拟筛选,通过 4 轮“吸附—洗脱—扩繁”的淘选过程,用自行设计的引物对筛选到的阳性噬菌体进行外源插入序列测序,得到了 2 段可能与 Cry2Ab 在昆虫中肠上的受体结合位点序列高度相似的多肽。该方法在蛋白相互作用位点研究中有效率高,周期短等优点,能够在高亲和噬菌体微量存在的情况下,通过感染细菌使其富集,并且展示多肽与其包含在噬菌体内部的基因密码相连,使得结合肽的序列分析既快速又简便。因此,该技术在 Bt 毒素作用机制研究中的应用,为进一步的探索 Bt 毒素作用机理,抗性治理以及害虫综合防治策略的制定提供有力的基础研究平台。

1 材料与方 法

1.1 Cry2Ab 杀虫蛋白的提取,活化和纯化

本实验采用 pHT315_Cry2Ab_HD-73⁻菌株(由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供),Luria-Bertani (LB) 培养基 30 ℃ 活培养后,转移至牛肉膏培养基中(1:100 稀释),30 ℃,红霉素 250 mg/mL 进行扩大培养。将菌体 7 000 r/min 离心,分别用 1 mol/L NaCl, ddH₂O 洗涤后,进行超声波裂解,12 000 r/min 离心 10 min,取沉淀加入裂解液(EDTA 0.05 mol/L, Na₂CO₃ 5.3 g/L, pH 值 11.4, 每 1 L 培养基培养细胞加入 50 mL)和巯基乙醇(每 1 L 培养基培养细胞加入 1.5 mL),以 4 mol/L NaAc-HAc 缓冲液/NaOH 调 pH 值至 11.5,置于 4 ℃ 摇床,4 h 至完全裂解。12 000 r/min, 15 min, 4 ℃ 离心,取上清加入 4 mol/L NaAc(每 1 L 培养基培养细胞加入 3.5 mL),调 pH 值至 7.8, 4 ℃ 静止过夜。7 000 r/min, 15 min 离心, ddH₂O 洗涤 2 次后将沉淀溶于 50 mmol/L Na₂CO₃(pH 9.6~10.0)中, 4 ℃ 保存待用。

胰蛋白酶(Trypsin, Sigma-aldrich) 1:50 (W/W), 37 ℃, 2.5 h, 对 Cry2Ab 前毒素进行活化后,用 30 ku 的超滤管进行超滤。以牛血清白蛋白(BSA)为蛋白标准,标准曲线法测定蛋白浓度。

1.2 Phage display 筛选

噬菌体随机 12 肽库(phage display peptide

library)购自美国 New England Biolabs 公司,肽库滴度为 1×10^{13} pfu/mL, 随机多样性 1.28×10^9 。宿主菌为 *E. coli* ER2738, 为 F⁺、四环素(Tetracycline)抗性转基因菌株。筛选流程见图 1。

1.2.1 肽库的生物淘洗 将活化后的 Cry2Ab 毒素蛋白(150 μL, 100 μg/mL)包被微孔板, 4 ℃ 密封过夜后, 封闭液(0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.6), 5 mg/mL BSA)加满封闭, 4 ℃, 4 h。用 TBST(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20 (v/v))快速洗板 6 次, 将肽库原液 1:10 稀释后取 100 μL 加入微孔中, 室温轻微振摇 1 h, TBST 洗涤 10 遍去除未结合的噬菌体; 加入 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/mL BSA, 100 μL, 室温振摇 10 min, 洗脱结合的噬菌体, 将洗脱物转移至微量离心管中, 加入 15 μL 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1)中和洗脱液。在进行第 2~4 轮筛选时, 提高 Tween-20 的浓度至 0.5%。

