

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

Bt-Cry1Ac 棉花抗性棉铃虫对 Cry2Ab
的抗性风险研究

**The investigation of resistance risk on Bt- Cry1Ac-resistant
Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab**

博 士 研 究 生 ： 罗术东

指 导 教 师 ： 吴孔明 研究员

申 请 学 位 类 别 ： 农学博士

专 业 ： 农业昆虫与害虫防治

研 究 方 向 ： 昆虫毒理学

培 养 单 位 ： 中国农业科学院研究生院

中国农业科学院植物保护研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**The investigation of resistance risk on Bt- Cry1Ac-resistant
Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab**

Ph.D Candidate: Luo Shudong

Advisor: Prof. Wu Kongming

Major: Agricultural entomology and pest management

Speciality: Insect Toxicology

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：罗永东

时间：2007年 6 月 20 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：罗永东

时间：2007年 6 月 20 日

导师签名：Goum

时间：2007年 6 月 21 日

中国农业科学院

博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		Bt-Cry1Ac 棉花抗性棉铃虫对 Cry2Ab 的抗性风险研究				
论文作者		罗术东	专 业	农业昆虫与 害虫防治	研究方向	昆虫毒理学
指导教师		吴孔明 研究员		培养单位(研究所)		植物保护研究所
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	匿名		硕导□ 博导□			
	匿名		硕导□ 博导□			
	匿名		硕导□ 博导□			
答辩主席	郭予元	研究员	硕导□ 博导☑	中国农科院植保所	农业昆虫与 害虫防治	郭予元
答 辩 委 员	张芝利	研究员	硕导□ 博导☑	北京市农林科学院	农业昆虫	张芝利
	戈峰	研究员	硕导□ 博导☑	中国科学院动物所	农业昆虫	戈峰
	张青文	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学	农业昆虫与 害虫防治	张青文
	高希武	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学	农业昆虫与 害虫防治	高希武
	张龙	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学	农业昆虫与 害虫防治	张龙
	王振营	研究员	硕导□ 博导☑	中国农科院植保所	农业昆虫与 害虫防治	王振营
会议记录(秘书)		苏宏华 苏宏华				
论文答辩时间地点		二零零七年六月十五日上午 10: 30 植保所农药楼会议室				

摘 要

Bt-Cry1Ac棉花的应用对棉花害虫的有效控制发挥了重要的作用，但长期大面积种植将导致靶标害虫抗性的产生。为延缓昆虫对Cry1Ac抗性的产生，人们提出了转双基因策略，但该策略有效实施的重要前提就是转入的双基因之间不存在交互抗性。本研究旨在利用生物测定的方法测定Cry1Ac抗性棉铃虫品系LFR₁₀和BtR对Cry2Ab是否存在交互抗性，并利用体外标记结合和表面等离子体共振技术研究Cry1A、Cry2Ab与Cry1Ac抗、感棉铃虫中肠刷状缘膜囊泡(Brush Border Membrane Vesicles, BBMV)的结合动力学，以明确棉铃虫中与Cry1Ac及Cry2Ab抗性相关的生化基础。另外，还运用酶标板动力学等方法研究了酯酶与Cry1Ac前毒素和毒素间的相互作用，以阐明酯酶与Cry1Ac抗性的关系。全文主要结果如下：

- 1、生物测定表明两个Cry1Ac抗性品系LFR₁₀和BtR对Cry1Ac抗性分别达 253.0 倍和 2971.3 倍，对Cry2Ab的抗性分别为 1.0 倍和 1.1 倍，说明对Cry1Ac具有抗性的棉铃虫对Cry2Ab不存在交互抗性；进一步对Cry2Ab与Cry1Ac抗、感品系BBMV的结合动力学研究表明：无论是在敏感品系内还是抗性品系中，Cry1Ac与Cry2Ab之间均不存在竞争，说明了它们之间不存在共同的结合位点，结合位点的不同是Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab不存在交互抗性的生理生化基础。
- 2、体外标记结合表明棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性后，Cry1Ac 与位点 2、Cry1Ab 与位点 1 的结合能力都会下降，Cry1Ac 与位点 2 的结合能力随着抗性的增加而继续减少，直至结合能力的丧失。但 Cry1Ab 与位点 1 的结合能力下降到一定程度时不再下降。Cry1Ac 抗、感品系 BBMV 与 Cry1Ac 间的亲和力没有差异，但抗性品系中的结合位点浓度及结合能力显著低于敏感品系。表面等离子体共振技术研究表明，在各品系与 Cry1Ac 的结合过程中，敏感品系的结合速率明显高于抗性品系。这些结果表明，结合位点浓度和结合速率的降低促使结合能力降低，结合能力的降低可能是棉铃虫对 Cry1Ac 抗性产生的重要因素。
- 3、酶活性测定表明，BtR 品系 Cry1Ac 抗性棉铃虫的酯酶活性显著高于敏感品系，但抗性品系中的碱性磷酸酯酶的活性却显著低于敏感品系。当用 Cry1Ac 前毒素和毒素处理酯酶时发现敏感品系棉铃虫的酯酶不能与它们结合，而抗性品系的却能与二者结合。当用酯酶处理 Cry1Ac 前毒素时，发现抗性品系棉铃虫的酯酶对前毒素的活化作用显著低于敏感品系。据此，我们推测：棉铃虫体内碱性磷酸酯酶的减少，减弱了其对前毒素的活化作用；同时，总酯酶在体内的大量表达，并与前毒素和毒素发生更多的非特异性结合，使毒素减少或失去与中肠上皮细胞膜上受体结合的机会。在以上两个因素的作用下，使得棉铃虫对 Cry1Ac 毒素不敏感，即表现为抗性的产生。

综上所述，无论是在 Cry1Ac 敏感棉铃虫还是抗性棉铃虫中，Cry2Ab 和 Cry1A 蛋白均不具有共同的结合位点，Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性。因此，Cry2Ab 可用于延缓棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性。

关键词：Bt 棉花, Cry1Ac 抗性棉铃虫, Cry2Ab, 交互抗性, 碱性磷酸酯酶

Abstract

The wide spread of the first generation transgenic cotton which expresses Cry1Ac has played an important role in the integrated pest management of cotton. However, there is a risk for resistance evolution of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). Therefore, a strategy of pyramiding different Bt genes in cotton is much valuable for managing the resistance risk from the target pest. One of requirements for the dual (pyramided) gene strategy to work is that the two toxins must have different modes of action, which means that there must be a low probability of cross-resistance between the two toxins. Here, we reports the investigation on the cross-resistance of Cry1Ac-resistant *H. armigera* strains (LFR₁₀ and BtR) to Cry2Ab by bioassay and other methods for understanding the molecular basis of resistance to Cry1Ac and cross-resistance to Cry2Ab, the binding kinetics between the BBMV from Cry1Ac-susceptible and -resistant strains of *H. armigera* and Cry toxins (Cry1A and Cry2Ab). In addition, the interaction analysis between the esterases from Cry1Ac-susceptible and -resistant strains of *H. armigera* were conducted. The results were as follows:

- 1、Bioassays between Cry toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Ab) and larvae of a Cry1Ac-susceptible (96S) and two -resistant strains (BtR and LFR₁₀) were conducted for investigating cross-resistance of Cry1Ac-resistant strains to Cry2Ab in *H. armigera*. The resistance ratios (RR) of the BtR and LFR₁₀ strains to Cry1Ac and Cry2Ab were 2971.3- and 1.1-fold, and 253.0- and 1.0-fold, respectively, indicating that the Cry1Ac-resisrant strains of *H. armigera* had no cross-resistance to Cry2Ab.
- 2、Binding in vitro and surface plasma resonance were conducted for binding kinetics between the toxins (Cry1A and Cry2Ab) and BBMV, the results suggested that Cry1A could not compete with Cry2Ab either in the Cry1Ac-susceptible strain of *H. armigera* or in -resistant strains, it also indicated that Cry1A could not share the binding site with Cry2Ab in *H. armigera*. In a word, the difference of binding sites between the –susceptible and –resistant strains may be contributed to no cross-resistant to Cry2Ab in *H. armigera*.The data from the binding kinetics implied that the binding ability of Cry1Ab to the binding site 1 and Cry1Ac to site 2 decreased, and the decrease of binding ability corresponding to the increase of resistant ratio. At the same time, we observed that the binding ability of Cry1Ab did not decrease anymore until it decreased to some degree, but the Cry1Ac did not stop decreasing until it lost the binding ability to binding site 2. To our surprise, there was no difference in the binding affinities of Cry1Ac and BBMV between the Cry1Ac-susceptible strain and –resistant strain of *H. armigera*, but the binding site concentration of Cry1Ac and the binding ability of Cry1Ac in –resistant strain were lower than in the –susceptible, the results from Surface Plasma Resonance (SPR) suggested that the velocity of association in Cry1Ac-susceptible strain was higher than in –resistant strain during the binding procession may be answered for this conflict. All these results suggested that the changes of

binding ability of the Cry1Ac to BBMV is the main reason for its resistance, but the binding ability was affected by the binding affinity, binding site concentration and the velocity of association during the binding procession.

- 3、Esterase and alkaline phosphatase may be also contributed to Cry1Ac resistance in *H. armigera*. We surveyed the activity of the total esterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase in the Cry1Ac- susceptible and –resistant stain of *H. armigera* by microplate reader 550. The results indicated that the activity of total esterase in –susceptible was lower than that in –resistant strain of *H. armigera*, but the activity of alkaline phosphatase in Cry1Ac-resistant strain was significantly higher than that in –susceptible strain of *H. armigera*. The interaction analysis between esterase and Cry1Ac protoxin and toxin were also investigated, the results suggested that the esterase of Cry1Ac-resistant strain could bind with Cry1Ac protoxin and toxin, but the –susceptible strain could not. At the same time, the ability of activation of Cry1Ac protoxin in Cry1Ac-susceptible was stronger than that in –resistant strain. According to these results, we proposed that once *H. armigera* resistant to Cry1Ac, the reduction of alkaline phosphatase would affect the activation of Cry1Ac protoxin, at the same time, more esterase could bind with Cry1Ac protoxin and toxin, and this binding would reduce or lose the chance of Cry1Ac toxin binding to the receptor on the midgut of epithelium, and these procession would cause *H. armigera* reduce its susceptiblity and resistance to Cry1Ac.

In a conclusion, these results demonstrated that Cry1A and Cry2Ab had different binding sites in *H. armigera* and provided a potential mechanism for the lack of cross-resistance between Cry1A and Cry2Ab toxins, and it also suggested that Cry2Ab could be used to delay the evolution of *H. armigera* resistance to Cry1Ac.

Keywords: Bt cotton, Cry1Ac-resistance *Helicoverpa armigera*, Cry2Ab, cross-resistance, alkaline phosphatase

目 录

摘要	I
Abstract	II
第一章 绪论	1
1. 1 Bt棉花生产应用概况	1
1. 2 Bt的结构与作用机理	2
1. 2. 1 Bt的类型	2
1. 2. 2 Bt的结构与功能	3
1. 2. 3 Bt的作用机理	4
1. 3 昆虫对Bt抗性的生理生化基础	6
1. 4 昆虫Bt受体蛋白及其与抗性的关系	8
1. 4. 1 氨肽酶N	8
1. 4. 2 钙粘蛋白	9
1. 4. 3 碱性磷酸酶和肌动蛋白	11
1. 4. 4 醣脂	12
1. 5 害虫抗性治理策略	12
1. 6 毒素-受体结合动力学研究新方法——表面等离子体共振技术	15
1. 6. 1 SPR的工作原理	16
1. 6. 2 SPR的特点及优点	17
1. 6. 3 SPR在毒素-受体结合中的应用	17
1. 7 本文研究意义	18
1. 8 研究技术路线	20
第二章 Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab的抗性测定	21
2. 1 材料与方法	21
2. 1. 1 供试棉铃虫品系	21
2. 1. 2 主要试剂与仪器	21
2. 1. 3 部分溶液储存液、缓冲液配方	22
2. 1. 4 Bt毒素及其纯化	23
2. 1. 5 蛋白质含量的测定	24
2. 1. 6 棉铃虫饲养条件及生测方法	24
2. 1. 7 数据分析	24
2. 2 结果与分析	25
2. 2. 1 Cry毒素的纯化	25

2. 2. 2	供试各品系对Cry1Ac的抗性程度	27
2. 2. 3	供试各品系对Cry2Ab的抗性程度	27
2. 3	结论与讨论	27
第三章	Cry1Ac抗、感棉铃虫酯酶比较	29
3. 1	材料与方法	29
3. 1. 1	供试昆虫与毒素	29
3. 1. 2	主要试剂与仪器	29
3. 1. 3	部分试剂及缓冲液的配制	30
3. 1. 4	酶液的制备、活力测定及酶谱分析	31
3. 1. 5	Cry1Ac前毒素与酶液的相互作用	32
3. 2	结果与分析	33
3. 2. 1	酶谱分析	33
3. 2. 2	酶活性分析	33
3. 2. 3	Cry1Ac前毒素对酯酶的抑制作用	34
3. 2. 4	酯酶液对Cry1Ac前毒素的酶解作用	35
3. 3	结论与讨论	38
第四章	Cry1Ac抗性棉铃虫BBMV与Bt毒素的相互作用	40
4. 1	材料与试剂	40
4. 1. 1	供试棉铃虫	40
4. 1. 2	主要试剂	40
4. 1. 3	部分储存液、缓冲液配方	40
4. 1. 4	主要仪器设备	42
4. 2	试验方法	42
4. 2. 1	棉铃虫抗、感品系BBMV的制备与溶解	42
4. 2. 2	Bt毒素的碘化标记	43
4. 2. 3	Bt毒素与Cry1Ac抗感品系的体外标记结合动力学研究	43
4. 2. 4	数据分析	44
4. 3	结果与分析	44
4. 3. 1	Cry毒素的碘化标记	44
4. 3. 2	Cry毒素与抗感棉铃虫各品系的体外标记结合研究	44
4. 4	结论与讨论	52
4. 4. 1	Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab没有交互抗性的原因初探	52
4. 4. 2	Cry1Ac抗性棉铃虫抗性产生的原因	53
第五章	棉铃虫BBMV与Cry2Ab、Cry1A结合过程的实时测定	55

5. 1	材料与方法	55
5. 1. 1	供试材料.....	55
5. 1. 2	主要试剂与仪器.....	55
5. 1. 3	样品的前处理.....	56
5. 1. 4	SPR检测Bt毒素与各品系的即时结合	56
5. 2	结果与分析	57
5. 2. 1	Bt毒素、BBMV的处理	57
5. 2. 2	Bt毒素的固定	58
5. 2. 3	Bt毒素与各品系BBMV的特异性结合	59
5. 2. 4	Bt毒素在各品系BBMV中的竞争结合	61
5. 3	结论与讨论	67
5. 3. 1	SPR分析Bt毒素与Cry1Ac抗、感品系BBMV的实时结合	67
5. 3. 2	Bt毒素与棉铃虫体内Bt毒素受体结合模型的构建	68
第六章	全文结论与讨论	71
6. 1	全文主要结论	71
6. 2	本研究的创新点	72
6. 3	有待于进一步开展的工作	72
参考文献	74
致谢	88
作者简介	89
附录错误！未定义书签。	

第一章 绪论

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性细菌,在其形成芽孢的过程中伴随着具有杀虫活性的伴孢晶体形成,因而又称为杀虫晶体蛋白(Insecticide Crystal Proteins, ICPs)或 δ -内毒素(δ -endotoxin),它是目前应用最为广泛的微生物农药之一。Bt杀虫剂及Bt植物的使用不仅可以有效防治目标害虫,而且可以显著降低农药的使用量、增加农民收益、增多农田中天敌的种类和数量、有效保护生态环境 (Wu and Guo, 2005)。根据环境影响系数(Environmental Impact Quotient, EIQ)——一种基于多种因素对单一活性成分构成的纯环境所造成影响的复合测试方法——的测算表明,1996年至2005年累计减少杀虫剂的使用量达二十二万四千三百吨的活性成分,相当于作物用杀虫剂对环境的破坏作用降低了14% (James, 2006)。因而,推广Bt植物和使用Bt杀虫剂已成为当前保护生态环境、稳定生产和害虫综合防治的重要措施之一。

然而,随着 Bt 使用量和转 Bt 基因作物的迅速增长,转入的 Cry 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 的抗药性已成为一个不容忽视的问题。虽然到目前为止,小菜蛾是唯一一种对 Bt 存在抗性的田间昆虫,但国内外许多研究证明:已有分属于鳞翅目、双翅目和鞘翅目的昆虫经室内筛选后可以对 Bt 产生抗药性(McGaughey *et al.*, 1985; Tabashnik *et al.*, 1990; Shelton *et al.*, 1993; Martinez-Ramirez *et al.*, 1995; 唐振华等, 1996; Huang *et al.*, 1997; 沈晋良等, 1998; 梁革梅等, 2000a)。2003 年, Janmaat 和 Myers 发现温室中粉纹夜蛾对 Bt 存在抗性,这是继小菜蛾后又一个实验室外昆虫对 Bt 抗性的报道(Janmaat and Myers, 2003)。因此,在广泛使用 Bt 制剂和种植 Bt 作物的时代,昆虫对 Bt 抗性的产生从某种意义上来说只是一个时间上的问题而已(De Maagd *et al.*, 1999),古语云“未雨绸缪”,因而研究昆虫对 Bt 的抗性机制对于运用 Bt 制剂和 Bt 作物来进行害虫综合治理以及延长转 Bt 基因作物的寿命就显得尤为重要。

本章简略介绍了 Bt 棉花的生产概况,从 Bt 的结构和作用机理入手,综述了影响昆虫对 Bt 抗性的生理生化基础,阐述了昆虫体内 Bt 受体蛋白的变异与抗性的关系,并对 Bt 作物害虫抗性治理策略进行了概括。最后对研究昆虫 Bt 毒素受体与 Bt 毒素相互作用中最有效的新技术——表面等离子体共振技术(Surface Plasma Resonance, SPR)进行了介绍,并对其在该领域的研究做了简短回顾。

1.1 Bt 棉花生产应用概况

利用现代基因工程技术在棉株中导入杀虫性Bt毒素而选育成的Bt棉,因其具有稳定和连续的抗虫效果,被认为是害虫管理最经济、最有效的防治方法。自1996年转基因棉花在美国商业化种植以来,其种植面积在世界范围内快速增长。1996年,我国政府首次批准单价抗虫棉在国内进行预中试和中试,1997年初批准进行环境释放试验,1997年底批准进行商业化生产。1999年,由美国孟山都(Monsanto)公司、中国农科院生物技术研究所以和棉花所等分别成功研制的转基因棉保铃新棉33B、GK系列和中棉系列,在获得农业部门的基因安全性检验后以商业运作的模式在生产领域得到迅速推广,美国孟山都公司的33B棉同年在中国的主栽省——河北——的植棉面积达10

万公顷左右。从此, 抗虫棉种植面积不断扩大。

2001年以前, 我国的Bt棉花主要种植于黄河流域棉区(如河北, 河南, 山东和山西等省), 种植面积约50万公顷。截至到2006年, 我国的Bt棉已广泛种植于全国各个棉区, 种植面积也从当初的10万公顷提高到了2006年的350万公顷, 居全球第六位, 占全国棉花种植面积的66%(James, 2006)。Bt棉花的大量种植对有效控制棉铃虫和红铃虫的危害发挥了重要作用(Wu *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004; 2005; 李号宾等, 2006; 吴孔明, 2007)。据James统计, 到2006年, 包括美国、中国、印度、澳大利亚、阿根廷、巴西、南非、墨西哥、哥伦比亚在内的9个国家总计种植以Bt基因为主的转基因棉花1340万公顷(James, 2006)。但和其它的化学农药一样, 随着Bt棉花的广泛种植, 靶标害虫也有可能对Bt棉花产生抗性, 从而导致Bt棉花失去其利用价值 (Wu and Guo, 2005)。

为延缓靶标害虫对Cry1Ac棉花抗性的产生, 多种Bt作物抗性治理策略得以提出, 其中转双价基因棉被认为是一种比较有效的措施。截至到2006年, 由美国孟山都 (Monsanto) 公司研制的转Cry1Ac+Cry2Ab基因棉已在美国、澳大利亚、南非、墨西哥和菲律宾等国商品化种植。同时, 基于Bt作物害虫抗性治理策略的原理, 一些具有与原来Cry毒素不同作用机理的新抗虫基因(如营养期杀虫蛋白)也被转入到棉花体内以开发新一代的转基因抗虫棉花。例如, 2005年, 由Syngenta (Greensboro, NC, USA) 公司开发的VIP Cotton™已被批准进入田间释放阶段(James, 2006)。

1. 2 Bt 的结构与作用机理

1. 2. 1 Bt 的类型

1989年, Höfte 和 Whiteley 根据当时已报道出来的 42 个 Bt 毒蛋白基因的氨基酸序列的同源性和杀虫谱的不同提出了著名的 H-W 分类系统, 将 Bt 毒蛋白基因分为以下五大类, 14 亚类, 分别用罗马数字 I、II、III、IV和V来命名。其中 I 类对鳞翅目昆虫具有高毒性; II 类则对鳞翅目和双翅目昆虫具有毒性; III类对鞘翅目昆虫有高毒性, IV类对双翅目昆虫有毒; 而V类晶体蛋白则对鳞翅目和鞘翅目昆虫有毒性, 然后在每一类型下用英文大写字母 A、B、C 等代表不同的基因型, 然后用小写字母表示同一基因型由于核苷酸序列差异造成的基因亚型, 另外还有仅对双翅目昆虫幼虫有毒性的 Cyt 型晶体蛋白(Höfte *et al.*, 1989)。后来由于对 Bt 菌株发现的逐步扩大, Bt 毒蛋白的家族成员得到了丰富, 使得分类系统存在许多的不足。虽有学者对此分类系统作了更进一步的调整, 但由于分类的基本原则未变(喻子牛, 1993), 所以未能从根本上解决它本身存在的问题(即杀虫谱和同源性之间的相互冲突)。

1995年, 在无脊椎病理学会年会上成立的由 Crickmore 为委员的杀虫晶体蛋白基因命名委员会对此提出了新的分类原则, 从而克服了这一冲突。与原有的 H-W 系统不同的是: 新系统分类时只考虑杀虫晶体蛋白氨基酸序列的同源性, 而不再考虑杀虫谱的不同。按同源性的差异大小将杀虫晶体蛋白分成四个等级: 同源性小于 45% (如 Cry1 和 Cry2 之间)、介于 45% 至 75%之间 (如 Cry1A 和 Cry1B 之间)、75%至 95%之间 (如 Cry1Aa 和 Cry1Ab 之间) 和同源性在 95%以上(如 Cry1Aa1 和 Cry1Aa2 之间)。同时, 在命名的方法上也有所改变, 新的命名法中规定: 第一级使用阿拉伯数字而不再是原来的罗马数字; 第二、三、四级则依次使用大写的英文字母、小写的英文字母和阿拉伯数字推导(Crickmore *et al.*, 1995), 例如: Cry1Aa2。这种方法也是目前我们对 Bt 进行分类和命名的主要依据。

1. 2. 2 Bt 的结构与功能

蛋白质的活性总是与其结构密切相关, 因此, 弄清 Bt 的结构与功能对于研究昆虫对 Bt 产生抗性的机理是十分重要而又非常必要的。

目前已克隆到大量 Bt 晶体蛋白基因, 并推导出相应蛋白的氨基酸序列, 但真正弄清其空间结构的 Bt 晶体蛋白很少。迄今为止, 只弄清了 Cry1Aa、Cry3Aa 和 Cry3Bb 等少数几种晶体蛋白(Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Frutos *et al.*, 1999; Morse *et al.*, 2001)的结构。一般而言, Bt 毒素一般含有三个结构域(domain): 结构域 I (domain I, DI)、结构域 II (domain II, DII)、结构域 III (domain III, DIII), 每一个结构域的生物功能不同。其中, DI 位于肽链的 N 端, 它在 Bt 杀虫机制中起着关键性的作用并参与细胞膜的穿孔(Gazit *et al.*, 1995; 1998); DII 位于肽链的中间, 是毒素活性片段 DI 和 DIII 之间的一个疏水性核心结构, 其顶端的突环在毒素与受体的识别和结合过程中起重要作用(Grochulski *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 1994; Rajamohan *et al.*, 1996, 1998); DIII 则位于 C 端, 是两组反平行的 β 折叠片层组成的夹心结构, 在 Bt 毒素结构中具有高度的保守性, 一般认为, DIII 能够维持毒素结构并决定毒素的杀虫特异性, 同时, 可能还有防止蛋白酶对毒素分子的过度降解的作用(Masson *et al.*, 1994; Bosh 1994; De Maagd *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999)。

1. 2. 2. 1 Cry1A 的结构与功能

Grochulski 等用 X 光衍射发现对鳞翅目幼虫具活性的 Cry1Aa 蛋白由三个结构域(DI、DII 和 DIII)构成 (图 1.1) (Grochulski *et al.*, 1995)。

其中, 位于N端的DI由8个 α 螺旋组成, 即由7个两亲(亲水、亲脂)的螺旋围绕1个位于中央的相对疏水的螺旋而成一个 α 螺旋束, 这一结构可能参与了细胞膜的穿孔, 而且, 该结构与其他细菌毒素(如大肠杆菌素A和白喉毒素)的膜作用结构域的结构十分相似(Lesieur *et al.*, 1997)。该结构域在DII与膜作用后必须发生较大的构象变化才能与细胞膜作用, 位于螺旋束中央的 α_5 被弹出, 暴露出的疏水面进一步与细胞膜作用, 结果两亲的 α 螺旋插入到细胞膜中, 多个这样的螺旋在细胞膜中聚合形成了内表面亲水而外表面疏水的离子通道。

DII由三组反向平行的 β 折叠片层(sheet)组成, 以“希腊钥匙”拓扑结构(“Greek key” topology)连接在一起, 呈 β -三棱柱围成一个三角形的疏水内核, 位于它们顶端的突环集中起来形成整个分子的顶点。同时由于该结构域位于高变区, 毒素的种类不同, 其突环的大小及氨基酸组成也不同, 因而该结构域决定了毒素的杀虫专一性, 并可能参与了膜受体蛋白的识别与结合。

DIII则位于C端, 是两组反平行的 β 折叠片层组成的夹心结构, 呈 β -果酱卷拓扑结构(β -jelly roll topology), 毒性肽分子的C端被深深地包埋于 β 折叠片层之间, 这种结构可能有利于防止昆虫蛋白酶对毒性肽的过度降解。此外, 在某些毒素中它还参与了与膜的结合并对离子通道活性有一定影响。

氨基酸序列的计算机模拟表明: 与Cry1Aa高度同源的其他Cry1A晶体蛋白(如Cry1Ab、Cry1Ac)的三个结构域的构型与Cry1Aa十分相似。

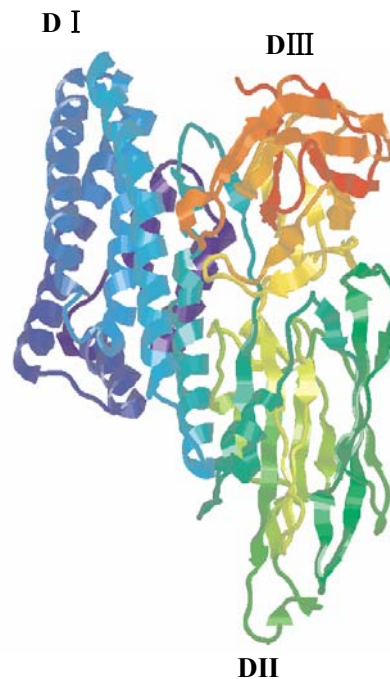
图 1.1 Bt 毒素 Cry1Aa 的分子结构 (Grochulski *et al.*, 1995)

Fig. 1.1 Structure of Cry1Aa

1. 2. 2. 2 Cry2A 的结构与功能

Morse等对同样对鳞翅目和双翅目均有效的Cry2Aa原毒素的晶体结构进行了分析,分析表明:虽然Cry2Aa分子的整体构造与Cry1Aa一样,其D I包括第 20 位到第 273 个氨基酸残基,由 8 个反向平行的螺旋束组成;D II包括第 274 位的天冬酰胺(Asn)到 474 位的异亮氨酸(Ile),该结构虽然在一级结构上属高变区,但在空间结构上还是保守的,也是由三个 β 折叠片层组成。与其他毒素不同的是,D II的第二个 β 折叠片层中的一条 β 链被一段 α 螺旋取代;D III包括第 485 位的组氨酸(His)到C端的第 633 位的酪氨酸(Tyr),是由卷曲的反向平行的 β 折叠片层面对面堆积而成的夹心结构(Morse *et al.*, 1998; 2001)。这三个结构域的相对取向(以D I 的螺旋束为参照)与Cry1Aa相比,D II和D III分别偏移 14° 和 6° 。有意思的是,该类蛋白质虽然缺少多个保守区,但仍能维持与Cry1 相似的空间结构(English *et al.*, 1994)。

1. 2. 3 Bt 的作用机理

许多学者曾从生物化学、组织病理学和分子生物学等方面研究了Bt毒素的作用机理,但到目前为止尚存在很大争议。一般认为:来源于苏云金杆菌或其它工程菌的Bt杀虫蛋白被敏感昆虫摄取后,进入中肠,在碱性中肠液的作用下发生溶解作用,经蛋白酶作用去除N-端的29个氨基酸残基和C-端的一半,只留下具有杀虫活性的毒素核心片段,该毒素核心片段大小在62~65kDa之间,且抗蛋白酶消化(Höfte and Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992; Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998),该片段能与昆虫中肠上皮细胞上的特异性受体蛋白结合,进而导致膜上孔洞的形成,最终

导致昆虫的死亡(Bravo *et al.*, 2002; 2004; Knowles, 1994; Pietrantonio and Gill, 1996; Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; Whalon and Wingerd, 2003)。因此, Bt毒性的发挥是一个复杂的过程。一般而言, 它需要以下几个步骤才能完成: 1) 晶体蛋白在昆虫体内的溶解; 2) 前毒素在昆虫中肠碱性环境中被胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解加工活化成具有活性的毒素核心片段; 3) 毒素核心片段高亲和性的与中肠上皮细胞上的特异性受体结合, 不可逆的将毒素插入膜上(Höfmann *et al.*, 1988a; 1988b; Van Rie *et al.*, 1989; 1990); 4) 形成跨膜的孔洞, 伴随而来的“离子流”和“水流”导致昆虫死亡。这个过程可以用图1.2 (Whalon and Wingerd, 2003)来表示。

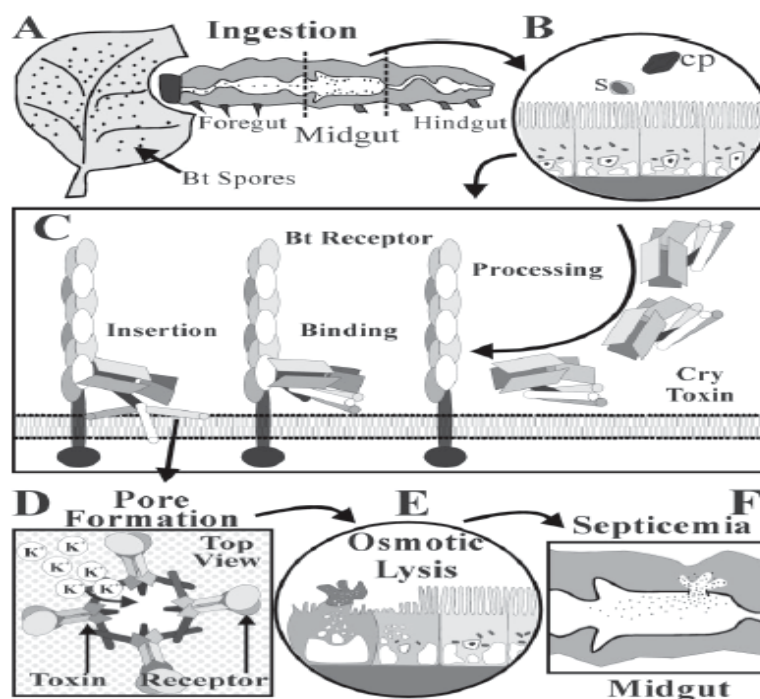


图 1.2 Bt 毒素作用机理 (Whalon and Wingerd, 2003)

Fig. 1.2: Mechanism of Bt protein toxicity (Whalon and Wingerd, 2003)

在发现室内筛选的烟芽夜蛾对 Cry1Ac 具有抗性的基础上, 明确了几类具有 GPI-锚定位点的 Bt 毒素受体蛋白(氨肽酶、碱性磷酸酶等)的功能后, Jurat-Fuentes 和 Adang 提出了 Cry1Ac 在烟芽夜蛾中的作用模式图 (Jurat-Fuentes and Adang, 2006), 如图 1.3 所示。他们认为 Cry1Ac 前毒素溶解后被活化成具有活性的 Cry1Ac 毒素单体, 部分的 Cry1Ac 毒素也可以和肌动蛋白及胞内磷酸酶作用, 但大部分的 Cry1Ac 毒素与烟芽夜蛾中的钙粘蛋白结合, 并激活细胞内控制磷酸酶活性的信号通路。与钙粘蛋白结合后, 大部分的 Cry1Ac 毒素单体被进一步加工形成低聚物而与 GPI-锚定蛋白(碱性磷酸酶和氨肽酶 N)结合, 这些蛋白复合体聚集在脂筏(lipid rafts)上, 毒素的结合导致了脂筏在细胞膜上的堆积。脂筏上毒素的浓度可能有两个作用, 一方面诱导毒素插入膜内形成孔洞, 另一方面激活细胞内信号转导。而信号的级联放大受控于某些通过钙粘蛋白调节信号的磷酸酶, 在激活反应的细胞内信号和渗透压改变的双重作用下促使毒素在膜上形成孔洞并最终导致昆虫死亡。

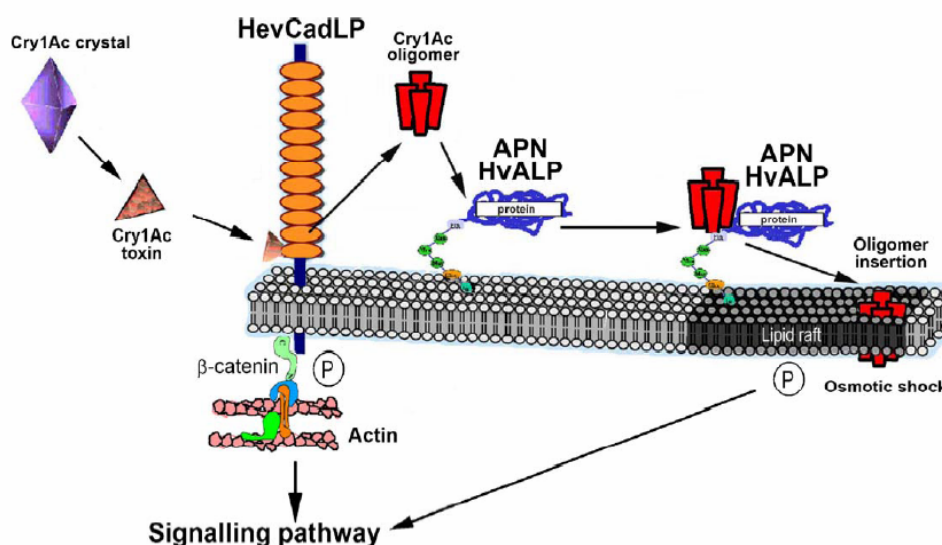


图 1.3 Cry1Ac 在烟芽夜蛾中的作用模式图 (Jurat-Fuentes and Adang, 2006)

Fig. 1.3 Proposed model for the mode of action of Cry1Ac toxin in *Heliothis virescens* larvae.

