

棉铃虫钙粘蛋白 N 端多肽多克隆抗体制备及对 Bt 抗性的初步检测^{*}

黄晶晶^{1**} 韩 斌¹ 常菊花² 沈文飏^{1***} 沈晋良²

(1. 南京农业大学生命科学学院 南京 210095; 2. 南京农业大学植物保护学院 南京 210095)

Preparation of polyclonal antibody of N-terminal peptide of cadherin of *Helicoverpa armigera* and primary detection of Bt-resistance. HUANG Jing-Jing^{1**}, HAN Bin¹, CHANG Ju-Hua², SHEN Wen-Biao^{1***}, SHEN Jin-Liang² (1. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Rabbit polyclonal antibodies were prepared with recombinant N-terminal peptide of *Helicoverpa armigera* (Hübner) cadherin, and were used for identification of Bt-resistance. N-terminal peptide fragment encoding gene *Cad285* was amplified by RT-PCR from midgut of *H. armigera* and cloned to prokaryotic expression vector pET-30a, then induced expressing in *E. coli* BL21 with IPTG. Recombinant protein (~35ku) was highly expressed and existed as inclusion bodies. The inclusion bodies were purified with denaturing, purifying by Ni-NTA and refolding. The purified recombinant *Cad285* was used to immunize rabbit for preparing polyclonal antibody with higher titer than 1:16 000 measured by ELISA. Finally, a laboratory strains of *H. armigera* was detected by western blot with the polyclonal antibody. The results showed a significant difference between the sensitive and resistant strains.

Key words *Helicoverpa armigera*, E-cadherin, prokaryotic expression, polyclonal antibody, Bt resistance

摘 要 用重组表达的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 中肠钙粘蛋白 N 端多肽片段制备兔多克隆抗体, 并利用其对 Bt 抗性进行鉴定。通过 RT-PCR 方法对棉铃虫中肠钙粘蛋白 N 端多肽的基因片段 *Cad285* 进行 PCR 扩增, 将其克隆到 pET-30a 原核表达载体中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中经 IPTG 诱导表达, 得到 35 ku 的重组融合蛋白, 融合表达的包涵体经过变性、Ni-NTA 柱亲和纯化、复性等方法处理包涵体, 获得可溶性纯化蛋白, 用纯化后蛋白免疫新西兰兔制备多克隆抗体, ELISA 检测其效价高于 1:16 000; 利用最终获得的多克隆抗体对室内纯合 Bt 抗/感品系的棉铃虫中肠钙粘蛋白进行 Western blot 分析, 结果显示敏感和抗性品系之间有明显差异, 表明其能够应用对 Bt 抗性进行初步检测。

关键词 棉铃虫, 钙粘蛋白, 原核表达, 多克隆抗体, Bt 抗性

转苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 基因抗虫棉在防治鳞翅目害虫方面具有独特的优越性。已经知道, Bt 毒素杀虫机制的几个过程是: 毒素蛋白溶解活化、穿过中肠围食膜、与中肠上皮细胞膜上的受体结合、形成寡聚体和插入细胞膜形成膜孔等^[1,2]。其中, Bt 活化毒素 Cry1A 能否与昆虫中肠上皮细胞上的受体结合是决定其杀虫特异性和毒力的主要因素^[3~7]。钙粘蛋白是 Bt 毒素 Cry1A 的主要受体, Vadlamudi 等^[8]首次报道其在烟草天蛾

Protoparce sexta 肠上皮组织中存在。近年研究证明了在烟草天蛾、家蚕 *Bombyx mori* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 中, 钙粘蛋白是 Cry1A 毒素的靶标受体 I。有证据表明, 钙粘蛋白基因的变异与昆虫对 Bt 产生抗性有关, 这些相关性

^{*} 资助项目: 农业部高毒农药替代试验示范项目 【2005】种植业(植保)函 7 号】。

^{**} E-mail: hjjdiudiapple@yahoo.com.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: wbshenh@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-08-18, 修回日期: 2009-09-03

