

昆虫神经毒素 LqhIT2 的表达、抗血清制备及活性分析

李洪波, 夏玉先

重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市杀虫真菌工程技术研究中心, 重庆 400030

摘要: 根据毕赤酵母密码子偏爱性, 不改变毒素蛋白质一级结构, 设计合成了昆虫神经毒素 *LqhIT2* 基因, 并分别克隆至大肠杆菌融合表达载体 pPET30-a(+) 和毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K。在 IPTG 的诱导下, 神经毒素在大肠杆菌中融合表达, 表达产物经镍亲和层析纯化后, 用于免疫 BALB/c 小鼠, 制备了特异性较高的抗血清, 抗体滴度超过 1:128 000。利用制备的抗血清, 采用斑点杂交, 筛选得到了较高水平分泌表达重组 *LqhIT2* 的酵母转化子, 摇瓶条件下, 毒素表达量约 9 mg/L。大肠杆菌表达产物没有生物活性, 酵母表达产物经注射蝗虫表现出杀虫活性。

关键词: 昆虫神经毒素, *LqhIT2*, 抗血清

Expression, Antiserum Preparation and Bioactivity Assays of Insect Neurotoxin LqhIT2

Hongbo Li, and Yuxian Xia

Genetic Engineering Research Center, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Abstract: According to the codon bias of *Pichia pastoris*, the mature insect neurotoxin gene *LqhIT2* was synthesized based on its amino acid sequence and was cloned to vector of PET-30a (+) and pPIC9K respectively. The fusion protein expressed in *Escherichia coli* was induced with IPTG and purified with Ni-NTA His Bind Column. The purified fusion protein was used to immunize BALB/c mice, and antiserum obtained was highly specific with the titer of over 1:128 000. Using the antiserum, high-level expression transformants of *P. pastoris* were screened by dot blotting. The highest expression of recombinant *LqhIT2* was about 9 mg/L in baffled flasks. The fusion protein of *LqhIT2* expressed in *E. coli* was not toxic to locust, but the recombinant *LqhIT2* expressed in *P. pastoris* had insecticidal activity against locust through injection.

Keywords: insect neurotoxin, *LqhIT2*, antiserum

昆虫神经毒素是一类作用于昆虫神经系统并具毒杀作用的多肽类神经毒素。到目前为止, 已分离纯化和命名的昆虫神经毒素近百种, 蝎子是该类毒素的主要来源之一。蝎长链昆虫神经毒素是一类作用于昆虫钠离子通道的昆虫神经毒素, 由 60~70 个氨基酸组成, 有 2~4 对链内二硫键^[1-3], 由 1 个 α -亚

基和 2 个 β -亚基组成。已报导的高度昆虫专一性的神经毒素主要作用于昆虫钠离子通道, 自 1971 年从非洲蝎 *Androctonus australis* Hector 毒液中分离到第一种昆虫神经毒素 AaIT^[4]以来, 国内外学者已从 10 多种蝎子的毒液中分离得到了数十种昆虫神经毒素。

Received: February 26, 2008; Accepted: April 17, 2008

Supported by: the National High Technology Research & Development Program of China(863 Program) (No. 2006AA10A212).

Corresponding author: Yuxian Xia. Tel: +86-23-65120486; Fax: +86-23-65120490; E-mail: yuxianxia@cqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划项目(“863 计划”)(No. 2006AA10A212)资助。

虫害是造成农业减产的主要原因之一。目前,控制虫害的主要方法是使用化学农药,化学农药的大量使用产生了许多问题,如:昆虫的抗药性增强、农药残留量增多、环境污染、杀伤昆虫天敌、破坏生态平衡、造成害虫再猖獗等。传统生物杀虫剂虽然能克服以上不足,但也存在见效慢的缺点。因此,运用基因工程手段设计改造传统生物杀虫剂非常紧迫。目前,基因工程中所采用的杀虫基因按杀虫机制分可分为四类:毒蛋白基因、酶抑制剂基因、凝集素基因和昆虫神经毒素基因。蝎长链昆虫神经毒,因其基因来源丰富、种类多、基因较小、注射虫体引起麻痹和死亡所需的剂量低,具有广阔的应用前景。蝎昆虫毒素的基因工程研究与应用相关的研究很多,主要有以下几个方面:将毒素与其它毒蛋白融合,以提高杀虫效率和对昆虫的抗药性^[5];将毒素基因转入昆虫病毒^[6-7]及虫生真菌中^[8],以增强杀虫效果;将毒素基因转入到植物中,获得抗虫植株^[9];利用大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞等^[10-13]进行表达,对其生理生化、杀虫谱及杀虫活性进行研究等。