1.3 昆虫对 Bt 抗性的生理生化基础

昆虫对杀虫剂的抗性演化是一种复杂的生态现象, (Caprio and Tabashnik, 1992; Georgiou and Taylor, 1977a; Taylor *et al.*, 1983; Tabashnik and Croft, 1985), Bt作为一种特殊的微生物杀虫剂也不例外。影响害虫对杀虫剂抗性演化的因子可分为三类: 即遗传学因子(抗性基因频率, 抗性基因的数目, 显隐性度等), 生物学因子(世代数, 与天敌的相互作用, 害虫的迁移)和操作因子(杀虫剂的用量, 施药频次, 非施药地区的部署等)(Georgiou and Taylor, 1977a, 1977b; Rosenhein and Tabashnik, 1990)。在此, 我们主要概述害虫本身的生理、生化、遗传基础对Bt抗性演化的影响。

在鳞翅目害虫中, 对Bt抗性最普遍的遗传方式模型称为“模型1”(Tabashnik *et al.*, 1998)。“模型1”的抗性特点是: (1)至少对一种Cry1A毒素的抗性倍数大于500倍; (2) 隐性遗传; (3) 对Cry1C有低或无交互抗性; (4) 对Cry1A毒素至少有一个与中肠靶标结合力下降的位点。到目前为止, 除红铃虫抗Cry1Ac品系符合“模型1”外 (Tabashnik *et al.*, 1998), 至少有三个小菜蛾品系、烟芽夜蛾YHD2品系、印度谷螟343R品系符合“模型1”(McGaughey *et al.*, 1985; Van Rie *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1995; Tabashnik *et al.*, 1998)。尽管对Bt抗性的一些例子不符合此种模式, 但在所有报道大于100倍抗性的“模型1”的抗性种群均能在表达高浓度Cry1A毒素的Bt作物上存活 (Tang *et al.*, 1997, 1999; Ramachandran *et al.*, 1998; Tabashnik *et al.*, 2000; 2003)。

理论上, 在Bt对昆虫发挥作用的每一个过程中(前毒素的溶解、酶解、上皮细胞膜的穿透、与受体的结合、细胞膜的插入、孔洞的形成和中肠细胞渗透压降低), 昆虫都有可能对Bt产生抗性 (Heckel, 1994)。Heckel分析了害虫对Bt抗性产生的10种潜在机理及其遗传方式, 但从目前的报道来看, 以下五个方面是影响昆虫对Bt抗性产生的主要因素:

1) Bt的溶解

Bt蛋白在昆虫中肠内的溶解是其作用的开始, 如果Bt在昆虫体内得不到溶解或者Bt植物表达的为不可溶的毒素混合物, 都有可能导致昆虫抗性的产生(Aronson *et al.*, 1991; Heckel, 1994)。

2) Bt的蛋白酶解

毒素被昆虫摄取并在肠体内溶解后,在中肠碱性环境和蛋白酶的作用下被分解和激活成具有杀虫活性的稳定毒性肽。如果毒素水解不完全或前毒素被过度的水解,很可能的原因是由于二者没有被昆虫体内的酶正确的酶解,因而所产生的毒素片段不具有杀虫活性。由于酶解后的Bt毒素对昆虫不具有杀虫活性,从而导致了抗性的产生。同时由于这种酶解一般并不是特异性的,所以通常还会导致高度的交互抗性(谭声江等, 2001)。

在用Bte HD-198筛选的印度谷螟(*Plodia interpunctella*)抗性品系198^r中,抗性品系中肠提取物的蛋白水解酶的活性较敏感品系低,并且对Cry1Ac前毒素的酶解作用降低(Oppert *et al.*, 1996)。进一步的研究表明对Cry1Ac敏感性的降低与中肠中一种主要蛋白酶的缺失密切相关(Oppert *et al.*, 1997)。在随后的研究中发现该种群对Cry1Ab前毒素的抗性是其对Cry1Ab毒素的11倍,从而确证了该酶参与了毒素的酶解,由于该酶的缺失而导致了抗性的产生(Herrero *et al.*, 2001a),而且这种抗性通常是具有交互抗性的。Forcada等曾报道在烟芽夜蛾抗性品系CP73-3中酶与其对Cry1Ab的抗性关系,与敏感品系相比较,抗性品系中的酶对Cry1Ab前毒素的加工明显减弱,但对活化的Cry1Ab毒素的分解加快(Forcada *et al.*, 1996)。

3) 毒素与中肠上皮细胞上特异性受体的结合

毒素与中肠上皮细胞上特异性受体结合能力的改变被认为是昆虫对Bt产生抗性的一种主要机制。水解后的毒素核心片段能够和昆虫中肠上皮细胞上的刷状缘膜囊(Brush Border Membrane Vesicles, BBMV)发生特异性地结合,导致细胞膜穿孔,并最终使昆虫致死。

众多实验表明,毒素与受体结合的动力学性质与毒效之间的关系是非常复杂的。一些研究表明昆虫BBMV与Bt毒素的结合能力与毒力效果呈正相关,如在印度谷螟中,抗性种群343-R品系的BBMV与Cry1Ab毒素的亲合力下降了50倍,但结合位点浓度没有改变。而同样对另一位点具有高亲和力的Cry1Ca在抗性品系中和敏感品系中亲和力一致,但抗性品系中结合位点浓度却比敏感品系的高3倍,这说明了由于Cry1Ab结合位点的改变导致了抗性的产生,而Cry1Ca结合位点浓度的升高可以解释该抗性品系对Cry1Ca的高度敏感的原因(Van Rie *et al.*, 1990)。运用放射免疫的方法确定了Cry1B 在大菜粉蝶的BBMV 上有高亲和力和低亲和力的两类受体群,对大菜粉蝶有毒但对烟草天蛾无毒的Cry1B,与大菜粉蝶的BBMV 有高度的亲和力,与烟草天蛾的BBMV 则不结合,而对大菜粉蝶和烟草天蛾均有毒力的Cry1Ab与两者的BBMV 都以高亲和力结合(Höfmann *et al.*, 1988)。

然而,其他一些试验却表明BBMV与毒素的结合能力与毒效呈负相关或不相关,如Cry1Ac对舞毒蛾(*Lymantria dispar* (Linnaeus))有高毒性, Cry1Ab对其几乎无毒,但Cry1Ab对舞毒蛾的BBMV 结合能力却大大高于Cry1Ac的结合能力(Wolfersberger, 1990)。

在对Cry1Ac具有高度抗性的烟芽夜蛾YHD2中,其与Cry1Ac和Cry1Ab (该品系对后者具有高度的交互抗性)的结合能力没有下降,但对仅具有中度交互抗性的Cry1Aa的结合能力下降较显著(Lee *et al.*, 1995)。竞争结合实验表明,在烟芽夜蛾中, Cry1Aa与受体位点A 结合,而Cry1Ab除了与受体位点A结合以外还与受体位点B结合, Cry1Ac除具有能结合受体位点A和B外,还可以结合受体位点C (Van Rie *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1995)。

4) 孔洞的形成

这被认为是最有效的一种抗性产生的方式,并非常容易引起交互抗性。如果毒素与BBMV结合后形成孔洞的能力受阻或者孔洞形成后马上被阻塞,将会影响其它毒素在细胞膜上形成孔洞,

这样一来就能使Bt的效果大打折扣,表现为抗性的产生,而且这种作用是非特异性的,因而易表现出交互抗性。

5) 中肠上皮细胞的修复作用和行为上的逃避也有可能使昆虫对Bt产生抗性

尽管昆虫对Bt产生抗性的途径是多种多样的,但目前的研究表明Bt毒素与BBMV上受体结合能力以及昆虫体内酶液的变化是影响昆虫对Bt产生抗性的主要因素(Ferré and Van Rie, 2002)。因此,了解昆虫体内Bt毒素受体与Bt毒素的结合就显得非常必要。

1.4 昆虫 Bt 受体蛋白及其与抗性的关系

从现有的相关报道来看,在昆虫体内可能主要存在以下几类Bt受体蛋白:氨肽酶N(Aminopeptidase N, APN) (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Garner *et al.*, 1999)、钙粘蛋白(Cadherin-like) (Vadlamudi *et al.*, 1995)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)、肌动蛋白(Actin) (English and Readdy, 1989; Sangadala *et al.*, 1994; McNall and Adang, 2003; Jurat-Fuentes and Adang, 2004b) 和糖脂类(Glycolipid) (Griffits *et al.*, 2005) 等。

1.4.1 氨肽酶 N

氨肽酶N(Aminopeptidase N, APN)是一种糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(glycosylphosphatidyl inositol anchored protein, GPI-anchored protein),它广泛存在于动植物中,催化许多蛋白氨基末端残基的分裂。氨肽酶通常分为4类:氨肽酶N (N (EC 3.14.11.12)、A (EC 3.14.11.17)、P (EC 3.14.11.19) 和W (EC 3.14.11.16) (Tieku *et al.*, 1992)。

昆虫中肠上具有丰富的APN,它属于锌依赖性多肽酶家族,具有锌指结构HEXXH和N连接的糖基化位点,以糖耦联的磷脂酰肌醇(GPI)与昆虫中肠的BBMV相连,属于胞外酶类,是昆虫中肠微绒毛膜的标志酶,偏好水解多肽氨基端的中性氨基酸。不同类型的APN对不同的毒素有不同的亲和性。研究表明APN是鳞翅目昆虫中Cry1A等毒素的受体,如棉铃虫(*Helicoverpa armigera* (Hübner))(Liang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005a)烟草天蛾 (*Manduca sexta*)(Harvey *et al.*, 1979; Vadlamudi *et al.*, 1993; Knight *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996)、烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*)(Gill *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997a)、舞毒蛾 (*L. dispar*)(Valaitis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Garner *et al.*, 1999)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)(Luo *et al.*, 1997b)、家蚕 (*Bombyx mori*)(Yao *et al.*, 1997; Hara *et al.*, 2003)、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni* (Hübner))(Lorence *et al.*, 1997)等,它介导毒素的杀虫作用,它的变异是导致昆虫对Bt产生抗性的主要原因(王桂荣等, 2003; 刘凯于等, 2004)。

不同昆虫的APN能与不同的Bt毒素结合,而且同一昆虫的不同APN与Bt毒素的结合特性也可能不一样。例如,在烟草天蛾中,Cry1C能与106kDa的APN结合,但不能结合115kDa的APN,而Cry1Ac的结合方式则正好相反,它仅能与115kDa的APN结合。在舞毒蛾中,Cry1Ac结合100kDa的APN1,但Cry1Ab和Cry1Aa结合其他不同的分子(Hara *et al.*, 2003)。但在烟芽夜蛾和烟草天蛾中,它们中肠上的120KD的APN能够与Cry1A家族的3种毒素(Cry1Aa、Cry1Ab和Cry1Ac)发生特异性结合。对于棉铃虫,APN1可与这三种毒素结合,但只有Cry1Ac能与APN2

结合。而采用烟草天蛾Cry1A毒素受体APN的cDNA片断在大肠杆菌中进行同框阅读表达,以大小为30kDa的表达产物制备抗体,能检测到欧洲玉米螟BBMV上APN有3种,其中分子量为154kDa的APN可与Cry1Ac、Cry1Ab和Cry1F毒素结合,第2、3种APN只与Cry1Ac结合而不与Cry1Ab和Cry1F毒素结合(Hua *et al.*, 2001)。

并不是所有的APN都能与Cry1A家族毒素发生特异性结合。家蚕BBMV上分子量分别为100和110 kDa的APN同工酶不与Cry1A类毒素结合,只有115 kDa 的APN与Cry1Aa毒素发生特异性结合(Jenkins *et al.*, 2001)。此外,斜纹夜蛾的BBMV上的APN只与Cry1C毒素结合,与此相反的是烟草天蛾的BBMV上120kDa的APN不与Cry1C毒素结合,Cry1C毒素的受体是一个分子量为106 kDa的氨肽酶N(Luo *et al.*, 1996)。Daniel等报道烟草天蛾BBMV上一种纯化的120 kDa 氨肽酶N不能与Cry1Ac的一种突变体结合,但变性的氨肽酶N却暴露出了非变性条件下隐藏的新的结合部位,并可与之相结合,所以在变性条件下配体印迹法(ligand blot)显示与Bt毒素结合的蛋白在非变性条件下并不一定与毒素结合(Daniel *et al.*, 2002)。

总之,昆虫APN作为Bt毒素的一种主要的受体,其与抗性的产生密切相关,但昆虫的APN不是能与所有的Bt毒素发生特异性结合,不同昆虫的APN能与不同的Bt毒素结合,同一昆虫的不同APN与Bt毒素的结合能力也不一样,二者之间的关系不是简单的一一对应关系。

1. 4. 2 钙粘蛋白

钙粘蛋白(cadherin)被证明是鳞翅目昆虫的另一类主要的Bt受体蛋白(Vadlamudi *et al.*, 1995; Francis *et al.*, 1997; Nagamatsu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005; Flannagan *et al.*, 2005)。众多研究表明在烟草天蛾、家蚕和烟芽夜蛾中,钙粘蛋白是Cry1A毒素的靶标受体,而且试验还表明钙粘蛋白基因的变异与昆虫对Bt抗性的产生密切相关,使得钙粘蛋白成为科学家们的又一个研究焦点。

Vadlamudi等首次在烟草天蛾BBMV上发现了Cry1A 毒素的一种受体与钙粘蛋白的结构很相似,称为类钙粘蛋白(Cadherin-like) (Vadlamudi *et al.*, 1995)。Francis等纯化了烟草天蛾中肠BBMV上Cry1Ab 毒素的受体BT-R1,其和氨肽酶、碱性磷酸酯酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶及-半乳糖苷酶的洗脱活性峰不同,也不象是和这些酶形成的复合体。Cry1Aa和Cry1Ac与BT-R1在分级凝胶过滤柱上的结合与Cry1Ab相似,这表明BT-R1可能是Cry1A毒素的高度亲合性受体(Francis *et al.*, 1997)。Nagamatsu等发现在家蚕体内存在一种能与伴刀豆蛋白A (Concanavalin A)反应的175kDa的糖蛋白,尽管在中肠膜泡中只有0.01%~0.02%,但它却与该蛋白的抗体能在体外抑制毒素与膜泡的结合,并降低毒素对家蚕的毒力,而且这种蛋白只存在于与肠体内,不存在于脂肪体、角质层和丝腺中,表明该蛋白极有可能是Bt的受体蛋白,于是将其命名为BtR175 (Nagamatsu *et al.*, 1998)。进一步的实验表明,当将BtR175在Sf9细胞系中进行表达并且将其暴露在Cry1Aa中时,细胞的形态会发生变化,同时膜电流也发生了改变,这表明BtR175的表达导致了膜对Cry1Aa渗透量的改变,说明二者是相互作用的,进一步确证了BtR175是Cry1Aa的一个受体(Nagamatsu *et al.*, 1998)。

不同昆虫的BBMV上受体钙粘蛋白结合的毒素种类不一定相同。很多试验表明,3种Cry1A (Cry1Aa、Cry1Ab和Cry1Ac)毒素都可以与某些昆虫的钙粘蛋白结合。这几种毒素的同源性很

高,因此它们很可能在昆虫体内有共同的结合位点。生物测定也表明,昆虫对这3种毒素一般具有较强的交互抗性。竞争结合试验结果表明,它们一般在钙粘蛋白上共享同一结合位点,但不完全重叠。对于家蚕,情况却不相同。利用纯化的家蚕体内类钙粘蛋白受体BtR175进行配体印迹试验没有观察到Cry1Ab和Cry1Ac与该受体的明显结合,Cry1Aa与该受体蛋白却具有很高的亲和力。而对虫体进行生物测定时发现3种毒素中Cry1Aa毒素对家蚕幼虫的毒力最高,这说明毒素与受体的亲和力与毒性呈正相关。

类钙粘蛋白受体在毒素分子上的结合区域与其它受体相同,但是具体结合位点却不相同。Jenkins等报道了Cry1Aa毒素的一种人工缺失突变物影响毒素与类钙粘蛋白受体的结合,但却不影响毒素与受体氨肽酶N的结合(Jenkins *et al.*, 2000)。Jenkins研究发现:由Cry1Ac的结构域I、Cry1Aa的结构域II和Cry1Ab的结构域III组成的融合毒素也能与家蚕BtR175具有很高的亲和力,而在毒素与受体的识别和结合过程中起重要作用的是结构域II,因此Cry1Aa毒素的结构域II与BtR175的结合密切相关(Jenkins *et al.*, 2001)。与此不同的是,舞毒蛾的幼虫也具有受体类钙粘蛋白,它对Cry1Ac也不敏感,但对Cry1Aa毒素却很敏感。Nagamatsu等采用将N端逐渐缩短,逐一的部分表达BtR175,然后将这些片段与Cry1Aa毒素结合,结果发现BtR175的N端最后一个重复子和近膜区域是受体BtR175与Cry1A毒素的结合部位(Nagamatsu *et al.*, 1999)。Gomez 等采用噬菌体展示技术首次筛选到了BtR1和BtR175上与Cry1A毒素结合的氨基酸序列,二者分别是⁸⁶⁹HITDTNN K⁸⁷⁶和¹²⁹⁶LDETTN¹³⁰¹(Gomez *et al.*, 2001; 2002)。由此可见,BtR1和BtR175结合Cry1A毒素的结合部位显著不同。

在烟芽夜蛾中,由钙粘蛋白(HevCaLP)组成的受体A被认为与Cry1Ac抗性的产生密切相关。HevCaLP 的缺失导致了抗性品系YHD2和KCBhyb的BBMV与Cry1Aa结合能力的下降,但不影响Cry1Ab和Cry1Ac的结合能力(Lee *et al.*, 1995; Jurat-Fuentes *et al.*, 2004a(Lee *et al.*, 1995; Jurat-Fuentes and Adang 2004)。Gahan等人发现对Cry1Ac抗性高达10 128倍的烟芽夜蛾YHD2品系的Cry1A毒素受体类钙粘蛋白基因发生了插入突变。在敏感虫体中该基因的转录产物mRNA为5.5kb;而在抗性虫体中该基因的转录产物有三种,大小分别是:7.8、4.4和2.1kb。序列分析表明抗性昆虫7.8kb片段比敏感昆虫的5.5kb多了一段2.3kb的内部插入序列。这种突变是由于反向转座子介导插入,使烟芽夜蛾YHD2品系受体类钙粘蛋白基因的结构遭到了破坏。该受体类钙粘蛋白基因被命名为Bt-R4(Gahan *et al.*, 2001)。Gahan等报道了对Cry1Ac和Cry2Aa都有抗性的烟芽夜蛾CP73品系,对Cry1Ac抗性具有最大影响的BtR-5基因位于连锁群10上,这和他们先前的报道不同,当时他们曾确认对Cry1Ac具有高抗性的YHD2品系中,对Cry1Ac有重要影响的BtR-4基因位于连锁群9上,但BtR-4和BtR-5 对Cry2Aa没有显著抗性。他们分析认为CP73品系对Cry2Aa的抗性不是因为Cry1Ac抗性引起,而是以数量遗传为基础的(Gahan, 2005)。

Morin等人研究了对Cry1Ac抗性为3100倍的棉红铃虫品系,分析认为其抗性的产生与类钙粘蛋白受体基因编码区的3个缺失突变点(r1、r2和r3)有关,每一个缺失突变至少导致毒素结合区域的上游缺失8个氨基酸残基,而且所有的缺失发生在Cry1Ac结合钙粘蛋白的上游(Morin *et al.*, 2003)。同时,他们还通过PCR的方法获得了r1、r2和r3部分基因序列,建立了以DNA为基础的监测抗性基因的方法来检测红铃虫对Bt的抗性基因,能区别鉴定r1r1、r1r2、r1r3、r2r2、r2r3、r3r3、r1s、r2s、r3s和ss等10种基因型(Morin *et al.*, 2003)。Tabashnik等应用此方法在AZP-R和

APHIS-98R两个独立的抗性品系中鉴定了有r1, r2, r3基因(Tabashnik *et al.*, 2004)。王桂荣等克隆了棉铃虫的钙粘蛋白全长基因,证明了棉铃虫钙粘蛋白是Cry1Ac的受体,同时,运用半定量RT-PCR的方法分析了钙粘蛋白基因在棉铃虫中的表达情况。研究表明,当棉铃虫对Cry1Ac产生抗性后,钙粘蛋白的表达量明显降低,钙粘蛋白基因表达量的变化导致了与棉铃虫中肠BBMV结合的Cry1Ac的量减少,这可能是棉铃虫对Cry1Ac产生抗性的主要原因之一(王桂荣等, 2004)。Xu等报道了室内对Cry1Ac抗性为564倍的棉铃虫种群研究表明:抗性的产生是因为在钙粘蛋白基因1258位处发生变异,提前插入了一个终止密码子TAA,使得大部分序列缺失,从而导致表达的受体蛋白仅含有428个氨基酸残基(Xu *et al.*, 2005)。

1. 4. 3 碱性磷酸酶和肌动蛋白

碱性磷酸酶与氨肽酶具有一个相同的性质,那就是都能够被糖基化磷脂酰肌醇 GPI 锚定。早在 1989 年的时候,English 和 Readdy 认为烟芽夜蛾中的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)可能是 Cry1Ac 的受体(English and Readdy, 1989)。随后, Sangadala 等的实验表明烟草天蛾中的氨肽酶与磷酸酶的混合物能增加 Cry1Ac 毒素的结合,并推断它可能是烟草天蛾中 Cry1Ac 的受体(Sangadala *et al.*, 1994),但他们的发现当时并未引起人们足够的重视。

直到 2003 年, McNall 等运用蛋白组技术首次证明了在烟草天蛾中存在两种新的 Bt 毒素受体蛋白:碱性磷酸酶和肌动蛋白(Actin) (McNall and Adang, 2003)。他们通过单相和双相电泳建立了烟草天蛾 BBMV 中 Cry1Ac 受体蛋白组和 GPI 锚定的受体蛋白组,最后通过肽质指纹 (Peptide Mass Fingerprints, PMFs)的方法得到 65KDa 的 Cry1Ac 的受体蛋白 ALP (McNall and Adang, 2003)。

烟芽夜蛾中的碱性磷酸酶(HvALP)也是Cry1Ac的受体(Jurat-Fuentes and Adang, 2004b)。Jurat-Fuentes等在YHD2的基础上筛选YHD2-B时发现,相对于前者,后者对Cry1Ac具有 73 倍的抗性,并且对Cry1Ab和Cry1Ac的结合能力减弱(Jurat-Fuentes *et al.*, 2002)。这些变化表明除了HevCaLP参与了作用外,还有其它的受体参与了作用。为了弄清楚这个问题,他们比较了抗、感幼虫中肠上皮细胞膜蛋白的差异,发现与Cry1Ac同样能识别GalNAc抗原决定簇的大豆凝集素(Soybean agglutinin, SBA)与BBMV能结合,但至少有两种蛋白结合的量减少了(Jurat-Fuentes *et al.*, 2002)。其中之一被鉴定为通过GPI锚定的细胞膜蛋白HvALP。进一步的研究表明抗性品系(YHD2-B, CXC, KCBhyb)中的碱性磷酸酶活性低于敏感品系YDK,其中抗性品系YHD2-B中肠BBMV的碱性磷酸酶的活性比敏感品系YDK减少了 3 倍。而对YHD2-B和YDK的杂交后代F₁的生测表明,F₁代对Cry1Ac敏感,且其中碱性磷酸酶的总量与YDK接近,从而确证了在烟芽夜蛾中碱性磷酸酶与Cry1Ac抗性密切相关(Jurat-Fuentes and Adang, 2004b)。

同时,他们通过双相电泳的方法发现抗性品系(YHD2-B, CXC, KCBhyb)中的碱性磷酸酶的量低于敏感品系 YDK,表明烟芽夜蛾中肠碱性磷酸酶活性的减少与抗性直接相关。在另一抗性品系 CXC 中,其 BBMV 与 Cry1Ac 的亲合力与敏感品系 YDK 的一致,碱性磷酸酶的活性降低与抗性相关,但不影响与 Cry1Ac 的结合(Jurat-Fuentes *et al.*, 2003)。因此,可以肯定的是,碱性磷酸酶活性的减少与烟芽夜蛾对毒素抗性的增加密切相关,但其具体作用机理尚

不清楚。

Fernandez 等在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的中肠中发现通过 GPI 锚定、大小为 65KDa 的碱性磷酸酶是以色列亚种 Cry11Aa 的功能受体。在用磷酸酯酶 C (Phospholipase C)处理埃及伊蚊中肠上皮细胞中提取的 BBMV 后,存在两个以 GPI 方式锚定的能与 Cry11Aa 发生特异性结合的蛋白。利用亲和层析的方法纯化了这一 65KDa 的蛋白,并呈现出碱性磷酸酶活性。结果表明 GPI-ALP 是导致 Cry11Aa 对埃及伊蚊高毒性的重要的分子受体(Fernandez *et al.*, 2006)。

McNall 和 Adang 通过 Western 杂交结合肽质指纹的方法也鉴定了另一 43KD 的 Cry1Ac 受体蛋白为肌动蛋白(Actin)(McNall and Adang, 2003)。Krianamoorthy 等在烟芽夜蛾中通过蛋白组的方法也得到类似的蛋白,并鉴定为 Cry1Ac 的受体(Jurat-Fuentes and Adang, 2006)。事实上,肌动蛋白做为毒素受体一直存在疑问,因为肌动蛋白家族成员通常是细胞内细胞骨架的组成部分。但是,如果 Cry1Ac 毒素与钙粘蛋白结合时引起的构象改变将会加强部分毒素与细胞内的肌动蛋白发生作用。肌动蛋白通过酪氨酸磷酸酶,连环蛋白和辅肌动蛋白与钙粘蛋白的细胞液作用引起细胞内的信号通路应答胞外的信号(Lilien and Balsamo, 2005)。Cry1A 毒素与钙粘蛋白结合后所导致的细胞内细胞凋亡通路(apoptotic pathway)的激活与 Cry1 的毒性相关(Zhang *et al.*, 2005; 2006)。Jurat-Fuentes 和 Adang 推测在烟芽夜蛾中,一部分 Cry1Ac 的单体就是直接作用于肌动蛋白,进而导致昆虫的死亡(如图 1.3, Jurat-Fuentes and Adang, 2006)。

1. 4. 4 醣脂

醣脂可能是生物体内中又一种 Bt 受体蛋白。早在 1999 年的时候, Silva 等就认为在尖音库蚊(*Culex pipiens*)的中肠中 α -葡萄糖苷酶可能是一种 Bt 毒素受体蛋白 (Silva *et al.*, 1999)。2001 年, Griffiths 等发现在模式生物线虫秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中 bre-5 基因编码的 β -1,3-半乳糖基转移酶与 Bt 毒素的抗性有关, bre-5 基因的缺失会导致其对 Cry5B 抗性的产生 (Griffiths *et al.*, 2001)。2005 年, Griffiths 等再次发现在该线虫体内存在一种醣脂类化合物,它能够与 Bt 毒素发生特异性结合,而且这种结合依赖于这种碳水化合物而产生毒性。这种醣脂类化合物的缺失引起秀丽隐杆线虫对 Bt 毒素的抗性,并认为这是抗性产生的主要机制(Griffiths *et al.*, 2005)。在其他的生物中也曾发现过类似的情况,但都没有深入的研究。例如, Kumaraswami 等在小菜蛾的 Cry1Ac 抗性品系中发现其醣脂类化合物的含量远低于敏感品系,虽然没有明确提到它可能是 Bt 毒素的功能受体,但推定它的变化可能参与了抗性的形成 (Kumaraswami *et al.*, 2001)。

总之,随着人们对 Bt 抗性的关注,越来越多的与抗性相关的受体基因被分离和克隆。昆虫对 Bt 的抗性机制呈现出多样性,不同昆虫对不同 Bt 毒素的抗性机制不同。而且,昆虫对 Bt 的抗性也是多种因素的作用结果,因此,系统深入地研究 Bt 毒素受体蛋白是研究 Bt 抗性的首要问题,也将为发展分子技术快速监测田间抗性基因频率和延长 Bt 农药、Bt 植物的使用寿命起到积极的作用。

1. 5 害虫抗性治理策略

随着 Bt 棉的大规模种植,害虫对 Bt 的抗性已严重威胁到 Bt 棉的可持续利用,因而多种害虫抗

性治理 (Insect Resistance Management, IRM) 策略得以提出(Brunke and Meeusen, 1991; Denholm and Rowland, 1992; Gould, 1994, 1998; Tabashnik, 1994a, 1994b; Caprio, 1994; McGaughey and Whalon, 1992; Alstad and Andow, 1995; Liu and Tabashnik, 1997; Zhao *et al.*, 2003), 主要包括以下几个方面的措施:

1) 特定时间特定部位表达毒素

这种策略通过对转基因毒素蛋白的时空表达进行调控, 从而达到防治害虫的目的。转基因植物在特定时期和易受攻击部位受到化学的或虫害的伤害, 这种伤害诱导并促使启动子启动, 表达毒素蛋白杀死害虫。这样将能调节Bt毒素在转基因植物上的时空表达特性, 尽可能在害虫高峰期和易受伤害的部位表达, 这样将能很好的延缓抗性(Wilson *et al.*, 1992; Gould, 1998)。这种策略特点是不需要另设庇护所, 转基因植物本身就担当了这种角色。如Bt毒素仅在幼棉铃中表达, 可以在减少棉花产量损失的同时允许有足够的敏感幼虫正常的生长和繁殖, 从而可延缓抗性的发生且增加天敌的数量, 维持田间的群落生态结构。

但是, 这种方法看起来并不是十分的有效。因为组织特异性表达将使Bt毒素在一些组织中高剂量表达, 而在另外一些组织中低剂量表达, 害虫可能在不同发育阶段食用不同的组织而被分化选择, 这样一来该策略最终的结果是加速而非延缓抗性的产生(McGaughey and Whalon, 1992; Frutos *et al.*, 1999), 因而并不是十分可取。

2) 低剂量/天敌策略

该策略利用转基因植物表达低剂量的Bt毒素, 其设想是: 利用表达的低剂量的毒素杀死部分敏感个体, 影响了大多数“抗性”害虫的行为和发育, 使它们更利于被天敌攻击, 利用天敌对害虫的控制作用从而达到延缓抗性的效果。但通过数学模型、实验室实验和田间实验分析发现, 没有足够的证据能够证明此策略有助于延缓抗性的产生。相反的, 在天敌看来, 敏感个体比“抗性”个体似乎更具诱惑力, 这样一来该策略直接加速了抗性的产生而不是延缓抗性的产生(Frutos *et al.*, 1999)。

3) 高剂量/庇护所策略

该策略被认为是一种比较有效的方法(Gould, 1998; Frutos *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003)。该策略基于假设害虫对Bt的抗性是隐性的, 由一个基因座上两个等位基因控制, 那么就有三种基因型: 敏感纯合子(SS), 杂合子(RS), 和抗性纯合子(RR)。庇护所寄主植物不产生Bt毒素, SS、RS、RR三种害虫均能存活, 在高剂量表达的Bt作物上只有RR个体才能存活。相对大量的庇护所内的SS成虫与在Bt作物上稀少的RR成虫进行交配, 根据孟德尔遗传, SS成虫和RR成虫进行交配, 产生的F1代只有RS, 而RS在Bt作物上不能存活, 因此, R基因型在种群中被剔除, 从而延缓了抗性的产生。

但该策略也有其局限性。首先, 该策略的提出是基于以下三个假设: 1)、初始抗性频率比较低, 如<10⁻³; 2)、隐性遗传; 3)、抗性个体能和敏感个体能自由交配。但是很多研究表明, 一些害虫并不符合这三个条件中的一个或多个。例如, 在欧洲玉米螟(*Ostrina nubilalis*)、烟芽夜蛾、烟草天蛾、小菜蛾等就是不完全隐性或非隐性遗传的(Frutos *et al.*, 1999; Burd *et al.*, 2003)。其次, 该策略还受限于操作过程中的实际情况。例如在Bt植株种子发育阶段, 花粉可能会漂移到非Bt植株上将导致害虫处于低选择压下(Chilcutt and Tabashnik, 2004)。再次, 该策略的另一个缺点就是多数害虫对毒素的敏感性并不一致。而该策略是基于杂合子的高致死, 而不同害虫对毒素的敏感性

是参差不齐的,即同一毒素对一种害虫而言可能是高剂量,但对另一种害虫可能是中等程度甚至是不敏感的,因而不可能完全达到高剂量的标准(Gould, 1994; Roush, 1997)。

4) 新毒素策略

新毒素策略是基于新毒素与现有毒素具有不同靶标位点或作用方式而制定的,它通过将非Cry毒素或对当前正在使用的毒素没有交互抗性的毒素转入植株体内而获得新的转基因植株。例如,在大量筛选新的对害虫具有活性的Cry毒素的同时,晶体孢子形成过程中产生的营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, Vips)引起了人们的关注(Schnepf *et al.*, 1998),这种杀虫蛋白在结构和功能上与Cry毒素不同,而且对鳞翅目和鞘翅目昆虫具有广谱性(Liu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2003),因而很适合作为一种新的基因转入植株内而获得新的抗虫转基因植物。由Syngenta (Greensboro, NC, USA) 公司研发的 VIP Cotton™已于2002~2003年在美国完成中试(http://www.icac.org/cotton_info/tis/biotech/documents/recorderdocs/june_03.pdf), 2005年被批准进入田间释放阶段(Bates *et al.*, 2006)。

另外一个非Cry毒素是从*Photobacterium luminescens* 里纯化出来的毒素A,在线虫感染期可以引起寄主死亡,最近转到植物上对鳞翅目和鞘翅目害虫有杀虫活性(Liu *et al.*, 2003)。除了毒素A以外,*P. luminescens*被认为可能有几个不同于其它编码的杀虫活性基因(Williamson, 2003)。

新合成的具有杀虫活性的蛋白基因可以转到作物中起到替代Bt毒素的作用。例如与Cry毒素不同的Vip毒素或毒素A就具有潜在的控制不同害虫的能力。但这些替代的毒素对非靶标的安全性评价还有待研究。

5) 转双价基因

该策略的提出是基于害虫对两种毒素的抗性频率要比一种毒素抗性频率低的假设,它被认为是一种能有效地延缓昆虫对Bt毒素抗性的策略(Tabashnik *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Bird and Akhurst, 2004)。

除了能够延长转基因作物品种的寿命以外,转双价基因作物比常规的“高剂量/庇护所”策略有两个明显的优势,第一,在同种作物中转入双基因要比转入单基因更为有效,只要有一个基因有效,其就具有抗虫性,因此,当害虫对其中的一种基因不敏感时,对另一种基因可能仍然很敏感;第二,转双价基因作物种植的时候,可以种植更小面积的庇护所(Bates *et al.*, 2005)。Roush (1998)模拟模型表明植物表达双毒素与5%—10%的庇护所对于抗性演化的效果等同于两种转基因作物先后种植与30%—40%的庇护所,尤其是在害虫对双价转基因植物无交互抗性情况下,可以实现最大的收益。

从害虫抗性治理的角度来看,在采用转双价基因作物的时候应避免同时种植转单基因作物(与该双价中之一相同的基因)。尽管转两种不同的Cry毒素能够延缓抗性的发展,但如果单基因作物与转双基因作物同时种植,转双价基因的作物的优势会消失。Zhao等(Zhao *et al.*, 2005)以一个对Cry1Ac和Cry1C抗性基因频率分别为0.1和0.34的小菜蛾种群为研究对象对此进行了研究。当小菜蛾经温室内筛选至24~26代后,两种转基因作物的同时种植,会导致失败;当只用转双基因花椰菜,害虫在单基因植株和双基因植株上不能存活,表明转双价基因作物和单基因作物的同时种植比只种植转双价基因作物的抗性演化的快。因此,在澳大利亚,2003年时尚允许单价(Cry1Ac)和双价转基因(Cry1Ac+Cry2Ab)品种的同时种植,现在已经禁止了单基因棉花的生产,全部种植转双价基因的品种,以达到延缓抗性的效果(Bates *et al.*, 2005)。

事实上, 2002年, 第二代转基因棉Bollgard II (Cry1Ac+Cry2Ab, Monsanto Company)首次在澳大利亚和美国被批准进行商业化生产, 2005年, 墨西哥和南非也已进入商品化生产阶段, 菲律宾政府也批准Bollgard II于2006年开始进入生产阶段(James, 2002; 2005)。

总而言之, 在Bt植物持续高剂量表达Bt杀虫蛋白的高压选择下, 害虫对Bt作物产生抗性不是“能否”的问题, 而是“何时”的问题(Bates *et al.*, 2005)。然而, 直到今天, 我们仍未见害虫对Bt作物抗性的报道。这可能与以下几个因素有关: 1) 适合度; 2) 低的初始抗性频率; 3) 从非Bt作物或庇护所上来的敏感基因对抗性基因的稀释; 4) Bt植物所表达的高剂量毒素的作用。

因此, 我们在利用上文提到的抗性治理策略对Bt作物进行抗性治理的同时, 也不能忽略采取一些诸如农业防治和生物防治的措施来对Bt作物进行害虫综合防治。例如, 在澳大利亚, 通过翻耕土壤, 降低越冬蛹存活率等方法来降低种群基数。同时, 没有一个抗性治理策略能够单独的、无限的对抗性演化有延缓作用。Bt作物抗性的治理也必须以抗性监测工作为基础, 同时还必须考虑到诸如适合度、天敌等对抗性治理的影响, 辅以农业防治和生物防治措施来进行Bt作物田间的害虫综合防治, 图1.4是有关影响害虫抗性治理的及其相应对策的图示。

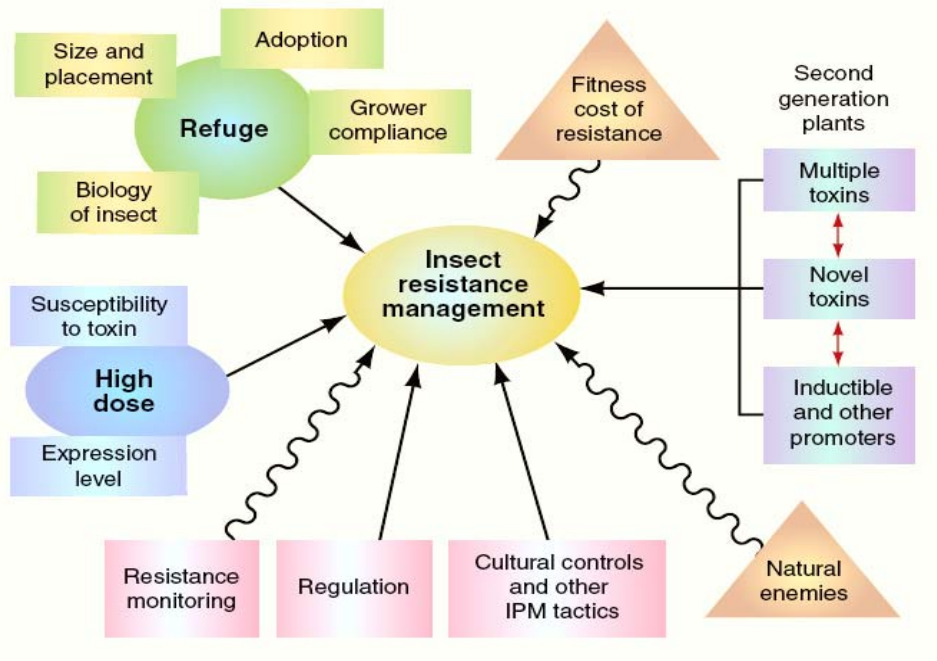


图1. 4 影响昆虫对Bt作物抗性治理策略的因素 (Bates *et al.*, 2005)

Fig. 1. 4 Factors affecting the efficacy of IRM strategies for insect-resistant transgenic crops

1. 6 毒素-受体结合动力学研究新方法——表面等离子体共振技术

昆虫Bt受体蛋白与Bt毒素之间的相互作用的本质是蛋白-蛋白间的相互作用。研究昆虫中Bt毒素受体与毒素相互作用最为经典的就是体外标记结合法, 其主要原理是将毒素进行标记, 然后将标记好的毒素与从昆虫中提取的受体蛋白室温温育, 使之结合, 然后通过放射性的测定来确定结合的作用方式和结合能力大小。但该技术研究的是蛋白相互作用的终结状态, 得到的动力学常数也是最终的结合动力学常数, 无法对二者相互作用进行实时监测。而且该方法是一种体外结合

的方法,无法模拟生物体内的真实情况。

许多新技术因此而应运而生,其中较重要的是表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)。它是依据光学-介质相互作用原理建立,属于实时和非标记的测试方法。该方法不仅能测定生物分子的浓度,同时可以研究其结合解离的动力学行为,具有直接提供分子间相互作用信息的本领,可以发展成具有广泛通用性的新型生物研究平台。

1. 6. 1 SPR 的工作原理

SPR 是一种物理光学现象。当一束平面单色偏振光以一定角度入射到镀有薄层金膜的玻璃表面发生全反射时,如果入射光的波向量与金膜内表面电子的振荡频率匹配,光线即耦合入金膜引发电子共振,即表面等离子共振。电子吸收入射光线的能量使反射光强度达最小,此时的入射光角度为SPR角。SPR角随金属表面折射率的变化而变化,而折射率的变化又与金表面结合的分子质量成正比。形成SPR的必要条件之一是金属与点介质界面的存在(Stefan *et al.*, 1991)。

当平行于表面的偏振光(称之为表面等离子角)的入射角照在界面上发生全反射时,入射光被耦合入表面等离子体内,在这个角度由于表面等离子体谐振将引起界面反射率显著减少。SPR对附着在金属表面的点介质的折射率非常敏感,而折射率是所有材料的固有特征。因此,任何附着在金属表面的点介质均可被检测,不同点介质的表面等离子角不同。而对于同一种材料,附着在金属表面的量不同,SPR的响应强度也不同(Stefan *et al.*, 1991; 沈平, 1997)。