1.2.2 洗脱噬菌体扩繁 将宿主菌 *E. coli* ER2738 的过夜培养物用 LB 培养基 1:20 稀释, 将洗脱噬菌体液接种到 20 mL 上述稀释后的细菌培养物中, 37 ℃ 振荡培养 4.5 h, 4 ℃ 12 000 g 离心 15 min, 将上清转移至另一个离心管中, 加入上清 1/6 体积的聚乙二醇(PEG)/NaCl (20% PEG-8000, 2.5 mol/L NaCl)溶液, 颠倒混匀, 4 ℃ 沉淀过夜。次日 4 ℃ 12 000 g 离心 25 min, 弃上清, 可见指纹状噬菌体沉淀, 用 1 mL TBST 重悬沉淀, 将噬菌体悬浮液短暂离心, 取上清加入 1/6 体积 PEG/NaCl 混匀, 4 ℃ 再沉淀 60 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 200 μL TBST 重悬, 4 ℃ 14 000 g 离心 1 min, 取上清即为扩繁后的噬菌体, 4 ℃ 保存。

将活化 Cry2Ab 再次包被微孔, 用扩繁后的噬菌体再次进行淘选, 如此反复进行 4 轮生物淘选。每轮筛选前后均铺 LB 顶层琼脂平板测定噬菌体滴度, 计算回收率。

回收率(%) = (洗脱的噬菌体克隆数 ÷ 洗脱前噬菌体克隆数) × 100,

滴度 = 平皿噬菌斑数 ÷ 该平皿噬菌体稀释倍数。

1.2.3 噬菌体滴度测定 将各轮投入和产出噬菌体按比例稀释后, 每个稀释度取 10 μL 接种 ER2738 的过夜培养物, 于 LB 固体培养基上铺制 LB/IPTG/X-gal 平板, 37 ℃ 过夜培养后记数, 每个蓝斑都记为一个噬菌体的单克隆。