蝎昆虫神经毒素 LqhIT2 是一种从以色列黄蝎 *Leiurus quinquestriatus hebraeus*(Ehrenberg)的毒液中分离得到的昆虫长链神经毒素,成熟毒素由 61 个氨基酸残基组成,含有 4 对链内二硫键,其作用位点是昆虫钠离子通道,有较强的抗虫活性,具有控制农业害虫的重要潜在应用价值^[14-16],该重组毒素已用于改造昆虫病毒,以提高这些昆虫病毒的杀虫活性^[14-16]。蝗虫是我国主要农业害虫之一,但迄今未见重组 LqhIT2 毒素对蝗虫作用的报道。因此,本文以蝗虫为供试昆虫来检测产物的活性,为进一步利用该毒素控制蝗虫提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与 LqhIT2 基因

表达菌株与载体:大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌表达载体 pET30a(+)、毕赤酵母 KM71 菌株及分泌表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。毒素基因:LqhIT2 基因根据成熟毒素的氨基酸序列和毕赤酵母密码子偏好性由上海 Sangon 公司合成并连接至载体 pPIC9K,重组载体命名为 pPIC9K/LqhIT2。

1.1.2 酶和试剂

质粒小量抽提试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;镍亲和层析柱(Ni-NTA His Bind Column)购自 Qiagen, AP 及 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国公司;各种工具酶为 Promega 公司产品;PCR 引物由 Invitrogen 公司合成;超滤管及 96 孔酶标板为 Millipore 产品;Bradford 溶液及 PVDF 膜为 Bio-Rad 产品;一般化学试剂为国产分析纯。

1.1.3 免疫用 BALB/c 小鼠及供试蝗虫

免疫用 BALB/c 小鼠购自第三军医大学;东亚飞蝗(*Locusta migratoria*)由本实验室饲养。

1.2 方法

1.2.1 LqhIT2 在大肠杆菌中的表达及纯化

以质粒 pPIC9K/LqhIT2 为模板,原核表达上游引物 PF (5'-3') ccggaattcgacggttacatca,下游引物 PR (5'-3') cgaagcttttaaccacaagtgttag,对 LqhIT2 进行扩增、琼脂糖凝胶电泳、切胶回收、Hind III 和 EcoR I 双酶切、连接至 pET-30(a+)质粒并转化大肠杆菌 JM109 菌株;小量抽提试剂盒抽提经测序验证的重组质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株。挑取转化子单菌落,接种至 20 mL 含 70 mg/L Kan LB 液体培养基的 50 mL 三角瓶中,37°C、250 r/min 培养过夜;取 1 mL 菌液接种至 200 mL 含 70 mg/L Kan LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,37°C、250 r/min 培养至 $OD_{600}=0.6\sim0.8$,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导 5 h,离心得菌体;采用 Ni-NTA His Bind Column 纯化目标产物,详细步骤参考精编分子生物学实验指南^[17];Bradford 法测定蛋白浓度,15% SDS-PAGE 银染检验纯度。

1.2.2 多克隆抗体制备、滴度测定及特异性验证

纯化产物经截留分子量 3 kD 的超滤管超滤脱盐、生理盐水调整蛋白浓度至 0.40 mg/mL,按 1:1 比例加入弗氏完全佐剂,每只小鼠注射 0.5 mL。每隔 2 周按 1:1 比例加入弗氏不完全佐剂,加强免疫 3 次,每次注射 0.5 mL;于第 3 次加强免疫后的第 7 天断尾取血,用 10 μ g/mL 的纯化融合蛋白包被 96 孔酶标板,ELISA 测定抗体滴度,详细步骤参考精编分子生物学实验指南^[17]。Western blotting 分析纯化抗血清的特异性,Western blotting 按照标准的方法进行^[17]。