SPR 生物传感器中生物分子相互作用分析(Biomolecular Interaction Analysis, BIA)正是基于这一原理,将探针或配体固定在几十纳米厚的金属(金、银等)膜——芯片——表面,含分析物的液体流过芯片表面时,如果分子间发生结合,则可引起芯片表面折射率的改变,从而导致谐振角改变,结合的强弱引起折射率的变化,折射率的改变促使谐振角改变,而谐振角反应为谐振峰,因而结合的强弱就直接表现为SPR曲线谐振峰的移动,通过检测谐振峰的移动就可以检测到生物分子间的作用,因此,我们就可以通过检测SPR信号的改变而监测分子间的相互作用。如果固定入射角度,就能根据谐振角的改变程度对互补的目标生物分子进行定量检测(隋森芳, 2003)。图1.5为SPR的工作原理图。

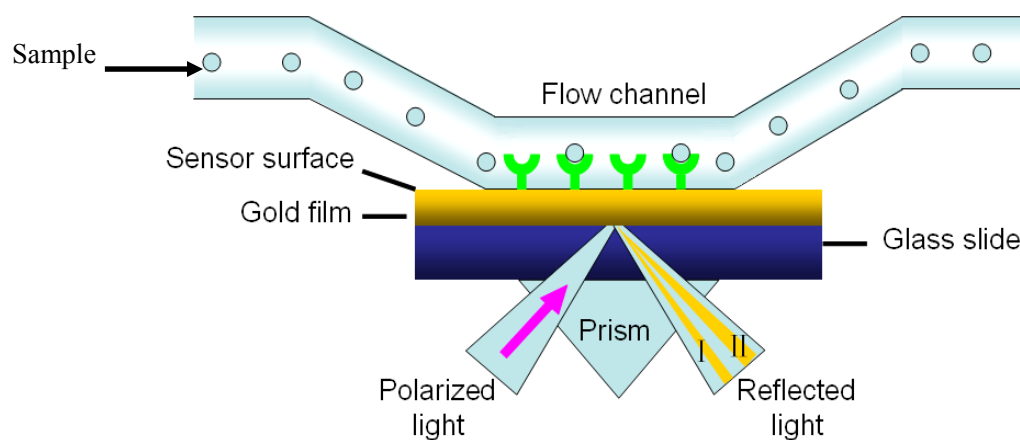


图1.5: SPR工作原理示意图 (仿 沈平, 1997)

Fig. 1.5 Principle diagram of SPR

SPR整个传感过程包括：(1)生物分子的相互作用（耦联、结合）；(2)敏感层电介质变化（介电常数折射率改变）；(3)传感器电磁场变化（反射光波衰减波）；(4)光电信号检测；(5)信号的连续检测与分析。在基于SPR 原理的生物传感器中，使用最多、应用范围最广的是Pharmacia公司生产的BIAcore 仪器，并由此发展出生物分子相互作用分析技术BIA。在BIA的测定中，待测的一对分子中的一个被固定在传感片的表面，另一种分子的溶液流过表面，如果二者有相互作用的结合，将使传感片表面结合的物质质量发生变化，导致传感片表面折射率的变化，从而引起SPR角度的变化，可以通过检测这一变化监测分子间相互作用。

1. 6. 2 SPR 的特点及优点

SPR方法在研究分子间相互作用方面具有独特的优势，其非标记和实时检测以及可以进行动力学分析的特点，给研究生物大分子的相互作用提供了诱人的解决方案；SPR测定不仅不会破坏生物大分子的天然状况，而且通过对测试表面的修饰，还能为生物大分子提供体内环境；SPR进行实时的过程监测，可以方便的研究生物大分子相互作用的时序性特点和规律，实时记录反应的结合与解离，提供了反应的动态过程，这是其他技术无法比拟的。这恰恰是基因组学和蛋白质组学所亟需的。

在SPR-BIA 的实时监测中，我们还可以获悉：(1) 特异性——哪些分子发生了相互作用？(2) 浓度——存在多少结合分子？(3) 动力学——相互作用的速率、结合和解离的比例是多少？(4) 亲和性——相互作用的程度有多大？(5) 协同作用——是否存在任何异构效应？(6) 相互作用模式——结合模式与不同样品是否存在对应关系？SPR的这些优点，使其近年的发展迅速加快，用于研究多种重要生物问题和过程，如蛋白质-蛋白质识别、核酸-蛋白质相互作用、受体-配体相互作用、细胞水平上的作用过程、活性组分含量测定等，也为免疫学、生物催化、药物设计等领域的发展提供了新的动力。

1. 6. 3 SPR 在毒素-受体结合中的应用

由于SPR能很好的研究生物大分子间的相互作用，因此，在研究昆虫Bt受体蛋白与Bt毒素相互作用方面得到了广泛的应用。例如，可以利用该技术来寻找昆虫体内的毒素受体、毒蛋白在昆虫体内的信号转导途径以及Bt 晶体毒素的专性杀虫机理。近年来，越来越多的研究人员意识到这一点，并纷纷开展了相关研究工作。

SPR 技术曾被美国乔治亚大学的 Adang 所领导的课题组成功应用于研究 Bt 毒素与昆虫受体的特异性结合反应(Masson *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1995a; 1995b; Hua *et al.*, 2001)。早在上个世纪 90 年代初期，Masson 等就运用该方法成功固定了云杉卷叶蛾（*Choristoneura fumiferana*）BBMV 和 Cry1A，并研究了 BBMV 与 Cry1A 类蛋白的相互作用。他们通过直接固定和间接固定两种方法分别将 BBMV 固定于芯片上，并用相应的抗体检测了固定的效果。同时他们还研究了将 Bt 毒素直接固定在芯片表面，然后将同源或异源的毒素与 BBMV 温育并作为流动相通过芯片的表面来研究毒素之间对 BBMV 的竞争作用(Masson *et al.*, 1994)。

同时，Masson 他们发现在烟草天蛾、烟芽夜蛾和欧洲玉米螟等鳞翅目昆虫中肠上皮细胞膜 (brushborder membranes) 上存在 Bt 毒素受体。于是他们运用 SPR 技术进行了研究，研究发现，

烟草天蛾中有一大小为 120 kDa 的受体蛋白能与 3 种 Cry1A 毒素 (Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac) 结合。进一步的研究发现, Cry1Aa 和 Cry1Ab 与该受体蛋白的结合的位点都只有 1 个, 分别位于活性毒素的结构域 II 和受体蛋白的位点 2。Cry1Ac 与受体蛋白的结合位点却有 2 个, 1 个位于毒素结构域 II 和受体蛋白的位点 2, 另 1 个位于毒素结构域 III 和受体蛋白的位点 1, 后者的亲和力比前者低 3~4 倍(Masson *et al.*, 1995a)。同时, 他们将 Bt 毒素固定在芯片上, 将 BBMV 作为流动相流经传感器的表面, 通过一系列参数分析, 找到了二者特异互作的蛋白, 并结合其它研究手段确定受体蛋白种类为氨肽酶和钙粘蛋白(Masson *et al.*, 1995a)。后来他们还运用该技术进一步研究了 Cry1A 毒素与从烟芽夜蛾中肠纯化的 170 kDa 的 APN 结合的动力学特性, 他们将纯化的 170kDa 的 APN 固定在 CM5 芯片上, 然后将 Bt 毒素做为流动相, 从而明确该受体上特异结合的 Bt 晶体毒素类型(Luo *et al.*, 1997)。Hua 等将不同 Bt 晶体毒素固定到生物传感芯片上, 将与固定的 Bt 晶体毒素同源或异源的 Bt 晶体 δ 内毒素与 BBMV 混合后流经芯片表面, 确定 Bt 毒蛋白与 BBMV 的相互作用, 从而明确欧洲玉米螟的特异性 Bt 毒素的受体位点(Hua *et al.*, 2001)。

Li 等利用 Biacore 3000 将 Cry1Ab 和 Cry1Ca 固定在 CM5 芯片上, 将抗性和敏感品系的欧洲玉米螟的 BBMV 作为流动相通过芯片表面, 观察了毒素与 BBMV 的亲和力(Li *et al.*, 2004)。当将敏感品系的 BBMV 通过 Cry1Ab 通道时, 发现 SPR 的信号缓慢而持续的增长, 证明了 Cry1Ab 与毒素间特异性结合的存在。而抗性品系 BBMV 与 Cry1Ab 的结合和敏感品系相差无异。而当将敏感品系和抗性品系的 BBMV 分别通过 Cry1Ca 通道时, 发现在 SPR 上几乎找不到信号, 说明 Cry1Ca 和二者均不能结合。

Gunning 等从棉铃虫幼虫里提取了酯酶, 同时通过氨基耦联的方法将 Cry1Ac 固定在芯片的表面, 观察到敏感品系的酯酶与 Cry1Ac 存在比较强的结合能力(Gunning *et al.*, 2005)。Xie 等通过 PCR 等方法克隆和表达了烟芽夜蛾和烟草天蛾的钙粘蛋白, 并利用定点突变的方法获得了一些突变体, 然后将重组蛋白固定在芯片上, 然后将活化的 Cry1Ab、Cry1Ac 作为流动相通过芯片表面来验证这些表达蛋白的功能, 并确认烟芽夜蛾中钙粘蛋白单个氨基酸的突变是影响其与 Cry1A 结合能力的重要因素(Xie *et al.*, 2005)。Kato 从对 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 三种毒素都敏感的敏感家蚕 PXS 和抗性品系 PXR 中分离 BBMV, 然后将其固定在 CM5 芯片上, 应用 SPR 技术研究了毒素与 BBMV 的相互作用, 研究结果显示对 Cry1Ac 抗性高达 120 000 倍的小菜蛾品系 PXR 的 BBMV 与 Cry1Aa 和 Cry1Ac 的结合每 10 分钟能达到 $0.7\text{ng}/\text{mm}^2$, 但 Cry1Ab 的结合几乎可以忽略不计(Kato *et al.*, 2006)。

总之, 随着 SPR 优越性的体现, 其在昆虫学中的应用将会越来越广。尤其在研究昆虫对 Bt 的抗性机制中, 由于研究的主要对象均为生物大分子, 相对而言比较容易固定, 同时它还是一种不需要任何标记的方法, 所以其作用将得到更大的发挥。另外, 由于 SPR 具有配体垂钓的功能, 因而在寻找新的昆虫 Bt 受体蛋白时将比以往的方法变得更加方便。

1.7 本文研究意义

我国是世界植棉大国, 总产量居世界第一, 植棉业是农业的支柱产业, 对国民经济发展至关重要。上个世纪 90 年代初期, 河北、山东、河南等棉花主产区, 因棉铃虫危害减产达 50% 以上, 全国棉花平均减产了 30% 左右, 直接经济损失达 100 亿元。究其原因, 除了其具有寄主范围广、

繁殖潜能大、种群能远距离迁移和对环境适应能力强等特点外，还有一个重要的因素就是它对化学农药的高度抗性导致了棉铃虫的大爆发（郭予元，1998；戴小枫，1991，1993）。棉铃虫的肆虐危害成为当时影响我国棉花生产的重要原因之一。

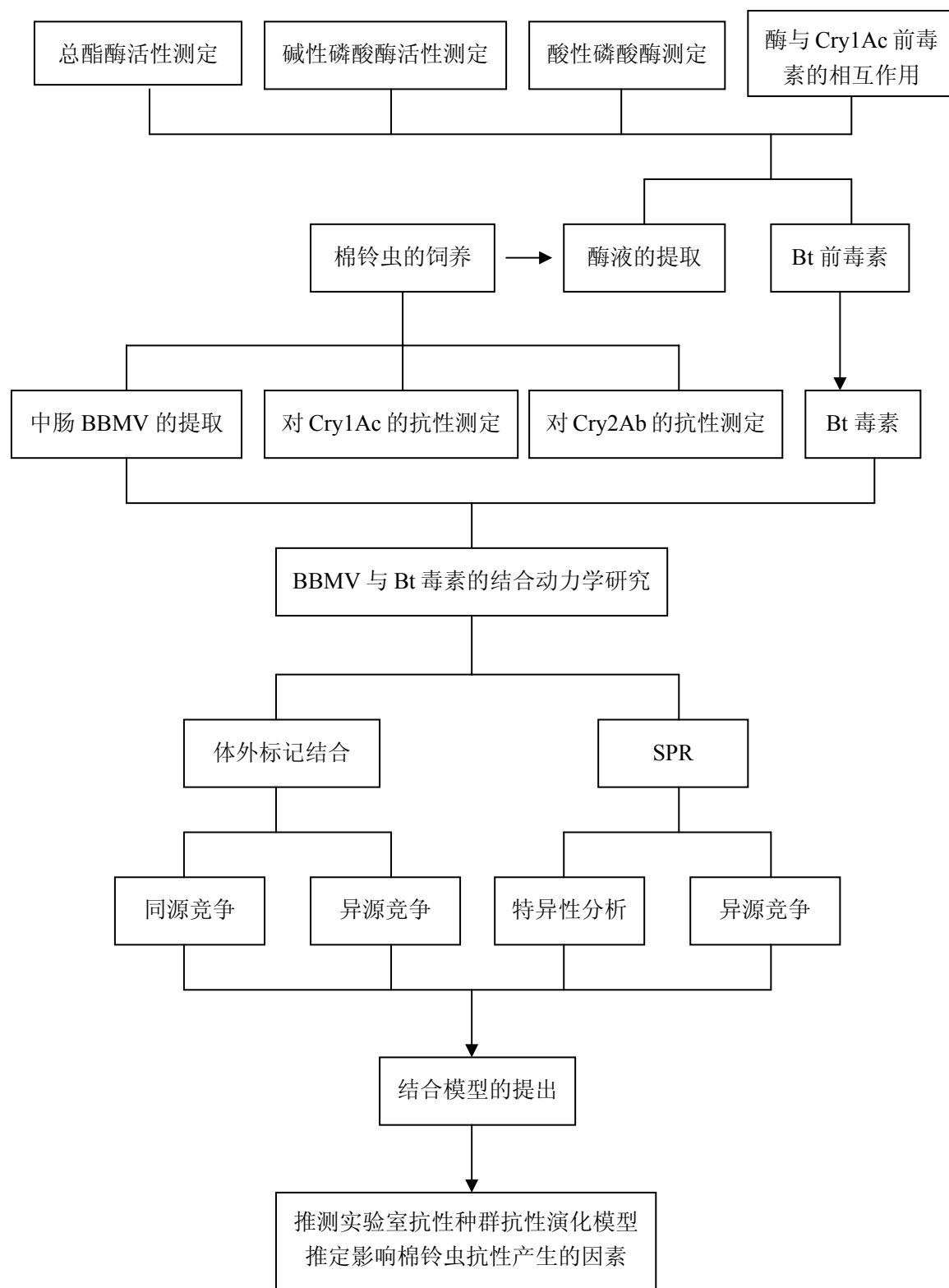
转 Bt 抗虫基因植物作为现代生物技术研究领域的重要成果之一，在产业化方面已取得迅速发展。和种植常规棉花比较，Bt-Cry1Ac 棉花具有较高的经济效益，同时也为棉田害虫的综合防治起到了重要的作用(Wu, 2007)。然而，随着 Bt 杀虫剂使用量的增加和 Bt-Cry1Ac 棉花种植面积的迅速增长，尤其是在 Bt-Cry1Ac 棉花中，转入的 *Cry1Ac* 基因在棉花体内持续高剂量的表达，使得害虫在整个生长周期都受到 *Cry1Ac* 杀虫蛋白的高压选择，主要靶标害虫——棉铃虫对 *Cry1Ac* 抗性的产生成为可能。通过连续几年的田间抗性监测发现，在 Bt 棉种植面积比较大的地区，棉铃虫对 *Cry1Ac* 的抗性基因频率有上升的趋势，同时，随着 Bt 棉的连续种植，棉铃虫对 *Cry1Ac* 的耐受性水平提高的很快 (Li *et al.*, 2004；李国平，2006)，因而棉铃虫对 *Cry1Ac* 的抗性已成为一个不容忽视的问题。

鉴于此，多种害虫抗性治理策略得以提出。而发展新的转基因作物已成为当前缓解害虫对 Bt 抗性最有效的措施。2002 年，由 Monsanto 公司开发的转双价基因棉 Bollgard II (*Cry1Ac*+*Cry2Ab*)在美国获得商品化生产。目前，包括美国、澳大利亚、南非、墨西哥和菲律宾等在内的多个国家已进入田间大规模化种植阶段(James, 2002；2005)。而使得双价基因棉具有商品化价值的一个重要因素就是转入的双价基因的作用方式不一样，或者说不存在交互抗性。

不同害虫对 Bt 的敏感程度不一样，但我国尚未有有关 *Cry1Ac* 抗性棉铃虫对 *Cry2Ab* 交互抗性的报道。同时，Bt 毒素-受体结合能力的改变和昆虫体内酶的变化被认为是昆虫对 Bt 抗性产生的主要机理。因此，本文从总酯酶的变化和 Bt 毒素-受体结合能力两个角度系统地分析了 Bt-Cry1Ac 棉花抗性棉铃虫对 *Cry1Ac* 的抗性机制以及对 *Cry2Ab* 的风险性，明确了 *Cry1Ac* 抗性棉铃虫对 *Cry1Ac* 的抗性机理以及其对 *Cry2Ab* 的抗性和相应的机理。

通过对棉铃虫对 *Cry1Ac* 的抗性机理的研究，为我们进行 Bt 棉田的害虫综合治理和合理利用 Bt 棉和 Bt 生物农药提供必要而可靠的科学理论依据。而研究 Bt-Cry1Ac 抗性棉花对 *Cry2Ab* 的抗性风险，对于延缓 Bt-Cry1Ac 棉花的使用寿命和对 Bt 棉田害虫抗性治理具有重要的指导意义，同时也对利用 *Cry2Ab* 具有重要的参考价值。

1.8 研究技术路线



第二章 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 的抗性测定

在多种 Bt 作物抗性治理策略中, 转双价被认为是一种能有效地延缓昆虫对 Bt 毒素抗性的策略(Tabashnik *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Bird and Akhurst, 2004)。因此, 转双价(Cry1Ac+Cry2Ab) Bt 基因棉 Bollgard II (Monsanto Company)应运而生, 到目前为止, 澳大利亚、美国、墨西哥、菲律宾和南非等国家已相继批准 Bollgard II 进入商品化生产阶段(James 2002; James 2005)。而要使得转双价基因棉具有商业化的价值的一个非常必要的前提就是: Cry1Ac 与 Cry2Ab 之间不存在交互抗性。

本章以本实验室经多代汰选而来的 Cry1Ac 抗性品系和敏感品系棉铃虫为研究对象, 通过生物测定的方法研究了对 Cry1Ac 具有高度抗性的实验室抗性种群对 Cry2Ab 的抗性, 为 Cry1Ac 棉花抗性棉铃虫治理过程中合理使用 Cry2Ab 提供必要的理论支持。

2. 1 材料与方法

2. 1. 1 供试棉铃虫品系

敏感品系(96S, LF): 96S, 1996 年采自河南省新乡棉田; LF 品系为 2002 年采自河北廊坊田间, 二者采后均在室内用人工饲料饲养至今而从未接触任何杀虫剂(梁革梅等, 2000a);

Bt 抗性品系: 三个室内抗性品系分别为 BtR、BtI 和 LFR10。其中 BtR 来源于 96S, 用 Cry1Ac 毒素筛选 75 代而来, 其选育过程参照梁革梅等 (2000b), 其中, 为确保遗传基础与母本的一致, 在第 27 代, 49 代和 69 代分别与母本 96S 进行杂交后继续汰选而来; BtI 为抗 Bt 杀虫剂品系, 用 Bt 杀虫剂筛选 76 代(梁革梅等, 2000b); 抗性品系 LFR10 来源于 LF 品系, 参照 Wu 等方法, 采用 MVP II 选育而成(Wu and Guo, 2004)。

2. 1. 2 主要试剂与仪器

考马斯亮蓝 R250 (Coomassie Brilliant Blue R250)、EGTA (ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether)-N, N'-tetracetic acid)、咪唑(Imidazole)来自 Sigma 公司;

牛血清白蛋白 BSA (Albumin Bovine V)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、考马斯亮蓝 G250(Coomassie Brilliant Blue G250)、丙烯酰胺(Acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(N, N'-Methylen-bis-acrylamide)等来自 Novon;

β -巯基乙醇、N, N, N', N'-四甲基乙二胺(N, N, N, N'-tetramethyl ethylene diamine, TEMED)来自德国 Serva 公司; 甘氨酸(Glycine)来自 Amersham 公司;

标准分子量蛋白来自 Pharmacia, 北京欣经科生物技术有限公司;

其他分析纯、化学试剂均为市售。

高速台式离心机 3K15, Sigma 公司;
恒压恒流 DF-D 电泳仪, 北京东方特立科贸中心;
DYCZ-24D 双垂直电泳槽、电转仪, 北京市六一仪器厂;
凝胶成像系统 Eagle Eye System, 美国 Stragene 公司;

2. 1. 3 部分溶液储存液、缓冲液配方

(1) 30%的丙烯酰胺:

丙烯酰胺	29 g
甲叉双丙烯酰胺	1 g
加水定容至 100 ml	

(2) 3 倍 SDS-PAGE 上样缓冲液:

蔗糖	15 g
SDS	3.45 g
Tris	1.034 g
β -巯基乙醇	7.5 ml
溴芬蓝	少量
加水定容至 50 ml	

(3) SDS-PAGE 分离胶 (10%):

去离子水	1.9 ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	1.3 ml
30%的丙烯酰胺	1.7 ml
10% SDS	50 μ l
10% 过硫酸铵 (AP)	50 μ l
TEMED	2 μ l
总体积 5 ml	

(4) SDS-PAGE 浓缩胶(5%)

去离子水	1.4 ml
30%的丙烯酰胺	0.33 ml
1M Tris-HCl (pH6.8)	0.25 ml
10% SDS	20 μ l
10%过硫酸铵(AP)	20 μ l
TEMED	2 μ l
总体积 2 ml	

(5) 5 倍 SDS 电泳缓冲液贮存液:

Tris	15.1g
------	-------

SDS(电泳级)	5 g
甘氨酸	94 g
加水定容至 1000ml, 调整 pH=8.3, 用时稀释成 1 倍	

(6) 染色液:

考马斯亮蓝 R-250	0.25 g
冰乙酸	10 ml
甲醇	45 ml
去离子水	45 ml

(7) 脱色液:

冰乙酸	10 ml
甲醇	45 ml
去离子水	45 ml

(8) 50 mM PBS(pH 7.4):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	17.91 g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.80 g/L

将二者按一定比例混合并调 pH 值至 7.4, 高压灭菌

2. 1. 4 Bt 毒素及其纯化

Bt 毒素: Cry1Ac 和 Cry2Ab 毒素均由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组张杰研究员提供; 其中前者由 HD-73 菌株中直接提取, 而后者采用 *E.Coli* 表达得到。

20% MVP II 粉剂: 美国 Mycogen 公司产品;

Bt 杀虫剂粉剂: 湖北省农科院 Bt 研究开发中心提供, 效价为 16000 IU/mg, 属 *B. thuringiensis* subsp. *kuratski* (Btk) 系列。

2. 1. 4. 1 Cry1A 类毒素的纯化

三种 Cry1A 毒蛋白(Cry1Aa、Cry1Ab 及 Cry1Ac)的纯化参照 Garczynski (Garczynski *et al.*, 1991) 和 Luo 等 (Luo *et al.*, 1997b) 方法, 即先将毒素用胰蛋白酶进行活化, 肽链在酶的作用下, N-端和 C-端各被切去一部分, 得到具有杀虫活性的毒素核心片段, 然后再将其通过离子交互柱, 得到纯化好的毒素。最后利用凝胶电泳的方法来检测纯度。

2. 1. 4. 2 Cry2Ab 的纯化

由于 Cry2Ab 是从大肠杆菌中表达而来, 且带有 6×His 标签, 因而我们采用镍亲和层析的方法来纯化该蛋白。其具体操作严格按照厂家说明书执行。

1) 样品的处理: 将表达所得的蛋白溶于适当的溶液中, 超声破碎后 $10\ 000\times g$, 4°C 离心

- 10min, 所得沉淀溶于缓冲液 1 中(50mM PBS, pH7.4, 0.5M NaCl), 过 0.45 μ m 滤膜;
- 2) 用缓冲液 1 平衡 5 个床体积, 控制流速为 2ml/min;
 - 3) 将 1) 所得的溶液通过亲和层析柱, 控制流速为 1ml/min;
 - 4) 分别用含 10、20、50、100、200、300、400 mM 咪唑的缓冲液 3 进行阶段洗脱, 控制流速为 2ml/min, 收集各阶段洗脱液, 然后在 280nm 处测定吸收光光度值, 并用 SDS-PAGE 检测各阶段洗脱峰;
 - 5) 用无菌水流洗 5 个柱体积, 再用 20%的乙醇流洗 3 个柱体积, 流速为 2ml/min, 柱子存于 4℃冰箱中。

2. 1. 4. 3 Cry2Ab 中的咪唑的去除

由于在洗脱过程中加入了咪唑, 而咪唑对蛋白间的相互作用具有明显的干扰作用, 为避免咪唑影响, 应尽量除去其中的咪唑。我们采用了分步透析的方法来进行, 也就是说逐步降低透析液中盐离子浓度(以防盐离子浓度突然降低导致蛋白质变性), 具体的透析方法参照《分子克隆实验指南(第二版)》(金冬雁译, 1996)。

- 1) 透析袋的处理: 先用 2%NaHCO₃, 1mM EDTA (pH 8.0)的缓冲液将透析袋煮 10 min, 然后用蒸馏水清洗数遍, 再用 1mM EDTA煮 10min, 直接用于后面的实验, 或者 4℃条件下保存在 2% NaHCO₃, 1mM EDTA (pH 8.0)缓冲液中, 用之前再煮 10min;
- 2) 将纯化后的蛋白装入透析袋中, 用夹子夹紧透析袋的两端, 放入透析液中 4℃透析过夜; 用磁力搅拌器搅拌;
- 3) 将透析后的溶液转入离心管中, 液氮速冻结实, 在冷冻干燥仪中浓缩;
- 4) 浓缩后的样品用 SDS-PAGE 检测。

2. 1. 5 蛋白质含量的测定

以牛血清白蛋白 BSA 为标准, 参照 Bragford (1976)的方法测定所提取的 BBMV 和纯化好的 Cry1A 蛋白中可溶性蛋白质含量。

2. 1. 6 棉铃虫饲养条件及生测方法

棉铃虫各品系饲养条件为: 温度 $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $75 \pm 10\%$ 、光周期 14:10 h (L:D)。

生物测定方法参照梁革梅等的体重抑制法(梁革梅等, 2000a): 待新鲜制备的饲料冷却到 50~60℃时, 将 Bt 毒素加入到饲料中, 搅匀配成系列浓度的饲料。待饲料凝固后, 将含有 Bt 的人工饲料切成小块放入 24 孔小板中, 接入初孵幼虫, 然后盖严。每一 24 孔小板为一重复, 每处理设三个重复。7 天后, 记录存活幼虫的个体数和体重。

2. 1. 7 数据分析

体重抑制法的计算参照下面的公式(1)进行, 先计算各处理的体重抑制率, 取整。然后在 POLO-PC (LeOra Software, Berkeley, CA)里运行程序, 求出各品系对应的 WLC₅₀。

$$IR = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad \text{-----公式 (1)}$$

IR----- 体重抑制率

Inhibition Ratio

W1 -----对照平均体重

Average mass of the control group

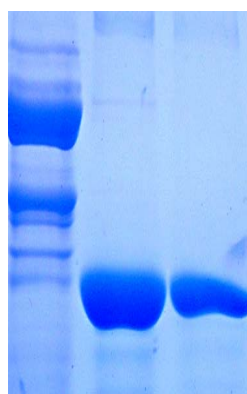
W2 -----每一处理平均体重

Average mass of the treated group

2.2 结果与分析

2.2.1 Cry 毒素的纯化

纯化好的蛋白用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行检测, 以 BSA 为对照, 图 2.1 为 Cry1Ac 的纯化效果图, 我们可以看到在纯化好的蛋白中具有单一的条带, 其分子量大小与牛血清白蛋白大小一致(图 2.1), 应为我们所需要的活化的毒素, 其它两种蛋白 Cry1Aa 和 Cry1Ab 的纯化效果图略。而对于 Cry2Ab, 由于它来自于大肠杆菌表达的重组蛋白, 且带有 6×His-tag, 因而在纯化的过程中, 我们利用了该特点, 先利用亲和层析的方法将表达的目标蛋白偶联在亲和层析柱上, 然后用含有不同浓度咪唑的洗脱液进行洗脱得到纯化的 Cry2Ab。研究发现, 在咪唑浓度为 100mM 时的



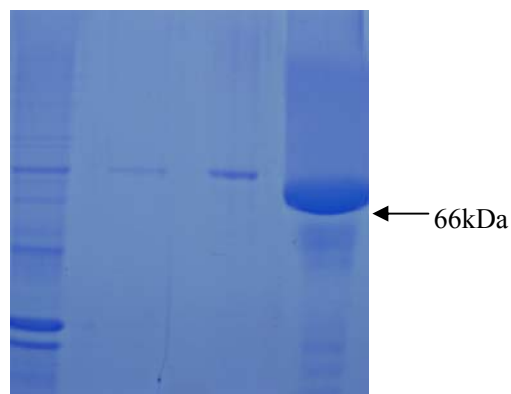
1 2 3

图 2.1: Cry1Ac 的纯化

1、纯化前的Cry1Ac 2、纯化后的Cry1Ac 3、BSA

Fig. 2.1 Purification of Cry1Ac

1、unpurified Cry1Ac 2、purified Cry1Ac 3、BSA



1 2 3 4

图 2.2: Cry2Ab 的纯化

1、纯化前的Cry2Ab 2~3、纯化后的Cry2Ab 4、BSA

Fig. 2.2 Purification of Cry2Ab

1、unpurified Cry2Ab 2~3、purified Cry2Ab 4、BSA

洗脱液中蛋白得到了洗脱。收集该洗脱液, 通过透析的方法设法除去其中的咪唑, 以避免由于样品中含有咪唑而影响后续试验。通过 SDS-PAGE 发现, 在原来刚表达出来的蛋白中含有很多的杂蛋白, 目标蛋白大小约为 70kDa, 而通过纯化后发现在所收集的洗脱液中只能见到同样大小为 70kDa 的蛋白条带(图 2.2)。

表 2.1 Cry1Ac抗、感品系(BtR, BtI, LFR₁₀, 96S, LF)对Cry1Ac的抗性倍数及对Cry2Ab的抗性
Table 2. 1 Toxicity and resistance ratio for Cry1Ac and Cry2Ab toxins in susceptible (96S, LF) and resistant (BtR, BtI and LFR₁₀) *H. armigera* strains

品系 (Strains)	毒素 (Toxins)							
	Cry1Ac				Cry2Ab			
	WLC ₅₀ ^a	95%FL	Slope ± SE	RR ^b	WLC ₅₀	95%FL	Slope ± SE	RR
96S	0.003	0.001 ~ 0.005	0.936 ± 0.106	—	0.148	0.074 ~ 0.255	0.542 ± 0.050	—
LF	0.003	0.002 ~ 0.005	1.051 ± 0.116	1.0	ND ^c	ND	ND	ND
BtI	6.681	5.339 ~ 8.390	1.113 ± 0.103	2227.0	2.799	1.927 ~ 4.041	0.648 ± 0.048	18.9
BtR	8.914	4.705 ~ 20.505	0.903 ± 0.100	2971.3	0.161	0.065 ~ 0.372	0.477 ± 0.043	1.1
LFR ₁₀	0.759	0.407 ~ 1.152	0.966 ± 0.118	253.0	0.150	0.070 ~ 0.272	0.539 ± 0.050	1.0

^a WLC₅₀ 单位: mg毒素/g饲料.
^b 抗性倍数 (抗性品系的WLC₅₀ /敏感品系96S的WLC₅₀).
^c 没有测定
^a WLC₅₀ values are expressed in micrograms of toxin per gram of diet.
^b Resistance ratio (WLC₅₀ for resistant strain/WLC₅₀ for 96S).
^c No detection

2.2.2 供试各品系对 Cry1Ac 的抗性程度

用含Cry1Ac的 20% MVP II 对各品系进行生测,结果如表 1:敏感品系 96S对Cry1Ac的WLC₅₀的值为 0.003 mg蛋白/g饲料。而用Bt杀虫剂筛选的抗性品系BtI的WLC₅₀为 6.681 mg蛋白/g饲料,相对Cry1Ac敏感品系 96S而言,其对Cry1Ac的抗性倍数达 2227.0 倍(表 2.1);同样的,对于用Cry1Ac毒素直接筛选 75 代而来的BtR品系,其WLC₅₀为 8.941mg蛋白/g饲料,抗性倍数为 2971.3 倍;而LFR₁₀的抗性倍数为 253.0 倍。

2.2.3 供试各品系对 Cry2Ab 的抗性程度

生物测定表明,Cry2Ab对用Bt杀虫剂筛选来的对Cry1Ac抗性倍数高达 2227 倍的BtI品系的毒力为 2.799 mg蛋白/g饲料,约为Cry1Ac敏感品系 96S的 18.9 倍(表 2.1),说明BtI品系对Cry2Ab存在交互抗性。而Cry2Ab对用单一蛋白Cry1Ac毒素筛选的两个品系BtR和LFR₁₀的WLC₅₀分别为 0.161 和 0.150 mg蛋白/g饲料,和敏感品系 96S的WLC₅₀(0.148 mg蛋白/g饲料)十分接近。表明二者对Cry2Ab没有交互抗性。

2.3 结论与讨论

随着 Bt 作物的大量种植,使得害虫对 Bt 毒素产生抗性成为威胁 Bt 作物寿命的一个重要因素。为延缓昆虫对 Bt 抗性的产生,延长 Bt 作物的使用寿命,科学家们提出了几种抗性治理策略:1) 将 Bt 作物中毒素的表达量控制在一定水平以允许部分敏感个体存在;2) 高剂量/庇护所策略,也就是如果没有庇护所做“避难”的场所,那么 Bt 作物表达的毒素足够使敏感个体全部被杀死,而庇护所的设立则为敏感个体提供了“避难”的场所;3) 不同的作物使用不同的 Bt 毒素;4) 在同一作物内转入多种 Bt 基因(Zhao *et al.*, 2003)。在这些策略中,第二个和第四个方法被认为是比较有效也最为常用的方法。转双价基因棉的使用的前提是转入的基因对害虫的作用机理不能完全一样或者作用的靶标位点不一样,也就是说它们之间不能存在交互抗性。

Tabashnik 等通过实验发现对 Cry1Ac 具有抗性的红铃虫很难在 Bollgard II (Cry1Ac+Cry2Ab) 上存活,说明对 Cry1Ac 具有抗性的红铃虫对 Cry2Ab 不具有交互抗性(Tabashnik *et al.*, 2002b); Akhurst 等发现 Cry1Ac 抗性棉铃虫 BX 品系对含有 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry2Ab 的 Bt 杀虫剂 Dipel 敏感,但对只含有 Cry1Ac 的 MVP 具有抗性,这说明 Cry1Ac 抗性品系 BX 对 Cry2Ab 不具有交互抗性(Akhurst *et al.*, 2003);但是, Gould 等发现具有 Cry1Ac 抗性的烟芽夜蛾对 Cry2A 具有交互抗性(Gould *et al.*, 1992),这说明了不同昆虫对不同毒素的交互抗性程度不一致。因而,尽管国外已有相关的报道,但在我国,了解 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 的交互抗性对于合理利用 Cry2Ab 是非常必要的。

本实验表明,与敏感品系 96S比较,用单一的Cry1Ac筛选 75 代后, BtR品系对Cry1Ac具有 2971.3 倍的高度抗性,而另一用单一Cry1Ac杀虫蛋白筛选的LFR₁₀品系对Cry1Ac的抗性倍数为 253.0 倍。进一步对Cry2Ab的生物测定表明, Cry2Ab对二者的毒力与敏感品系相当,这说明了用单一的Cry1Ac杀虫蛋白筛选而来的两个Cry1Ac棉铃虫抗性品系BtR和LFR₁₀均不会对Cry2Ab产生

交互抗性, 即对Cry1Ac具有抗性的棉铃虫并不会对Cry2Ab具有交互抗性。

而在用具有多种毒素的 Bt 粉剂筛选而来的抗性品系 BtI 中, 生物测定表明该品系对 Cry1Ac 具有 2227.0 倍的抗性, 同时, 其对 Cry2Ab 产生了约 18.9 倍的抗性。产生这种现象的原因可能有两个: 一是杀虫剂粉剂中 Cry2Ab 的含量不高, 害虫没有在一个高压的选择下, 所以对 Cry2Ab 的抗性发展相当缓慢; 另一个原因是由于粉剂中含有多种杀虫蛋白, 害虫在多种毒素的作用下, 抗性的进化缓慢。我们认为后者的可能性更大, 这说明了多种毒素对于延缓昆虫对 Bt 的抗性具有一定的作用, 因而多基因策略在转基因作物的应用中是可行的。

国外研究表明, Cry2Ab 的杀虫谱和 Cry1Ac 也不一样。例如 Adamczyk 等研究发现, 与第一代转基因棉 Bollgard (Cry1Ac)和常规棉相比较, 第二代转基因棉 Bollgard II (Cry1Ac+Cry2Ab) 棉田中鳞翅目害虫种类更少, 表明 Cry2Ab 由于和 Cry1Ac 的作用机理不一样, 前者能杀死对 Cry1Ac 并不敏感的甜菜夜蛾和大豆夜蛾(soybean looper) (Adamczyk *et al.*, 2001); Stewart 和 Chitkowski 等研究也发现在 Bollgard II 棉田中, 烟草天蛾、菜豆卷叶蛾(*Pseudoplusia includens*) 和草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) 的数量比 Bollgard 和常规棉中的少(Stewart *et al.*, 2001; Chitkowski *et al.*, 2003)。因此, 从扩大杀虫谱的角度而言, Bollgard II 有利于扩大防治谱。但正如前文所讲到的, 不同害虫对相同毒素的敏感性不一样, 在我国特定的环境条件下, Cry2Ab 与 Cry1Ac 的同时应用是否能扩大杀虫谱的相关试验还需要通过进一步的田间试验来验证。