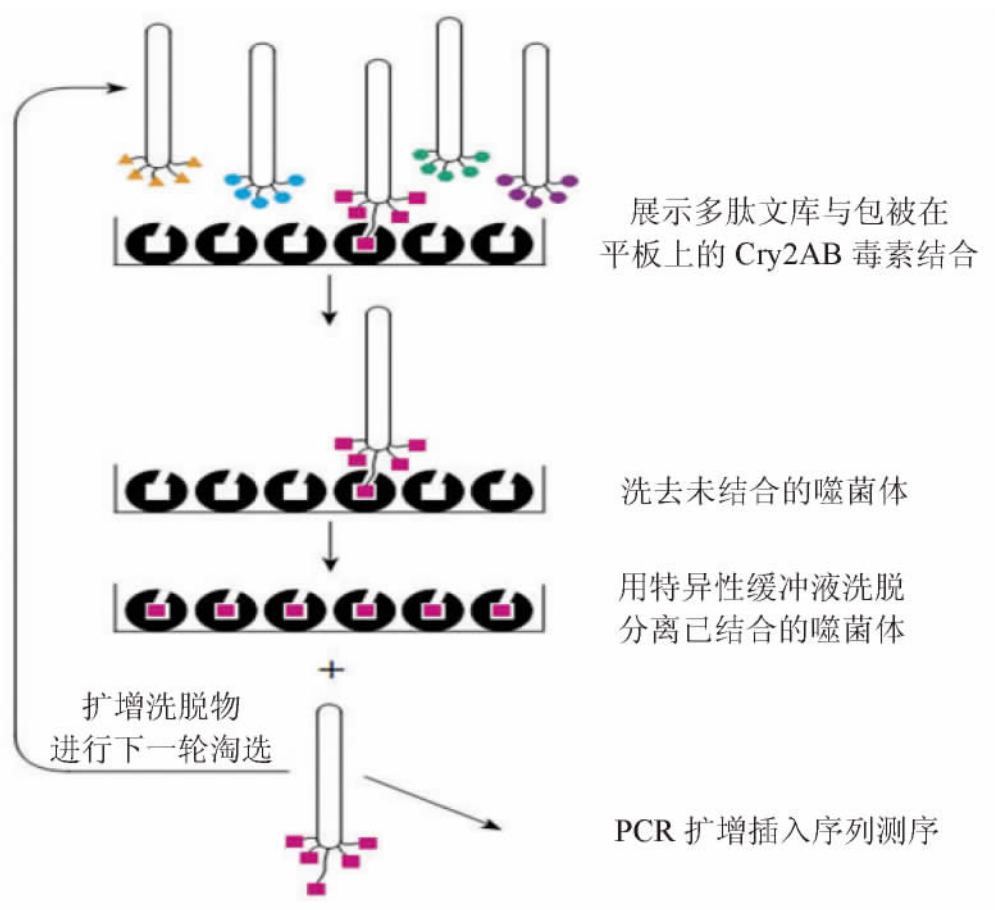


图 1 筛选流程

Fig.1 Panning with the phage display peptide library

1.3 洗脱噬菌体 DNA 序列测定

根据 M13 噬菌体文库外源插入片段的位置，自行设计一对引物（由上海生工生物工程技术有限公司合成）（表 1）。用灭菌牙签挑取 LB/IPTG/X-gal 平板上的蓝色单克隆于 20 μ L ddH₂O，98 $^{\circ}$ C，10 min 后，10 000 g 离心 3 min，上清即为噬菌体 DNA。PCR 扩增含插入目的片段的噬菌体 DNA。50 μ L PCR 反应体系含 10 mmol/L dNTPs 4 μ L，5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L，10 $\times$ PCR 反应缓冲液（内含 15 mmol/L MgCl₂）5 μ L，10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L，噬菌体 DNA 模板 1 μ L，灭菌蒸馏水 37.5 μ L。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、58 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，共 32 个循环，72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物中含插入目的片段的产物长为 195 bp，缺失插入片段的产物长为 150 bp。将 PCR 产物在 2% 琼脂糖

凝胶上电泳（140 V）30 min 后。通过凝胶成像分析仪判断电泳结果，将含有插入片段的电泳条带切下用凝胶回收试剂盒（Biomed）进行纯化回收，回收产物 16 $^{\circ}$ C 连接 pMD19 – T simple（TaKaRa）30 min，转入 DH5 α 感受态细胞（天根公司）中，涂板进行蓝白斑筛选，37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取白斑，培养测序（上海生工公司）。

表 1 扩增噬菌体插入片段的引物序列

Table 1 Primers used for amplifying the insert DNA in phage

引物名称 Primer name	引物序列 Primer base (5'→ 3')
Phage-F	TTATTGCAATTCCTTTAGT
Phage-R	CCCTCATAGTTAGCGTAACG

1.4 ELISA 检测

1.4.1 目的噬菌体多肽扩繁 灭菌牙签于 LB/

IPTG/X-gal 平板上挑取单个蓝斑,接种于 ER2738 ($OD_{600} < 0.05$) 培养物中,37 ℃,250 r/min,4.5 h 培养后按 1.2.2 所述分离扩繁的噬菌体。取扩繁噬菌体 20 μL,98 ℃,10 min 后,10 000 g 离心 3 min,取上清(噬菌体 DNA)如 1.3 中所述进行测序,4 ℃保存含有目的多肽的噬菌体,待用,并进行噬菌体滴度测定。

1.4.2 ELISA 检测 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH8.6) 缓冲液配制 1.6 μg/μL 活化 Cry2Ab 毒素,并进行倍半稀释至 0.00078 μg/μL,将稀释好的活化 Cry2Ab,150 μL 分别包被于微孔中,4 ℃密封过夜,次日倒出过量包被液,每孔加满封闭液进行封闭 4 ℃,2 h,倒出封闭液,TBST(0.5% Tween-20)洗板 6 次,每孔中加入相同滴度的目的噬菌体 100 μL,室温抚育 2 h,倒出过量噬菌体,TBST(0.5% Tween-20)洗板 6 次,每孔加入 1:5 000 稀释的 HRP/Anti-M13 单克隆抗体 200 μL,室温抚育 1 h,TBST(0.5% Tween-20)洗板 6 次,每孔加入 HRP 反应底物 Substrate Solution 100 μL,室温抚育 20 min,加入终止液 Stop Solution 100 μL,于 450 nm 处测定吸光值。以相同浓度的 BSA 作为对照,每个浓度设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 活化 Cry2Ab 浓度测定