1.2.3 高水平表达酵母转化子的筛选

重组质粒 pPIC9K/LqhIT2 采用 *Sac* I 线性化后, 电转化毕赤酵母, 转化子的筛选及 PCR(引物为通用引物 5' Factor 和 3' AOX)检测参照毕赤酵母表达试剂盒说明书(Invitrogen)。挑取经 PCR 验证的毕赤酵母转化子, 划线接种至 YPD 平板, 28°C, 培养 3 d; 挑取部分长势优良的单菌落, 接种至含 10 mL 毕赤酵母生长培养基(BMGY)的 50 mL 离心管中, 28°C, 250 r/min, 培养至 $OD_{600}=2.0\sim6.0$, 4000 × g, 5 min, 离心得菌体, 用 2 mL 的诱导培养基(BMMY)重悬菌体, 于 28°C, 250 r/min, 诱导培养; 每 24 h 补加一次甲醇, 至终浓度为 0.5%, 诱导培养 5 d; 4000 × g 离心 10 min, 取上清; Dot blotting 检测各菌株表达水平的高低, Dot blotting 按照标准的方法进行^[17]。

1.2.4 最佳收获期的确定

按 1.2.3 的方法, 三角瓶诱导培养 20 mL 酵母高水平表达转化子, 诱导培养 7 d, 每天取样 1 mL, 离心取上清, -20°C 冻存。取 -20°C 冻存的 0~7 d 的诱导产物, 4°C 解冻, 离心取上清 50 μL, 按 1:1 比例加入 2×碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6), 混合均匀并加至 96 孔酶标板中, 4°C 包被过夜; 用本文中自制的抗血清稀释 10 000 倍液为一抗, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 进行 ELISA 分析, 详细步骤参考精编分子生物学实验指南^[17]。

1.2.5 LqhIT2 在酵母中表达产物的验证及扩大培养

经 5 d 诱导的培养物离心、取上清, Bradford 法测定总蛋白含量, 16% SDS-PAGE 分析, 并利用 Quantity one(Bio-Rad)分析目标蛋白含量。Western blotting 检测目标产物的表达情况, Western blotting 按照标准的方法进行^[17], 二抗为 AP 标记山羊抗小鼠 IgG。

按 1.2.3 的方法, 三角瓶诱导培养 100 mL 酵母高水平表达转化子, 诱导培养 5 d, 离心培养液, 取上清。所得上清转移至截留分子量为 3 kD 的超滤管中, 4000 × g, 4°C, 离心至近干; 加入 10 mL PBS 溶液, 4000 × g, 4°C, 离心至近干, 重复此操作 3 次。空质粒转化子诱导后, 上清液同样按上述步骤处理。

1.2.6 活性测定

大肠杆菌融合表达产物的活性分析: 将纯化的融合蛋白经 3 kD 超滤管脱盐、PBS 调整蛋白浓度 500 μg/mL; 按 1:1 的质量比与粗麸皮混合拌匀、晾

干, 饲喂 4 龄蝗虫 20 只, 于饲喂后 24 h 统计蝗虫的虫口死亡数; 同时设粗麸皮饲喂 4 龄蝗虫 20 只作对照组, 连续喂养并观察 7 d。将上述处理好的融合蛋白腹腔注射 4 龄蝗虫 20 只, 每只注射 10 μL(5 μg 纯化蛋白); 设腹腔注射 10 μL PBS 的 4 龄蝗虫 20 只为对照组, 注射 2 h 后统计蝗虫虫口死亡数并观察蝗虫的取食行为, 观察 24 h。

酵母表达产物的活性分析: 酵母表达产物经截留分子量为 3 kD 的超滤管脱盐、浓缩、PBS 调总蛋白浓度至 500 μg/mL, 腹腔注射 4 龄蝗虫 20 只, 每只 10 μL; 空质粒转化子诱导上清液, 经相同处理, PBS 调整蛋白浓度至 500 μg/mL, 腹腔注射 4 龄蝗虫 20 只, 每只 10 μL; PBS 注射 4 龄蝗虫 20 只, 每只 10 μL。各组在注射 2 h 后观察蝗虫的取食行为, 于注射后 12 h 及 24 h 统计虫口存活数; 采用前述处理, PBS 调整蛋白浓度至 500 μg/mL, 以质量比 1:1 的比例与粗麸皮拌匀、凉干, 饲喂 4 龄蝗虫 20 只, 每 24 h 统计虫口死亡数, 观察 7 d; 相同处理和相同蛋白浓度的空质粒转化子诱导上清液按前述方法与粗麸皮拌匀, 饲喂 4 龄蝗虫 20 只, 作为对照。