第三章 Cry1Ac 抗、感棉铃虫酯酶比较

从 Bt 的作用机理可知, 昆虫对 Bt 抗性的产生受到诸多因素的影响, 昆虫体内酶液、结合位点等因素的改变通常会影响到昆虫对 Bt 抗性的产生。研究表明昆虫对 Bt 的抗性与参与 Bt 毒素溶解和活化的酶密切相关(Oppert *et al.*, 1996, 1997; Sangadala *et al.*, 1994; Forcada *et al.*, 1996, 1999; Herrero *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Jurat-Fuentes and Adang, 2004b; Gunning *et al.*, 2005; Sayyed *et al.*, 2005)。Gunning 等认为在棉铃虫中, 酯酶含量的增加使得酶能结合更多的毒素, 从而在一定程度上缓解 Cry1Ac 对中肠上皮细胞的破坏作用, 最终导致 Cry1Ac 对昆虫毒性的降低, 表现为抗性的上升(Gunning *et al.*, 2005)。而在酯酶中, 碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, ALP)则被认为是一种影响昆虫对 Bt 抗性的主要酯酶。Sangadala 等曾报道 Cry1Ac 可使碱性磷酸酯酶的活性下降 52%, 说明 Cry1Ac 和碱性磷酸酯酶是相互作用的(Sangadala *et al.*, 1994); 而 Jurat-Fuentes 和 Adang 通过实验验证了抗性品系中碱性磷酸酯酶的表达量的减少直接导致了碱性磷酸酯酶活性的降低, 并引起 Cry1Ac 毒素与受体结合量的减少, 最终导致对 Cry1Ac 抗性的上升, 表明烟芽夜蛾中碱性磷酸酯酶活性的减少与抗性直接相关(Jurat-Fuentes and Adang, 2004b)。

为了更好的了解 Cry1Ac 抗、感棉铃虫品系的生化基础, 同时也为明确酯酶与 Cry1Ac 抗性的关系, 本章利用酶标板动力学等方法测定了各品系的总酯酶、碱性磷酸酯酶和酸性磷酸酯酶活力及总酯酶与 Cry1Ac 前毒素、毒素的相互作用。

3. 1 材料与方法

3. 1. 1 供试昆虫与毒素

实验采用 96S 品系、BtR 品系及其它们的杂交子一代 F_1 代 $F_{1s\sigma}$ ($96S\sigma \times BtR\eta$) 和 $F_{1s\eta}$ ($96S\sigma \times BtR\eta$), 具体饲养方法及条件见第二章。生测结果表明, 相对于敏感品系 96S 而言, BtR、 $F_{1s\sigma}$ 和 $F_{1s\eta}$ 对 Cry1Ac 抗性倍数分别为 2971 倍、8 和 9 倍, 待供试昆虫长到 3~4mg 时, 挑取发育一致的幼虫, 单头或 20 头装入离心管中, 液氮速冻后立即使用或存于 -80℃ 冰箱中备用。

本章中所用毒素为未经胰蛋白活化的 Cry1Ac 前毒素以及经胰蛋白酶活化的 Cry1Ac 毒素, 具体纯化过程见第二章。

3. 1. 2 主要试剂与仪器

对-硝基苯磷酸二钠、对-硝基苯酚 (*p*-NPP)、 α -乙酸萘酯(α -naphthyl acetate)、固牢兰 RR 盐(Fast blue RR salt)等购自 Sigma 公司, 其余为市售;

酶标仪为 Bio-Rad 公司产品, 型号为 Microplate Reader 550。

3. 1. 3 部分试剂及缓冲液的配制

(1) 0.2 M PBS (pH 7.0, 6.0)

0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 g/L

0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 g/L

将二者混合, 用后者调整 pH 到 7.0 和 6.0

(2) 0.02 M PBS (pH 7.0)

0.02 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.164 g/L

0.02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.121 g/L

将二者混合, 用后者调整 pH 到 7.0

(3) 0.2 M 醋酸缓冲液 (pH 4.6)

1.15 ml 99.5%冰乙酸 定容到 100 ml

1.64 g 无水醋酸钠 用蒸馏水定容到 100 ml

将二者混合, 调整 pH 至 4.6

(4) 0.0075 M 对-硝基苯磷酸二钠

取 0.1392 g 对-硝基苯磷酸二钠, 用蒸馏水定容到 50 ml

(5) 0.1 M 氢氧化钠

取 0.4 g 氢氧化钠, 用蒸馏水定容至 100 ml

(6) 5×10^{-4} 对-硝基苯酚溶液

取 0.139 g 对-硝基苯酚, 并用丙酮定容到 10 ml, 配制成 0.1 M 母液

取母液 0.5 ml, 用蒸馏水定容到 100 ml

(7) 0.04 M 巴比妥钠-盐酸溶液 (pH 9.6)

巴比妥钠 0.825 g 蒸馏水定容到 100 ml

36% 盐酸 1.724 ml 蒸馏水定容到 100 ml

将两者混合, 调整 pH 到 9.6

(8) 酯酶提取液 buffer A

Triton X-100 1.6 ml

蔗糖 10 g

溴甲酚紫 少量

用 0.02 M 磷酸缓冲液定容到 100 ml

(9) 酯酶提取液 buffer B

Triton X-100 0.05 ml

0.02 M 的磷酸缓冲液定容到 100 ml

(10) 酯酶染色液

α -乙酸萘酯 1.86

固牢兰 RR 盐 0.6

用适量丙酮溶解前者，再用 0.2 M PBS (pH 6.0)定容到 100 ml

(11) 分离胶缓冲液 (pH 8.9)

48 ml 1 N 盐酸+36.3 g Tris+蒸馏水 定容到 100 ml，调整 pH 到 8.9

(12) 成层胶缓冲液 (pH 6.7)

48 ml 1 N 盐酸 + 5.98 g Tris + 蒸馏水 定容到 100 ml，调整 pH 到 6.7

(13) 丙烯酰胺溶液

30 g 丙烯酰胺 + 0.8 g Bis + 蒸馏水 定容到 100 ml

(14) 电泳缓冲液 (pH 8.3)

0.6 g Tris + 2.88 g 甘氨酸 + 蒸馏水 定容到 1000 ml

(15) 酯酶染色液

α -乙酸萘酯 0.0186

固牢兰 RR 盐 0.2

用适量丙酮溶解前者，再用 pH 6.0 的 PBS 定容到 100 ml

(16) 0.1 M PBS (pH 7.0)

0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.82 g/L

0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6 g/L

将二者混合，用后者调整 pH 到 7.0

其它未特别注明的试剂及溶液参照前文所述

3. 1. 4 酶液的制备、活力测定及酶谱分析

3. 1. 4. 1 酶液的制备

酶谱分析用酯酶的制备参照 Gunning 等的方法(Gunning *et al.*, 1996; 2005)，将单头幼虫从冰箱中取出，加入 200 μl buffer A，低温匀浆，4℃，10 000×g 离心 10 min 所得上清即为酶液。

酶活力测定用酶液在参照 Gunning 等的方法基础上略做改动(Gunning *et al.*, 2005)，往装有 20 头幼虫的管中加入 1 ml buffer B，低温匀浆，4℃，10 000×g 离心 10 min 所得上清即为酶液。

酯酶中可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 方法测定(Bradford, 1976)。

3. 1. 4. 2 酶谱分析

凝胶的配制如下：

7.5%分离胶的制备：分离胶缓冲液 2.5 ml，丙烯酰胺 4.9 ml，5%TEMED 0.6 ml，水 11.8 ml，

过硫酸胺 0.2 ml, 将以上溶液迅速混匀, 轻轻注入电泳槽中, 用蒸馏水覆盖, 静置 10 min, 待凝固后吸出表面水分。

4%成层胶的制备: 成层胶缓冲液 1.25 ml, 丙烯酰胺 1.32 ml, 5%TEMED 0.3 ml, 水 7.0 ml, 过硫酸胺 0.1 ml, 迅速混匀上述溶液并注入分离胶表面, 插入样品梳, 然后静置 10 min, 待凝固后, 将样品梳取出, 加入电极缓冲液。

取酶液 20 μ l, 4℃环境中 250 V 电泳, 待样品接近分离胶底部时停止电泳, 用酯酶染色液染色至条带清晰为止。

3. 1. 4. 3 酯酶活性测定(酶标板酶动力学法)

酶标板酶动力学法测定酶活性具有高通量, 简便等特点, 因而得到广泛的应用。用酶标仪测定酶活力的方法具体参照 Gunning 等所述(Gunning *et al.*, 2005)。

总酯酶活性分析: 往空白酶标板中每孔加入 10 μ l 酶液, 然后用多通道移液器迅速加入 240 μ l buffer C, 然后用 Bio-Rad 公司产品 Microplate Reader 550 测定其在 450 nm 处吸收光值, 设定每间隔 15 s 记录一次光密度值, 共记录 20 次, 酶促反应阶段温度为 27℃。实验共设 3 次重复, 每次重复匀浆 6 管, 每管测定 6 次酶活性。最后取光密度值 0~3.5 之间的数据计算反应速度, 以反应速度表示酶活力($\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。用 SAS 软件进行显著性测验(SAS, 1998)。

碱性磷酸酯酶活性分析: 试验设计同上, 参照 Bessey (1946)的方法, 反应混合液中含有 0.4 M 巴比妥钠-盐酸溶液 720 μ l, 酶液 30 μ l, 0.0075 M 对-硝基苯磷酸二钠溶液 150 μ l。将混合液混匀后, 在 37℃水浴中振荡温育。30 min 后及时加入 0.1 M 氢氧化钠 600 μ l 终止反应。用 Microplate Reader 550 在 405nm 处测定吸收光值。以对-硝基苯酚溶液为底物做标准曲线。用 SAS 软件进行显著性测验。

酸性磷酸酯酶活性分析: 用 0.2 M 醋酸缓冲液代替 0.4 M 巴比妥钠-盐酸溶液。其它试剂及方法同碱性磷酸酯酶活力测定。用 SAS 软件进行显著性测验。

3. 1. 5 Cry1Ac 前毒素与酶液的相互作用

3. 1. 5. 1 Cry1Ac 毒素与酯酶液的抑制作用

参照 Gunning 等的方法(Gunning *et al.*, 2005), 将 Cry1Ac 前毒素和毒素分别用 pH 为 9.5 的碳酸钠缓冲液稀释成 9 个浓度梯度。取 50 μ l 酯酶液, 再加入 100 μ l 上述系列浓度毒素, 使毒素和前毒素的终浓度分别为 4×10^{-8} 、 8×10^{-8} 、 2×10^{-7} 、 4×10^{-7} 、 8×10^{-7} 、 2×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 2×10^{-5} 、 8×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$, 以加入 100 μ l 碳酸钠缓冲液为对照, 室温温育 60 min 后测定总酯酶活性, 根据酯酶活性的变化来确定酯酶与毒素是否发生结合。

3. 1. 5. 2 酯酶液对 Cry1Ac 前毒素的酶解作用

参照 Karumbaiah 的方法并稍做改动(Karumbaiah *et al.*, 2007)。

定量实验: 将 20 μg 的 Cry1Ac 前毒素加入 1.5 ml 的离心管中, 分别将含有 5 μg 、10 μg 、20 μg 、30 μg 、50 μg 和 100 μg 可溶性蛋白的酶液加入到离心管中, 室温反应 2 小时。将混合物

放入沸水中煮 10 min 以终止反应,待冷却后加入 $3\times$ SDS 上样缓冲液后再煮 10 min,然后点样进行 SDS-PAGE 电泳。用考马斯亮兰进行染色,脱色至条带清晰,拍照。

定时实验: 根据定量实验确定应加入的酶和 Cry1Ac 前毒素的量,使之反应,按定量实验中的方法来终止反应,反应时间分别设为 1 min、10 min、30 min、60 min、2 hr、4 hr。后续操作同定量实验。用考马斯亮兰进行染色,脱色至条带清晰,拍照。

3.2 结果与分析

3.2.1 酶谱分析

我们对幼虫酯酶图谱进行了分析,结果如图 3.1。在Cry1Ac敏感品系 96S中,我们仅能见到两条比较清晰的条带。而在Cry1Ac抗性品系BtR中,其酯酶条带明显较Cry1Ac敏感品系丰富。对它们进行杂交,发现在它们杂交后的子一代 F_1 中, $F_{1s\sigma}$ ($96S\sigma\times BtR\sigma$)和 $F_{1s\varphi}$ ($96S\sigma\times BtR\varphi$)具有相同的酶谱(图 3.1),且 F_1 的酶谱是二者“叠加”而得来,说明了在棉铃虫品系中,酯酶具有可遗传性,同时,两种杂交后代在酶谱上的无差异性说明酯酶的遗传可能与性连锁无关。

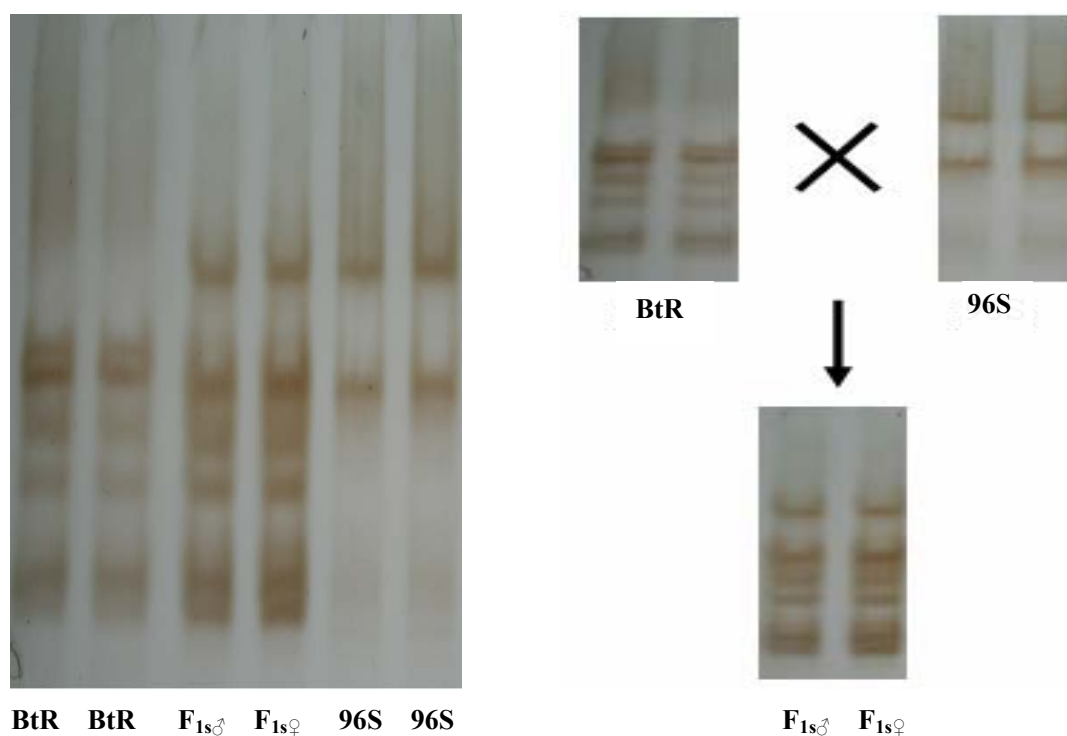


图 3.1 各品系酯酶电泳图

Fig. 3.1 Esterase analysis of *H. armigera* (96S, BtR, $F_{1s\sigma}$ and $F_{1s\varphi}$) on polyacrylamide gel

3.2.2 酶活性分析

总酯酶活性分析发现,对Cry1Ac具有抗性的棉铃虫酯酶活性显著高于敏感品系和二者杂交后的子一代(表 3.1)。在Cry1Ac敏感品系 96S中,酶活性只有 $139.3 \text{ mOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$,而抗性品系BtR具有较高的酯酶活性($461.5 \text{ mOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$);二者杂交后代 $F_{1s\sigma}$ 和 $F_{1s\varphi}$ 的总酯酶活性分别为 187

$\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $181 \text{ mOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 二者没有显著性差异(表 3.1)。同时对各品系酸性磷酸酯酶、碱性磷酸酯酶的酶活性测定表明: 各品系中的酸性磷酸酶的酶活性无显著性差异, 但敏感品系中的碱性磷酸酯酶活性显著高于抗性品系; 而两个杂交 F_1 代的碱性磷酸酯酶的活性介于敏感品系和抗性品系之间, 且两个杂交后代之间没有显著性差异。因此, 酯酶含量的变化与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性密切相关, 其中与碱性磷酸酯酶的变化最为密切。比较两个杂交后代 $F_{1s\sigma}$ 和 $F_{1s\varphi}$ 在酶活性方面的差异进一步说明了在棉铃虫中酯酶的遗传并不是伴性遗传的, 也就是说酯酶的遗传与性连锁无关。

表 3.1 各棉铃虫品系中各酯酶活性测定
Table 3.1 Determination of total esterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase in *H.armigera*

品系 strain	总酯酶活性 Activity of total esterase	碱性磷酸酯酶活性 Activity of Alkaline phosphatase	酸性磷酸酯酶活性 Activity of acid phosphatase
96S	$139.3 \pm 1.27 \text{ a}$	$69.3 \pm 1.28 \text{ a}$	$34.9 \pm 1.89 \text{ a}$
BtR	$461.5 \pm 4.14 \text{ b}$	$28.5 \pm 4.13 \text{ b}$	$33.6 \pm 1.46 \text{ a}$
$F_{1s\sigma}$	$187.3 \pm 2.09 \text{ c}$	$40.3 \pm 2.09 \text{ c}$	$33.3 \pm 0.76 \text{ a}$
$F_{1s\varphi}$	$181.2 \pm 1.72 \text{ c}$	$41.2 \pm 1.71 \text{ c}$	$34.2 \pm 0.82 \text{ a}$

注: 同一列中字母不同者表示差异显著, 显著水平为 $p=0.05$ (Duncan's 新复极差检验)

Note: Different case letters in same subcolumn was significant difference, $p=0.05$ (Duncan' test)

3. 2. 3 Cry1Ac 前毒素对酯酶的抑制作用

利用酯酶与Cry1Ac前毒素的作用前后总酯酶活性的变化, 可以明确Cry1Ac前毒素是否与昆虫体内酶液相互作用。结果表明: 抗性品系的酯酶能与Cry1Ac毒素及其前毒素结合, 而敏感品系则不能(图 3.2); Cry1Ac前毒素对 $F_{1s\sigma}$ 、 $F_{1s\varphi}$ 中的酯酶活性的影响表现出一致性, 且结合能力介于敏感品系和抗性品系之间, 表明前毒素在两个杂交子一代中的作用是相似的, 更进一步说明了酯酶在遗传过程中与性连锁无关。

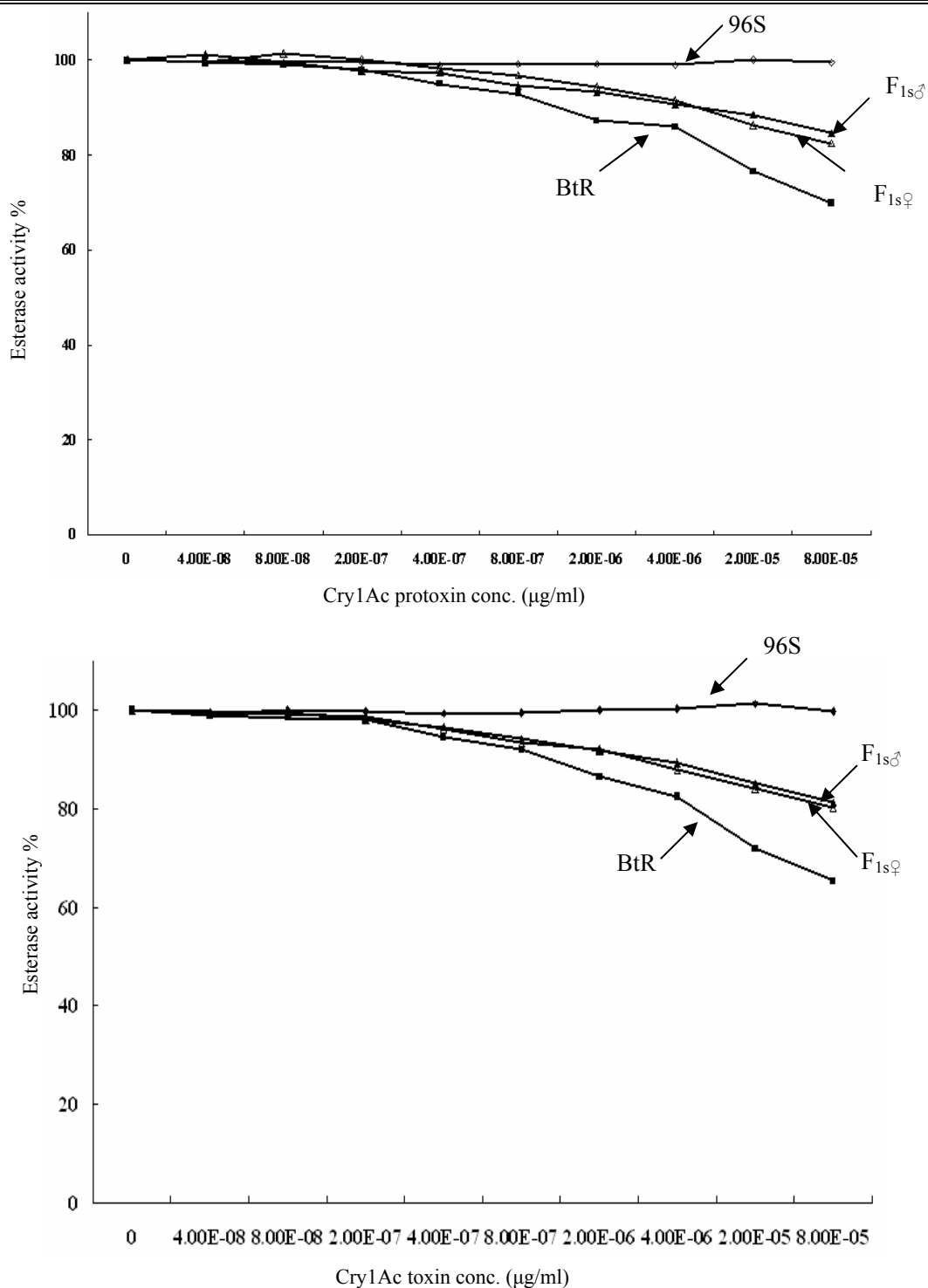


图 3. 2 Cry1Ac 前毒素(A)和毒素(B)对棉铃虫各品系酯酶活性的抑制作用
Fig. 3.2 Esterase inhibition by Cry1Ac protoxin (A) and Cry1Ac toxin (B) in 96S, BtR, F_{1S}♂ and F_{1S}♀ strains of *H. armigera*.

3. 2. 4 酯酶液对 Cry1Ac 前毒素的酶解作用

为明确酯酶对Cry1Ac前毒素酶解的量效关系, 我们选用不同蛋白含量的酯酶与 20 μg的Cry1Ac前毒素反应。结果发现, 对于敏感品系, 在酯酶含有 10 μg可溶性蛋白时Cry1Ac前毒素的

降解就发生了,而在 20 μg 时我们可以清楚的看到原毒素被酶解后的蛋白条带,大小为 65 kDa左右(图 3.3 A);而对于 F_1 代,则在 20 μg 时开始酶解,40 μg 时能看到清楚的被活化的蛋白条带(图 3.3 B)。在反应所用的Cry1Ac前毒素的量一致的情况下,抗性品系BtR在 60 μg 酯酶液时才发现有原毒素的降解,到 100 μg 时能看到比较清晰的被降解的条带(图 3.3 C)。

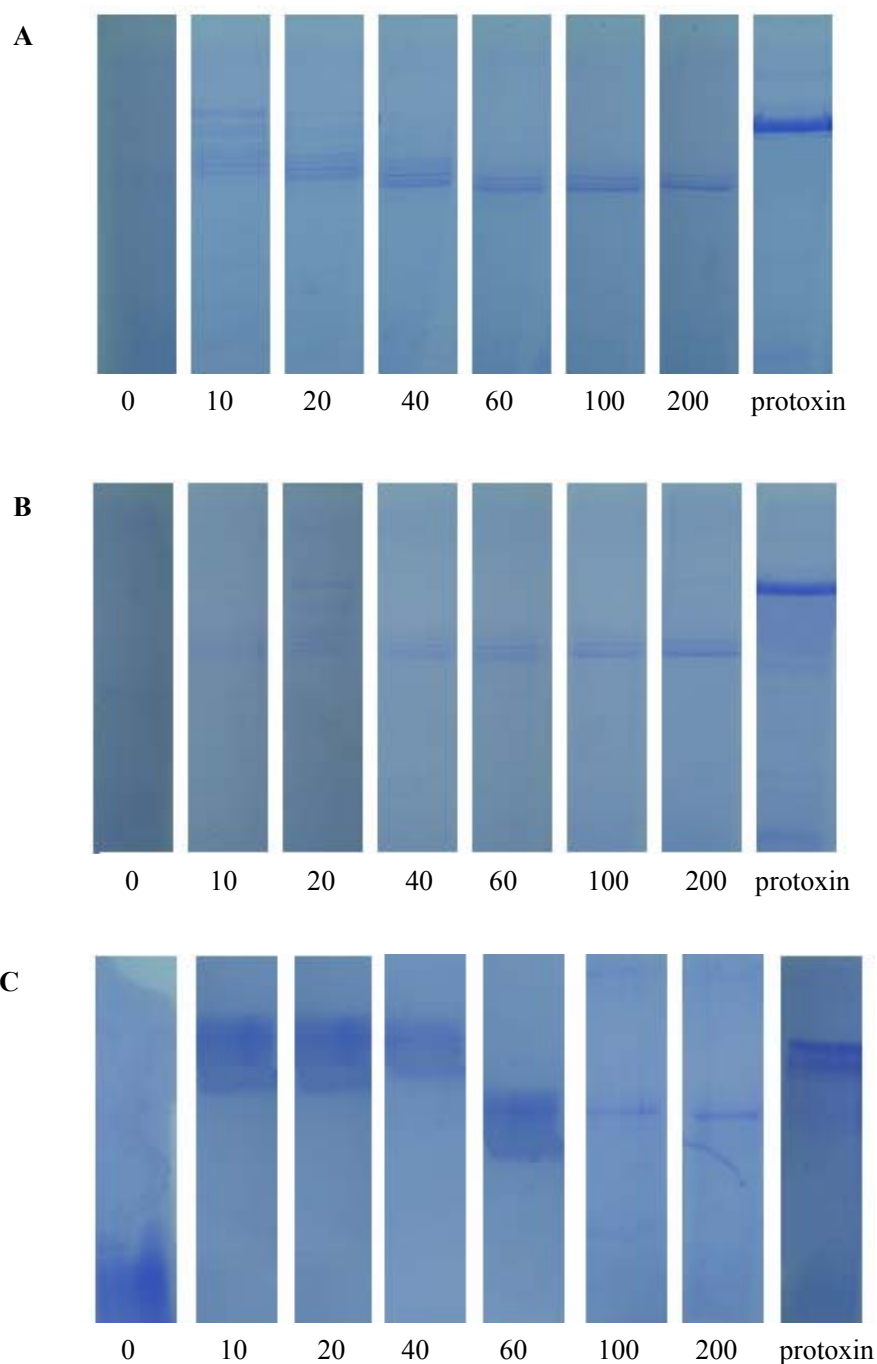


图 3.3 96S (A)、 F_1 (B)和BtR (C)中不同蛋白含量酯酶液对Cry1Ac前毒素的酶解作用

注: 相应泳道下的数字表示加入的酯酶液中可溶性蛋白质的含量

Fig. 3.3 Cry1Ac protoxin activation by increasing esterase from larvae of 96S (A), F_1 (B)and BtR (C) strains of *H. armigera*.

Note: The number below the lane corresponding to the amount of protein in the esterases

在上面实验的基础上,我们选择了含 50 μg 可溶性蛋白的各品系酯酶液对 20 μg Cry1Ac 前毒素进行处理,以明确酯酶液对前毒素酶解的作用,结果如图 3.4 所示。当用 96S 品系的酯酶液处理时,在 1 min 内就发生了降解,在 1 min~60 min 内,我们可以看到原毒素被降解成三条大小相当接近的中间态蛋白条带,在 60 分钟时,65kDa 的蛋白条带就显得特别突出,2 小时后能看到一

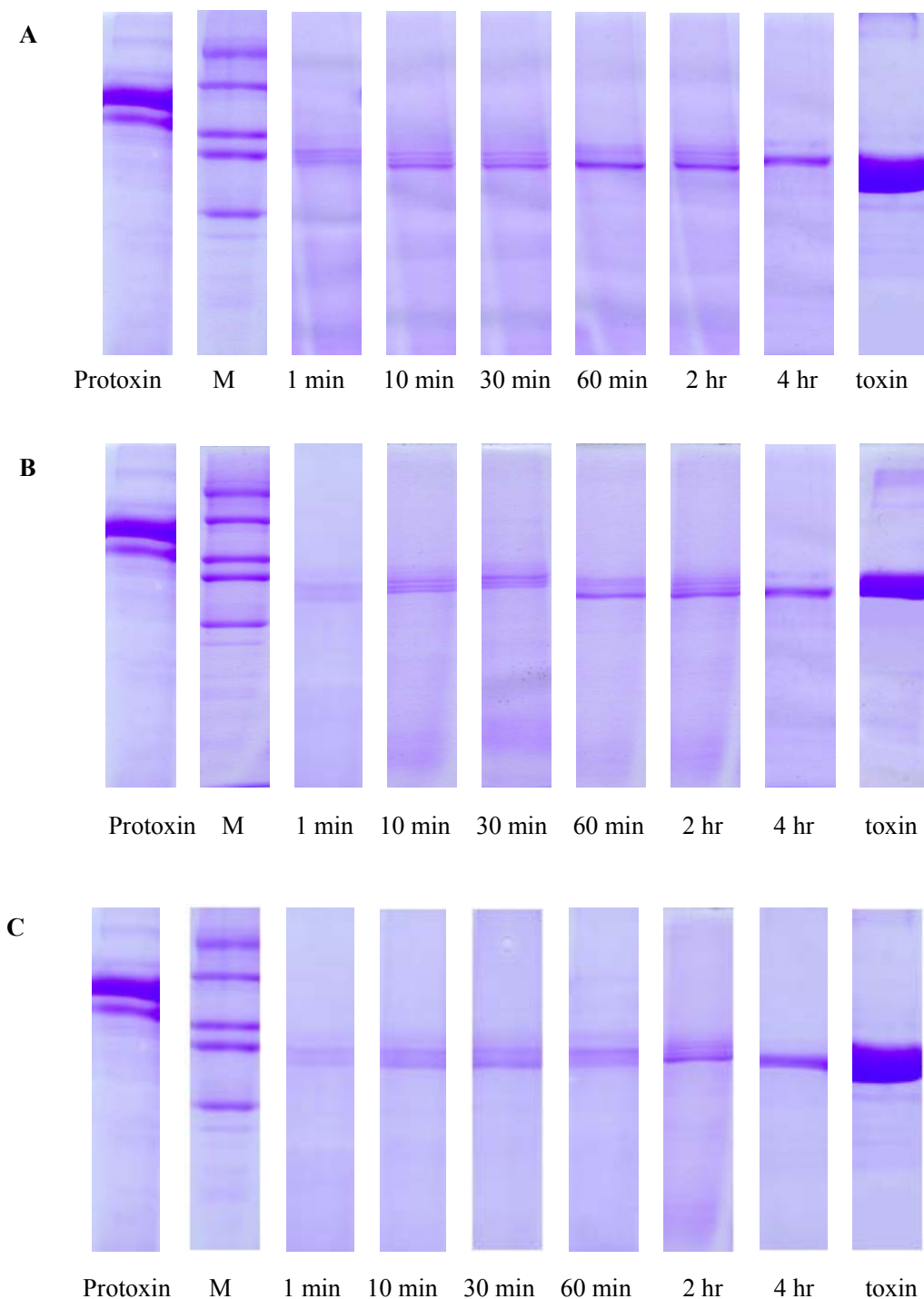


图 3.4 Cry1Ac 前毒素在不同品系酯酶液中的酶解过程 (A. 96S; B. F₁; C. BtR)

Fig. 3.4 The activation of Cry1Ac protoxin procession in different strains of *H. armigera*. (A. 96S; B. F₁; C. BtR)

条非常清晰的被降解的蛋白条带,说明前毒素已经完全被酯酶液所降解(图 3.4 A)。用F₁的酯酶液处理时,酯酶液作用 1 分钟后能模糊的看到被活化的原毒素中间态蛋白,10 分钟时可以看到被降解的三条中间态蛋白条带。随着作用时间的增长,1 小时后,绝大部分原毒素从中间态降解到 65 kDa 左右,到 4 小时时,原毒素已彻底被降解成 65 kDa 左右的毒素片段(图 3.4 B)。BtR 品系的酯酶液对前毒素的处理结果显示在 1~10 分钟时,原毒素开始被降解,但条带不清晰,到 30 分钟时,能清晰的看到原毒素被降解。2 小时后,开始看到一条比较明显的 65 kDa 蛋白条带,到 4 小时,前毒素基本被降解成毒素(图 3.4C)。

3.3 结论与讨论

昆虫的碱性磷酸酯酶广泛分布于昆虫的肠体和马氏管中(Eguchi, 1995),碱性磷酸酯酶的活性与昆虫对 Cry1Ac 的敏感性密切相关。English 和 Readdy 曾报道在烟芽夜蛾中存在一大一小为 72kDa 的碱性磷酸酯酶,且能被 Cry1Ac 所抑制,说明碱性磷酸酯酶和 Cry1Ac 在烟芽夜蛾体内毒性的发挥密切相关(English and Readdy, 1989)。在烟草天蛾中, Sangadala 等曾报道 Cry1Ac 最大可使碱性磷酸酯酶的活性下降 52%,同时也发现少量的 Cry1Ac 对碱性磷酸酯酶的活性没有降低作用(Sangadala *et al.*, 1994)。而 Zhuang 等在分离烟草天蛾中肠上皮细胞的脂筏时发现一个 66kDa 的蛋白,该蛋白通过 GPI 锚定(Zhuang *et al.*, 2002);随后, Jurat-Fuentes 和 Adang 认为他们所发现的大小为 68kDa 的蛋白就是 Zhuang 等发现的那个蛋白,并通过实验验证了由于抗性品系中碱性磷酸酯酶的表达量的减少直接导致了碱性磷酸酯酶活性的降低,并引起 Cry1Ac 毒素结合量的减少,最终导致了昆虫对 Cry1Ac 抗性的上升(Jurat-Fuentes and Adang, 2004b)。Gunning 等认为在棉铃虫中,酯酶含量的增加使得酶能将毒素缠绕起来,即发生一种非特异性的结合,这种结合在一定程度上缓解 Cry1Ac 对中肠上皮细胞的破坏作用,最终导致 Cry1Ac 对昆虫毒性的降低,表现为抗性的上升(Gunning *et al.*, 2005)。本研究也同样发现了这一现象,抗性的增加与酯酶活性呈正相关。同时,用 Cry1Ac 前毒素和活化的毒素对酶液的处理发现,敏感品系的酶液与 Cry1Ac 之间不能结合,但抗性品系能结合 Cry1Ac 前毒素和活化毒素,这在一定程度上验证了 Gunning 等的实验。

在用 BteHD-198 筛选的印度谷螟(*P. interpunctella*)抗性品系 198^r中,抗性品系中肠提取物的蛋白水解酶的活性较敏感品系低,并且对 Cry1Ac 前毒素的酶解作用降低(Oppert *et al.*, 1996)。进一步的研究表明对 Cry1Ac 敏感性的降低与中肠中一种主要蛋白酶的缺失密切相关(Oppert *et al.*, 1997)。而且,在随后的研究中发现该种群对 Cry1Ab 前毒素的抗性是其对 Cry1Ab 毒素的 11 倍,从而确证了该酶参与了毒素的酶解,由于该酶的缺失而导致了抗性的产生(Herrero *et al.*, 2001)。我们测定了不同敏感程度棉铃虫的酶液的碱性磷酸酯酶和酸性磷酸酶的活性,发现各品系之间在酸性磷酸酯酶方面没有显著性差异,而抗性品系中的碱性磷酸酯酶活性明显低于敏感品系和杂交种群,因此碱性磷酸酯酶的降低可能与棉铃虫对 Cry1Ac 抗性相关,但具体的确认有待于进一步从分子生物学的角度来加以验证。该结论的成立将为利用该方法监测田间抗性种群提供新的思路与方法。

Forcada 曾报道在烟芽夜蛾抗性品系 CP73-3 中,与敏感品系相比较,其对 Cry1Ab 前毒素的加工明显减慢,而在中肠中对活化的 Cry1Ab 毒素的分解加快(Forcada *et al.*, 1996)。在我们的研究中发现,对于各品系的酯酶而言,在相同时间降解同样多的 Cry1Ac 前毒素所需要的酯酶的量

随抗性的上升而增加。同时我们将等量各品系的酯酶液处理 Cry1Ac 前毒素发现,虽然在降解的过程中均存在三条中间态的蛋白。但敏感品系对前毒素的降解作用明显强于抗性品系的作用,在 1 分钟时就有中间态蛋白产生,杂交品系次之,而抗性品系在 10min 后才开始出现明显的中间态。三个品系最后达到稳定的 65kDa 毒素片断所需要的时间也不一样,敏感品系、杂交品系和抗性品系分别需要 1 小时、2 小时和 4 小时。同时,这说明了随着抗性的增加,酯酶对前毒素的活化加工作用变得迟钝,而前毒素只有被降解成毒素核心片断后才能与昆虫中肠上皮细胞膜上的受体发生结合,最终导致昆虫死亡,因此,这样一来就使得可以和昆虫中肠上皮细胞膜上受体结合的毒素的量减少,结合量的减少必然导致昆虫对 Cry1Ac 毒素的敏感性降低,即昆虫对毒素的处理变得不敏感。因此我们的实验说明了棉铃虫酯酶对 Cry1Ac 前毒素的降解具有很重要的意义,并关系到棉铃虫是否对 Cry1Ac 敏感,因此棉铃虫酯酶的变化与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性密切相关。

同时,对杂交后代的研究发现,杂交子一代之间无论是在酶活(总酯酶、碱性磷酸酯酶和酸性磷酸酯酶)还是在酶谱上均没有区别,说明了在棉铃虫中,与 Cry1Ac 抗性相关的酯酶的遗传并非伴性遗传,也就是说酯酶的遗传与性连锁无关。

综述以上研究结果,我们推测在 Cry1Ac 抗性棉铃虫体内,酯酶的增加和碱性磷酸酯酶的减少与 Cry1Ac 抗性密切相关。碱性磷酸酯酶的减少降低了将 Cry1Ac 毒素活化成具有杀虫毒性的 Cry1Ac 毒素的效率,使得可发挥毒效的 Cry1Ac 毒素的相对量的减少。同时,酯酶的增加使得酯酶能有更多的机会与 Cry1Ac 毒素发生非特异性的结合,结合的结果是使得 Cry1Ac 毒素与中肠上皮细胞上的毒素结合的机会减少,从而使得昆虫对 Cry1Ac 毒素表现出不敏感性或者敏感性降低,即表现为抗性的上升。