提取 Cry2Ab 前毒素后,经过胰蛋白酶的消化,得到活化的 Cry2Ab 毒素,通过超滤提高活化毒素的纯度(图 2),用 Bradford 法(以 BSA 为标准),对超滤后的活化 Cry2Ab 毒素浓度进行定量。

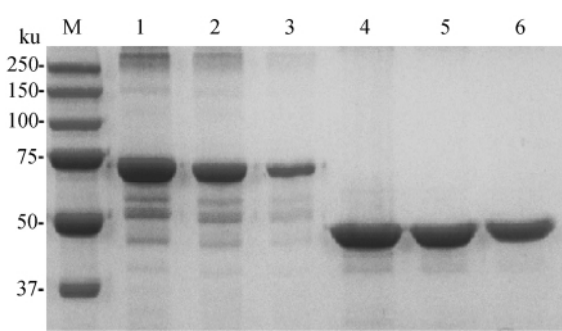


图 2 SDS-PAGE 电泳分析 Cry2Ab 毒素活化
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the activated Cry2Ab toxin
M: 蛋白分子量标准;泳道 1~3:Cry2Ab 前毒素;
泳道 4,5:活化 Cry2Ab 毒素;
泳道 6:超滤离心后的活化 Cry2Ab 毒素。
M:protein standards; lane 1-3:Cry2Ab protoxin;
lane 4,5:activated Cry2Ab;
lane 6:activated Cry2Ab after centrifugal ultrafiltration.

2.2 噬菌体的滴度和回收率

噬菌体文库共进行了 4 轮“吸附—洗脱—扩繁”的生物淘选。噬菌体的回收率由第 1 轮的 1×10^{-7} 增加到第 4 轮的 1×10^{-5} ,富集了 100 倍,在进行第 2~4 轮筛选时,洗涤液中 Tween-20 的浓度由 0.1% 增加到 0.5% (v/v),进一步减少了低亲和力和非特异性结合的噬菌体,提高了筛选效率。对各轮的回收率进行比较,携带强亲和力多肽的噬菌体通过 4 轮的筛选得到高度富集(表 2)。

2.3 序列测定

从第 3 轮和第 4 轮的洗脱噬菌体中,分别随机挑取 20 个阳性克隆,用 Phage 引物 PCR 扩增外源插入的展示多肽的 DNA 序列(图 3)后,测定这

表 2 亲和筛选中噬菌体的富集
Table 2 Enrichment of the selected phage in each round

筛选轮数 Round	噬菌体加入量 (pfu) Phage input	噬菌体产出量 (pfu) Phage output	噬菌体回收率 (%) Recovery rate
1	1×10^{11}	1×10^4	1×10^{-7}
2	5×10^{11}	3×10^4	0.6×10^{-7}
3	4×10^{10}	2×10^5	0.5×10^{-5}
4	4×10^9	4×10^4	1×10^{-5}