2 结果与分析

2.1 LqhIT2 基因的合成

按照毕赤酵母密码子的偏好性([http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Pinichia+pastoris+\[gbpln\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Pinichia+pastoris+[gbpln]))来设计成熟毒素基因的全长序列, 当连续出现几个相同氨基酸时尽量选用酵母偏好的不同密码子, 5'端和 3'端分别设计 *Eco*R I 和 *Avr* II 酶切位点, 在 *Avr* II 位点前设 TAA TGA 双终止密码子, 合成后连接至 pPIC9K 载体。设计合成的 LqhIT2 序列(5'-3'): ccggaattcGACGGTTACATCAAGAGAAGAGACGGTTGCAAAGTCGCTTGCTTGATCGGAAACGAGGGTTGCGATAAGGAGTGCA AAGCTTACGGTGGATCCTACGGTTACTGCTGGA CCTGGGGTTTGGCTTGCTGGTGCAGGGTTTGC CTGACGACAAGACCTGGAAGTCCGAAACTAAC ACTTGTGGTTAATGAcctaggggc (斜体代表双终止密码子, 小写字母代表酶切位点和保护碱基)。

2.2 LqhIT2 在大肠杆菌表达及纯化

随机挑取 11 个 BL21(DE3)转化子, PCR 验证其在 200 bp 左右出现特异条带(图 1), LqhIT2 成熟基因全长为 183 bp, 合成基因中包含酶切位点及保护碱

基。因此, 该 200 bp 片段为目标片段。利用镍亲和层析, 得到融合蛋白, 银染显示单一条蛋白质条带且与预期大小相符(图 2), 银染结果表明: 利用镍亲和层析, 纯化到了高纯度的融合蛋白。

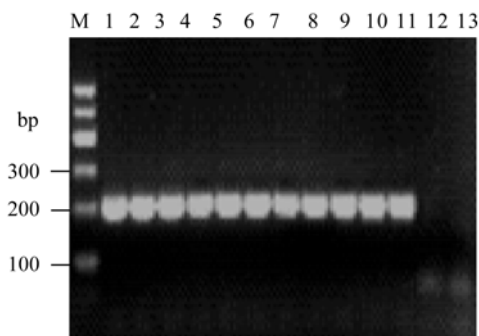


图 1 大肠杆菌转化子 PCR 检测

Fig. 1 PCR results of *E. coli* transformants

M: DNA marker; 1~11: transformants of plasmid pET-30a (+)/LqhIT2; 12~13: transformants of plasmid pET-30a (+)

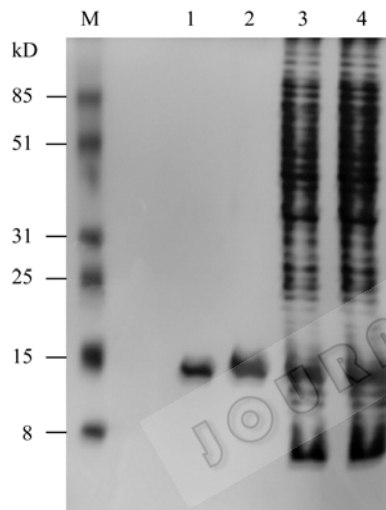


图 2 纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified protein

M: protein marker; 1,2: purified protein; 3,4: before purification

2.3 多克隆抗体的制备

BALB/c 小鼠经一次初次免疫与三次加强免疫、断尾取血、采用 ELISA 测定滴度, 滴度最高的一只小鼠的抗体在稀释 128 000 倍后仍能检测到纯化的融合蛋白, 表明滴度超过 1:128 000。将该血清稀释 10 000 倍用作一抗, 对表达产物进行 Western blotting 检测, 显色结果显示纯化前后均在约 14 kD 处出现特异单一条带, 结果表明: 制备的多克隆抗体具有较高的特异性(图 3)。