已经在烟蚜夜蛾和红棉铃虫中有所报道^[9,10]。棉铃虫中肠钙粘蛋白基因已成功克隆、表达并对 Cry1A 结合区进行了定位^[11]。例如,转 Bt 基因棉抗性品系的钙粘蛋白基因与敏感品系相比缺失了的核苷酸近 10 kb,并推断出钙粘蛋白 cDNA 的 5 541 bp 全长序列(GenBank 登录号:AY351904)和抗性的 1 581 bp cDNA 的序列(GenBank 登录号:AY714874)^[12],Yang 等^[13]又进一步鉴定出 Bt 抗性 GYBT 品系中钙粘蛋白 mRNA 的长短 2 种转录本(GenBank 登录号:AY647975 和 DQ523168)。

为了进一步研究钙粘蛋白在棉铃虫对 Bt 产生抗性的机理及对抗性的鉴定,本研究通过原核表达钙粘蛋白 N 端 101~385 氨基酸残基的 cDNA 片段,命名为 *Cad285*,获得重组蛋白纯品,制备以该融合蛋白为抗原的多克隆抗体,并利用其对室内纯合棉铃虫进行 Western blot 检测,从而为进一步探索棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性机理及对抗性检测方案奠定初步的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试棉铃虫 棉铃虫敏感品系 YCS 是 1991 年采自河南堰师市棉田第 2 代,在室内不接触任何农药饲养至今。抗性品系 YCR 为用 YCS 室内人工饲料饲养 53 代后的群体,在室内用转 Bt 基因棉叶(表达 Cry1Ac 毒素)连续筛选至今,抗性倍数达到 16 000 以上。

1.1.2 菌体和质粒 *E. coli* DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存;重组表达质粒 pET-30a 购自 Novagen 公司。

1.1.3 试剂 Biozol 试剂购自南京丁贝生物公司;DNA Marker DL 2 000、DNA Marker 100、DNA Marker λ -Hind III、低(高)分子质量蛋白 Marker、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 Bam H I 和 Hind III 为宝生物工程(大连)有限公司产品;Ni-NTA 亲和纯化蛋白柱购自南京金思特生物公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗为武汉博士德公司产品;DNA 胶回收试剂盒购自

上海申能博彩试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的合成 在冰盘上取出棉铃虫 5 龄幼虫的中肠,去除围食膜后,用 Wang 等^[11]的方法提取棉铃虫幼虫中肠的总 RNA,反转录酶 AMV (TaKaRa 公司)进行反转录合成 cDNA。

1.2.2 引物的设计与合成 用 Primer Premier 5 软件分析 GenBank (AF519180)已报道的棉铃虫钙粘蛋白 cDNA 序列,按照 PCR 引物设计原则,在棉铃虫中肠钙粘蛋白 N 端的编码基因片段设计一对引物,基因片段命名为 *Cad285*,两端均加上 Bam H I 和 Hind III 酶切位点。引物序列如下:

Cad285-P1: 5'-CTAGGATCCACTCCGAC-CATTGTATCTCCA-3';

Cad285-P2: 5'-CGGAAGCTTGAACGACG-AACTGCCTATAA-3'。

引物由南京金思特公司合成。

1.2.3 基因片段 *Cad285* 的 PCR 扩增 以合成的 cDNA 为模板进行 *Cad285* 的 PCR 扩增。反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,47℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 55 s,共 35 个循环;72℃ 保温 10 min。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖电泳,切胶回收目的基因,-20℃ 保存备用。

1.2.4 目的基因的克隆及鉴定 用 T4 连接酶将纯化的目的基因连接到 pUCm-T 载体上,16℃ 孵育过夜,连接产物转化至 *E. coli* DH5 α ,经氨苄青霉素(Amp)抗性、半乳糖苷酶蓝白斑筛选,挑取单菌落培养,提取重组质粒后用 Bam H I 和 Hind III 双酶切鉴定阳性克隆。挑选含有目的片段的阳性克隆送至南京金思特公司测序。

1.2.5 重组表达载体构建及原核表达 将酶切正确的 pUCm-T-*Cad285* 和原核表达载体 pET-30a 分别用 Bam H I 和 Hind III 进行双酶切,构建重组质粒 pET-30a-*Cad285*,将含有目的基因的质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3),用卡那抗性进行筛选,经酶切验证鉴定出含插入片段的阳性克隆。挑取鉴定正确的阳性克隆接种 5

mL LB 培养基, 37℃ 摇床培养过夜, 次日按 1:100 (v/v) 转接, 至 OD₆₀₀ 为 0.5, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导 3、6 和 12 h, 收集菌体进行 12% SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