第四章 Cry1Ac 抗性棉铃虫 BBMV 与 Bt 毒素的相互作用

Oddou 等发现在烟芽夜蛾中 Cry1Ac 有 140kDa 和 120kDa 两种受体蛋白, 而另一 170kDa 的受体蛋白可以与毒素 Cry1Aa 和 Cry1Ab 结合, 但可能存在不同的结合位点(Oddou *et al.*, 1993)。在烟草天蛾中 Cry1Ac 识别 120kDa 的蛋白(Garczynski *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1994), 但是 Cry1Ab 识别的是一大小为 210kDa 的蛋白, 而 Cry1C 结合的蛋白为 40kDa (Vadlamudi *et al.*, 1993)。因此, Bt 毒素与 Bt 之间不是简单的一一对应关系, 不同的毒素可能结合不同的蛋白, 也可能结合相同的蛋白的不同结合位点(Garczynski *et al.*, 1995)。

多数研究认为, 不同毒素结合相同结合位点是交互抗性产生的基础。从第二章的研究结果来看, Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 并不存在交互抗性, 那么在棉铃虫中是否也是因为结合位点的不同而导致 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性呢? 到目前为止, 尚未有研究从结合动力学或生化、分子的角度来报道 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不具有交互抗性的本质。鉴于此, 本章通过体外标记结合的方法研究了 Cry1Ac 抗性棉铃虫中肠 BBMV 与 Cry2Ab 和 Cry1A 毒素的结合动力学差异, 从结合位点模型的角度解释了 Cry2Ab 对 Cry1Ac 抗性棉铃虫不存在交互抗性的原因, 同时, 实验还明确了棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性的主要机制。

4. 1 材料与试剂

4. 1. 1 供试棉铃虫

同第二章(敏感品系: 96S、LF; 抗性品系: LFR₁₀、BtR)

4. 1. 2 主要试剂

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、甘露醇(D-mannitol)、CHAPS(3-[(3-cholami- dopropyl) dimethylammonio]-1-Propanesulfonate)等来自 NOVON, 由北京绿生源生物技术有限公司经销;

β -巯基乙醇、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(N, N, N, N'-tetramethyl ethylene diamine, TEMED)来自 Serva 公司; 甘氨酸(Glycine)来自 Amersham 公司;

标准分子量蛋白来自 Pharmacia, 北京欣经科生物技术有限公司经销;

Na¹²⁵I来自Pharmacia, 中国同位素公司经销;

其他分析纯、化学试剂均为市售。

4. 1. 3 部分储存液、缓冲液配方

(1) 缓冲液 A:

manitol	300 mM
EGTA	5 mM
Tris-HCl	17 mM

PMSF(现用现加)	1 mM
调 pH 至 pH=7.5	
(2) 缓冲液 B:	
manitol	150 mM
EGTA	2.5 mM
Tris-HCl	8.5 mM
调 pH 至 pH=7.5	
(3) 缓冲液 C:	
氯化钠	150 mM
EGTA	5 mM
PMSF(现用现加)	1 mM
Tris-HCl	20 mM
CHAPS	1%
调 pH 至 pH=7.5	
(4) SDS-PAGE 分离胶 (10%):	
去离子水	1.9 ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	1.3 ml
30%的丙烯酰胺	1.7 ml
10% SDS	50 μ l
10% 过硫酸铵 (AP)	50 μ l
TEMED	2 μ l
总体积 5 ml	
(5) SDS-PAGE 分离胶 (8%)	
去离子水	4.6 ml
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 ml
30%的丙烯酰胺	2.7 ml
10% SDS	100 μ l
10% 过硫酸铵 (AP)	100 μ l
TEMED	6 μ l
总体积 5 ml	
(6) SDS-PAGE 浓缩胶(5%)	
去离子水	1.4 ml
30%的丙烯酰胺	0.33 ml
1M Tris-HCl (pH6.8)	0.25 ml
10% SDS	20 μ l
10%过硫酸铵(AP)	20 μ l

TEMED	2 μ l
总体积 2 ml	
(7) 磷酸盐缓冲液(PBS):	
氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
加水定容至 1000 ml 用 HCl 调 pH 值至 7.4, 高压灭菌	

4. 1. 4 主要仪器设备

高速低温立式离心机 RC-Plus 26, 美国 Dupoint (杜邦)公司;
恒压恒流 DF-D 电泳仪, 北京东方特立科贸中心;
DYCZ-24D 双垂直电泳槽, 北京市六一仪器厂;
凝胶成像系统 Eagle Eye System, 美国 Stragene 公司;
Spectrum752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司;

4. 2 试验方法

4. 2. 1 棉铃虫抗、感品系 BBMV 的制备与溶解

BBMV 的制备参照 Wolfersberger 的差速离心法(Wolfersberger and Maurer, 1987, Wolfersberger, 1993), BBMV 的溶解参照 Knight 和 Lee 等改进的方法(Knigh *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996)). 具体步骤如下:

- 1) 将 5 龄幼虫置于冰上 15 分钟, 从幼虫后部的第 3、4 节之间取出中肠, 纵剖开, 用 0.7%的 NaCl 冲洗中肠, 吸干水, 称重后置于-70℃冰箱中保存(最长不可超过 6 个月)或直接制备 BBMV;
- 2) 从-70℃冰箱中取出中肠, 加 9 倍重量冰冷的缓冲液 A 于中肠中, 用玻璃匀浆器在冰上进行充分的匀浆, 每匀浆 1 分钟冰冷 1 分钟, 重复 5~6 次;
- 3) 往匀浆液中加入等体积 24 mM MgCl₂, 混匀置于冰上 15 分钟, 4℃, 45 00 rpm (2 450 \times g)离心 15 分钟;
- 4) 取上清, 4℃、16 000 rpm (30 500 \times g)离心 30 分钟;
- 5) 所得沉淀加 0.5 倍匀浆液体积的冰冷缓冲液 A, 混匀, 重复步骤 3)、4);
- 6) 第二次 16 000 rpm 离心得到的沉淀溶于冰冷缓冲液 B 中, 即得到粗提的 BBMV, 保存于-80℃冰箱中;
- 7) 将 BBMV 从-80℃冰箱中取出, 冰上溶解;
- 8) 4℃、16 000 rpm 离心 15 分钟, 所得沉淀悬浮于冰冷的缓冲液 C 中, 混合均匀;
- 9) 置于冰上期间轻柔振荡, 4℃、18 000 rpm (32 000 \times g)离心 30 分钟, 上清即为溶解的 BBMV。

4. 2. 2 Bt 毒素的碘化标记

具体操作方法参照Luo 等的操作方法(Luo *et al.*, 2006), 该方法是在Garczynski提出的氯胺-T(Chloramine-T)法上加以改进而来(Garczynski *et al.*, 1991)。先将纯化好的毒蛋白用Na¹²⁵I进行标记 (¹²⁵I大大过量), 随后用Sephadex G-50 分子筛柱进行分离, 用FT-603 # 型闪烁探头测定收集组分的放射活性, 结合SDS-PAGE电泳, 得到标记好的Cry1A蛋白。准确测定标记好的Cry1A蛋白的放射活性, 用于结合实验。具体步骤如下:

- 1) 在 100 μ l PBS缓冲液中加入 0.5 mCi Na¹²⁵I和 0.1 mg氯胺-T, 再加入 10 μ g Bt毒蛋白, 轻轻摇动反应 60 s, 用 0.125 mg偏重亚硫酸钠 (以 2.4 mg/ml(w/v)浓度溶于PBS中) 终止反应;
- 2) 5 ml 的 Sephadex G-50 分子筛柱分离、去除自由的碘。先用 0.07 M 的巴比妥钠盐缓冲液(pH8.6)平衡柱子, 再用含 20 mg/ml BSA (pH8.6) 的巴比妥钠盐缓冲液过柱, 进行预饱和, 最后用 20 ml 同样的 0.07M 的巴比妥钠盐缓冲液冲洗;
- 3) 将与Na¹²⁵I反应后的样品过柱, 控制流速, 用若干个 1.5 ml的离心管收集洗脱液, 用 FT-603 # 型闪烁探头测定其放射活力;
- 4) 将所收集相对高放射性的组分进行 SDS-PAGE, 然后用 X-ray 胶片进行压片暴光, 以确定蛋白标记的好坏。

4. 2. 3 Bt 毒素与 Cry1Ac 抗感品系的体外标记结合动力学研究

结合实验分为饱和度的测定及同源竞争和异源竞争结合实验。参照Garczynski和Tabashnik等的方法(Garczynski *et al.*, 1991; Tabashnik *et al.*, 2000)。

4. 2. 3. 1 饱和度实验

- 1) 在 PBS 缓冲液中加入 2 μ l 标记好的各种毒蛋白, 然后再加入不同浓度的 BBMV (本实验设 5、10、25、50、100、200nM 6 个浓度梯度), 最后加 PBS 缓冲液补足至 100 μ l, 室温下反应 60min。
- 2) 12 000 \times g 离心 10 min 后, 用 500 μ l 含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 检测管中残留放射性;
- 3) 从每个测量值中减去非特异结合的值, 即可得到毒蛋白与BBMV的特异性结合值。非特异性结合值是先在¹²⁵I标记的毒蛋白中加入超过标记毒蛋白 1000 倍的未标记毒蛋白, 混合均匀后与BBMV反应 60 min, 后续步骤同 2)。

4. 2. 3. 2 饱和度实验

- 1) 在 BBMV 中加入适量标记好的各种毒蛋白, 使之达到饱和, 然后再加入不同浓度的同种未标记的毒蛋白(本试验设 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、100、500、1000nM 共 12 个浓度梯度), 最后加 PBS 缓冲液补足至 100 μ l, 室温下反应 60min;
- 2) 12 000 \times g 离心 10 min, 用含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液 500 μ l 洗涤 2 次, 检测管中残留

放射活性;

- 3) 从每个测量值中减去非特异结合的值, 即可得到毒蛋白与 BBMV 的特异性结合值。

4. 2. 3. 3 饱和度实验

异源竞争结合试验的具体方法与同源竞争结合试验大致一致, 但往标记好的毒蛋白和 BBMV 的混合物中加入的是不同种类的未标记的毒蛋白, 同样经过室温温育结合 60 min, 最终测得毒蛋白与 BBMV 反应的特异性结合值, 用于后面的数据分析。

4. 2. 4 数据分析

应用 Ligand 程序(Munson and Rodbard, 1980)进行数据分析, 得到结合位点浓度 R_t 值和亲和性常数 K_d 。用 SAS 软件进行显著性测验。

4. 3 结果与分析

4. 3. 1 Cry 毒素的碘化标记

将毒素进行碘化标记后, 通过一个 5 ml Sephadex G-50 分子筛柱进行分离, 得到标记好的毒素蛋白, 然后取少量样品进行 SDS-PAGE 电泳, 然后用 X-ray 胶片进行曝光, 根据曝光点的大小来判断蛋白是否被标记上。图 4.1 为 SDS-PAGE 结果。根据所加入的 Bt 毒素的含量和所测得的放射活性, 得到 Cry2Ab、Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 各毒素的放射活力依次为 4.5、2.9、3.1 和 3.8 mCi/mg。

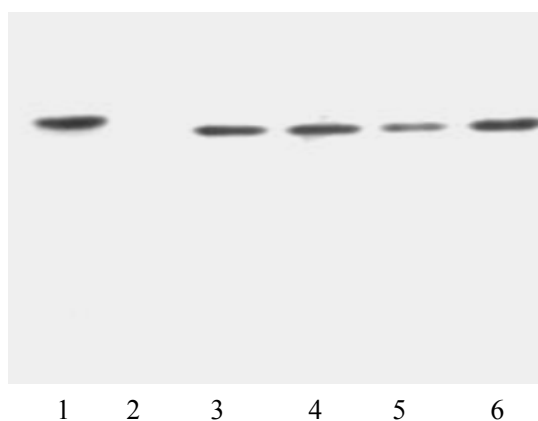


图 4. 1: ^{125}I 标记蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

1、 ^{125}I -Cry2Ab 2、空白对照 3、 ^{125}I -Cry1Aa 4~5、 ^{125}I -Cry1Ab 6、 ^{125}I -Cry1Ac

Fig. 4.1 SDS-PAGE analysis of ^{125}I -Cry toxins.

1、 ^{125}I -Cry2Ab 2、blank 3、 ^{125}I -Cry1Aa 4~5、 ^{125}I -Cry1Ab 6、 ^{125}I -Cry1Ac

4. 3. 2 Cry 毒素与抗感棉铃虫各品系的体外标记结合研究

4. 3. 2. 1 饱和度实验及同源竞争

我们主要研究了各供试品系 BBMV 与 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的饱和度试验, 试验表明所有品系的 BBMV 均能与 Cry1Ac 和 Cry2Ab 发生饱和结合。Cry1Ac 与各品系的饱和结合结果如图 4.2 所示, 各

品系在 50 $\mu\text{g/ml}$ 时均能与 ^{125}I -Cry1Ac发生饱和结合, 各品系在最大结合效率上没有太大差异; 图 4.3 为各品系棉铃虫中肠BBMV与Cry2Ab的饱和结合图, 与Cry1Ac一样, 96S、LF、LFR₁₀和BtR的BBMV均能在 100 $\mu\text{g/ml}$ 时与Cry2Ab发生饱和结合, 且最大结合率依次为 19.3%、19.2%、20.2%和 19.1%。

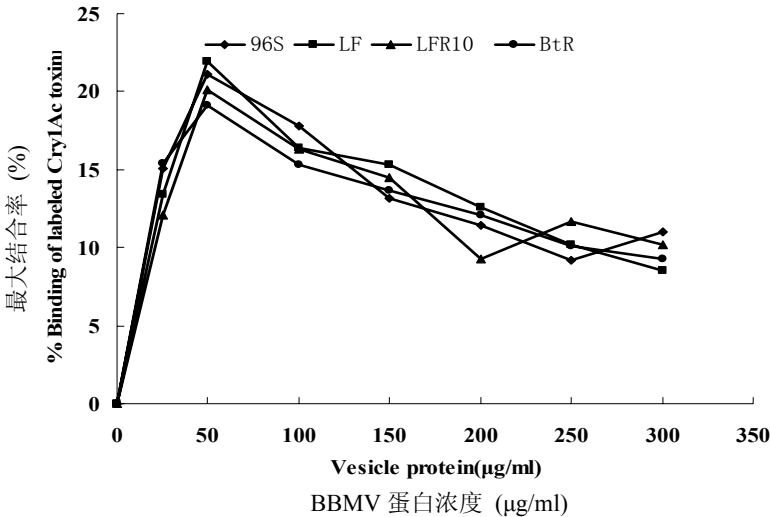


图 4.2 96S、LF、LFR₁₀和BtR各品系BBMV 与Cry1Ac结合饱和度的测定
Fig.4.2 Saturation binding between Cry1Ac and BBMV from 96S、LF、LFR₁₀ and BtR.

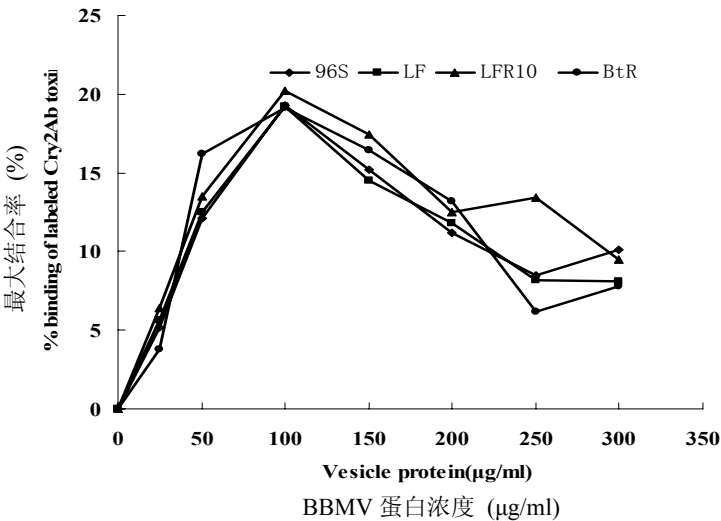


图 4.3 96S、LF、LFR₁₀和BtR各品系BBMV 与Cry2Ab结合饱和度的测定
Fig. 4.3 Saturation binding between Cry2Ab and BBMV from 96S、LF、LFR₁₀ and BtR.

用Ligand程序可以分析得出亲和性常数K_d (nM)以及结合位点浓度R_t (pmol/mg蛋白)值, 见表 4.1。不同敏感程度的棉铃虫品系与Cry1Ac的亲和性常数K_d值无明显差异, 也就是说在亲和力方面没有差异(表 4.1); 但是, 各品系在与 ^{125}I -Cry1Ac的同源竞争时的结合位点浓度相差甚远, 从结合位点浓度R_t值的变化可以看出: 两个敏感品系 96S (47.30 pmol/mg 蛋白) LF (45.90 pmol/mg 蛋白)之间的R_t值差异不显著, 但显著高于两个抗性品系LFR₁₀ (20.01 pmol/mg 蛋白)和BtR (6.86

pmol/mg 蛋白), 敏感品系的Rt值是抗性品系的 7 倍。

各品系对 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的亲性常数 K_d 值十分一致, 说明了各品系对二者的结合能力相当接近。换言之, 不同敏感程度的棉铃虫品系与 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的亲合力基本一致, 且在 Cry2Ab 与各品系 BBMV 结合时结合位点浓度无明显差异, 而在与 Cry1Ac 的结合中, 敏感品系的结合位点浓度显著高于抗性品系。

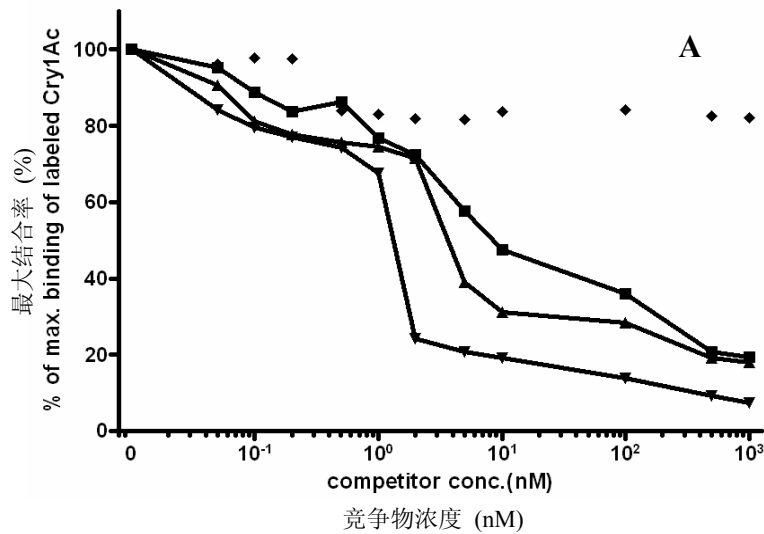
表 4.1 棉铃虫各品系BBMV与标记毒素的亲性常数 K_d (nM)及结合位点浓度Rt (pmol/mg蛋白)
Table 4.1 Dissociation constants K_d (nM) and binding site concentration Rt (pmol/mg of protein) values calculated from 125 I labeled toxins on BBMV from different strains of *H. armigera*

Strain	Cry1Ac		Cry1Ab		Cry 2Ab	
	$K_d \pm SE$	$Rt \pm SE$	$K_d \pm SE$	$Rt \pm SE$	$K_d \pm SE$	$Rt \pm SE$
96S	0.56 ± 0.20 a	47.30 ± 6.70 a	0.90 ± 0.37 a	10.08 ± 2.10 a	0.60 ± 0.23 a	11.08 ± 5.13 a
LF	0.62 ± 0.18 a	45.90 ± 5.98 a	0.89 ± 0.41 a	10.13 ± 0.98 a	0.54 ± 0.16 a	10.57 ± 6.10 a
LFR ₁₀	0.78 ± 0.24 a	20.01 ± 2.43 b	0.83 ± 0.56 a	10.88 ± 6.10 a	0.67 ± 0.20 a	12.13 ± 5.80 a
BtR	0.73 ± 0.32 a	6.86 ± 3.41 c	0.84 ± 0.71 a	9.73 ± 3.56 a	0.63 ± 0.17 a	11.34 ± 6.23 a

注: 同一列中字母不同者表示差异显著, 显著水平为 $p=0.05$ (Duncan's 新复极差检验)
Note: Different case letters in same subcolumn was significant difference, $p=0.05$ (Duncan' test)

4. 3. 2. 2 敏感品系 96S、LF 的中异源竞争结合

总的说来, 两个敏感品系 96S、LF在竞争结合上没有太大差异, 基本上保持一致。其中, 在与 125 I-Cry1Ac 的竞争结合中, Cry1Aa 与 Cry1Ab 只有在高浓度(5nM)时才能与 125 I-Cry1Ac 竞争, 而且Cry1Aa 的竞争能力较Cry1Ab弱, 但Cry2Ab不能与 125 I-Cry1Ac 发生竞争说明Cry1Ac 的位点能部分被Cry1Aa和Cry1Ab所识别, 替代的不完全说明了Cry1Ac 还存在有Cry1Aa和Cry1Ab所识别不了的位点(图 4.4)。



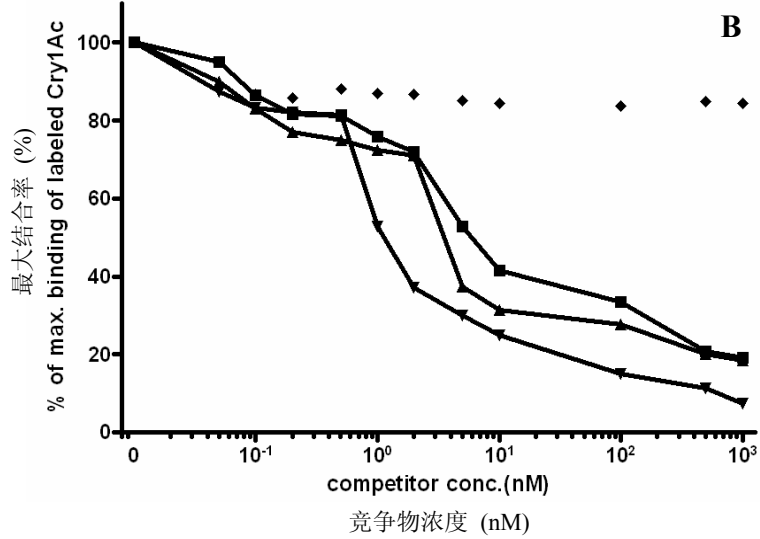
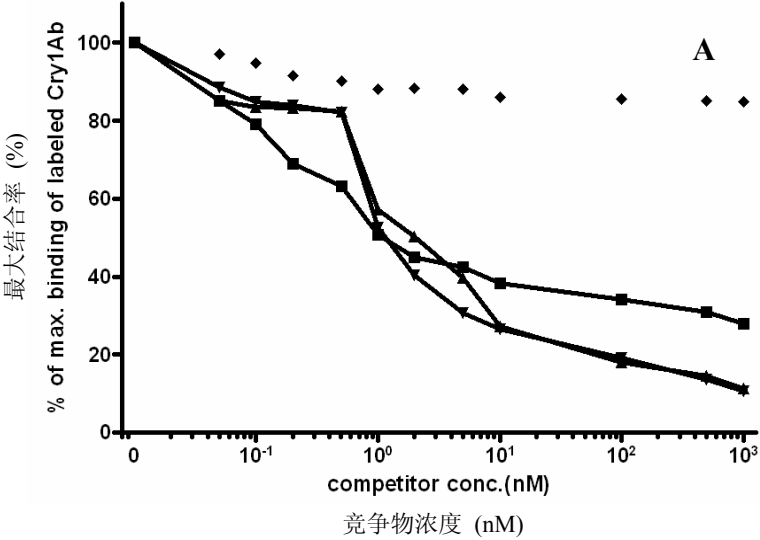


图 4.4 敏感品系 96S (A)、LF (B) 中各毒素与¹²⁵I-Cry1Ac 的异源竞争
Fig. 4.4 Heterologous competition for labeled Cry1Ac in 96S (A)、LF (B)
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼ Cry1Ac ◆Cry2Ab)

将¹²⁵I-Cry1Ab 做为被竞争对象，其它的Cry1A和Cry2Ab毒素作为竞争物时的竞争试验发现，Cry1Ac能很好的与¹²⁵I-Cry1Ab竞争，说明Cry1Ac能识别Cry1Ab所有的位点；但Cry1Aa只有在高浓度（10nM）时才能与其有明显的竞争，则说明Cry1Ab尚存在Cry1Aa所不能识别的位点；同样的，Cry2Ab不能取代¹²⁵I-Cry1Ab (图 4.5)，说明Cry2Ab的结合位点不同于Cry1Ab。



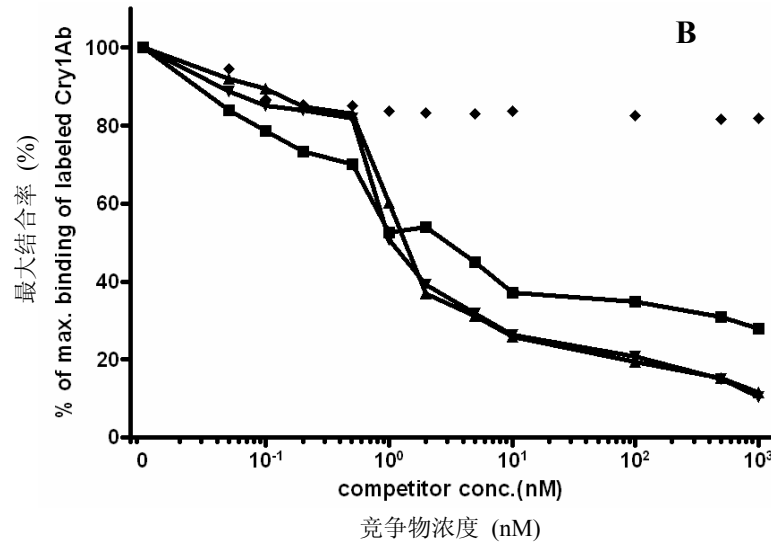
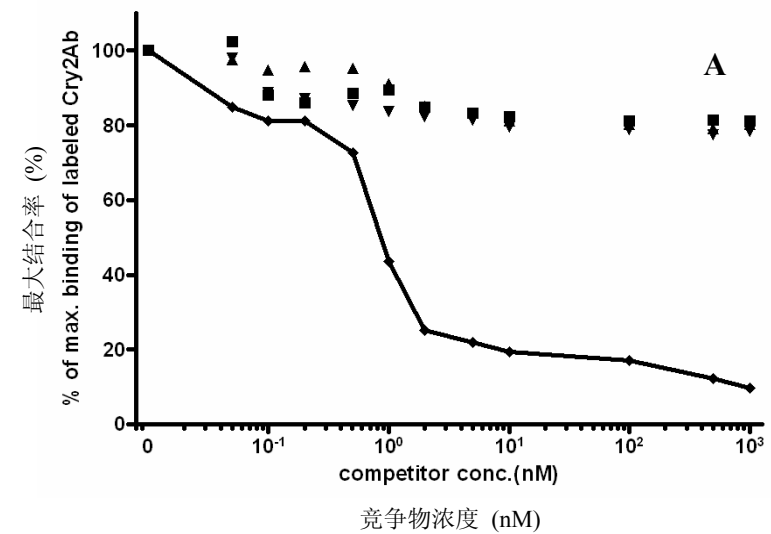


图 4.5 敏感品系 96S (A)、LF (B) 中各毒素与¹²⁵I-Cry1Ab的异源竞争
Fig. 4.5 Heterologous competition for labeled Cry1Ab in 96S (A)、LF (B)
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼ Cry1Ac ◆Cry2Ab)

而在与¹²⁵I-Cry2Ab的竞争结合中，我们发现三种Cry1A(Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac)均不能与之发生竞争(图 4.6)，结合上面的分析我们可以得知在敏感品系 96S中，Cry2Ab与Cry1A(Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac)不能共享结合位点。



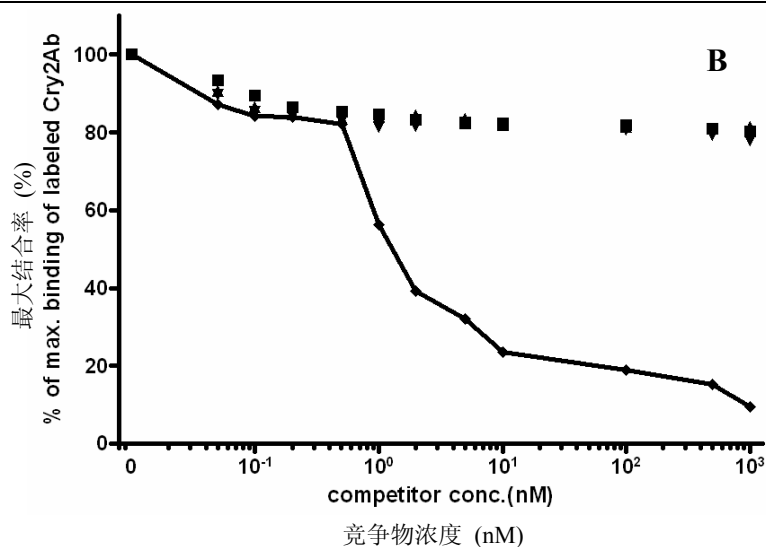
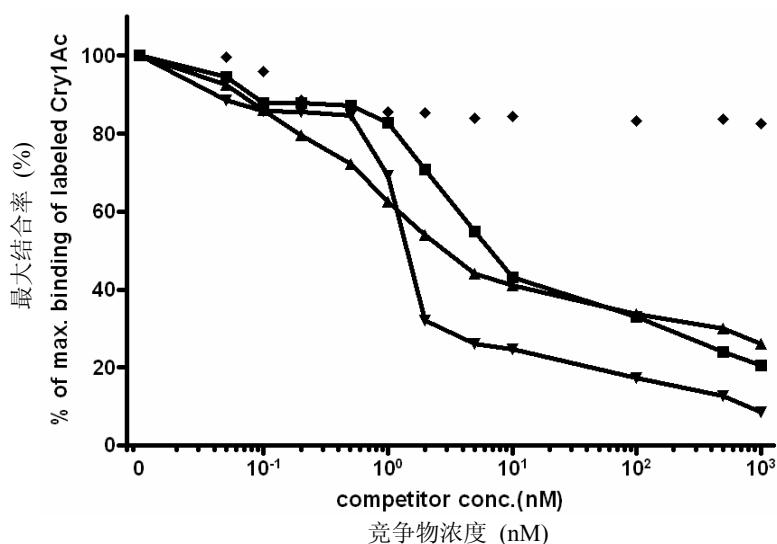
图 4.6 敏感品系 96S (A)、LF (B) 中各毒素与¹²⁵I-Cry2Ab 的异源竞争

Fig. 4.6 Heterologous competition for labeled Cry2Ab in 96S (A)、LF (B)

(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼Cry1Ac ◆Cry2Ab)

4.3.2.3 抗性品系LFR₁₀中的异源竞争结合

在抗性品系LFR₁₀中, Cry1Aa 与Cry1Ab只有在高浓度 (5nM)时才能与¹²⁵I-Cry1Ac发生竞争结合, 说明Cry1Ac的位点能部分被Cry1Aa和Cry1Ab所识别, 替代的不完全性说明了Cry1Ac还存在有Cry1Aa和Cry1Ab所识别不了的位点 (图 4.7); 另一方面, Cry1Aa 的竞争能力较Cry1Ab弱, 说明Cry1Aa所能识别的位点比后者少或者是Cry1Aa与BBMV的亲和力不如Cry1Ab (图 4.7)。与 96S比较而言, Cry1Ab的竞争能力下降, 说明在LFR₁₀中可能发生的情况是: 原来与Cry1Ac共享的结合位点减少或缺失(图 4.4, 图 4.7)。

图 4.7 抗性品系LFR₁₀中各毒素与¹²⁵I-Cry1Ac 的异源竞争Fig. 4.7 Heterologous competition for labeled Cry1Ac in LFR₁₀

(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼Cry1Ac ◆Cry2Ab)

Cry1Ac仍能与¹²⁵I-Cry1Ab竞争, 虽然能较好的替代Cry1Ab, 但与 96S和LF种群比较而言,

其替代的能力明显下降 (图 4.5, 图 4.8)。引起的原因有可能是二者共享的受体位点发生了改变或缺失, 使得Cry1Ac与BBMV的结合能力下降; 而Cry1Aa对 125 I-Cry1Ab的竞争能力没有下降, 这说明了最大的可能是与Cry1Ab结合的位点中, 与Cry1Aa结合的位点没有发生改变, 变化的位点只是与Cry1Ab和Cry1Ac发生结合的位点。

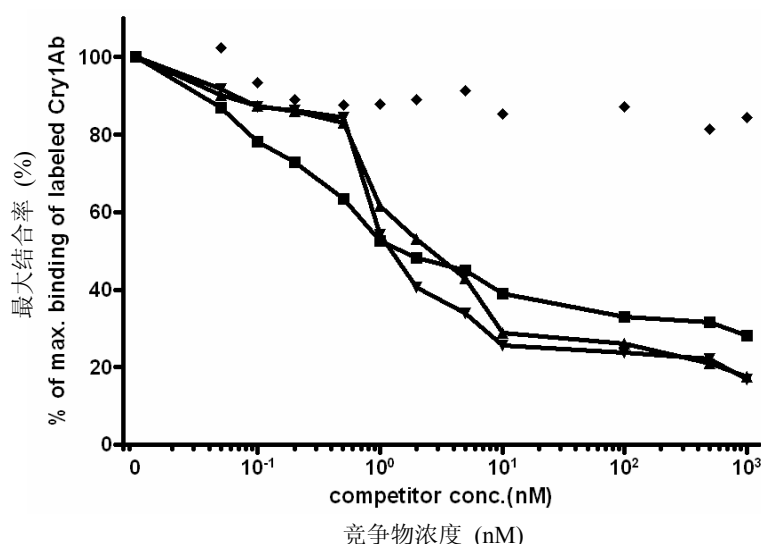


图 4.8 抗性品系LFR₁₀中各毒素与 125 I-Cry1Ab的异源竞争
Fig. 4.8 Heterologous competition for labeled Cry1Ab in LFR₁₀
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼Cry1Ac ◆Cry2Ab)

与两个敏感品系一样, 无论是用Cry2Ab作为竞争物还是被竞争物, 均不能显示出它与其它三种Cry1A蛋白的竞争性(图 4.7~图 4.9), 这说明了在抗性品系LFR₁₀中, Cry2Ab仍然不能与Cry1A类蛋白共享结合位点。

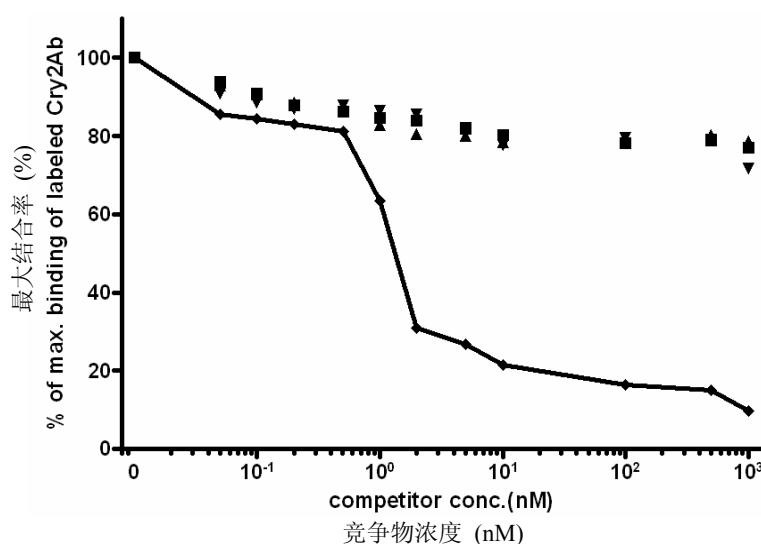


图 4.9 抗性品系LFR₁₀中各毒素与 125 I-Cry2Ab的异源竞争
Fig.4.9 Heterologous competition for labeled Cry2Ab in LFR₁₀
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼Cry1Ac ◆Cry2Ab)

4. 3. 2. 4 抗性品系 BtR 中的异源竞争结合

与敏感品系和抗性品系LFR₁₀比较而言，在BtR中，Cry1Ab替代¹²⁵I-Cry1Ac的能力显著下降，说明Cry1Ab和Cry1Ac共享的位点发生了改变或缺失，使得二者不能共享此位点或部分位点；与敏感品系和抗性品系LFR₁₀相比较，Cry1Aa的竞争能力依然没有下降 (图 4.9, 4.12)。这说明原来改变或缺失的位点仅与Cry1Ac和Cry1Ab有关，而与Cry1Aa的结合位点无关。

相对于抗性品系LFR₁₀，Cry1Ac替代¹²⁵I-Cry1Ab的能力得到进一步的下降，说明Cry1Ac与Cry1Ab所能结合的受体或位点的结合能力随着棉铃虫对Cry1Ac抗性的上升而进一步下降 (图 4.8, 4.11)；但Cry1Aa的竞争能力依然没有下降，说明无论抗性怎么发展，Cry1Aa所识别的位点不发生改变。

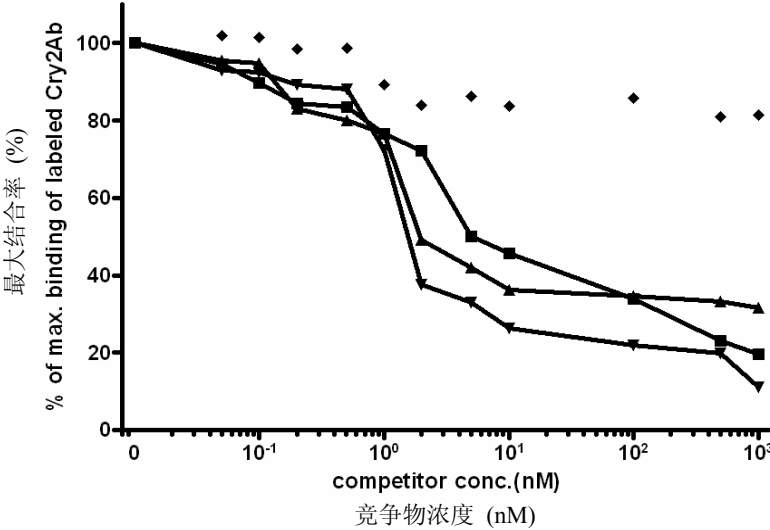


图 4.10 抗性品系BtR中各毒素与¹²⁵I-Cry1Ac的异源竞争
Fig. 4.10 Heterologous competition for labeled Cry1Ac in BtR
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼ Cry1Ac ◆Cry2Ab)