些克隆所携带的外源性序列并推导出相应的氨基酸序列,见表 3,4。比较测序结果发现,在第 3 轮

筛选序列中有 10 条含有 2 个相同的氨基酸序列,并且这 2 个序列在第 4 轮的筛选序列中得到高度

富集,可见这 2 个氨基酸序列可能为活化 Cry2Ab 毒素的模拟受体表位,其他序列视为无效序列。

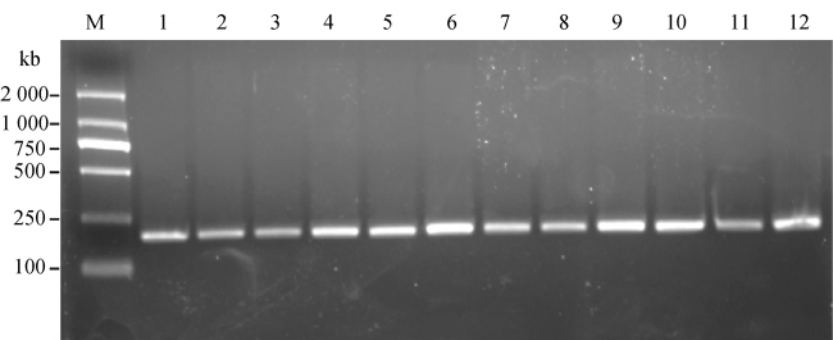


图 3 PCR 扩增阳性克隆编码多肽的基因片段
Fig.3 The insert fragment of the selected phage
M:DNA 分子量标准;泳道 1~12:阳性克隆 PCR 产物。
M:DNA marker; lane 1-12:PCR product of selected phage.

表 3 第 3 轮阳性噬菌体克隆的外源 DNA 序列及相应氨基酸序列分析
Table 3 The insert DNA sequence and peptides of eluted phage in the third round

克隆 Clone	DNA 序列 DNA sequence (5'→3')	氨基酸序列 Amino acid sequence
1	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
2	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
3	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
4	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
5	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
6	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
7	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
8	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
9	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
10	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
11	ATTTATACGAAGAGTGTGCTTAGCTGGATGAGCTG	IYTKSVA.LDEL
12	GTTACGGCTAATTCGCCGTCTAATCGGAATTATTGG	VTANSPSNRNYW
13	AGTAAGACTACGCAGGAGCCGACTACGAATCTTCCG	SKTTQEPTTNLP
14	ATTACTCCGCCGCTTTATCATGCTGGTGCTCCTGCG	ITPLYHAGAPA
15	ACTAATGTGAGTTATATTGTGCAGAGTGTGCATGAT	TNVSIVQSVHD
16	AATATTAATAATCATATGCTTTATCCTTTTGCGGTG	NINNHMLYPFAV
17	ACTGATGCGCAGCATAATATTACGATGAGTAAGCCG	TDAQHNITMSKP
18	CTTGAGTCTTGTGATACGAATGGAATAGTACGCCG	LESCDTNGNSTR
19	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
20	ACTCTGACTAAGTCTGCTTTGTGCGCATGGGTATTCC	TLTKSALSHGYS

2.4 ELISA 检测结果

含有目的多肽序列的噬菌体扩繁后,测定滴度为 1×10^{15} pfu/ μ L,以此浓度为加入的噬菌体与不同浓度梯度的活化 Cry2Ab 进行亲和反应,结果

表明,这 2 个多肽序列与活化 Cry2Ab 具有较强的亲和力,并且不与包被的其他蛋白相结合,说明这种结合具有特异性,并随靶蛋白浓度的降低而降

低,NQFPSGAVYEHS 序列的亲 and 性强于序列 ATNEFPNPLHAP,这也与筛选测序中其出现的几率趋势相同(图 4,5)。

表 4 第 4 轮阳性噬菌体克隆的外源 DNA 序列及相应氨基酸序列分析

Table 4 The insert DNA sequence and peptides of eluted phage in the fourth round

克隆 Clone	DNA 序列 DNA sequence (5'→3')	氨基酸序列 Amino acid sequence
1	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
2	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
3	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
4	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
5	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
6	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
7	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
8	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
9	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
10	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
11	AATCAGTTTCCTTCGGGGGCTGTTTATGAGCATTCT	NQFPSGAVYEHS
12	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
13	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
14	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
15	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
16	GCTACTAATGAGTTTCCTAATCCTCTTCATGCGCCT	ATNEFPNPLHAP
17	TTGTCGACTTATACTACGGAGTCTCGTTCTATGGTG	LSTYTTESRSMV
18	AGTAAGACTACGCAGGAGCCGACTACGAATCTTCCG	SKTTQEPTTNLP
19	TTGTCGACTCATACTACGGAGTCTCGTTCTATGGTG	LSTHTTESRSMV
20	GCTACTGATACGCATAATCCTCTGCGTTATAAGCGG	ATDTHNPLRYKR