2.4 酵母转化子的检测及高表达菌株的筛选

挑取不同的酵母转化子, 进行 PCR 分析, 结果

显示: pPIC9K/LqhIT2 酵母转化子在约 400 bp 处存在特异条带, 而未加模板及 KM71 出发菌株两组对照均未出现特异扩增(图 4), 表明目标基因已成功插入到毕赤酵母中。将验证后的酵母转化子菌体转入 50 mL 离心管进行诱导表达, 诱导后的上清液经 Dot blotting 分析, 筛选出一株高表达菌株(图 5), 命名为 LqhIT2/B1。

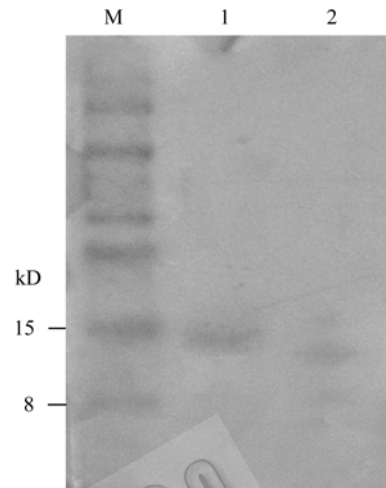


图 3 抗血清的特异性分析

Fig. 3 Specificity assays of antiserum

M: prestained SDS-PAGE standards; 1: purified LqhIT2; 2: before purification

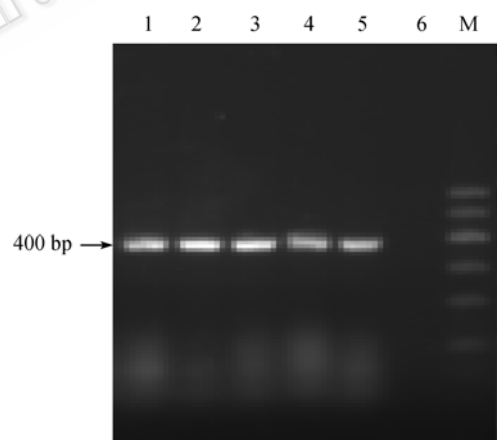


图 4 酵母转化子的 PCR 检测

Fig. 4 PCR results of *P. pastoris* transformants

1~5: *P. pastoris* transformants; 6: KM71 original strain; M: DNA marker

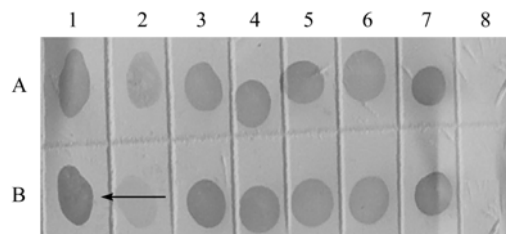


图 5 Dot blotting 筛选结果

Fig. 5 Screening with dot blotting

The culture supernatants of high-level expressing transformant was marked with black arrows

2.5 最佳收获期的确定及产物验证

采用 ELISA 分析 LqhIT2/B1 在诱导过程中表达量的变化, 结果显示, 甲醇诱导的第 3~5 天目标产物在上清中含量增加最快, 在第 5 天表达量达到最大, 并持续到第 6 天。因此, 最佳收获期诱导后的第 5~6 天(图 6); 高表达菌株 LqhIT2/B1 经扩大培养, 甲醇诱导 5 天后取上清液, 经脱盐后 16% SDS-PAGE 分析, 在约 6 kD 处出现一特异蛋白带(图 7A); 经 Western blotting 验证, 该 6 kD 蛋白带是目标蛋白, 与预期的毒素分子量大小相符(图 7B), 表明该神经毒素实现了在酵母中的分泌表达。蛋白含量测定和 Quantity one 软件分析表明, 在该培养和诱导条件下, 诱导上清液的总蛋白含量为 180 mg/L, 重组 LqhIT2 约占总蛋白量 5%, 即重组 LqhIT2 在摇瓶条件下分泌表达量达 9 mg/L。