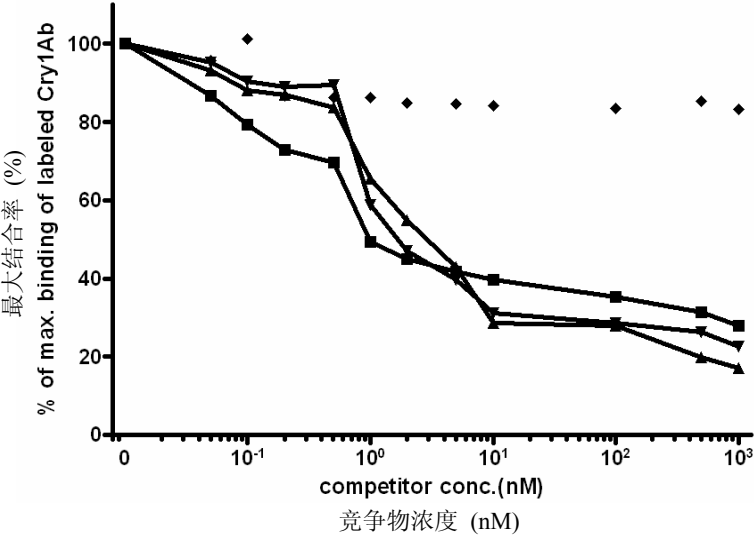


图 4.11 抗性品系BtR中各毒素与¹²⁵I-Cry1Ab的异源竞争
Fig. 4.11 Heterologous competition for labeled Cry1Ab in BtR
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼ Cry1Ac ◆Cry2Ab)

有意思的是, 尽管 BtR 对 Cry1Ac 的抗性高达 2971 倍, 但 Cry2Ab 始终不能与 Cry1A 类蛋白竞争 (图 4.12)。说明了这两类蛋白不存在共同的结合位点。

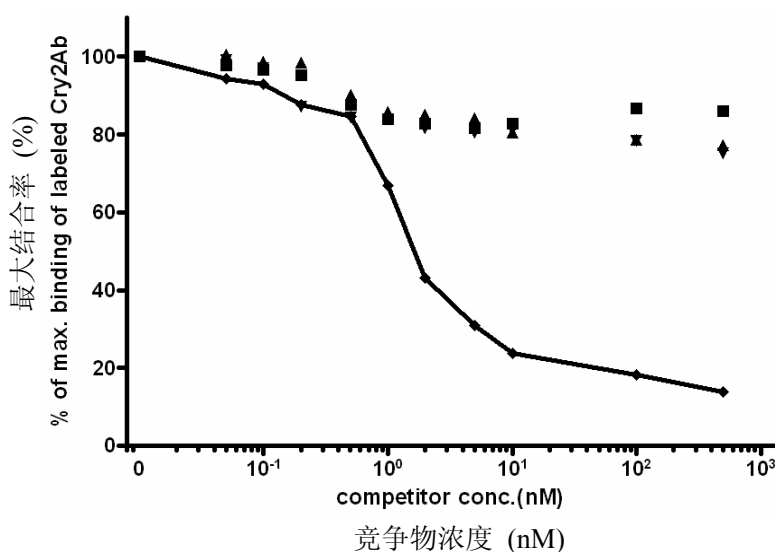


图 4.12 抗性品系BtR中各毒素与¹²⁵I-Cry2Ab的异源竞争
Fig. 4.12 Heterologous competition for labeled Cry2Ab in BtR
(■Cry1Aa ▲Cry1Ab ▼ Cry1Ac ◆Cry2Ab)

4. 4 结论与讨论

4. 4. 1 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 没有交互抗性的原因初探

多数研究认为, 不同毒素结合不同的结合位点是不产生交互抗性的基础。Morse 发现由于 Cry2A 与 Cry1A 的氨基酸序列不一样, 因而具有不同的受体结合决定簇(receptor binding epitopes)(Morse *et al.*, 2001); Jurat-Fuentes 等的研究表明 Cry1A 和 Cry2Aa 均能与 Cry1Ac 抗性烟芽夜蛾 CXC 的 BBMV 结合, 但 Cry1Aa 和 Cry2Aa 具有不同的结合位点(Jurat-Fuentes *et al.*, 2003)。同样地, Liao 发现在棉铃虫中, Cry2Aa 不能竞争 Cry1Ac 的结合位点(Liao, 1999)。Gahan 等通过 AFLP 等方法发现对 Cry1Ac 产生抗性的两个主要抗性因子与 CP73 对 Cry2Aa 的抗性无关(Gahan *et al.*, 2005), 该实验间接的说明了 Cry1Ac 与 Cry2Aa 没有交互抗性。

从已往的研究结果来看, 大部分的研究单一的从生物测定、毒素分子结构或结合动力学的角度来阐述Cry1Ac与Cry2Aa的交互抗性关系, 而未能将它们很好的结合起来进行系统的研究。而且, 到目前为止, 尚未见有相关的报道, 在此, 我们对此进行了系统的研究。在前一章中, 我们通过生物测定发现了对Cry1Ac具有抗性的棉铃虫并没有对Cry2Ab产生交互抗性。而在本章中, 我们着重从结合动力学的角度阐明了Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab不存在交互抗性的生理生化基础。研究发现: 无论是在Cry1Ac敏感品系还是在Cry1Ac抗性品系中, Cry2Ab不能与¹²⁵I-Cry1A (¹²⁵I-Cry1Aa、¹²⁵I-Cry1Ab 和¹²⁵I-Cry1Ac)竞争, 同时, Cry1A (Cry1Aa、Cry1Ab 和Cry1Ac)也不能与¹²⁵I-Cry2Ab竞争, 这说明了在棉铃虫中, Cry1A的结合位点不同于Cry2Ab。结合位点的不同又可以分为两种情况, 即结合位点位于同一蛋白上和位于不同蛋白上, 具体的结论有待于进一步试验来验证。总之, 通过本试验的研究可以确认Cry1A类蛋白与Cry2Ab不能共享共同的结合位点

是Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab没有产生交互抗性的根本原因。

4. 4. 2 Cry1Ac 抗性棉铃虫抗性产生的原因

昆虫对 Bt 抗性的产生可发生于毒素的溶解、酶解、毒素与受体的结合、孔洞的形成、中肠细胞的修复等诸多环节 (Heckel, 1994; 谭声江等, 2001), 但毒素与受体的结合能力的改变被认为是昆虫对 Bt 产生抗性的主要机理。Höfmann 等 (Höfmann *et al.*, 1988b)利用碘标记进行结合实验, 证实 Cry1Ab 和 Cry1B 对烟草天蛾和欧洲粉蝶不同的杀虫谱与结合位点的亲和性相关。Van Rie 等首次报道烟草天蛾和烟芽夜蛾中肠上皮细胞膜上的特异性受体是决定 Bt 不同杀虫谱的主要因素, Bt 的毒性与受体蛋白-毒蛋白的结合能力呈正相关(Van Rie *et al.*, 1989; 1990)。此后, 诸多研究证明与毒素结合的特异性受体的变异是害虫对 Bt 产生抗性的主要原因, 而且同一 Bt 蛋白对不同昆虫在受体及毒性专一性上显示出差异, 而同一昆虫对不同的 Bt 蛋白也会表现出受体、结合位点的差异, 即同一昆虫中肠可能存在一种 Bt 蛋白的多种受体, 不同 Bt 蛋白也可能共同识别一种受体。因此, Bt 与昆虫中肠受体的结合, 并不是简单的对应结合的关系, 显示出多样性和复杂性 (Heckel, 1994; Tabashnik *et al.*, 2000; Ferré and Van Rie, 2002; 梁革梅等, 2003)。

竞争实验表明, 随着抗性的上升, Cry1Ac与棉铃虫BBMV的结合能力下降。我们以前的研究发现: 在敏感品系中, Cry1Aa在敏感品系中存在一个结合位点, 即我们以前提出的位点 1; 而 Cry1Ab在敏感品系中存在两个结合位点, 其中一个是与Cry1Aa共享的结合位点 1, 当棉铃虫对 Cry1Ac产生 425 倍的抗性时, 其与位点 1 的结合能力下降; 在敏感品系内, Cry1Ac除了能与Cry1Aa和Cry1Ab共享结合位点 1 和 2 外, 还可以独自享受结合位点 3, 而具有 425 倍抗性的抗性品系丧失了与位点 2 的结合能力 (Luo *et al.*, 2006)。本研究中, 我们另外用了一个抗性倍数为 253 倍的抗性品系LFR₁₀, 结果表明, 该品系与原来的 425 倍抗性的结合能力基本一致, 但与敏感品系相比, LFR₁₀中Cry1Ac与位点 2 的结合能力下降而不是发生缺失。但当抗性上升到 2971 倍时, 抗性品系BtR表现出与 425 倍时相似的结合能力——Cry1Ac与位点 2 的结合位点发生了缺失。而结合位点的减少又存在三种可能: 受体蛋白完全缺失、受体蛋白部分缺失以及受体蛋白上Bt结合位点发生变异。在本研究中, 虽然抗性品系BtR中位点 2 不与Cry1Ac发生结合, 但是位点 2 仍能与Cry1Ab发生结合, 表明位点 2 仍然存在, 没有完全缺失, 但不能肯定位点 2 是部分缺失还是关键的结合位点发生了变异, 需要进一步借助分子生物学的其它手段来进行研究确定。

同时, 通过对 Cry1Ac 与各品系的结合能力和亲和力的大小比较发现, 各品系对 Cry1Ac 的亲和性常数基本一致, 无显著性差异, 也就是说各品系 BBMV 与 Cry1Ac 的结合能力应该一致。但结果却表明抗性品系中的结合能力明显低于敏感品系。因此, 在毒素与 BBMV 的结合过程中, 应该还有其它的因素参加了作用, 从而导致了这一矛盾体的形成。

结合位点浓度的减少可能是昆虫抗性产生的一个原因, 这一点在本试验中得到了证实。我们发现在同源竞争试验得出的亲和性常数 K_d 值上, 抗性品系与较敏感品系并无明显差异; 而在结合位点浓度上, 三种毒蛋白虽均显示出差异, 但 Cry2Ab 和 Cry1Ab 差异不显著, 相反地, 而抗性品系中 Cry1Ac 的结合位点浓度明显低于敏感品系。这说明了棉铃虫对 Bt 产生了抗性以后, 虽然亲和性没有什么改变, 但结合位点浓度却明显降低。因此棉铃虫体内结合位点数目的减少可能是影响抗性产生的又一个因素, 这与以前在小菜蛾和烟芽夜蛾中报道的结果相似 (MacIntosh *et*

al., 1991; Gill *et al.*, 1995)。MacIntosh 等认为，造成这种现象的原因，除了受体蛋白本身的因素外，可能还有其它的因素参与了作用(MacIntosh *et al.*, 1991)，但究竟是何种因素参与了作用，起到了一种什么样的作用，有待于进一步深入的研究。

同时，我们采用了两个敏感品系，二者具有不同的遗传背景，更重要的是：96S 采自 Cry1Ac 棉花在我国商品化之前，而 LF 品系则采于商品化后 5 年后(2002 年)的 Bt 棉田中，但实验表明，二者在结合动力学方面没有明显差异，表现出与生测结果的一致性。同时，也说明了棉铃虫对 Bt 棉花抗性的产生是一个相对缓慢的过程。

第五章 棉铃虫 BBMV 与 Cry2Ab、Cry1A 结合过程的实时测定

表面等离子体共振(Surface Plasma Resonance, SPR)是近年来新发展起来的一种可广泛用于监测生物分子间相互作用的新技术。它具有非标记和实时检测的特点,同时 SPR 测定不仅不会破坏生物大分子的天然状况,而且通过对测试表面进行修饰,还能为生物大分子提供提体内环境;SPR 进行实时的过程监测,可以方便的研究生物大分子相互作用的时序性特点和规律,实时记录反应的结合与解离,提供了结合反应的动态过程,这是其他技术无法比拟的。而我们在研究 Bt 毒素与昆虫 Bt 毒素受体蛋白作用时,由于涉及到的是蛋白质之间的相互作用,因而 SPR 在该领域的研究越来越广泛。

如前一章所述,我们发现在本章比较抗、感品系棉铃虫 BBMV 与 Cry1Ac 的结合时发现,虽然 Cry1Ac 对几个品系 BBMV 的亲合性常数一样,即亲和力一致,但最终的结合能力不一样。因此在毒素与 BBMV 结合的过程中,肯定还有其它的因素参与了作用。因此,我们希望能通过本章对 Cry1Ac 抗、感棉铃虫中肠 BBMV 与 Cry1A、Cry2Ab 的即时结合的研究,来动态的监测毒素-受体间的即时结合,来解释这一矛盾的形成原因,验证体外标记结合所推测模型的正确性。

5.1 材料与方法

5.1.1 供试材料

1) 供试 蛋白样品: Cry1Ac, Cry1Ab, Cry2Ab

2) 供试昆虫:

Cry1Ac 敏感种群: 96S, 同第二章

Cry1Ac 抗性种群: BtR, 同第二章

LFR₁₀, 同第二章

5.1.2 主要试剂与仪器

Sephadex-G50 为 Pharmacia 公司产品;

SPR氨基耦联试剂: N-羟基琥珀酰胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、N-乙基-N'-(二乙基-氨丙基)-碳二酰胺(*N*-ethyl-*N*-(3-diethylaminopropyl, EDC) 和盐酸乙醇胺

SPR专用HBS缓冲液: 10 mmol/ L HEPES (pH 7.4)、150 mmol/ L NaCl、3.4mmol/ L EDTA 、0.005 %表面活性剂P20;

CM5芯片等SPR仪专用试剂及配件均为GE Healthcare公司产品, 其它试剂为市售。

SPR仪器为GE Healthcare公司产品, 型号为BIAcore 3000。

5. 1. 3 样品的前处理

在 SPR 仪中, 对所提供的各种蛋白的要求在溶解度, 等电点等方面有严格要求, 样品质量的高度直接决定实验的成败与好坏。所有样品都必须通过 0.45 μm 滤器, 如果蛋白样品中有大于 0.45 μm 且没有被除去的话, 严重时会导致进样通道被毒素, 对仪器造成不必要的伤害。同时, 由于做为流动相的 BBMV 是从各棉铃虫中肠中提取的, 因而一般情况下可能会含有比较多的核酸, 这些核酸的存在也会在一定程度上影响蛋白质之间的结合, 同时也会影响机器的灵敏度。因此本实验的样品前处理是十分关键的一个因素。

5. 1. 3. 1 Bt 毒素的处理

如第二章所述, 我们可以通过将 Bt 毒素通过离子交换的方法获得活化的 Cry1A 类毒素, 由于所使用的两个蛋白 Cry1Ab 和 Cry1Ac 蛋白的等电点均在 SPR 仪所能允许样品的下限, 且为碱性蛋白, 而做为流动相的蛋白样品需要溶解在 pH 为 7.0 的 1mM 的 PBS 缓冲液中, 因而, 我们将原来的碳酸钠溶解缓冲液换为 1mM 的 PBS (pH 7.0) 缓冲液, 然后通过 0.45 μm 的滤器, 然后室温放置 48 小时, 确定无任何不溶物后再取样进行 SDS-PAGE 电泳检测, 用 Bradford 方法测定其中蛋白质含量(Bradford,1976)。

5. 1. 3. 2 BBMV 的前处理

按第三章所述方法提取棉铃虫各品系的 BBMV 后, 将最后一次 16 000 rpm 离心得到的沉淀溶于 HBS 缓冲溶液中。由于所提取的蛋白来自昆虫组织, 因而含有较多的核酸, 不能直接用于实验。因此我们通过分子筛柱来将核酸与蛋白分离, 以达到提纯蛋白的目的。为此, 我们自行设计了一个以一次性注射器为柱, Sephadex-G50 为填料的分子筛柱。用分子筛柱提纯 BBMV 的具体步骤如下:

- 1) 柱子的制备: 参照 Sephadex-G50 的说明对填料进行溶胀和装填, 然后置于真空干燥仪中脱气而得到, 柱子用 HBS 溶液封存于 4 度冰箱中备用或直接按下面步骤进行;
- 2) 柱子的平衡: 在开始分离样品之前, 需要对柱子用 HBS 溶液进行平衡;
- 3) 过柱: 将溶于 HBS 的 BBMV 通过柱子, 用 1.5 ml 小管收集, 同时用分光光度计在 280 nm 处检测蛋白峰值;
- 4) 对所收集的组分通过 0.45 μm 的滤器, 然后进行 SDS-PAGE, 并将之与未经处理 BBMV 作为对照, 并最终测定蛋白质含量。

5. 1. 4 SPR 检测 Bt 毒素与各品系的即时结合

5. 1. 4. 1 Bt 毒素的固定

采用氨基耦联的方法将 3 种 Bt 毒素蛋白依次耦联在 CM5 芯片的亲水羧甲基葡聚糖基质上, 留下另一空白通道做为空白对照。在固定的过程中, HBS 缓冲液以 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的恒定流速流经芯片表面。耦联的具体操作按照 BIAcore 3000 系统的操作手册进行。具体步骤如下:

- 1) 芯片的活化: 注入 40 μl 按比例 1:1 (v/v) 混合的 0.1 M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 N-乙基-N'-(二乙基-氨丙基)-碳二酰胺(EDC) 活化液, 活化芯片的葡聚糖表面, 使生成 NHS-酯, 为蛋白的耦联提供载体的着力点;
- 2) 蛋白耦联缓冲液的选定: 在蛋白耦联以前, 有必要对所使用缓冲液的 pH 进行摸索, 将各个 pH 的缓冲液分别与蛋白按照一定比例混合通过芯片表面, 选定获得较高响应 RU 值(Response Unit)时的 pH 缓冲液做为耦联溶液;
- 3) 蛋白的耦联: 将 100 μl 含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Bt 毒素的 10 mM 乙酸钠耦联缓冲液在 5 $\mu\text{l/min}$ 的低流速下通过活化的芯片表面, 使蛋白的侧链氨基与芯片表面暴露出来的羧甲基发生共价作用而将蛋白固定在芯片上, 芯片封闭好后应用乙醇胺封闭芯片来完成蛋白的耦联过程。耦联的具体过程可通过观察到的响应值来判断, 该信号反应了 Bt 毒素与活化芯片表面的 NHS-酯反应过程;
- 4) 芯片上残留 NHS-酯的封闭: 往耦联好的芯片表面注入 1 M 的乙醇胺 (pH 8.5) 40 μl , 使之与芯片上残留的 NHS-酯反应以封闭活性残基, 以免后续亲和测定中发生配体的共价结合;
- 5) 用大量 10 mM 的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.0)洗脱非共价结合的配体。洗涤后得到的基线与活化前基线之差反应了配体的固定量。

5.1.4.2 各品系 BBMV 与 Bt 毒素的特异性结合

将各品系含有BBMV用HBS缓冲溶液稀释成适当的浓度, 以 15 $\mu\text{l/min}$ 的流速依次通过芯片的表明, 以观察各品系BMMV与 3 种Bt毒素的亲合性。结合后用 0.1 M H_3PO_4 (10 μl) 对芯片表明进行再生, 以恢复芯片表面的结合能力, 从而可用于多次测量。整个测试过程使用Biacore的控制软件中的动力学(kinetic)模式进行, 实验温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。同时, 该模式下获得的数据传感图将自动扣除背景或是非特异性的结合信号, 每一处理设三次重复。

5.1.4.3 Bt 毒素在各品系 BBMV 中的竞争结合分析

参照 Hua 等的方法(Hua *et al.*, 2001), 并做适当的修正。将各品系 BBMV 与 3 μM Bt 毒素在冰上温育 60 min, 然后将该混合物做为流动相液体用于异源(混合用的毒素与芯片上固定的毒素不同)竞争实验中。将各混合物依次通过芯片表面, 并打开所有通道, 观察各通道与混合物的 SPR 信号变化, 记录的 RU 值为自动扣除空白对照后的值, 重复三次。

5.2 结果与分析

5.2.1 Bt 毒素、BBMV 的处理

我们通过SDS-PAGE对处理后Bt毒素样品与处理前对比发现二者没有区别(图 5.1), 说明将Cry1A毒素通过 0.45 μm 滤器后对Cry1A毒素并没有影响, 因此用该方法来处理Bt毒素以达到SPR所需的要求是可行的。而对BBMV的处理发现, 处理后的样品与处理前比较起来清亮了许多, 而通过测定样品的 A_{260}/A_{280} 时发现样品中不存在核酸。同时通过SDS-PAGE发现样品条带和处理前

一致(图 5.2)。



图 5.1 处理前(1)、后(2)Cry1A 毒素电泳对照图

Fig. 5.1 Comparison analysis between treated and untreated toxin by SDS-PAGE

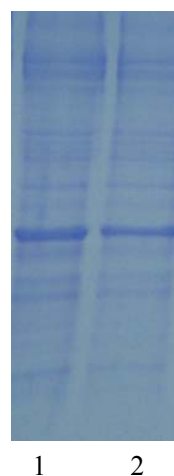
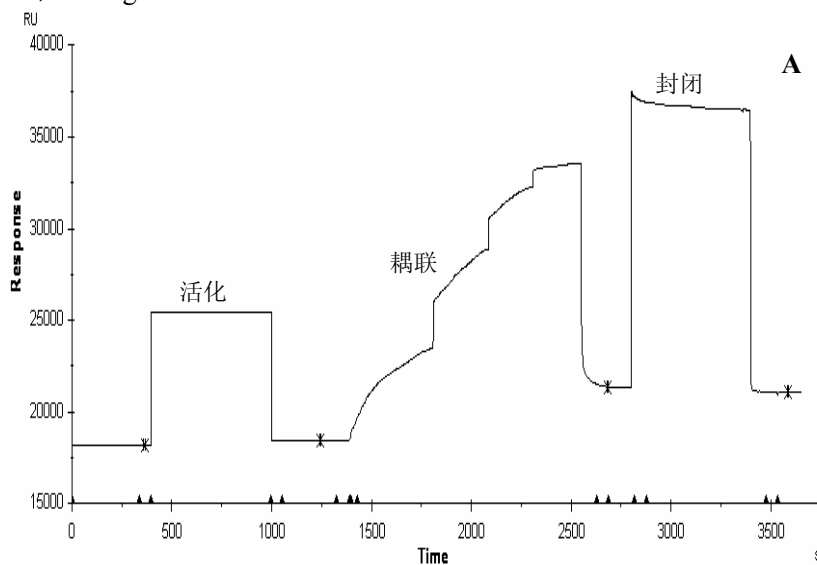


图 5.2 处理前(1)、后(2)BBMV 电泳对照图

Fig. 5.2 Comparison analysis between treated and untreated BBMV by SDS-PAGE

5. 2. 2 Bt 毒素的固定

通过对蛋白耦联缓冲液的研究发现,三种蛋白的最适pH值分别为 4.0 (Cry1Ac)、4.0 (Cry1Ab)、5.0 (Cry 2Ab)。通过活化、耦联和封闭的过程,我们将三种蛋白以共价的方式固定在CM5 芯片上,图 5.3 就是各蛋白耦联后各蛋白在各自通道上的响应图,从图上我们可以得知每个通道上所固定的蛋白的含量(每 1 000 共振单位(RU)表明芯片上对应通道固定的蛋白为 1 ng/mm^2),例如在 Cry1Ab 的通道中,其对应的响应值为 2 700RU (图 5.3A),相当于在芯片的这一通道上固定的蛋白浓度大约为 2.7 ng/mm^2 ,相应地, Cry1Ac(图 5.3B)和Cry2Ab(图 5.3C)通道上所固定的蛋白的量分别为 2.8 ng/mm^2 和 3.1 ng/mm^2 。



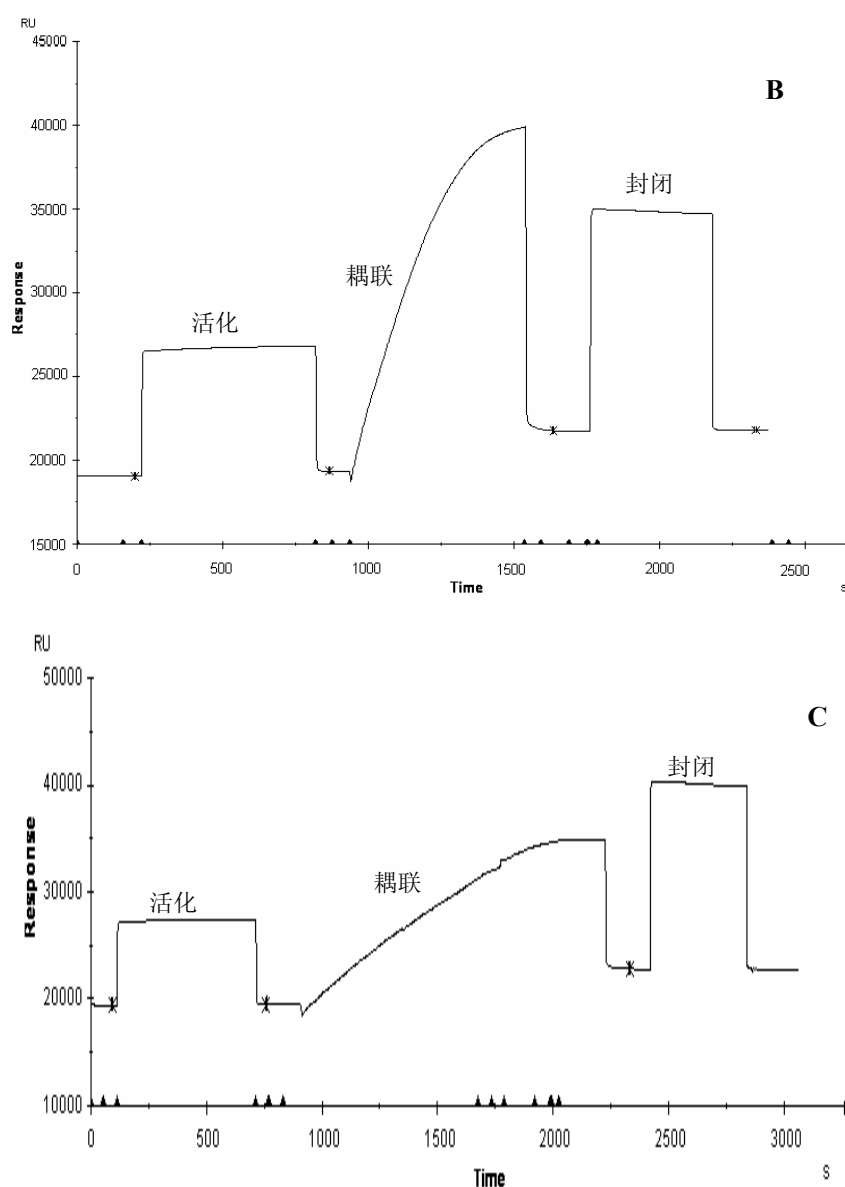


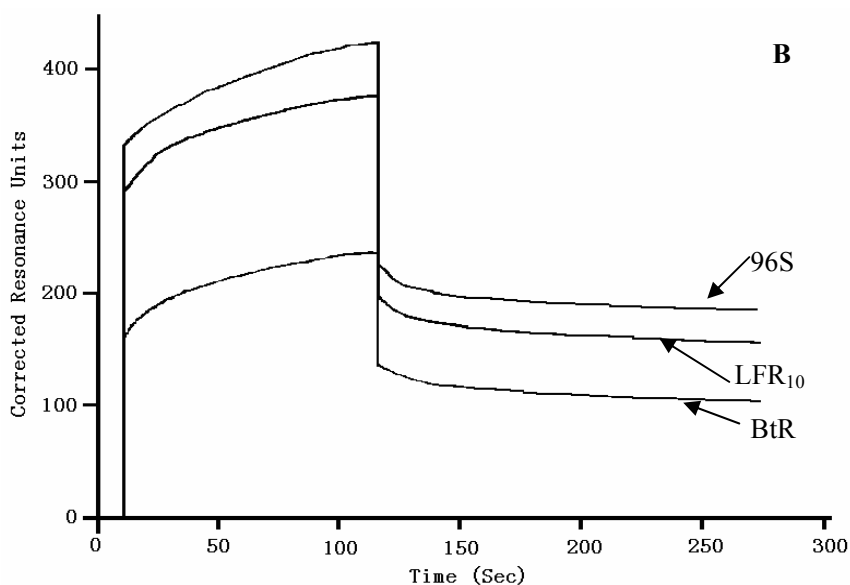
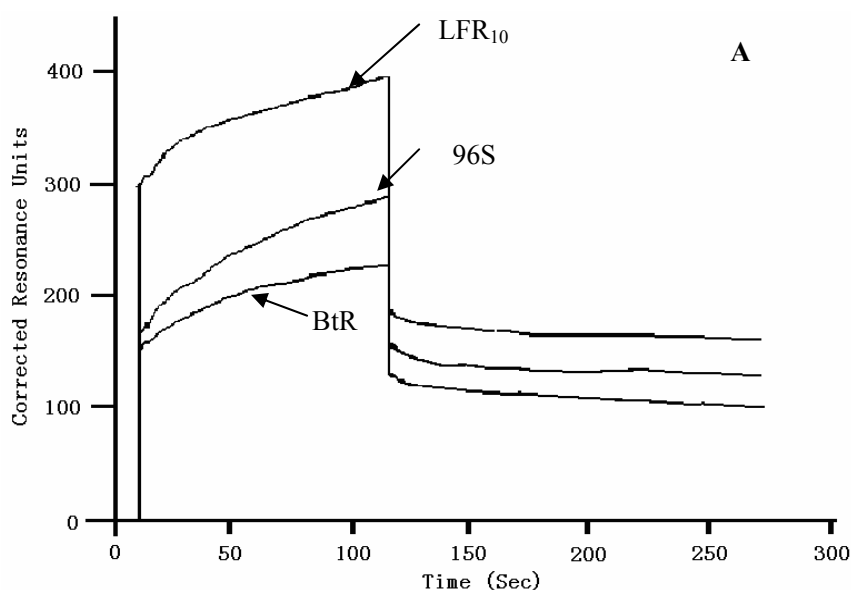
图 5.3 CM5 芯片偶联毒素 SPR 信号图 (A、Cry1Ac B、Cry1Ab C、Cry2Ab)

Fig. 5.3 Sensorgrams obtained on immobilization of Bt toxins onto sensor chip CM5 (A、Cry1Ac B、Cry1Ab C、Cry2Ab)

5. 2. 3 Bt 毒素与各品系 BBMV 的特异性结合

将各品系BBMV用HBS缓冲液，然后通过芯片表面，这样我们就能通过SPR仪记录下来的响应强度来判断毒素与BBMV的结合大小。在注入样品后的第一个阶段就是结合的阶段，接下来达到平衡，最后是解离。解离后可注入再生液进行对芯片表面再生，以进入下一个反应程序。在SPR仪的kinetic模式下，将自动扣除空白背景的值，得到的是实际结合的值，同时，能根据响应曲线判断结合和分离时的实时动态过程。我们发现，在供试的三种Bt毒素中，Cry1Ac与敏感品系 96S 的结合最为强烈，响应强度达 187 ± 30 RU，其与抗性品系BtR的结合最弱，相应强度只有 141 ± 28 RU，而LFR₁₀的响应强度则介于二者之间，为 158 ± 33 RU，说明Cry1Ac对三个品系的BBMV结

合能力是随抗性的增强而降低的。观察其结合曲线发现, 96S品系在结合阶段的结合速率明显高于BtR品系, 说明在结合的过程中敏感品系BBMV与毒素Cry1Ac的结合强于抗性品系。但抗、感品系在解离阶段时的解离速度基本趋向一致, 没有太大差异 (图 5.4 A)。而Cry1Ab是三种毒素中与各品系BBMV结合强度最低的, 其与敏感品系 96S、抗性品系BtR和LFR₁₀的结合的响应强度分别为 162 ± 29 RU、 145 ± 32 RU和 102 ± 20 RU, 而且三个品系与Cry1Ab的结合曲线斜率较一致, 但LFR₁₀的结合时的结合比其它两个品系稍大, 在解离的动态过程中各品系之间基本没有差异, 但与Cry1Ac比较起来, Cry1Ab与各品系的结合能力较弱(图 5.4A, B)。Cry2Ab与各品系BBMV的结合的响应强度分别为 183 ± 41 RU (96S)、 177 ± 27 RU (LFR₁₀)和 181 ± 36 RU (BtR), 三者在Cry2Ab中结合和解离速率相当接近, 说明各品系对Cry2Ab的结合能力基本没有差异 (图 5.4 C)。



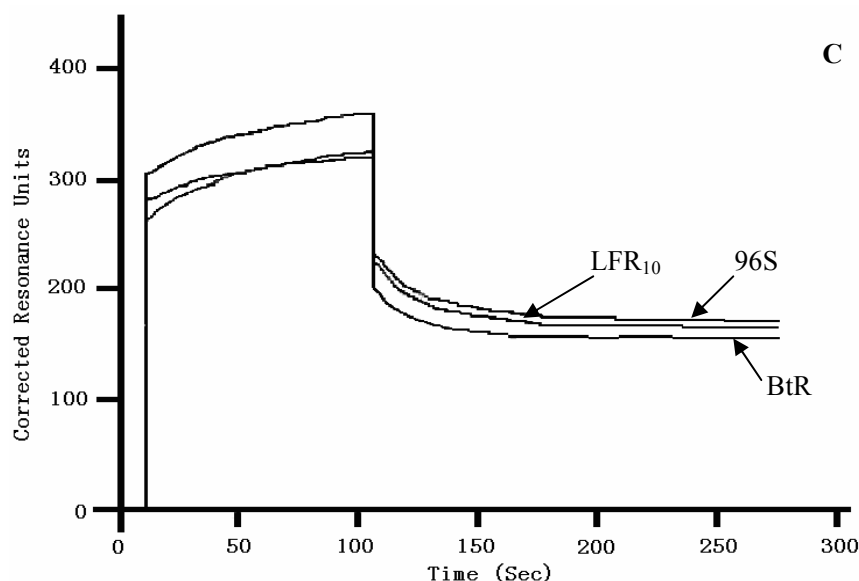


图 5.4 各品系 BBMV 与芯片上固定毒素 (A、Cry1Ac B、Cry1Ab、C、Cry2Ab) 的即时结合 SPR 信号图

Fig. 5.4 The SPR sensorgrams of the interaction between Cry1Ac (A), Cry1Ab (B), Cry2Ab (C) and BBMV from 96S, LFR₁₀ and BtR strains of *H. armigera*

5. 2. 4 Bt 毒素在各品系 BBMV 中的竞争结合

我们将两个品系的 BBMV 与 3 μ M 不同的毒素(毒素大大过量)混合后,置于冰上温育 60 min, 然后通过各芯片表面,测得它们之间的竞争结合能力。表 5.1 为几种毒素在各品系中的竞争结合响应值。

表 5.1 Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry2Ab 在各品系 BBMV 中的竞争结合 SPR 响应值

Table 5.1 The response values of SPR for binding competitions among Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Ab in BBMV of different strains of *H. armigera*.