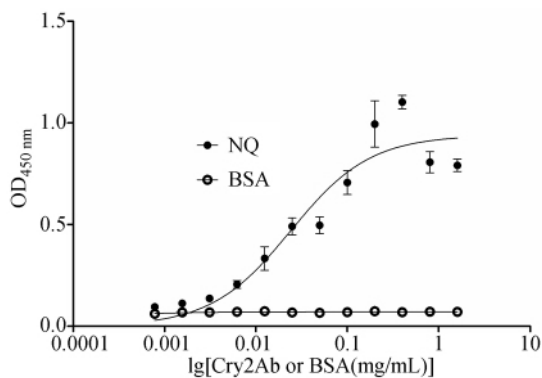


图 4 ELISA 结合分析 - NQ 序列(NQFPSGAVYEHS)
Fig. 4 ELISA binding assay of NQ-sequence
(NQFPSGAVYEHS)

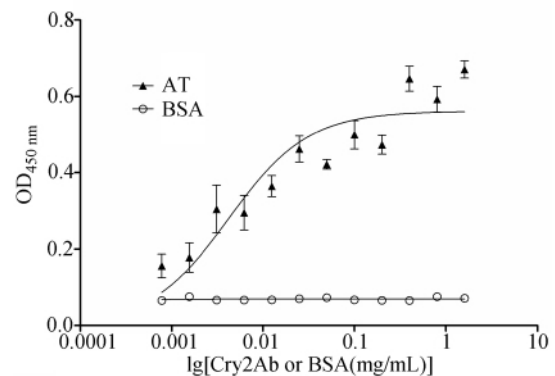


图 5 ELISA 结合分析 - AT 序列(ATNEFPNPLHAP)
Fig. 5 ELISA binding assay of AT-sequence
(ATNEFPNPLHAP)

3 讨论

昆虫取食 Cry1A 毒素后,在中肠的碱性环境下,水解为具有杀虫活性的毒素单体,毒素单体与昆虫中肠上皮细胞的钙粘蛋白结合后,毒素单体发生寡聚化,寡聚体结合锚定在上皮细胞的氨肽酶和碱性磷酸酯酶,这导致寡聚体大量聚集于脂筏上,从而插入到细胞膜中,引起细胞穿孔,最终导致昆虫死亡。

尽管 Cry1A 毒素与 Cry2 毒素具有相似的空间结构,但它们识别的受体表位是不同的。用 phage display 的方法,在体外进行模拟筛选,通过每一轮的“吸附—洗脱—扩繁”,不断提高洗脱噬菌体对包被蛋白的亲合力,减少非特异性结合,使回收率不断增加,得到了具有高亲和力的多肽序列,这种高亲和性使得筛选到的序列很可能与 Cry2Ab 毒素在昆虫中肠上的受体结合表位高度相似。在第3轮和第4轮的展示序列筛选中,第4轮的筛选效率明显高于第3轮中这2个序列的筛选效率,目的多肽筛出率大大提高,也表现出了这种高亲和力序列富集的提高。ELISA 分析验证实验表明两序列能与 Cry2Ab 毒素高亲和的特异结合,在多肽序列过量的情况下,与 Cry2Ab 的结合具有饱和性,这与之前的研究结果一致 (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008),与同浓度的 BSA 对照相比,这种结合具有高的亲合力。在筛选结果中, NQFPSCAVYEHS 序列较 ATNEFPNPLHAP 序列的筛选效率高,这种亲和力的差异同样体现在 ELISA 分析结果中。

本实验用自行设计的引物扩增插入片段后进行测序,打破了传统噬菌体 DNA 提取和测序方法。筛选出的两段序列虽然表现了较高的亲合力,两段多肽在功能验证上还需要进一步研究和探讨。