1.2.6 Cad285 包涵体的纯化及复性 重组菌经大量诱导表达后离心收集菌体, 诱导超声破碎后于 4℃, 12 000 × g 离心 15 min, 收集包涵体沉淀, 最后用含 8 mol/L 尿素的 10 mM Tris-Cl (pH 8.5) 重悬 15 min 后, 4℃, 1 200 × g 离心 15 min, 收集上清。上清加入预先平衡好的 Ni-NTA 中, 根据金思特公司 High-Affinity Ni-NTA Resin 说明书进行重组融合蛋白包涵体的纯化, 利用升高洗脱液中咪唑的浓度收集各组分洗脱液, 用 SDS-PAGE 分析其纯度, 收集一定纯度的洗脱液即为纯化后蛋白。用 Bradford 法测定蛋白浓度。

将纯化后蛋白装入透析袋, 放入透析液 I (50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaCl, 4 mmol/L 尿素, 2 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSH, pH 7.4) 中复性, 4℃ 透析 8 h; 将透析袋放入透析液 II (50 mmol/L Na₂HPO₄, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L 尿素, pH 7.4) 中, 不断摇动, 每 4 h 换液 1 次, 更换 2 次后将透析袋放入透析液 III (50 mmol/L Na₂HPO₄, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 中透析过夜。

1.2.7 Cad285 融合蛋白多克隆抗体的制备 取纯化复性后蛋白 1 mg 与等量的弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后背部皮内多点注射新西兰大白兔, 每隔 2 周用纯化蛋白与弗氏不完全佐剂充分混合, 进行 3 次加强免疫, 第 3 次加强免疫后 1 周静脉少量采血测定其 ELISA 效价, 最后一次性动脉采血, 按常规方法制备抗血清。

用 ELISA 的方法测定抗血清的效价, 具体方法如下: 纯化蛋白包被酶联反应板, 0.2 μg/孔; 将兔抗血清稀释成: 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000; 用稀释成 1:1 000 免疫前的正常兔血清做阴性对照; 二抗用羊抗兔 HRP-IgG; 四甲基联苯胺显色, 在 λ = 450 nm 其测得光密度值。

1.2.8 Cad285 多克隆抗体对室内棉铃虫的

Western blot 分析 提取室内对 Bt 棉敏感 (YCS) 和抗性 (YCR) 2 品系棉铃虫中肠总蛋白, 经考马斯亮蓝定蛋白定量后, 取 100 μg 等量蛋白进行 SDS-PAGE, 电转印至 PVDF 膜上, 用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TPBS) 4℃ 封闭过夜; 次日用 TPBS 在室温下脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入用含 3% 脱脂奶粉的 TPBS 1:8 000 稀释的 Cad285 多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜; 次日用 TPBS 在室温下脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入用含 3% 脱脂奶粉的 TPBS 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 4℃ 孵育过夜; 次日用 TPBS 在室温下脱色摇床上洗涤 3 次, 每次 10 min, 用 DAB 对其进行显色。

2 结果与分析

2.1 基因片段 Cad285 的扩增及鉴定

以敏感品系 (YCS) 和抗性品系 (YCR) 棉铃虫中肠 cDNA 为模板, 用已设计引物做 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 855 bp 处均可见特异条带, 与 Cad285 预期大小一致 (图 1)。

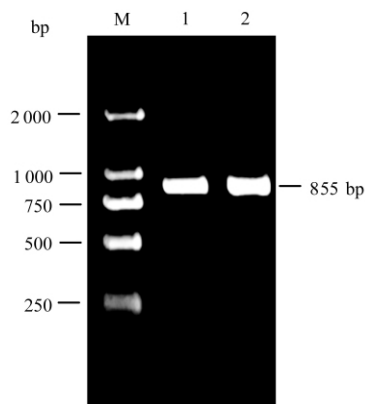


图 1 棉铃虫中肠钙粘蛋白基因片段
Cad285 的 PCR 扩增

M: DNA 分子量标准 1~2: 基因片段 Cad285
PCR 产物 (1: YCS 2: YCR)