固定相 Immobilized	流动相 influx	响应值 (Response Unit, Average \pm SE)		
		96S (RU)	LFR ₁₀ (RU)	BtR (RU)
Cry1Ac	Cry1Ab	96 \pm 10 a	82 \pm 14 ab	65 \pm 8 b
	Cry2Ab	165 \pm 18 a	150 \pm 22 a	156 \pm 25 a
Cry1Ab	Cry1Ac	22 \pm 4 a	65 \pm 7 b	90 \pm 13 c
	Cry2Ab	148 \pm 12 a	149 \pm 15 a	146 \pm 11 a
Cry2Ab	Cry1Ab	155 \pm 22 a	151 \pm 10 a	145 \pm 21 a
	Cry1Ac	153 \pm 12 a	155 \pm 10 a	151 \pm 23 a

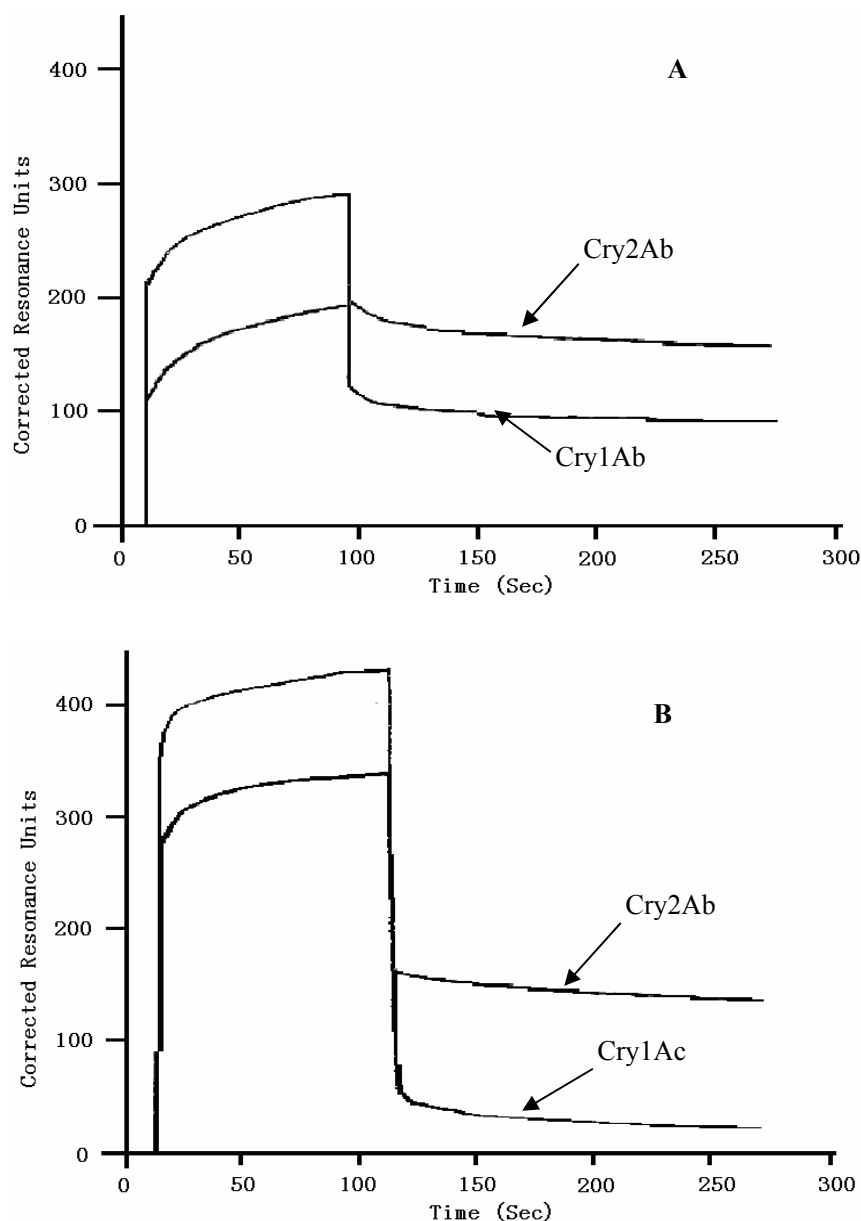
注: 同一行中字母不同者表示差异显著, 显著水平为 $p=0.05$ (Duncan's 新复极差检验)

Note: Different case letters in same row was significant difference, $p=0.05$ (Duncan' test)

5. 2. 4. 1 Bt 毒素在 96S 品系 BBMV 中的竞争结合

研究发现, 将 96S 敏感品系 BBMV 与过量的 Bt 毒素(Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab)冰上温育 60 min 后, 将芯片上的四个通道全部开放, 将混合物与 HBS 缓冲液做为流动相以 15 μ l/min 的流速通过芯片表面, 得到各毒素之间的竞争结合动力学图如图 5.5。我们发现, 在通过 Cry1Ac 的通道时, Cry1Ab 上响应值为 97 ± 10 RU 左右, 说明在 96S 品系的 BBMV 中, BBMV 与 Cry1Ab 结合后尚有点位供 Cry1Ac 结合, 而 Cry2Ab 在该通道上的响应值在 165 ± 18 RU 左右, 这和 Cry2Ab 在 96S 品系中的结合相当接近, 说明 Cry2Ab 的结合位点不能被 Cry1Ac 所识别(图 5.5 A)。同时从二者的响应强度上也可以看出 Cry1Ac 对 Cry1Ab 的竞争能力比对 Cry2Ab 的竞争能力弱。

而在 Cry1Ab 通道上, Cry1Ac 的响应值为 22 ± 4 RU, 说明混合物中 BBMV 与 Cry1Ac 充分结合后, Cry1Ab 所能识别的位点全部被 Cry1Ac 所结合; 但当加入含有 Cry2Ab 的 BBMV



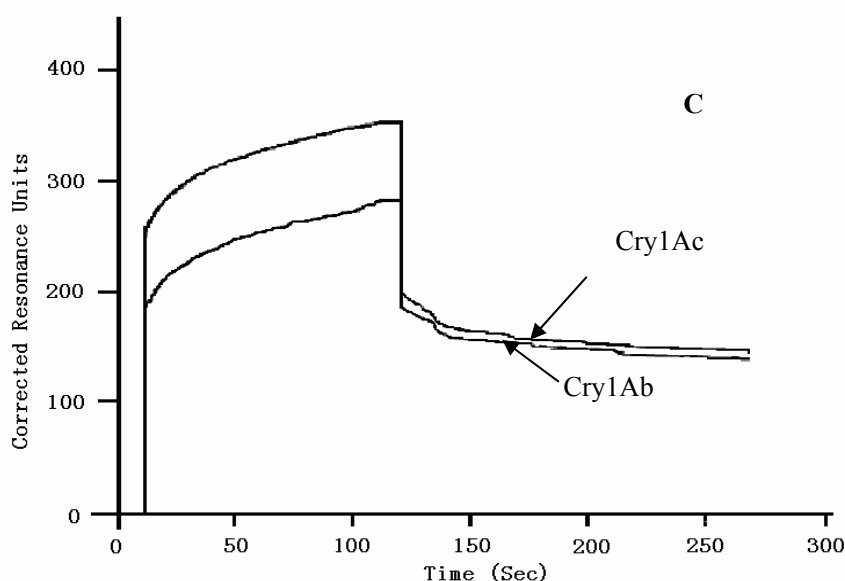


图 5.5 Bt 毒素在敏感品系 96S BBMV 中的竞争结合

A、Cry1Ac 与 Cry1Ab、Cry2Ab 竞争 B、Cry1Ab 与 Cry1Ac、Cry2Ab 竞争 C、Cry2Ab 与 Cry1Ab、Cry1Ac 竞争

Fig. 5.5 Competition binding analysis of Bt toxins in BBMV isolated from Cry1Ac-susceptible strain 96S

A: Cry1Ac competed with Cry1Ab and Cry2Ab B: Cry1Ab competed with Cry1Ac and

Cry2Ab C: Cry2Ab competed with Cry1Ac and Cry1Ab

的混合物后，其响应值为 148 ± 12 RU，这和 Cry2Ab 与 96S 品系特异性结合时的信号强度无显著性差异，说明 Cry2Ab 的结合位点与 Cry1Ab 不同，且 Cry1Ab 对 Cry2Ab 有比较强的竞争能力(图 5.5 B)。

对于 Cry2Ab 通道，Cry1Ac 和 Cry1Ab 的响应值在 155 ± 22 RU 和 153 ± 12 RU，而这与两种毒素在该品系中的特异性结合值无异，说明 Cry1Ab 和 Cry1Ac 所识别的位点与 Cry2Ab 的结合位点不同(图 5.5 C)。

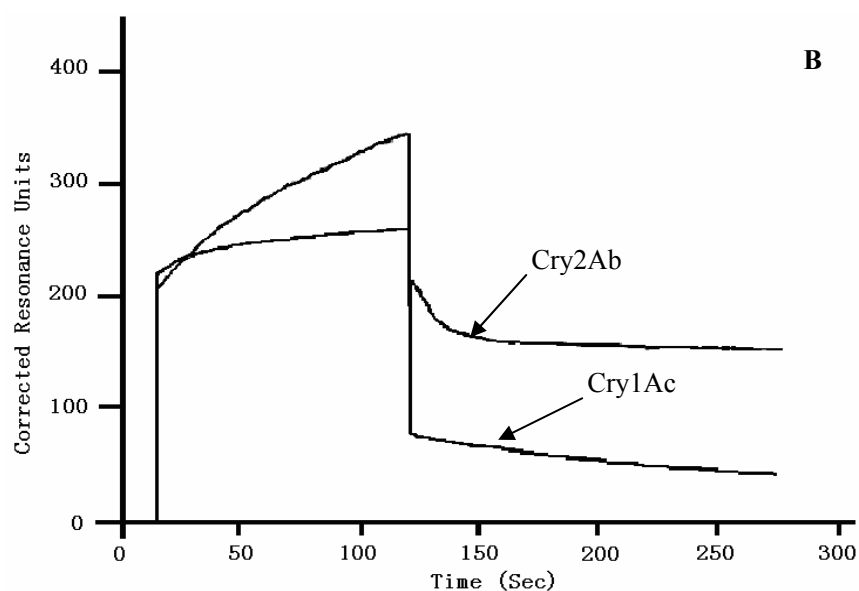
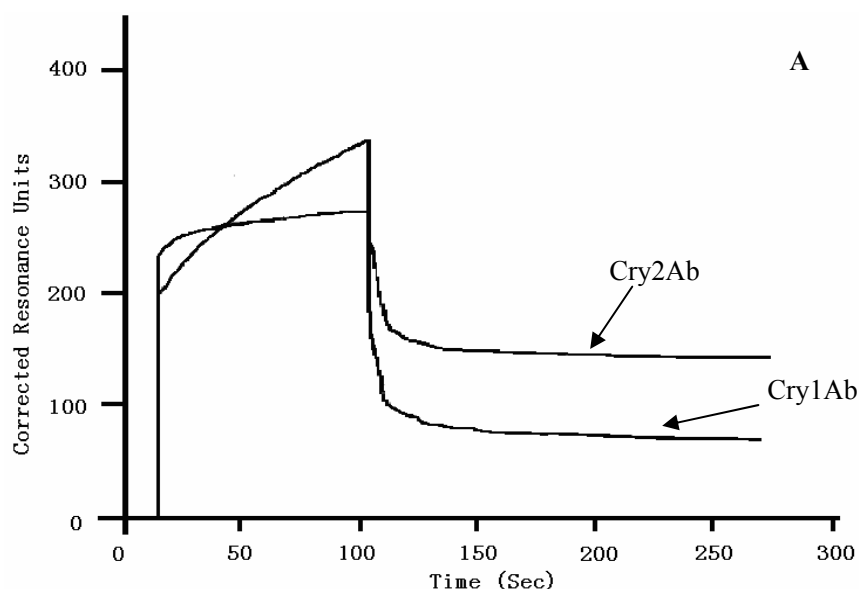
5. 2. 4. 2 Bt毒素在LFR₁₀品系BBMV中的竞争结合

实验表明，当开放Cry1Ac通道时，将Cry1Ab毒素与BBMV预混合后的混物流经芯片表面时，SPR显示结合的响应值在 82 ± 14 RU，证明尚有结合存在，说明了LFR₁₀品系BBMV与Cry1Ab结合后尚有位点供Cry1Ac结合，但结合能力低于敏感品系 96S，说明在LFR₁₀品系中，仍存在为Cry1Ab所不能结合的但能被Cry1Ac结合的结合位点，但Cry1Ac的结合能力较敏感品系稍弱。对于Cry2Ab，响应值在 150 ± 22 RU，这和它在LFR₁₀中的特异性结合值差异不显著，说明在LFR₁₀中，Cry2Ab的结合位点也不能被Cry1Ac所识别，Cry1Ac对Cry2Ab的竞争结合在结合阶段的速率明显高于Cry1Ab(图 5.6 A)。

当将相应的混合物通过固定的Cry1Ab时，对应含Cry1Ac的混合物的响应值为 65 ± 7 RU，显著高于在敏感品系中对应的响应值 22 ± 4 RU，说明BBMV与Cry1Ac结合后，有位点可供Cry1Ab结合或者说Cry1Ab能和Cry2Ab竞争，这是与敏感品系 96S所不同的地方，也说明了与敏感品系 96S相比，LFR₁₀中的与Cry1Ac和Cry1Ab共同结合的结合位点发生了改变。但Cry2Ab的响应值为

149 ± 15 RU, 所能观察到的SPR信号和敏感品系 96S相比没有太大差异, 说明在抗性品系LFR₁₀中Cry2Ab的位点没有发生改变(图 5.6 B)。

而在通过Cry2Ab通道时, 无论是将含有Cry1Ac混合物的样品做为流动相还是将含有Cry1Ab混合物的样品做为流动相, 均保持了较高的响应值, 分别为 155 ± 10 RU和 151 ± 10 RU, 因而Cry2Ab在LFR₁₀中的结合能力并没有减弱, 而Cry1Ac的竞争结合能力比Cry1Ab略强(图 5.6 C)。



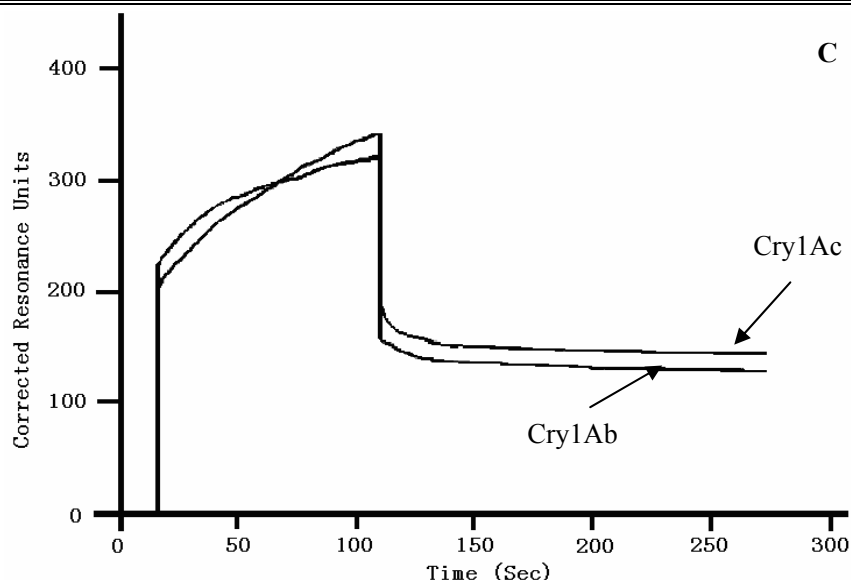


图 5.6 Bt毒素在抗性品系LFR₁₀ BBMV中的竞争结合

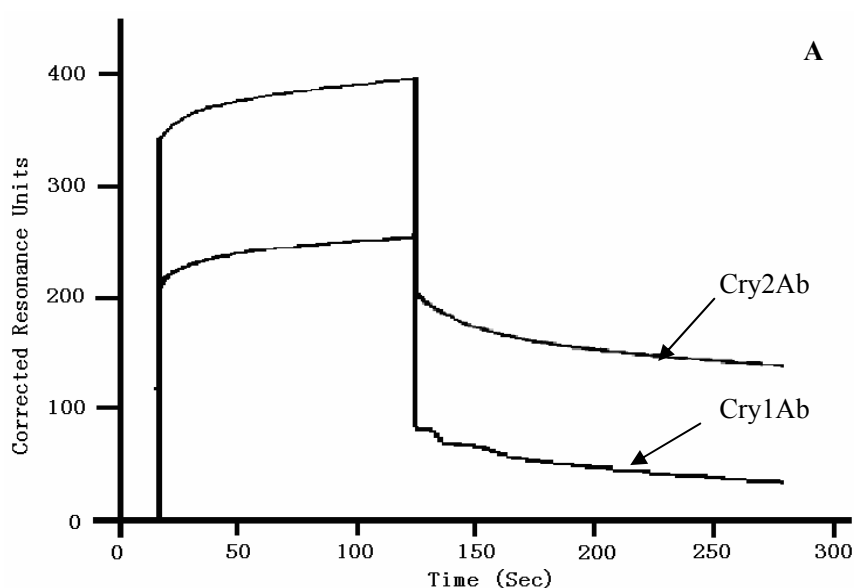
A、Cry1Ac 与 Cry1Ab、Cry2Ab 竞争 B、Cry1Ab 与 Cry1Ac、Cry2Ab 竞争 C、Cry2Ab 与 Cry1Ab、Cry1Ac 竞争

Fig. 5.6 Competition binding analysis of Bt toxins in BBMV isolated from Cry1Ac-resistant strain LFR₁₀

A: Cry1Ac competed with Cry1Ab and Cry2Ab B: Cry1Ab competed with Cry1Ac and Cry2Ab C: Cry2Ab competed with Cry1Ac and Cry1Ab

5. 2. 4. 3 Bt 毒素在 BtR 品系 BBMV 中的竞争结合

在抗性品系 BtR 中，当 Cry1Ac 通道开放时，Cry1Ab 做为被竞争对象时，SPR 的响应值是在 65 ± 8 RU，说明在抗性品系 BtR 的 BBMV 上，Cry1Ac 与 Cry1Ab 存在共同的结合位点，但 Cry1Ac 还有 Cry1Ab 所不能结合的结合位点存在(图 5.7 A)；而对于 Cry2Ab，响应值在 156 ± 25 RU，说明 Cry2Ab 的结合位点不能被 Cry1Ac 所识别(图 5.7 A)。



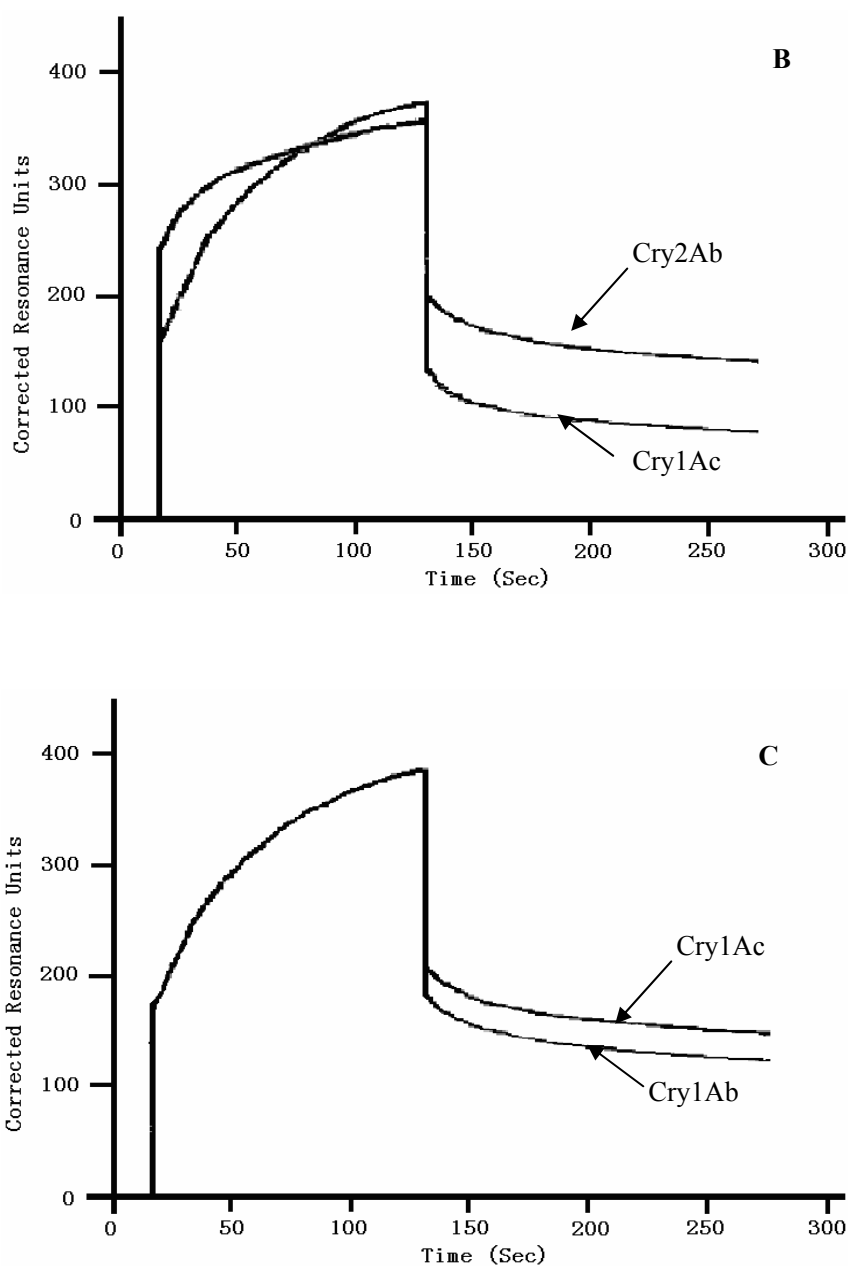


图 5.7 Bt 毒素在抗性品系 BtR BBMV 中的竞争结合

A、Cry1Ac 与 Cry1Ab、Cry2Ab 竞争 B、Cry1Ab 与 Cry1Ac、Cry2Ab 竞争 C、Cry2Ab 与 Cry1Ab、Cry1Ac 竞争

Fig. 5.7 Competition binding analysis of Bt toxins in BBMV isolated from Cry1Ac-resistant strain BtR.

A: Cry1Ac competed with Cry1Ab and Cry2Ab B: Cry1Ab competed with Cry1Ac and Cry2Ab C: Cry2Ab competed with Cry1Ab and Cry1Ac

当 Cry1Ab 通道开放时, 含 Cry1Ac 的 BBMV 混合物与 Cry1Ab 的响应值为 90 ± 13 RU, 说明在抗性品系 BtR 的 BBMV 中, BBMV 与 Cry1Ac 结合后, 仍有位点可供 Cry1Ab 结合(图 5.7 B); 而含有 Cry2Ab 的混合物与 Cry1Ab 结合的反应值为 146 ± 11 RU, 说明 Cry2Ab 与 BBMV 的结合不影响 Cry1Ab 与 BBMV 的结合(图 5.7 B)。

同样的, 当我们将 Cry2Ab 通道开放时, 我们研究了 Cry2Ab 与 Cry1Ac 和 Cry1Ab 的结合能力, SPR 结果显示, Cry2Ab 与二者的响应值分别为 145 ± 21 RU 和 151 ± 23 RU, 说明 Cry1Ac 和 Cry1Ab 与 BBMV 的结合不影响 Cry2Ab 的结合, Cry2Ab 的结合位点不能被 Cry1Ab 和 Cry1Ac 所识别, 同时 Cry2Ab 对它们的竞争结合能力相当接近, 但 Cry1Ac 的解离速度大于 Cry1Ab(图 5.7 C)。

5.3 结论与讨论

5.3.1 SPR 分析 Bt 毒素与 Cry1Ac 抗、感品系 BBMV 的实时结合

通过分子筛的方法我们降低从昆虫中肠中提取的 BBMV 中的核酸浓度, 从而达到 SPR 分析的要求。同时通过氨基耦联的方法可将三种 Bt 毒素蛋白固定在 CM5 芯片上, 确定了三种蛋白固定时耦联缓冲液的最佳 pH 值分别为: 4.0 (Cry1Ac)、4.0 (Cry1Ab)、5.0 (Cry2Ab)。固定后芯片表面的浓度为 Cry1Ac (2.8 ng/mm^2)、Cry1Ab (2.7 ng/mm^2) 和 Cry2Ab (3.1 ng/mm^2)。

Cry2Ab 与 Cry1A 结合位点的不同是 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性的生理生化基础。通过竞争结合实验分析可知, 无论是在敏感品系还是抗性品系里, 含有两种 Cry1A 毒素的 BBMV 混合物总是能引起 Cry2Ab 较强的信号, 且与 Cry2Ab 特异性结合值无明显差异; 当用 Cry2Ab 与各品系 BBMV 的混物流经 Cry1Ac/Cry1Ab 通道时, 同样能引起较高的 SPR 信号, 以上两个方面说明了 Cry2Ab 与 Cry1A 的类毒素在棉铃虫体内不存在共同的结合位点。

对 Cry1A 类毒素间的竞争研究发现: 在敏感品系中, 当 Cry1Ac 与 BBMV 混合后的混物流经 Cry1Ab 的通道时不能引起太强的 SPR 信号, 说明在敏感品系中 Cry1Ab 不能与 Cry1Ac 竞争, 说明 Cry1Ab 不能识别除 Cry1Ac 以外的结合位点; 当 Cry1Ab 与 BBMV 的混物流经 Cry1Ac 通道时则能引起比较大的信号变化, 说明 Cry1Ab 与 BBMV 反应后, 尚有一部分 Cry1Ac 的结合位点不能被 Cry1Ab 所识别; 同样的, 在对抗性品系 LFR₁₀ 和 BtR 进行研究时发现: 在 LFR₁₀ 中, 与敏感品系相比, Cry1Ab 对 Cry1Ac 的竞争能力得到了加强, 这可能是由于 Cry1Ac 的相对结合能力下降而引起的变化; 而在抗性品系 BtR 中, Cry1Ab 对 Cry1Ac 的竞争能力得到更进一步的加强, 说明随着抗性的增加, Cry1Ac 的结合能力在逐步的下降。因此, Cry1Ac 结合能力的下降可能是棉铃虫对 Cry1Ac 抗性产生的一个重要的原因。

通过上一章的分析可知, 虽然 Cry1Ac 对各品系的亲和力一致, 但结合能力也同样存在差异。这样一来就是一个矛盾体, 因而在结合的过程中必定有其它的因素参与了作用。我们利用 SPR 对毒素-受体的结合过程进行实时监测。研究发现 Cry1Ac 与敏感品系 BBMV 的结合能力明显高于抗性品系, 这以结论验证了体外标记结合的竞争实验。对结合作用中的结合过程分析时我们可以得知, 敏感品系 96S 的 BBMV 在结合过程中的结合速率明显高于两个抗性品系, 且各品系的结合速率随着抗性的增加而下降, 同时, 对解离过程中的解离速率的分析可知, 无论是在敏感品系中还是抗性品系中, 其速率基本趋向一致。因此, 我们推测在 Bt 毒素-受体的结合过程中, 影响结合能力的不仅仅是 Bt 毒素与其受体结合时的亲和力, 动态结合过程中的结合速率可能也直接影响到结合能力的变化, 这可能是亲和力一致但毒性不一致的重要原因。但由于受各方面条件的限制, 我们未能开展毒素-受体结合的定量分析, 如果能通过定量的试验来进一步求得结合速率的相对大小, 将会更有力的来说明结合速率对于结合能力的影响。

5. 3. 2 Bt 毒素与棉铃虫体内 Bt 毒素受体结合模型的构建

以往的研究大多偏重于分离单一的 Bt 受体, 研究单一受体与 Bt 间的结合关系 (Gill *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 1997; Yaoi *et al.*, 1997)。小菜蛾和烟芽夜蛾中 Bt 与中肠受体间的结合模型 (Ballester *et al.*, 1999; Jurat-fuentes *et al.*, 2001)得到了构建, 除此之外, 很少有研究从整体上考虑 Bt 蛋白与昆虫中肠上所有受体间复杂的相互作用关系。

本研究中, 我们针对所研究的对象和相应的材料, 结合体外标记结合试验和表面等离子体共振及其以前的研究结果, 构建了几种 Bt 毒素(Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry2Ab)与棉铃虫中 Bt 毒素受体间的结合模型图(图 5.8 ~ 5.10)。该模型在一定程度上阐明了 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性的原因, 同时, 也在一定程度上动态地反应了棉铃虫对 Cry1Ac 抗性产生的演化模型。结合我们以前的研究发现: 当抗性产生时, 首先改变的是 Cry1Ac 与位点 2 以及 Cry1Ab 与位点 1 的结合能力, 当抗性继续上升时, 后者的结合能力不再下降, 而 Cry1Ac 丧失与位点 2 的结合能力。由于各种原因, 我们尚且只能做一个定性的预测, 至于究竟抗性倍数上升到什么高度时才发生变化有待于进一步的研究。

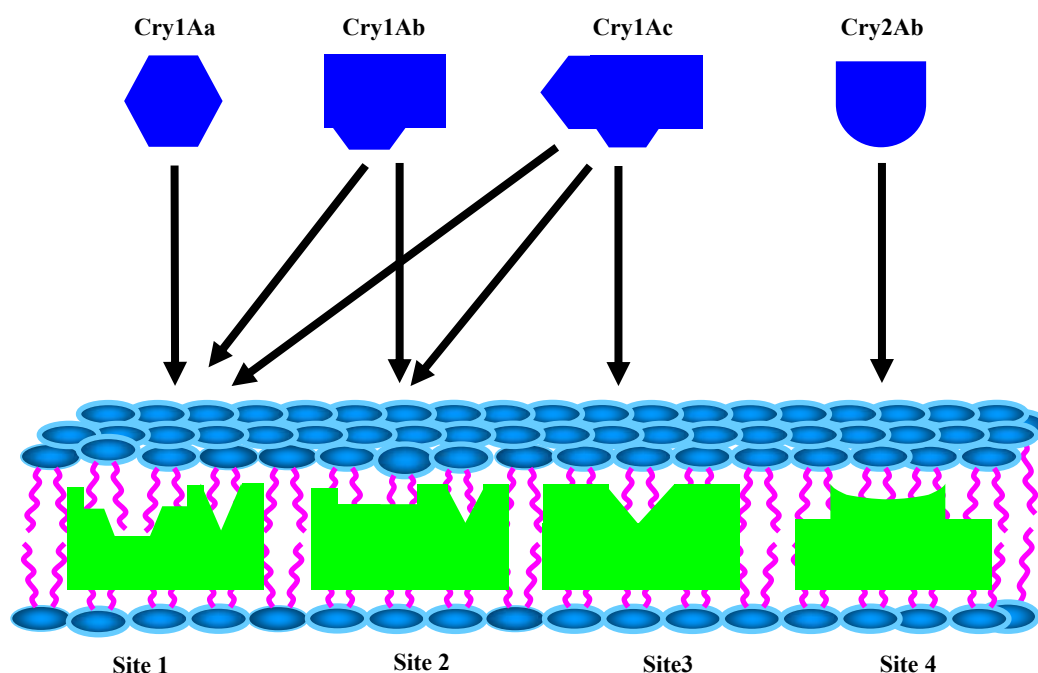


图 5.8 Bt 毒素与 Cry1Ac 敏感棉铃虫的结合模型图

Fig. 5.8 Binding model between Bt toxins and Cry1Ac-susceptible strain of *H. armigera*

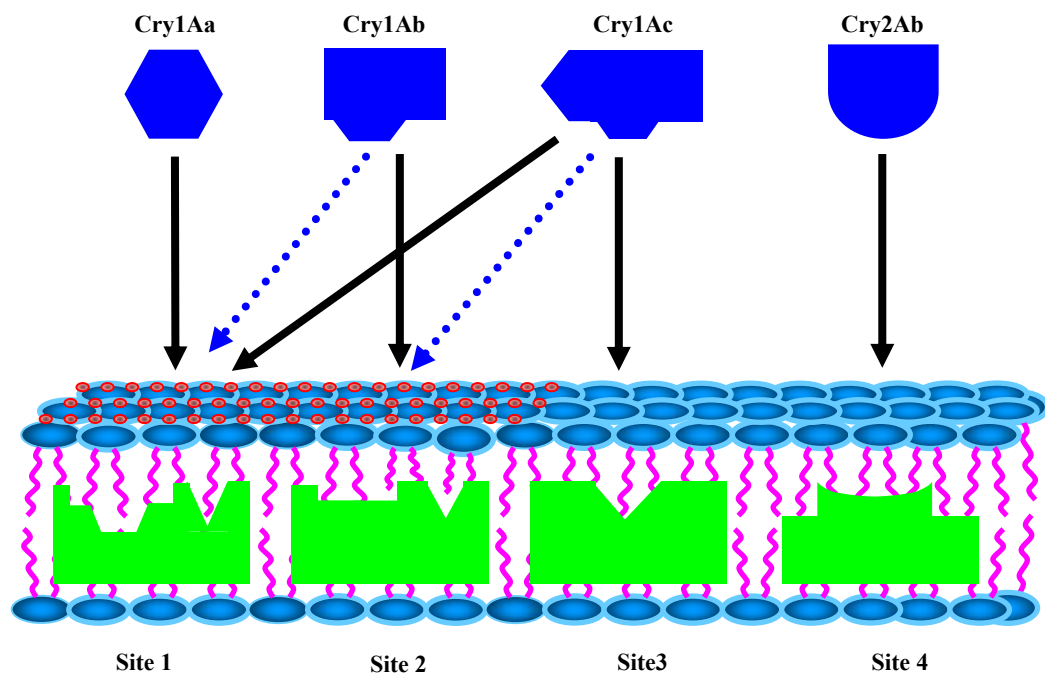


图 5.9 Bt 毒素与 Cry1Ac 抗性棉铃虫 (RR=253.0) 的结合模型图

注：蓝色虚线表示结合能力下降

Fig. 5.9 Binding model between Bt toxins and Cry1Ac-resistant strain of *H. armigera* (RR=253.0)

Note: The blue dashed arrows indicated that the binding capability decreased.

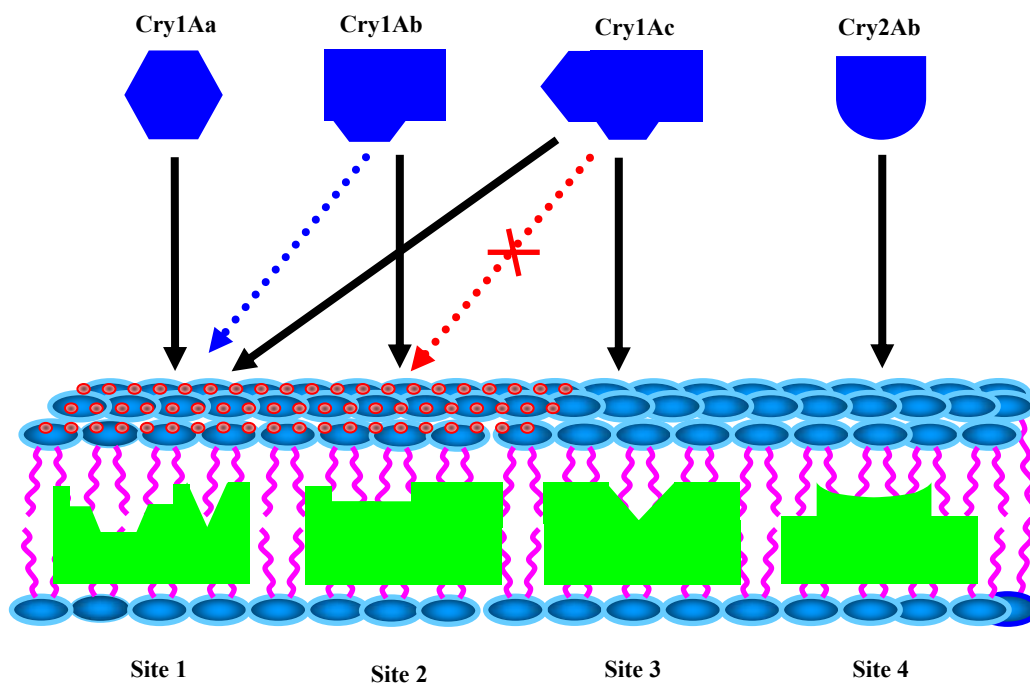


图 5.10 Bt 毒素与 Cry1Ac 抗性棉铃虫 (RR=2971.3) 的结合模型图

注：蓝色虚线表示结合能力下降，红色虚线表示结合能力丧失

Fig. 5.10 Binding model between Bt toxins and Cry1Ac-resistant strain of *H. armigera* (RR=2971.3)

Note: The blue dashed arrow indicated that the binding capability decreased, and the red dashed arrow indicated that the binding capability lost.

Jurat-fuentes 等对烟芽夜蛾的结合模型研究表明：在烟芽夜蛾中，Cry1A 蛋白适合三位点结合模型，即位点 A 能与 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 结合，位点 B 能与 Cry1Ab 和 Cry1Ac 结合，但位点 C 则仅能与 Cry1Ac 结合 (Jurat-fuentes and Adang, 2001)。这与我们得到的敏感品系的结合模型是一致的(图 5.8)。Heckel 等建立了棉铃虫的连锁图谱，推测棉铃虫中存在一些类似于烟芽夜蛾 BtR-4 位点的锚定(anchor)位点。该位点的酶谱及 RFLP 图谱在烟芽夜蛾中已得到构建，在两种害虫中可能具有高度的保守性；而且棉铃虫对 Bt 抗性的连锁与烟芽夜蛾对 Bt 抗性的连锁相同，显示它们可能具有共同的抗性机制，而这一推测在我们所构建的结合模型中也得到了验证。在诸如棉铃虫和烟芽夜蛾等鳞翅目昆虫中对 Bt 最为常见的一种抗性模型称为“模型 1”。“模型 1”必须具备以下几个条件：1) 对 Cry1A 中的一种毒素的抗性倍数超过 500 倍；2) 抗性为隐性遗传；3) 至少对 Cry1A 中的一种毒素的结合能力降低；4) 对 Cry1C 没有交互抗性(Tabashnik *et al.*, 1998; Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2003)。以前的研究发现棉铃虫不会对 Cry1C 具有交互抗性(Zhao *et al.*, 2000)，且对 Cry1Ac 的遗传为不完全隐性遗传(梁革梅等, 2000b; Akhurst *et al.*, 2003)。而我们通过本实验的研究发现棉铃虫对 Cry1Ac 抗性产生的原因是因为 Cry1Ac 与结合位点 2 结合能力的减少而导致的，因此棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性也具有“模型 1”的抗性特点。

本实验仅仅是一个定性分析实验，由于定量实验要求对所参加反应的两个蛋白有更多的了解，而且，我们所用的 BBMV 是一种多组分的粗蛋白，不利于定量实验，因此，将来应开展的工作是利用分子生物学的手段，从昆虫体内克隆并表达单一蛋白来验证其与毒素的结合，可能对于研究受体-毒素间的作用更具参考价值。同时，我们在实验中发现由于毒素蛋白的等电点偏低，在固定的过程中难度比较大，因而可以通过寻找其它桥梁的方法可能会使得固定更加容易，例如可以考虑先将一种比较容易固定的物质(例如抗体)先固定在芯片的表面，然后再将毒素与该物质特异性的固定在其表面。

同时，该方法还可以达到寻找新的 Bt 受体蛋白的目的。也就是说将毒素固定在芯片表面后，可将粗提的 BBMV 通过芯片的表面，然后通过合适的方式将芯片所捕获的蛋白解离下来，这样做的优点是所捕获的蛋白由于是在一种非变性的条件下得到的，因而可以通过其它的方法来对其进行结构和功能的鉴定。

第六章 全文结论与讨论

6.1 全文主要结论

棉铃虫对 Bt-Cry1Ac 的抗性严重威胁到 Bt-Cry1Ac 棉花的可持续利用,包括“高剂量/庇护所”和“多基因”等在内的多种抗性治理策略得以提出。为明确 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 的交互抗性及其机理,本文通过对室内筛选昆虫的交互抗性的测定,明确了 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 的抗性,同时,通过体外标记结合和表面等离子体共振技术研究了 Cry1Ac 抗、感棉铃虫 BBMV 与几种 Bt 毒素的结合动力学,明确了 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 抗性的生理生化基础,同时揭示了棉铃虫对 Cry1Ac 抗性产生的主要原因。通过对 Cry1Ac 抗、感棉铃虫幼虫酶液与 Cry1Ac 前毒素的作用,揭示了酯酶与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性关系。通过以上研究内容得到了以下几个创新性的结论:

- 1、室内生物测定表明,用不同剂量筛选不同代数而来的抗性品系 LFR₁₀ 和 BtR 对 Cry1Ac 毒素毒性分别是敏感品系 96S 的 253 倍和 2971 倍,而 Cry2Ab 对 96S、LFR₁₀ 和 BtR 的 WLC₅₀ 分别为 0.148、0.150 和 0.161mg/g 饲料,说明对 Cry1Ac 具有高度抗性的抗性品系棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性, Cry2Ab 将可以用于延缓棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性治理;
- 2、进一步对 Cry2Ab 与 Cry1Ac 抗、感品系 BBMV 的结合动力学研究表明:无论是在敏感品系内还是抗性品系中, Cry1Ac 与 Cry2Ab 之间均不存在竞争,说明了它们之间不存在共同的结合位点,结合位点的不同是 Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry2Ab 不存在交互抗性的生理生化基础;
- 3、阐明了棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性演化模型:棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性以后, Cry1Ac 和 Cry1Ab 与受体的结合能力都会下降,但后者下降到一定程度时不再下降,但 Cry1Ac 的结合能力随着抗性的增加而继续减少,直至结合能力的丧失,因此, Cry1Ac 与 BBMV 结合能力的改变是影响抗性产生的一个主要因素;
- 4、抗性品系(LFR₁₀和BtR)和敏感品系(96S和LF)与Cry1Ac结合时在亲和性常数上没有差异,也就是说各品系对Cry1Ac亲和力一致,但抗性品系中结合位点浓度显著低于敏感品系,因此结合位点浓度的降低棉铃虫对Cry1Ac产生抗性的一个原因,而除了受体蛋白本身的因素外,可能还有其它因素参与了作用。而SPR即时结合的研究则在一定程度上解释了这个问题,研究表明:在BBMV与Cry1Ac的结合过程中,虽然解离的速率一致,但敏感品系与Cry1Ac毒素的结合速率明显高于抗性品系,这可能是影响毒素-受体间结合能力的一个重要因素,也是各品系亲和力一致,但结合能力却相差很大的重要原因;
- 5、棉铃虫总酯酶是影响棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性的又一个因素。酶活性测定表明, Cry1Ac 抗性棉铃虫 BtR 品系中的酯酶活性显著高于敏感品系,但抗性品系中的碱性磷酸酯酶的活性则显著低于敏感品系。当用 Cry1Ac 前毒素和毒素处理酯酶时发现敏感品系棉铃虫的酯酶不能与它们结合,而抗性品系密棉铃虫的却能与二者结合。用酯酶处理 Cry1Ac 前毒素时发现抗性品系的酯酶对前毒素的活化作用显著低于敏感品系。据此,我们推测:抗性棉铃虫