噬菌体展示系统的作用来自亲和选择和生物学扩增能力的有效结合。与其它体外研究蛋白质相互作用的方法相比,如:酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system),免疫共沉淀等,该技术在靶受体的亲和筛选,表位筛选以及模拟筛选中,可以直接筛选到具有较强亲和反应、能够作为模拟表位的相互作用位点的氨基酸序列,并且这种亲和筛选更高效、亲和噬菌体更易扩繁和富集以便得到亲和性更高的序列,在筛选出亲和多肽或蛋白的

同时也得到了其核酸编码序列。通过几轮的亲和选择,不断提高筛出多肽与靶受体的亲和力,最后得到能够模拟昆虫体内受体结合位点的表位,为蛋白质相互作用机制的基础研究提供更精确的信息。

在 Bt 毒素作用机理研究中,噬菌体展示筛选技术已经逐渐得到认识和广泛应用 (Fernández *et al.*, 2008),这种方法可以识别 Cry 毒素在受体上的结合位点,鉴定新的受体分子,为研究毒素与受体的相互作用及进一步探索抗性机制提供技术平台。

参考文献 (References)

- Caccia S, Hernández-Rodríguez CS, Mahon RJ, Downes S, James W, Bautsoens N, Rie JV, Ferré J, 2010. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 5 (4) :e9975.
- Dorsch JA, Candas M, Griko NB, Maaty WSA, Midboe EG, Vadlamudi RK, Bulla Jr LA, 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R₁ in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (9) :1025—1036.
- English L, Robbins HL, Von Tersch MA, Kulesza CA, Ave D, Coyle D, Jany CS, Slatin SL, 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24 (10) :1025—1035.
- Estela A, Escriche B, Ferré J, 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (3) :1378—1384.
- Fernández LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.*, 394 (Pt1) :77—84.
- Fernández LE, Gómez I, Pacheco S, Arenas I, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2008. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides*, 29 (2) :324—329.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV, 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37:615—636.
- Gómez I, Oltean DI, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2001.

- Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.*, 276 (31) :28906—28912.
- Gómez I, Miranda-Ríos J, Rudino-Pinera E, Oltean DI, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2002. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope⁸⁶⁹ HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with Loop 2 of Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.*, 277 (33) :30137—30143.
- Gómez I, Dean DH, Bravo A, Soberón M, 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry*, 42:10482—10489.
- Hernández-Rodríguez CS, Vliet AV, Bautsoens N, Vliet JV, Ferré J, 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (24) :7654—7659.
- Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2004. Bt-R_{1a} extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 279 (27) :28051—28056.
- Janmaat AF, Myers J, 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270 (1530) :2263—2270.
- Karim S, Riazuddin S, Gould F, Dean DH, 2000. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 67 (3) :198—216.
- Mahon RJ, Olsen KM, Downes S, Addison S, 2007. Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian population of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 100 (6) :1844—1853.
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM, 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9 (5) :409—417.
- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y, 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin. *FEBS. Lett.*, 460: 385—390.
- Nakanishi K, Yaoi K, Shimada N, Kadotani T, Sato R, 1999. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1432 (1) :57—63.
- Scott JK, Smith GP, 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249 (4967) : 386.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW, 1990. Field development of resistance to in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 1671—1676.
- Tabashnik BE, Unnithan GC, Masson L, Crowder DW, Li X, Carrière Y, 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *PNAS*, 106 (29) :11889—11894.
- Wang GR, Wu KM, Liang GM, Guo YY, 2004. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Science in China Series C: Life Science*, 48 (4) :346—356.
- Xie R, Zhuang MB, Ross LS, Gómez I, Oltean DI, Bravo A, Soberón M, Gill SS, 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.*, 280 (9) : 8416—8425.
- Yaoi K, Nakanishi K, Kadotani T, Imamura M, Koizumi N, Iwahana H, Sato R, 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N. *FEBS. Lett.*, 463 (3) :221—224.