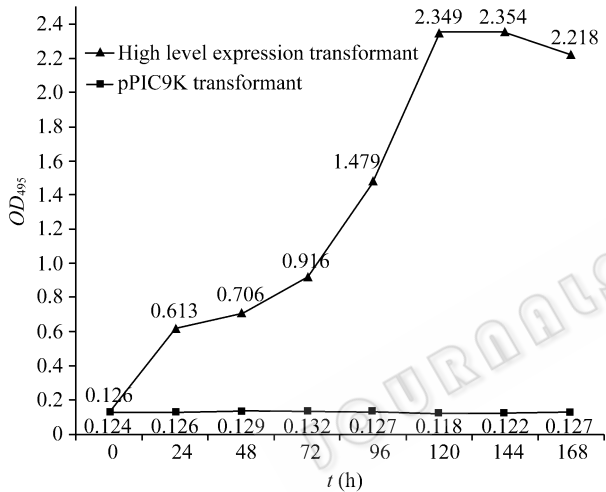


图 6 ELISA 确定收获期
Fig. 6 Determine the harvest time by ELISA

2.6 活性测定

大肠杆菌表达产物注射和饲喂蝗虫没有表现出毒性; 酵母分泌表达产物饲喂蝗虫没有检测到杀虫活性, 但经注射表现出了杀虫活性: 20 只供试蝗虫, 在注射酵母表达产物后活动能力迅速下降并停止取食, 24 h 内全部死亡; 注射空质粒转化子上清液的对照组蝗虫在注射后活动有所下降并停止取食, 注射 12 h 内有 3 只蝗虫死亡, 但随时间延长, 虫口不再减少, 且在注射 12 h 后, 存活蝗虫的进食及活动能力恢复到注射前; 注射 PBS 的 20 只供试蝗虫在注射后无虫口减少现象, 且于注射后不久开始进食, 进食与活动能力与注射前差别不明显(表 1)。上述结果表

明: 原核表达产物对供试昆虫蝗虫没有毒性, 酵母表达产物经注射表现出杀虫活性。

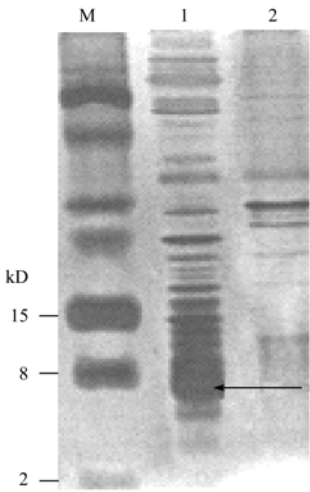


图 7-A 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 7-A SDS-PAGE analysis of expressed production
M: protein marker; 1: supernatants of strain LqhIT2/B1; the black arrow stands for the recombinant LqhIT2; 2: supernatants of pPIC9K transformant

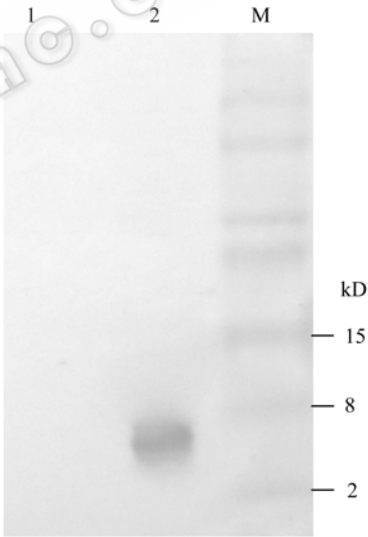


图 7-B 表达产物的 Western blotting 结果
Fig. 7-B Western blotting results of expressed production
1: supernatants of pPIC9K transformant; 2: supernatants of strain LqhIT2/B1; M: prestained SDS-PAGE standards

表 1 重组 LqhIT2 在酵母中表达产物的注射活性分析
Table 1 Insecticidal activity of recombinant LqhIT2 with injection

Sample	Survived locusts	Survived locusts	Mortality (%)
	12 h post injection	24 h post injection	24 h post injection
PBS	20	20	0
pPIC9K	17	17	15
LqhIT2	12	0	100