体内碱性磷酸酯酶的减少导致了对 Cry1Ac 前毒素活化作用的减弱;同时,总酯酶在体内的大量表达,使得酯酶能与 Cry1Ac 前毒素和毒素发生更多非特异性的结合,这种结合使 Cry1Ac 毒素减少或失去与中肠上皮细胞膜上受体结合的机会,从而使得棉铃虫对 Cry1Ac 毒素不敏感,即表现为抗性。

- 6、对抗性品系BtR与敏感品系 96S及其杂交子一代 $F_{1S♀}$ 和 $F_{1S♂}$ 的研究表明,杂交后代 $F_{1S♀}$ 和 $F_{1S♂}$ 无论是在酶谱、酶活性还是酶与Cry1Ac前毒素、毒素的相互作用方面均无差异,且 $F_{1S♀}$ 和 $F_{1S♂}$ 的酶谱是BtR和 96S酶谱的“叠加”;同时, $F_{1S♀}$ 和 $F_{1S♂}$ 的酶活力在其亲本BtR和 96S之间,杂交子一代对Cry1Ac前毒素的活化作用介于抗性品系BtR和敏感品系 96S之间,上述结果说明了与抗性有关的酯酶在棉铃虫中是可以遗传的,且与性连锁无关。

6.2 本研究的创新点

通过对棉铃虫 BBMV 与两类、四种 Bt 毒素(Cry1A 类(Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac)和 Cry2Ab)间结合动力学的研究以及棉铃虫酯酶与 Cry1Ac 抗性关系的研究,本论文的研究具有以下 3 个方面的创新性:

- 1、 本文通过对 Bt 毒素(Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry2Ab)与 Cry1Ac 抗、感棉铃虫 BBMV 之间的亲和性分析以及 Bt 毒素蛋白在各品系 BBMV 间的相互竞争研究,构建了 Bt 毒素与棉铃虫 BBMV 的结合模型。
- 2、 在论文的研究过程中,创新性的借助了蛋白质相互作用的最新研究技术手段——表面等离子体共振技术——研究了 Bt 毒素与棉铃虫 BBMV 的结合动力学,为研究昆虫对 Bt 的抗性机理提供了新的技术手段和途径。同时,该方法的运用将为昆虫学的其它研究方向(如化学生态学)提供一些可借鉴的思路和启示。
- 3、 通过比较 Cry1Ac 抗、感棉铃虫体内酯酶的研究,明确了碱性磷酸酯酶的降低与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性密切相关,为进一步发展田间抗性监测技术提供了新的思路和技术手段。

6.3 有待于进一步开展的工作

本研究从体外标记结合和表面等离子体两个方面研究了棉铃虫 Bt 受体蛋白与 Bt 毒素的结合动力学,阐明了棉铃虫对 Bt 的主要抗性机理。其中后者在很大程度上能解释前者所不能解释的问题:例如在体外标记结合中,Cry1Ac 抗、感棉铃虫二者的亲和性常数 Kd 值没有差异,但结合能力却不一致,在体外标记结合试验中是无法解释这一矛盾的。但我们通过对 Bt 毒素与受体间结合能力的实时测定发现,SPR 曲线显示敏感品系的结合速率高于抗性品系,这可能是解释这一矛盾的关键所在。但由于试验条件的限制,我们只进行了定性的试验,没有能够进行进一步的定量试验,不能不说是一个遗憾!因此,在以后的工作中,很有必要进行定量的试验以准确求得结合、解离速率,以揭示 Bt 毒素与棉铃虫 BBMV 间结合动力学与棉铃虫对 Bt 抗性的关系。

同时,SPR 技术还具有配体垂钓的功能,因而,该方法可能用于寻找昆虫中 Bt 毒素的受体蛋白。该方法的具体设想是:将 Bt 毒素固定在芯片上,然后将 BBMV 通过芯片表面,通过计算机程序的控制,使得其中的 Bt 受体固定在芯片表面,然后,再利用相应的洗脱液将受体从芯片上解离下来。这样,再通过电泳和氨基酸序列测定就可以确定其中的 Bt 毒素受体蛋白,同时,

该方法也可以用来比较抗、感 Bt 昆虫中 Bt 受体的差异。

另外, 本文研究还表明, 与 Cry1Ac 敏感棉铃虫相比, 在 Cry1Ac 抗性棉铃虫中, 总酯酶的量是增加的, 但碱性磷酸酯酶的量显著减少, 因而, 我们推测碱性磷酸酯酶的减少与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性密切相关。但有关进一步的验证需要从分子生物学的角度来进行。

参考文献

- 1) 戴小枫, 郭予元. 棉铃虫大暴发的成因初析. 植物保护, 1993, 19: 35~37
- 2) 戴小枫. 浅谈华北棉区三代棉铃虫防治困难的原因及治理对策. 植物保护, 1991, 17: 30~32
- 3) 郭予元. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- 4) 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版), 北京: 科学出版社, 1996
- 5) 李国平. 不同种植模式下棉铃虫对转基因棉花的抗性演化分析. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- 6) 李号宾, 吴孔明, 杨秀荣, 徐遥, 姚举, 汪飞, 马祁. 新疆南部棉区棉铃虫发生趋势及Bt棉花的控制效率. 中国农业科学, 2006, 39: 199~205
- 7) 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学, 2000a, 33: 46~53
- 8) 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 棉铃虫对转 Bt 基因棉花的抗性筛选及遗传方式的研究. 昆虫学报, 2000b, 43(增):57~62
- 9) 梁革梅, 王桂荣, 徐广, 吴孔明, 郭予元. 昆虫 Bt 毒素受体蛋白的研究进展. 昆虫学报, 2003, 46: 390~396.
- 10) 刘凯于, 姚汉超, 杨红, 洪华珠. 昆虫中肠 Bt 杀虫晶体蛋白毒素受体氨肽酶 N 的研究进展. 昆虫知识, 2004, 41: 203~207
- 11) 沈晋良, 周威君, 吴益东. 棉铃虫对 Bt 生物农药早期抗药性及与转 Bt 基因棉的抗虫性关系. 昆虫学报, 1998, 41(1): 8~14
- 12) 沈平. 生物传感技术的新应用——生物分子相互作用分析新技术(BIA). 生物化学与生物物理进展, 1997, 24: 91~94.
- 13) 隋森芳. 膜分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 2003
- 14) 谭声江, 陈晓峰, 李典谟. 昆虫对 Bt 毒素的抗性机理研究进展. 昆虫知识, 2001, 38: 12~17
- 15) 唐振华, 周新, 张光美. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京: 农业出版社, 1996
- 16) 王桂荣, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元. 棉铃虫中肠氨基氨肽酶 N 基因的克隆及序列分析. 中国农业科学, 2003, 36: 1293~1300
- 17) 王桂荣, 吴孔明, 梁革梅, 郭予元. 棉铃虫中肠钙粘蛋白基因的克隆、表达及 Cry1Ac 结合区定位. 中国科学(C 辑), 2004, 34: 537~546
- 18) 吴孔明. 我国 Bt 棉花商业化的环境影响与风险管理策略. 农业生物技术学报, 2007, 15: 1~4
- 19) 喻子牛. 生命科学和土壤学中几个领域研究的进展. 北京: 农业出版社, 1993
- 20) Adamczyk, Jr. J. J., L. C. Adams, and Hardee, D. D. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. J. Econ. Entomol., 2001, 94: 1589~1593.
- 21) Akhurst, R. J., W. James, L. J. Bird, and C. Beard. Resistance to the Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 2003, 96: 1290~1299.

- 22) Alstad, D. N., and D. A. Andow. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 1995, 268: 1894~1896.
- 23) Aronson, A. I., E. S. Han, W. McGaughey, and D. Johnson. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 981~986.
- 24) Ballester, V. V., F. Granero, R. A. de Maagd, D. Bosch, J. L. Mensua, and J. Ferré. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65:1900~1903.
- 25) Bates, S. L., J. Z. Zhao, R. T. Roush, and A. M. Shelton. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23: 57~62.
- 26) Bird, L. J., and R. J. Akhurst. Relative fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on conventional and transgenic cotton. *J. Econ. Entomol.*, 2004, 97: 1699~1709.
- 27) Bosh, D., B. Schipper, H. Klei, R. De Maagd, and W. J. Stiekema. Domains of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins involved in insecticidal activity. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1994, 4: 449.
- 28) Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~254.
- 29) Bravo, A., I. Gomez, J. Conde, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill, and M. Soberon. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2004, 1667: 38~46.
- 30) Bravo, A., J. Sanchez, T. Kouskoura, and N. Crickmore. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 23985~23987.
- 31) Brunke, K. J., and R. L. Meeusen. Insect control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.*, 1991, 9: 197~200.
- 32) Burd, A. D., F. Gould, J. R. Bradley, J. W. Van Duyn, and W. J. Moar. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. *J. Econ. Entomol.*, 2003, 96: 137~142.
- 33) Caprio, M. A. *Bacillus thuringiensis* gene deployment and resistance management in singleand multi-tactic environments. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1994, 4: 487~497.
- 34) Caprio, M. A., and B. E. Tabashnik. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.*, 1992, 85: 611~620.
- 35) Carrière, Y., J. P. Deland, D. A. Roff, and C. Vincent. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 1994, 258: 35~40.

- 36) Chilcutt, C. F., and B. E. Tabashnik. Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxins gene from transgenic maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2004, 101: 7526~7529.
- 37) Chitkowski, R. L., S. G. Turnipseed, M. J. Sullivan, and W. C. Bridges Jr. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Berliner proteins for management of Noctuid (Lepidoptera) pests. J. Econ. Entomol., 2003, 96: 755~762.
- 38) Crickmore, N., R. Zeigler, and J. Feitelson. Program and abstract of the 28th annual meeting of the society for invertebrate pathology. (eds). 1995
- 39) Daniel, A., S. S. Sangadala, D. H. Dean, and M. J. Adang. Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes binding epitopes hidden under non-denaturing conditions. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 2106~2112.
- 40) De Maagd R. A., H. Klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema, and D. Bosch. Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 2753-2757.
- 41) De Maagd, R. A., D. Bosch, and W. Stiekema. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. Trends. Plant. Sci., 1999, 4: 9~13.
- 42) Denholm, I., and M. W. Rowland. Tactics for managing resistance in arthropods: theory and practice. Annu. Rev. Entomol., 1992, 22: 91~112.
- 43) Eguchi, M. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. Comp. Biochem. Physiol. B, 1995, 111: 151~162.
- 44) English, L. H., and T. L. Readdy. Delta-endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. Insect Biochem., 1989, 19: 145~152
- 45) English, L., H. L. Robbins, M. A. Von Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany, and S. Slatin. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Insect Biochem. Mol. Biol., 1994, 24: 1025~1035.
- 46) Fernandez, L. E., K. G. Aimanova, S. S. Gill, A. Bravo, and M. Soberón. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. Biochem. J., 2006, 394: 77~84.
- 47) Ferré, J., and J. Van Rie. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., 2002, 47: 501~533.
- 48) Flannagan, R. D., C. G. Yu, J. P. Mathis, T. E. Meyer, X. Shi, H. A. A. Siqueira, and B. D. Siegfried. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). 2005, Insect Biochem. Mol. Biol., 2005, 35: 33~40.
- 49) Forcada, C., E. Alcácer, M. D. Garceía, A. Tato and R. Martínez. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1999, 42: 51~63.
- 50) Forcada, C., E. Alcácer, M. D. Garceía, and R. Martínez. Differences in the midgut proteolytic

- activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1996, 31: 257~72.
- 51) Francis, B. R., and L. A. Bulla. Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. Insect Biochem. Mol. Biol., 1997, 27: 541~550.
- 52) Frutos, R., C. Rang and M. Royer. Managing resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Crit. Rev. Biotechnol., 1999, 19: 227~276.
- 53) Gahan, L. J., F. Gould and D. G. Heckel. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science, 2001, 293: 857~860.
- 54) Gahan, L., J. Y. T. Ma, M. L. Coble, F. Gould, W. J. Moar, and D. G. Heckel. Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 2005, 98: 1357~1368.
- 55) Garczynski, S. F., and M. J. Adang. *Bacillus thuringiensis* Cry I A(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca Sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. Insect Biochem. Mol. Boil., 1995, 25: 409~415.
- 56) Garczynski, S. F., J. W. Crim, and M. J. Adang. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin by protein blot analysis. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57: 2816~2820.
- 57) Garner, K. J., S. Hiremath, K. Lehtoma, and A. P. Valaitis. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Insect Biochem. Mol. Biol., 1999, 29: 527~535.
- 58) Gazit, E., and Y. Shai. The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the por-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin relevance to a functional model. J. Biol. Chem., 1995, 270: 2571~2578.
- 59) Gazit, E., P. La Rocca, M. S. Sansom, and Y. Shai. The structure and organization with the membrane of the helices composing the por-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998, 95: 12289~12294.
- 60) Georgiou, G. P., and C. E. Taylor. Genetic and biological influence in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol., 1977a, 70: 319~323.
- 61) Georgiou, G. P., and C. E. Taylor. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol., 1977b, 70: 653~658.
- 62) Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol., 1992, 37: 615~636.
- 63) Gill, S. S., E. A. Cowles, and V. Francis. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., 1995, 270: 27277~27282.
- 64) Gómez, I., D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo, and M. Soberón. Mapping the epitope in

- cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. J. Biol. Chem., 2001, 276: 28906~28912.
- 65) Gómez, I., J. Miranda-Rios, E. Rudiño-Piñera, D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo, and M. Soberón. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. J. Biol. Chem., 2002, 277: 30137~30143.
- 66) Gonzalez-Cabrera, J., B. Escriche, B. Tabashnik, and J. Ferré. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*), Insect Biochem. Mol. Biol., 2003, 33: 929~935.
- 67) Gould, F. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. Biocontrol Sci. Technol., 1994, 4: 451~461.
- 68) Gould, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Annu. Rev. Entomol., 1998, 43: 701~726.
- 69) Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, L. Bumgarner, and W. Moar. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Econ. Entomol., 1995, 88: 1545~1559.
- 70) Gould, F., A. Martinez-Ramirez, A. Anderson, J. Ferré, F. J. Silva, and W. J. Moar. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1992, 89: 7986~7990.
- 71) Griffiths, J. S., J. L. Whitacre, D. E. Stevens, and R. V. Aroian. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. Science, 2001, 293: 860~864.
- 72) Griffiths, J. S., S. M. Haslam, T. L. Yang, S. F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang, and R. V. Aroian. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Science, 2005, 307: 922~925.
- 73) Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol., 1995, 254: 447~464.
- 74) Gunning, R. V., G. D. Moores, and A. L. Devonshire. Esterases and esfenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae. Pestic. Biochem. Physiol., 1996, 54: 12~23.
- 75) Gunning, R. V., H. T. Dang, F. C. Kemp, I. C. Nicholson, and G. D. Moores. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71: 2558~2563.
- 76) Hara, H., S. Atsumi, K. Yaoi, K. Nakanishi, S. Higurashi, N. Miura, H. Tabunoki, and R. Sato. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. FEBS Lett., 2003, 538: 29~34.
- 77) Harvey, W. R., and M. G. Wolfersberger. Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of *Manduca sexta* by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. J. Exp.

- Biol., 1979, 83: 293 ~304.
- 78) Heckle, D. G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. Biocontrol Sci. Tech., 1994, 4: 405~417.
- 79) Herrero, S., B. Oppert, and J. Ferré. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. Appl. Environ. Microbiol., 2001b, 67: 1085~1089.
- 80) Herrero, S., J. Ferré, and B. Escriche. Mannose phosphate isomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in lepidopteran species. Appl. Environ. Microbiol., 2001a, 67: 979~981.
- 81) Höfmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, van Rie, J., S. Jansens, and H. Van Mellaert. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush-border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1988a, 85: 7844~7848.
- 82) Höfmann, C., P. Lüthy, and V. Pliska. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem., 1988b, 173: 85~91.
- 83) Höfte, H., and H. R. Whigley. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., 1989, 53: 242~255.
- 84) http://www.icac.org/cotton_info/tis/biotech/documents/recorderdocs/june_03.pdf
- 85) Hua, G., J. L. Jurat-Fuentes, and M. J. Adang. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. J. Biol. Chem., 2004, 279: 28051~28056.
- 86) Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab and M. J. Adang. Binding of analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 872~879.
- 87) Huang, F., R. A. Higgins, and L. L. Buschman. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* under selection pressure in European Corn Borer (Lepidoptera: Pyratidae). J. Econ. Entomol., 1997, 90: 1137~1143.
- 88) James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2003, Brief NO. 32.
- 89) James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005, Brief NO. 34.
- 90) James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006, Brief NO. 33.
- 91) James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. Brief NO. 35.
- 92) James, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2002, Brief NO. 27.
- 93) Janmaat, A. F., and J. Myers. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B., 2003, 270: 2263~2270.
- 94) Jenkins, J. L., and D. H. Dean. Exploring the mechanism of action of insecticidal protein by genetic engineering methods (eds). New York: Plenum Press, 2000, 33~54.

- 95) Jenkins, J. L., and D. H. Dean. Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. BMC Biochem., 2001, 2:12.
- 96) Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur. J.Biochem., 2004b, 271: 3127~3135.
- 97) Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. J. Invertebr. Pathol., 2006, 92: 166~171.
- 98) Jurat-Fuentes, J. L., F. L. Gould, and M. J. Adang. Altered Glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. Appl. Environ Microbiol., 2002, 68: 5711~5717.
- 99) Jurat-Fuentes, J. L., F. L. Gould, and M. J. Adang. Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69: 5898~5906.
- 100) Jurat-Fuentes, J. L., L. J. Gahan, F. L. Gould, D. G. Heckel, and M. J. Adang. HevCaLP protein mediates specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Biochemistry, 2004a, 43: 14299~14305.
- 101) Jurat-Fuentes, J., and M. J. Adang. Importance of Cry1 δ -endotoxin domain loops II for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.) Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 323~329.
- 102) Karumbaiah, L., B. Oppert, J. L. Jurat-Fuentes, and M. J. Adang. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis Virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Comp. Biochem. Physiol. Part B., 2007, 146: 139~146.
- 103) Kato, T., M. Higuchi, R. Endo, T. Maruyama, K. Haginoya, Y. Shitomi, T. Hayakawa, T. Mitsui, R. Sato, and H. Hori. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, but not Cry1Aa or Cry1Ac, disrupts liposomes. Pestic. Biochem. Physiol., 2006, 84: 1~9.
- 104) Knight, P. J. K., N. Crickmore, and D. J. Ellar. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol., 1994, 11: 429 ~436.
- 105) Knowles, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. Adv. Insect Physiol., 1994, 24: 275~308.
- 106) Knowles, B. H., P. J. Knight, and D. J. Ellar. N-Acetylgalactosamine is part of the receptor in insect gut epithela that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond. B., 1991, 245: 31~35.
- 107) Kranthi, K. R., S. A. Kranthi, and S. K. Banerjee. Resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in a laboratory selected strain of *Helicoverpa armigera* (Hübner). Curr. Sci., 2000, 78: 1001~1004.
- 108) Kumaraswami, N. S., T. Maruyama, S. Kurabe, T. Kishimoto, T. Mitsui, and H. Hori. Lipids of brush border membrane vesicles (BBMV) from *Plutella xylostella* resistant and susceptible

- to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Comp. Biochem. Physiol. B., 2001, 129: 173~183.
- 109) Lee, M. K. F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J. S. Chen. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -Endotoxin. Appl. Envir. Micro., 2003, 69: 4648~4657.
- 110) Lee, M. K., F. Rajamohan, F. Gould, and D. H. Dean. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliotis virescens* strain is related to receptor alteration. Appl. Env. Microbiol., 1995, 61: 3836~3842.
- 111) Lee, M. K., T. You, B. Young, J. Cotrill, A. Valaitis, and D. Dean. Aminopeptidase-N purified from *gypsy moth* brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 2845~2849.
- 112) Lesieur, C., B. Vecsey-Semjen, L. Abrami, M. Fivaz, and F. Gisou van der Goot. Membrane insertion: the strategies of toxins (Review). Mol. Membr. Biol., 1997, 14 : 45~64.
- 113) Li, G., K. Wu, F. Gould, H. Feng, Y. He, and Y. Guo. Bt toxin resistance gene frequencies in *Helicoverpa armigera* populations from the Yellow River cotton farming region of China. Entomol. Exp. Appl. 2004, 112: 135-143. (Hofte and Whiteley 1989)
- 114) Li, H., B. Oppert, R. A. Higgins, F. Huang, K. Y. Zhu, and L. L. Buschman. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochem. Mol. Biol., 2004, 34: 753~762.
- 115) Li, J., Carroll, J., and D. J. Ellar. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, 1991, 353: 815~821.
- 116) Liang, G., G. Wang, G. Xu, K. Wu, and Y. Guo. Purification of aminopeptidase N protein and difference in cDNAs encoding APN1 between susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* strains to *Bacillus thuringiensis* toxins. Agri. Sci. China, 2004, 3: 456~467.
- 117) Liao, C. The toxicology of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal crystal protein in *Helicoverpa armigera*. [PhD Thesis]. Australian National University, Canberra. 1999.
- 118) Lilien, J., and J. Balsamo, The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. Curr. Opin. Cell Biol., 2005, 17: 459~465.
- 119) Liu, D., S. Burton, T. Glancy, Z. S. Li, R. Hampton, T. Meade, and D. J Merio. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photobacterium lumines* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Biotechnol., 2003, 21: 1222~1228
- 120) Liu, Y. B., and B. E. Tabashnik. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond., 1997, 264: 605~610.
- 121) Lorence, A., A. Darszon, and A. Bravo. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. FEBS Lett., 1997, 414: 303 ~ 307.
- 122) Luo, K., B. E. Tabashnik, and M. J. Adang. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant *plutella xylostella*. Appl. Environ. Microbiol., 1997b, 63: 1024~1027.

- 123) Luo, K., S. Sangadala, L. Masson, A. Mazza, R. Brousseau, and M. J. Adang. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997a, 27: 735~743.
- 124) Luo, K., Y. Lu, and M. J. Adang. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 26: 783~791.
- 125) Luo, S., G. Wang, G. Liang, K. M. Wu, L. Bai, R. Guo., and Y. Guo. Binding of three Cry1A toxins in resistant and susceptible strains of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2006, 85: 104~109.
- 126) MacIntosh, S. C., T. B. Stone, R. S. Jokerst, and R. L. Fuchs. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88: 8930~8933.
- 127) Masson, L., A. Mazza and R. Brousseau. Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Analyt. Biochem.*, 1994, 218: 405~412.
- 128) Masson, L., A. Mazza, L. Grin gorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.*, 1994, 14: 851~860.
- 129) Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau, and B. Tabashnik. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J Biol. Chem.*, 1995b, 270: 11887~11896.
- 130) Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau, and B. Tabashnik. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 11887~11896.
- 131) Masson, L., Y. J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau, and M. J. Adang. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *Biol. Chem.*, 1995a, 270: 20309~20315.
- 132) Martinez-Ramirez, A. C., E. A. Baltasar, and D. Real. Inheritance of resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a field population of diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Pestic. Sci.*, 1995, 43: 115~120.
- 133) McGaughey, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 1985, 229: 193~195.
- 134) McGaughey, W. H., and M. E. Whalon. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 1992, 258: 1451~1455.
- 135) McNall, R. J., and M. J. Adang. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 33: 999~1010.
- 136) Morin, S., R. W. Biggs, M. S. Sisterson, L. Shriver, C. Ellers-Kirk, D. Higginson, D. Holley, L. J.

- Gahan, D. G. Heckel, Y. Carriere, T. J. Dennehy, J. K. Brown, and B. E. Tabashnik. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003, 100: 5004~5009.
- 137) Morse, R. J., G. Powell, and V. Ramalingam. Crystal structure of Cry2Aa from *Bacillus thuringiensis* at 2.2 Angstroms: structure basis of dual specificity. VIIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control & IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Sapporo, Japan, 1998
- 138) Morse, R. J., T. Yamamoto, and R. M. Stroud. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure, 2001, 9: 409~417.
- 139) Munson, P. J., and D. Rodbard. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal. Biochem., 1980, 107: 220~239.
- 140) Nagamatsu, Y., S. Toda, F. Yamaguchi, M. Ogo, M. Kogure, M. Nakamura, Y. Shibata, and T. Katsumoto. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, 62: 718~726.
- 141) Nagamatsu, Y., T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto, and Y. Furukawa. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. FEBS Lett., 1999, 46: 385~390.
- 142) Oddou, P., H. Hartmann, F. Radecke, and M. Geiser. Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin. Eur. J. Biochem., 1993, 212: 145~150.
- 143) Oppert, B., K. J. Kramer, D. Johnson, S. Upton, and W. H. McGaughey. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. Insect Biochem. Mol. Biol., 1996, 26: 571~583.
- 144) Oppert, B., K. J. Kramer, R. W. Beeman, D. Johnson, and W. H. McGaughey. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biol. Chem., 1997, 272: 23473~23476.
- 145) Pietranonio, P.V., and S. S. Gill. *Bacillus thuringiensis* toxins: Action on the insect midgut. (In) Lehane, M. J. and Billingsley, P. F. (eds). Biology of the Insect Midgut. London: Chapman & Hall, 1996, 345~372
- 146) Rajamohan, F., J. A. Contrill, F. Gould, and D. H. Dean. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., 1996, 271: 2390~2396.
- 147) Rajamohan, F., M. K. Lee, and D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., 1998, 60: 1~27.
- 148) Ramachandran, S., G. D. Buntin, J. N. All, B. E. Tabashnik, P. L. Raymer, M. J. Adang, D. A. Pulliam, and Jr. C. N. Stewart. Survival, development, and oviposition of resistant diamondback (Lepidoptera: plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. J. Econ. Entomol., 1998, 91: 1239~1244.

- 149) Rosenheim, J. A., and B. E. Tabashnik. Evolution of pesticide resistance: interactions between generation time and genetic, ecological, and operational factors. *J. Econ. Entomol.*, 1990, 83: 1184~1193.
- 150) Roush, R. T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pestic. Sci.*, 1997, 51: 328~334.
- 151) Roush, R. T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1998, 353: 1777~1786.
- 152) Sangadala, S. F. S. Walters, L. H. English, and M. J. Adang. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $86\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 10088~10092.
- 153) SAS Institute. 1998. SAS/STAT user's guide, release 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, NC.
- 154) Sayyed, A. H., R. Gatsi, M. S. Ibiza-Palacios, B. Escriche, D. J. Wright, and N. Crickmore. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAb and CryIAc. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71: 6863~6869.
- 155) Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbio. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62: 775~806.
- 156) Shelton, A. M., J. L. Robertson, J. D. Tang, C. Perez, S. D. Egnbrode, H. K. Preisler, W. T. Wilsey, and R. J. Cooley. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.*, 1993, 86: 697~705.
- 157) Silva-Filha, M. H. C. Nielsen-LeRoux, and J. F. Charles. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, 29: 711~721.
- 158) Stefan, L., M. Malmqvist, and I. Ronnberg. Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors Actr.*, 1991, 5: 79~84.
- 159) Stewart, S. D., J. J. Adamczyk, Jr., K. S. Knighten, and F. M. Davis. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of Noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 2001, 94: 752~760.
- 160) Tabashnik, B. E. Y. B. Liu, T. Malvar, D. G. Heckel, L. Masson, and J. Ferré. Insec resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philos. Trans. R. Soc. B.*, 1998, 353: 1751~1756.
- 161) Tabashnik, B. E., Y. B. Liu, T. J. Dennehy, M. A. Sims, M. S. Sisterson, R. W. Biggs, and Y. Carrière. Inheritance of resistance to Bt toxin CryIAc in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.*, 2002a, 95: 1018~1026.
- 162) Tabashnik, B. E. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1994b, 255: 7~12.
- 163) Tabashnik, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 1994a, 39: 47~79.

- 164) Tabashnik, B. E. Y. B. Liu, D. C. Unnithan, Y. Carriere, T. J. Dennehy, and S. Morin. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *J. Econ. Entomol.*, 2004, 97: 721~726.
- 165) Tabashnik, B. E., and B. A. Croft. Evolution of pesticide resistance in apple pests and their nature enemies. *Biocontrol*, 1985, 30: 37~49.
- 166) Tabashnik, B. E., L. P. Amanda, J. D. Timothy, Y. B. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims, and L. Antilla. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97:12980~12984.
- 167) Tabashnik, B. E., N. L. Cusing, N. Finson, and M. W. Johnson. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 1990, 83:1671~1676.
- 168) Tabashnik, B. E., T. J. Dennehy, M. A. Sims, K. Larkin, G. P. Head, W. J. Moar, and Y. Carriere. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002b, 68: 3790~3794.
- 169) Tabashnik, B. E., Y. Carrière, T. J. Dennehy, M. A. Sims, M. Sisterson, R. T. Roush, A. M. Shelton, and J. Z., Zhao. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.*, 2003, 96: 1031~1038.
- 170) Tang, J. D., H. L. Collins, R. T. Roush, T. D. Metz, E. D. Earle, and A.M. Shelton. Survival, weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (L.) on broccoli expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 1999, 92: 47~55.
- 171) Tang, J. D., S. Gilboa, R. T. Roush, and A. M. Shelton. Inheritance, stability, and lack-of-fitness costs of field selection resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90: 732~741.
- 172) Taylor, C. E., F. Quaglia, and G. P. Georgiou. Evolution of resistance to insecticides: A cage study on the influence of migration and insecticide decay rates. *J. Econ. Entomol.*, 1983, 76: 704~707.
- 173) Tieku, S., and N. M. Hooper. Inhibition of aminopeptidases N, A and W: A reevaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochem. Pharmacol.*, 1992, 44: 1725~1730.
- 174) Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji and L. Bulla Jr. Cloning and expression of a receptor for an insectidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 5490~5494.
- 175) Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, and L. A. Bulla. A specific binding protein from *Manduca Sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268: 12334~12340.
- 176) Valaitis, A. P., M. K. Lee, F. Rajamohan, and D. H. Dean. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 1995, 25: 1143~1151.
- 177) Van Rie J., S. Jansens, Höfte H, D. Degheele, and H. Van Mellaert. Specificity of *Bacillus*

- thuringiensis* δ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membranes of the mid-gut of target insects. Eur. J. Biochem., 1989, 186: 239~247.
- 178) Van Rie J., S. Jansens, Höfte H, D. Degheele, and H. Van Mellaert. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56: 1378~1385.
- 179) Wan, P., K. Wu, M. Huang, and J. Wu. Seasonal pattern of infestation by pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) in field plots of Bt transgenic cotton in the Yangtze River Valley of China. Crop Protection, 2004, 23: 463~467
- 180) Wan, P., Y. Zhang, K. Wu, and M. Huang. Seasonal expression profiles of insecticidal protein and control efficacy against *Helicoverpa armigera* for Bt Cotton in the Yangtze River Valley of China. J. Econ. Entomol., 2005, 98: 195~201
- 181) Wang, G. R., G. M. Liang, K. M. Wu, and Y. Y. Guo. Gene cloning sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Eur. J. Entomol., 2005a, 102: 13~19.
- 182) Wang, G. R., K. M. Wu, and Y. Y. Guo. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hiibner). Insect Biochem. Mol. Biol., 2003, 33: 115~124.
- 183) Wang, G., K. Wu, G. Liang, and Y. Guo. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. Sci. China (C), 2005b, 48: 346~356.
- 184) Whalon, M. E., and B. A. Wingerd. Bt: mode of action and use. Arch. Insect Biochem. Physiol., 2003, 54: 200~211.
- 185) Williamson, V. M., and H. K. Kaya. Sequence of a symbiont. Nat. Biotechnol., 2003, 21: 1294-1295
- 186) Wilson, F. D., H. M. Flint, W. R. Deaton, D. A. Fischhoff, F. J. Perlak, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. A. Berberich, N. J. Parks, and B. R. Stapp. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. J. Econ. Entomol., 1992, 85: 1516~1521.
- 187) Wolfersberger, M. G. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). Arch. Insect Biochem. Physiol., 1993, 24: 139~147.
- 188) Wolfersberger, M. G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* endo-toxins to gypsy moth larvae is inversely related to affinity to binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. Experientia, 1990, 46: 475~477.
- 189) Wolfersberger, M., and A. Maurer. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comp. Biochem. Physiol., 1987, 86: 301~308.
- 190) Wu, K. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. J. Invertebr. Pathol., 2007, doi: 10.1016/j.jip.2007.03.012

- 191) Wu, K. M., and Y. Y. Guo. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annu. Rev. Entomol.*, 2005, 50: 31~52.
- 192) Wu, K., and Y. Guo. Changes in susceptibility to conventional insecticides of a Cry1Ac-selected population of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Manag. Sci.*, 2004, 60: 680~684.
- 193) Xie, R., M. Zhuang, L. S. Ross, I. Gomez, D. I. Oltean, A. Bravo, M. Soberon, and S. S. Gill. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 8416~8425.
- 194) Xu, X., L. Yu, and Y. Wu. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71: 948~954.
- 195) Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takahashi, H. Iwahana, and R. Sato. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.*, 1997, 246: 652~657.
- 196) Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, , L. Rose-Young, and L. A. Bulla Jr. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R(1) expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1407~1416.
- 197) Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig, and L. A. Bulla Jr. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, 103: 9897~9902.
- 198) Zhao, J. Z., C. H. Rui, M. G. Lu, X. L. Fan, and L. J. Ru. Monitoring and management of *Helicoverpa armigera* resistance to transgenic Bt cotton in north China. *Resistant Pest Management*, 2000, 11: 28~31
- 199) Zhao, J. Z., J. Cao, H. L. Collins, S. L. Bates, R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2005, 102: 8426~8430.
- 200) Zhao, J. Z., J. Cao, Y. Li, H. L. Collins, R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21: 1493~1497.
- 201) Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo, and S. S. Gill. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 13863~13872.

致 谢

在植保所度过的三年博士研究生生活将以此论文的提交作为汇报。其中经历的艰辛与烦恼、欢喜与满足都将变成美好的回忆和终生的财富。

在此,我首先要向尊敬的恩师吴孔明研究员表示由衷的谢意!整个研究生期间,从资料收集、论文选题、到论文的写作和发表,无不浸润着先生太多太多的心血,没有先生五年来的心血浇灌,就没有学生的今天,更不会有对明天的憧憬和理想。先生严谨的治学态度、孜孜不倦的敬业精神和渊博的学识使我获益匪浅,感铭良深。由于本人天资驽钝,论文离先生的要求相差甚远,唯有今后发奋努力,以回报先生的殷切期望和辛勤栽培。师母程红梅研究员对我和我爱人在生活、学习和工作中给与了诸多关心和帮助,在此,谨向先生和师母一同献上我诚挚的谢意和良好的祝愿!

非常感谢郭予元院士五年来从各个方面给予的极大关注与帮助。老一辈科学家广博的学识、严谨的治学态度和求实的科研态度深深的感染着我,每一次聊天总能带给我很多启示,教给我很多做人和做事的人生哲理,使我受益终生。同时,也非常感谢我博士生指导小组的另外几位老师:梁革梅副研究员、张永军副研究员和王桂荣副研究员,无法忘记他们在过去几年中在生活上兄长般的照顾,也无法忘记他们在论文的研究和写作中给予的师长般的悉心指导。

在论文的研究过程中,生物技术组的张杰研究员在毒素蛋白的提供和纯化技术上给予了具体而细微的指导,科研处的陈巨莲副研究员在 SPR 试验中给予了极大的鼓励、帮助和许多建议,同时,棉病组的简桂良研究员和重点实验室的尹蔚庄老师在仪器的使用上给予了极大的方便和指导,在此一并致以深深的谢意!

在棉虫组生活的几年里,感触甚深。这是一个团结向上的集体,一个充满生机和富有创造力的集体。永远不能忘记一起埋头苦干到深夜的时光,不能忘记饭桌上的觥筹交错,不能忘记见面时会意的一笑,也不能忘记出去郊游时一路撒下的欢歌笑语,更不能忘记与我曾经度过或多或少令人难忘岁月的兄弟姐妹们:韩兰芝博士、赵新成博士、苏宏华博士、林克剑博士、李国平博士、刘晨曦博士、陆宴辉博士、陈利珍博士、高玉林博士、张莹博士、于慧林博士、张帅博士,硕士生常洪雷、田岩、涂业苟、吴先富、冯雪、陈洋、于宏坤、杨忠诚、刘仰青、仝亚娟、陆琼等,不能忘记他们曾给过我诸多的帮助。同窗好友陈浩涛博士、陈林博士、许景升博士和乔红波博士在我学习中曾给予的多方面帮助,张翠荣女士、王者力女士、王芳女士和史全华女士在棉铃虫饲养方面给予的大力帮助,在此对他们的热心帮助致以由衷的谢意!

感谢我的爱妻信月芝女士,为了让我能安心顺利的完成学业,她放弃了自己进一步深造的梦想,挑起了赡养我父母和照顾我弟、妹的重担,正是由于她毫无怨言、义无反顾的支持,才使得我能安心的完成学业。

最后感谢我的父母和岳父、岳母,正是由于他们的鼓励和支持,我才能顺利的完成学业。

感谢国家重点基础研究发展计划“973”项目——“害虫与寄主植物的协同进化(2006CB102004)”和“十一五”国家科技支撑计划——“棉花重大病虫害防控技术(2006BAD08A07)”的支助。

术东 2007年6月于马连洼

作者简介

姓名：罗术东 性别：男 出生年月：1977年1月

民族：汉族 籍贯：湖南新邵

专业：农业昆虫与害虫防治

主要学习、工作和研究经历：

2004.9---2007.7 中国农业科学院研究生院 农业昆虫与害虫防治专业攻读博士学位

2002.9---2004.7 湖南农业大学生物安全科技学院 农药学专业攻读硕士学位

2002.12---2004.5 中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫研究组 完成硕士课题

2000.6---2002.9 湖南省大方植保公司

1997.9---2000.6 湖南农业大学植物科技学院

博士期间论文发表情况：

1. Shudong Luo, Kongming Wu, Yan Tian, Gemei Liang, Xue Feng, Jie Zhang and Yuyuan Guo. Cross-resistance studies of Cry1Ac-resistant strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab. *Journal of Economic Entomology*. 2007. 100: 909-915.
2. Shudong Luo, Guirong Wang, Gemei Liang, Kong Ming Wu, Lianyang Bai, Xinguo Ren and Yuyuan Guo. Binding of three Cry1A toxins in resistant and susceptible strains of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006. 85: 104-109.
3. 李咏军, 刘晓辉, 王恩东, 罗术东. ^{60}Co γ 辐照对光肩星天牛雄虫繁殖生物学的影响. *核农学报*, 2006, 20 (5): 441-443
4. 罗术东, 吴孔明, 田岩, 梁革梅, 张永军, 郭予元. Cry1Ac抗性棉铃虫对Cry2Ab的交互抗性研究. *科技创新与绿色植保*. 2006 北京, 中国农业科学出版社

附录