2.2 重组表达载体的酶切验证

重组表达质粒 pET-30a-Cad285 的双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 5 441 bp 和

855 bp 处分别可见载体片段和目的基因片段(图2),测序结果表明 *Cad285* 基因已成功克隆入 pET-30a 载体中。

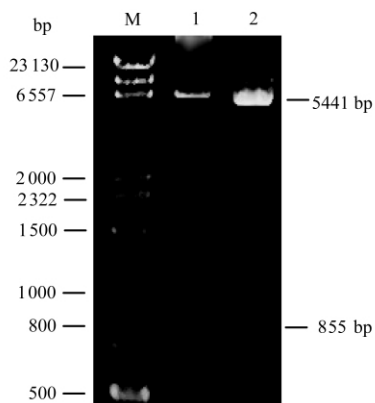


图2 重组表达质粒 pET-30a-
Cad285 酶切鉴定

M:DNA 分子量标准 1:重组 pET-30a-*Cad285* 质粒 2:重组 pET30a-*Cad285* 质粒经 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切

2.3 目的蛋白的诱导

用总浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 0、3、6 和 12 h 的表达产物经 SDS-PAGE 分析,结果在 35 ku 处可见目的蛋白表达条带,表达量随着诱导时间递增(图3)。

2.4 融合蛋白的纯化及 *Cad285* 融合蛋白多克隆抗体的制备

菌液诱导后经离心,收集其上清及菌体,经 SDS-PAGE 分析鉴定,融合蛋白以包涵体形式表达。表达的融合蛋白经包涵体变性、复性及利用 Ni-NTA 柱的 His-tag 亲和纯化,经 SDS-PAGE 分析显示,在 35 ku 处可见单一条带(图4),其纯度达到 90% 以上,浓度为 1 mg/mL。纯化蛋白制备抗兔多克隆抗体,免疫后经 ELISA 鉴定抗血清效价达到 1:16 000 以上,Protein A 亲和层析纯化 *Cad285* 抗体浓度大约为 1 mg/mL。

2.5 *Cad285* 多克隆抗体对室内 Bt 敏感及抗性 Western blot 分析

图5结果显示,YCS 和 YCR 2 品系棉铃虫均有 2 个条带产生。利用蛋白分子量 Marker 的相对迁移率对其进行估算,发现 YCS 在 185

ku 处有条带,YCR 则在 58 ku 处有明显条带;此外,两品系在 44.3 ku 处还有 1 条共有条带,根据 SDS-PAGE 蛋白质染色后在此位置的蛋白量较大的现象,推测可能与浓度较大的蛋白与多克隆抗体之间的相互作用所产生的杂带有关。

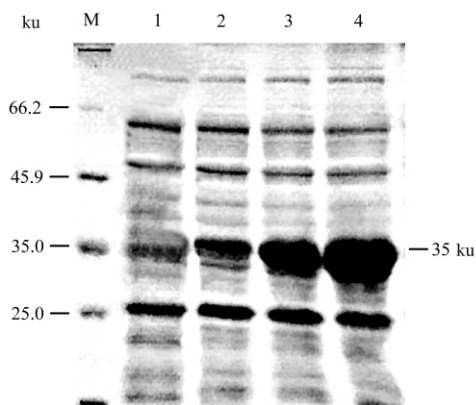


图3 重组表达质粒 pET-30a-*Cad285*
在大肠杆菌 BL21 中诱导表达

M:蛋白分子量标准;1~4:含质粒 pET-30a-*Cad285* 的大肠杆菌 BL21 经 IPTG 分别诱导 0,3,6 和 12 h

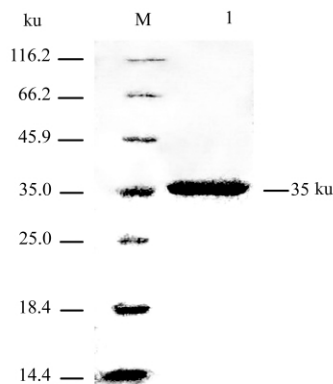


图4 纯化后 His-*Cad285* 融合蛋白
M:蛋白分子量标准 1:纯化后蛋白

3 讨论

Yang 等^[3,14] 对棉铃虫 *Cry1Ac* 抗性品系 GYBt 的研究发现,其钙粘蛋白基因由于大片段的缺失和插入突变,导致其翻译提前终止。棉铃虫正常的钙粘蛋白基因可以编码出 1 730 个氨基酸(aa),包括 6 个部分:1 个信号肽、1 个前