3 讨论

昆虫神经毒素自分离至今, 由于其在农业生物防治中的潜在价值, 已成为研究的热点。由于蝎毒液成分复杂, 昆虫神经毒素在毒腺中的含量低, 分离天然昆虫神经毒素并应用于毒素特性的研究是一项非常困难的工作, 外源表达系统为我们更好地研究和应用该毒素奠定了基础。本研究以 PET30a(+) 为表达载体, 实现了 LqhIT2 在大肠杆菌中的融合表达, 生物活性测定表明, 该表达系统表达的 LqhIT2 不具生物活性。其原因主要在于: 该蝎毒素含有 4 对二硫键, 二硫键的正确形成对功能极其重要, 而该大肠杆菌表达系统的表达产物二硫键不能正确配对^[10, 18-20], 因而不能形式正确的高级结构; 此外, 该表达系统表达的产物为不可溶的包涵体, 包涵体经溶解和复性才能恢复活性^[18-20]; 最后, 由于在毒素的 N-端融合了长达几十个氨基酸残基的多肽, 融合区段可能影响其空间结构的正确形成, 从而不能形成正确的空间结构, 影响其生物活性。PET30a(+) 载体表达该毒素的优点是: 该系统外源基因的产量较高, 而且载体自身带有 His 标签, 表达的融合蛋白易于纯化, 有利于制备高质量的多克隆抗体。本研究制备质量较高的 LqhIT2 抗血清, 为该毒素的快速准确鉴定奠定了基础。

毕赤酵母是一种高效的外源蛋白表达系统, 表达产物的二硫键通常能正确配对、高级结构正确形成^[5, 20, 21]; 分泌型表达载体 pPIC9K 自身携带 α -交配因子信号肽序列, 能分泌表达外源基因^[5, 20, 21]。因此, 该系统被用于蝎毒素的活性分泌表达。本研究利用毕赤酵母表达系统, 按毕赤酵母的密码子偏好性合成毒素基因, 在甲醇诱导下, 重组 LqhIT2 在该表达系统中分泌表达, 摇瓶条件下, 最高表达量约为 9 mg/L。在活性测定中, 重组 LqhIT2 饲喂蝗虫也没有表现毒杀作用, 而注射对蝗虫具有杀虫活性。一些毒素如 AaIT, 其转基因杨树对一龄舞毒蛾幼虫有明显抗性^[9], AaIT 的转基因棉花对二龄棉铃虫具有较强的杀虫活性^[22]。吉永华等^[23]认为, 虫体对毒素的敏感性与虫体的大小呈对应关系。本研究选择了不同虫龄和体重的蝗虫, 经饲喂都没有表现出杀虫活性(饲喂结果未在文中显示), 说明虫体大小不是该毒素没有饲喂活性的主要原因, 可能是不同的神经毒素对不同的

供试昆虫的毒性强弱不一样。Bishop 等^[23]认为毒素在昆虫肠道中的稳定性决定其经饲喂毒性的强弱, 这可能是该毒素没有饲喂活性的另一个原因。本研究用毕赤酵母表达的 LqhIT2 具有体内注射活性, 其二硫键应正确形成, 但不具有体外活饲喂活性, 说明二硫键正确形成并不是影响体外活性的唯一因素, 究竟还有其它什么影响还待进一步研究。本实验室以将本研究结果为基础, 正在大量纯化毕赤酵母中表达的 LqhIT2, 以详细分析该毒素对蝗虫、玉米螟、稻纵卷叶螟等重要农业害虫的杀虫活性, 为更广泛地应用该毒素提供依据。

REFERENCES

- [1] Zlotkin E, Eitan M, Bindokas VP, *et al.* Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry*, 1991, **30**(19): 4814-4821.
- [2] Possani LD, Becerril B, Delepierre M, *et al.* Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem*, 1999, **264**(2): 287-300.
- [3] Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 2005, **46**(8): 831-844.
- [4] Zlotkin E, Fraenkel G, Miranda F, *et al.* The effect of scorpion venom on blowfly larvae: a new method for evaluation of scorpion venom toxicity. *Toxicon*, 1971, **9**(1): 1-8.
- [5] Trung NP, Fitches E, Gatehouse JA. A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *Omonrice*, 2006, **14**: 28-43.
- [6] Vasconcelos SD, Hails RS, Speight MR, *et al.* Differential crop damage by healthy and nucleopolyhedrovirus-infected *Mamestra brassicae* L (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae: A field examination. *J Invert Pathol*, 2005, **88**(2): 177-179.
- [7] Rajendra W, Hackett KJ, Buckley E, *et al.* Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: Potential for effective pest management. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760**(2): 161-162.
- [8] Wang CS, Leger SRJ. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nature Biotechnol*, 2007, **25**: 1455-1456.
- [9] Wu NF, Sun Q, Yao B, *et al.* Insectresistant transgenic poplar expressing AaIT gene. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(2): 129-132.
伍宁丰, 孙芹, 姚斌, 等. 抗虫的转 AaIT 基因杨树的获得. *生物工程学报*, 2000, **16**(2): 129-132.
- [10] Pang SZ, Oberhaus SM, Rasmussen JL, *et al.* Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in