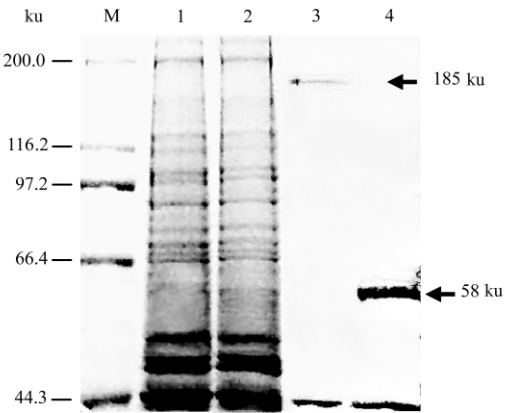


图 5 室内 Bt 抗性、敏感 2 品系棉铃虫

Western blot 分析

M:蛋白分子量标准 1、2:棉铃虫中肠蛋白 SDS-PAGE 的蛋白染色 3、4:棉铃虫中肠蛋白的 Western blot (1、3: YCS; 2、4: YCR)

蛋白区、11 个钙粘蛋白重复、1 个靠近细胞膜的区域、1 个跨膜区和细胞质内结构域,而抗性棉铃虫的钙粘蛋白仅由 428 个 aa 残基组成,仅含有剪切信号肽和 2 个重复结构域,其它的结构域都已缺失。王桂荣等^[1]通过表达不同长度的类钙粘蛋白片段,结合配体杂交技术对棉铃虫中肠钙粘蛋白 Cry1A 结合区进行了定位,将 Cry1Ac 结合区定位于钙粘蛋白第 1 217 ~ 1 461 位的 244 个氨基酸组成的肽链上。由于抗性棉铃虫类受体蛋白 Cry1A 毒素结合区的缺失, Cry1A 毒素无法与棉铃虫中肠上皮细胞膜上钙

粘蛋白受体结合,毒素无法插入细胞膜形成膜孔,是其对 Bt 产生抗性的主要原因。

根据预测, *Cad285* 及其表达产物在棉铃虫钙粘蛋白基因 cDNA 及蛋白氨基酸序列的位置如图 6 所示。根据计算, Bt 敏感品系 (YCS) 钙粘蛋白 (1 730 aa) 的分子量约为 195 ku, 抗性品系 (YCR) 突变钙粘蛋白 (428 aa) 的分子量约为 49.1 ku。本试验通过原核表达诱导了棉铃虫中肠钙粘蛋白 N 端的基因片段 *Cad285* 融合蛋白, 并制备了高效价的多克隆抗体, 应用 *Cad285* 编码蛋白的多克隆抗体对室内 YCS 和 YCR 进行 Western blot 分析, 根据 YCS/YCR 钙粘蛋白表达的分子量大小不一样 (图 5), 从而区分两品系。在 Western blot 结果中, YCS 出现在 185 ku 左右处的条带较预测的 195 ku 要偏小, 而 YCR 在 58 ku 处出现的条带较预测的 49.1 ku 要高, 我们推测这有可能与棉铃虫中肠钙粘蛋白及其突变蛋白质经过翻译后加工修饰, 从而导致了其实际分子量大小偏于理论值。

棉铃虫对 Bt 抗性的加剧日益受到人们的关注, 对棉铃虫的 Bt 抗性的检测是防治抗性的必要条件, 本研究通过原核表达棉铃虫钙粘蛋白 N 端多肽的基因片段 *Cad285*, 并用其纯化蛋白制备的多克隆抗体, 利用其多克隆抗体对室内两纯和品系棉铃虫进行 Western blot 检测, 从蛋白水平上对棉铃虫 Bt 抗性进行检测。相对

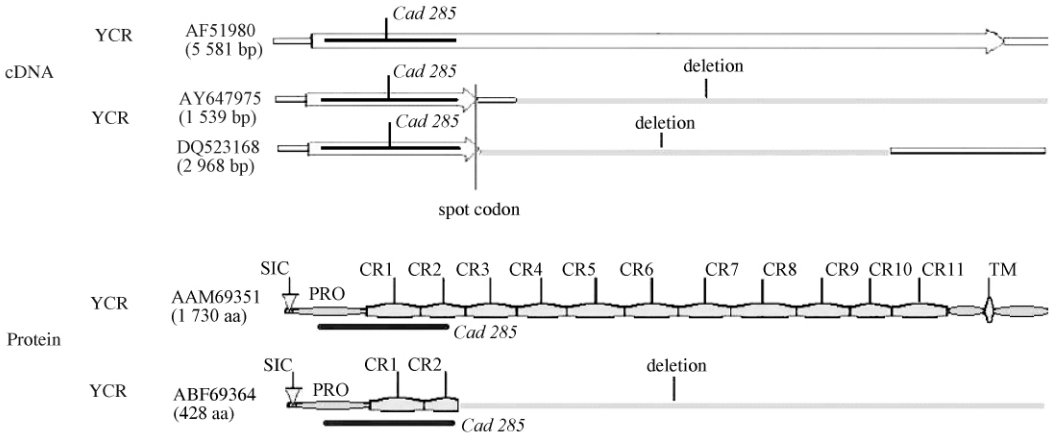


图 6 *Cad285* 在棉铃虫钙粘蛋白及其抗性品系的 cDNA 和蛋白氨基酸序列上的位置表示

SIG:信号肽 PRO:前蛋白区 CR:重复序列 MPR:近膜区 TM:跨膜区 CYT:胞内结构域

于核酸水平的千差万别,蛋白质的功能较稳定,从蛋白水平来分析、鉴定其对 Bt 的抗性要更加直接、准确。综上研究为进一步探索棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性机理及对抗性检测方案奠定初步的基础。

参 考 文 献

- 1 Gill S. S. ,Cowles E. A. ,Pictrantonio P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* ,1992,**37**: 615 ~ 636.
- 2 Ferré J. , Rie J. V. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* , 2002,**47**: 501 ~ 533.
- 3 Hofmann C. ,Vanderbruggen H. ,Höfte H. ,*et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sties in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1988,**85**:7 844 ~ 7 848.
- 4 Van Rie J. , Jansens S. , Höfte H. , *et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush norder membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* ,1989,**186**:239 ~ 247.
- 5 Van Rie J. ,Jansens S. , Höfte H. ,*et al.* Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* ,1990,**56**:1 378 ~ 1 385.
- 6 Wolfersberger M. G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush norder membranes for the toxins. *Experientia* , 1990,**46**:475 ~ 477.
- 7 苏建亚,余杰,韦宏伟,等. 棉铃虫和甜菜夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶活性测定以及活化、降解 CryI AC 毒素分析. 昆虫分析,2009,**46**(2):260 ~ 266.
- 8 Vadlamudi R. K. , Ji T. H. , Bulla L. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* , 1993, **268**:12 334 ~ 12 340.
- 9 Ganhan L. J. ,Gould F. ,Heckel D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*,2001, **293**:857 ~ 860.
- 10 Morin S. , Biggs R. W. , Sisterson M. S. , *et al.* Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2003,**100**(9) :5 004 ~ 5 009.
- 11 Wang G. R. ,Wu K. M. ,Liang G. M. ,*et al.* Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Science in China Ser. C Life Sciences* , 2005 ,**48**(4) : 346 ~ 356.
- 12 苏建亚. 棉铃虫对转 Bt 基因棉抗性的分子机理及抗性基因分子检测技术. 博士论文. 南京:南京农业大学,2004.
- 13 Yang Y. , Chen H. , Wu S. W. , *et al.* Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* ,2006,**36**:735 ~ 740.
- 14 Yang Y. J. , Chen H. Y. , Wu Y. D. , *et al.* Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* , 2007, **73**: 6 939 ~ 6 944.