- yeast, bacteria and plants. *Gene*, 1992, **116**(2): 165–172.
- [11] Chejanovsky N, Zilberberg N, Rivkin H, *et al.* Functional expression of an alpha anti-insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. *FEBS Lett*, 1995, **376**(3): 181–184.
- [12] Mejri T, Borchani L, Srairi-Abid N, *et al.* BotIT6: a potent depressant insect toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Toxicon*, 2003, **41**(9): 163–171.
- [13] Sheng JJ, Feng L, Ee QL, *et al.* Recombinant scorpion insectotoxin AaIT kills specifically insect cells but not human cells. *Cell Res*, 2002, **12**(2): 143–150.
- [14] Beek N, Lu A, Presnail J, *et al.* Effect of signal sequence and promoter on the speed of action of a genetically modified *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus expressing the scorpion toxin LqhIT2. *Biol Cont*, 2003, **27**(1): 53–64.
- [15] Karbat I, Turkov M, Cohen L, *et al.* X-ray structure and mutagenesis of the scorpion depressant toxin LqhIT2 reveals key determinants crucial for activity and anti-insect selectivity. *J Mol Biol*, 2007, **366**(2): 586–601.
- [16] Regev A, Rivkin H, Inceoglu B, *et al.* Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett*, 2003, **537**(3): 106–110.
- [17] Frederick FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition Books. John Wiley and Sons, Inc., Publishers, 2000.
- [18] Estrada G, Garcia BI, Schiavon E, *et al.* Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsxII: Heterologous expression and proper folding *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1770**(8): 1161–1168.
- [19] Banerjee S, Curto EV, Beckman M, *et al.* Expression of functional scorpion neurotoxin Lqq-V in *E. coli*. *Peptides*, 2006, **27**(1): 49–54.
- [20] Wang EW, Xu JP, Lu W, *et al.* Expression and functional analysis of a recombinant scorpion neurotoxin AaIT. *J Wuhan Univ*, 2005, **51**(6): 727–732.
王二文, 徐进平, 鲁伟, 等. 蝎神经毒素 AaIT 的表达及功能分析. 武汉大学学报, 2005, **51**(6): 727–732.
- [21] Martin-Eauclaire MF, Sogaard M, Ramos C, *et al.* Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *Eur J Biochem*, 1994, **223**(2): 637–645.
- [22] Yao B, Fan YL, Zeng Q, *et al.* Insect-resistant tobacco plants expressing insect-specific neurotoxin AaIT. *Chin J Biotech*, 1996, **12**(2): 113–118.
姚斌, 范云六, 曾勤, 等. 表达昆虫特异性神经毒素 AaIT 基因的转基因烟草的抗虫性. 生物工程学报, 1996, **12**(2): 113–118.
- [23] Ji YH, Zhao Q. Advances in insect poison of *Buthus martensii*. *Life Sci*, 1996, **8**(3): 37–39.
吉永华, 赵菁. 蝎抗昆虫毒素基因病毒距生物杀虫剂“任重而道远”. 生命科学, 1996, **8**(3): 37–39.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程, 扩大国际交流, 本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议, 合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》, 该刊与中文版同步, 月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上, 我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司, 《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台, 将可以大大地提高文章的浏览量, 扩大期刊及作者在国内外影响, 提高文章的被引频次。同时, 出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍, 使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

我刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等, 范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等, 涉及生物技术各个领域, 非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的, 也将同时发表在中文印刷版上。我刊将增加英文稿件的刊出量, 并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色, 部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是: 每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文, 凡具备以下条件之一者即可入选: 1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展, 达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文, 经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工, 再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项: 1. 稿件撰写时, 应力求叙述清楚, 避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点, 用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释, 使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息, 请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327; E-mail: cjb@im.ac.cn