

• 农业生物技术 •

## 家蚕氨肽酶 (BmAPN5) 与黑胸败血芽孢杆菌伴孢晶体 (PC) 毒素相互作用

付剑锋, 林平, 冯铁山, 程冬, 张权, 夏庆友, 程廷才

西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

付剑锋, 林平, 冯铁山, 等. 家蚕氨肽酶 (BmAPN5) 与黑胸败血芽孢杆菌伴孢晶体 (PC) 毒素相互作用. 生物工程学报, 2017, 33(1): 90–98.

Fu JF, Lin P, Feng TS, et al. Interaction of aminopeptidase (BmAPN5) and parasporalcrystal (PC) toxin isolated from *Bacillus bombysepticus*. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 90–98.

**摘 要:** 氨肽酶 N (APN) 属于锌金属肽酶 M1 (Peptidase\_M1) 家族的成员, 不仅参与蛋白水解过程, 而且也作为毒素受体参与病原微生物的致病过程。家蚕氨肽酶家族含有 16 个成员, 其中 BmAPN4 结合黑胸败血芽孢杆菌产生的伴孢晶体 (PC) 毒素, 为研究该基因家族其他成员是否与 PC 毒素结合, 参与其致病过程。本文克隆家蚕中肠特异表达的氨肽酶家族成员 *BmAPN5* 基因, 全长 3 313 bp, 编码 953 个氨基酸, 含有 1 个锌金属肽酶 M1 和 ERAP1\_C 结构域。构建原核表达载体, 表达和纯化获得可溶性 GST-BmAPN5 重组蛋白。Far-Western blotting、免疫共沉淀和 ELISA 等实验结果表明 BmAPN5 和活化的 PC 毒素相互结合。通过构建 BmAPN5 细胞转染载体, 转染 Sf9 细胞系, 与 PC 毒素共孵育, 导致细胞形态改变和裂解死亡; 同时, 乳酸脱氢酶含量测定结果 (LDH) 表明 BmAPN5 参与 PC 毒素致病过程, 导致细胞裂解死亡, 使细胞培养基中的乳酸脱氢酶升高。上述结果表明 BmAPN5 作为一种功能性受体, PC 毒素与其相互作用, 参与了病原物的致病过程, 为进一步揭示病原微生物黑胸败血芽孢杆菌与宿主相互作用的致病机制研究奠定了基础。

**关键词:** 家蚕, 黑胸败血芽孢杆菌, 氨肽酶, PC 毒素, 相互作用

**Received:** May 28, 2016; **Accepted:** July 22, 2016

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114600), Natural Science Foundation of Chongqing (No. CSTC2014JCYJA80004).

**Corresponding author:** Tingcai Cheng. Tel: +86-23-6825187; Fax: +86-23-68251128; E-mail: chengtc@swu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114600), 重庆市科委自然科学基金 (No. CSTC2014JCYJA80004) 资助。

# Interaction of aminopeptidase (BmAPN5) and parasporal crystal (PC) toxin isolated from *Bacillus bombysepticus*

Jianfeng Fu, Ping Lin, Tieshan Feng, Dong Cheng, Quan Zhang, Qingyou Xia, and Tingcai Cheng

State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Aminopeptidase N (APN) belonging to zinc-dependent metalloproteinase, not only catalyzes protein proteolytic process, but also is involved in the pathogenic process as the receptor of pathogenic toxin. In *Bombyx mori*, APN gene family consists of 16 members, of which BmAPN4 binds trypsin-activated parasporal crystal (PC) toxin isolated from *Bacillus bombysepticus* (*Bb*). In order to verify whether or not other APNs interact with PC toxin during the pathogenesis of *Bb*, we cloned *BmAPN5*, a member of aminopeptidase family, from the silkworm midgut. The full length of *BmAPN5* is 3313 bp, encoding 953 amino acids, containing a zinc peptidase\_M1 and ERAPI\_C domains. A recombinant GST-BmAPN5 was purified by a prokaryotic expression system. Far-Western blotting, co-immunoprecipitation and ELISA. Binding saturation assays demonstrated that PC after activated by trypsin could be bound by BmAPN5. Additionally, cytotoxic activity of trypsin-activated PC in Sf9 cells transfected with BmAPN5 showed that cells exhibited dramatic cytological changes, including swelling and lysis, revealing BmAPN5 serves as a functional receptor that participates in *Bb* and PC pathogenicity. These provide some clues for further exploring the pathogenesis relationships of *Bb* and host.

**Keywords:** *Bombyx mori*, *Bacillus bombysepticus*, aminopeptidase, PC toxin, interaction

氨肽酶 N (APN) 属于锌金属肽酶 M1 成员, 具有从 N 端水解蛋白质或寡肽的活性<sup>[1]</sup>。在鳞翅目昆虫中肠刷状缘膜上的 APN 不仅参与蛋白水解过程, 也是病原毒素的重要受体之一。昆虫中肠刷状缘膜上的 APN 含量丰富, 结合苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 伴孢晶体毒素 (Cry), 参与其致病过程<sup>[2]</sup>。*Bt* Cry 与 APN 受体特异结合后, 毒素插入细胞膜形成孔洞, 导致膜电压和离子平衡改变, 破坏细胞, 从而在中肠形成孔洞, 细菌及其毒素通过孔洞进入血淋巴, 最终导致昆虫死亡<sup>[3-4]</sup>。

家蚕 *Bombyx mori* 作为典型的鳞翅目模式昆虫, 已被广泛应用于鳞翅目昆虫与病原微生物相互作用研究, 尤其是 *Bt* 毒素的致病机理研究。家蚕基因组含有 16 个 APN 基因, 分为 3 个亚家族, 11 个 APN 基因具有表达活性, 其中

有 7 个 *BmAPN* 在中肠特异表达或高量表达<sup>[5]</sup>。

目前, 在家蚕中已报道 4 个 APN 蛋白与 *Bt* 的 Cry 毒素的致病性相关, 其中, BmAPN1 可结合 Cry1Aa 和 Cry1Ab 蛋白<sup>[6-7]</sup>。BmAPN2-4 分子量介于 90-110 kDa 之间, 它们不直接与 Cry1Aa 相互作用<sup>[8]</sup>, 而位于中肠刷状缘膜上的 BmAPN3 可与 Cry1Ac 相互作用, 参与其致病过程<sup>[9]</sup>。由此可见, 并非所有家蚕 APNs 都可以与 *Bt* 的不同类型的 Cry 直接作用。

黑胸败血芽孢杆菌 (*Bacillus bombysepticus*, *Bb*) 与 *Bt* 同属芽孢杆菌属, 是家蚕细菌性败血病的常见病原之一。类似 *Bt* 的致病机制, *Bb* 在形成芽孢的过程中, 同样产生伴孢晶体毒素蛋白 (PC), 引发家蚕细菌性败血症<sup>[10]</sup>。基因表达谱芯片结果显示 9 个 APN 基因诱导表达, 例如 *BmAPN1*、*BmAPN2* 和 *BmAPN4* 等<sup>[10]</sup>。其中,

活化的 PC 毒素对表达 BmAPN4 蛋白的昆虫细胞具有强烈的毒性,揭示了 BmAPN4 作为功能性受体参与 PC 毒素的致病过程<sup>[11]</sup>。在此基础上,本研究采用基因克隆、构建重组蛋白表达载体和转染质粒、分离纯化 *Bb* 伴孢晶体 PC 毒素、Far-Western blotting、免疫共沉淀 (Co-IP)、酶联免疫吸附 (ELISA) 和免疫荧光等方法,研究 BmAPN5 受体是否与胰蛋白酶活化的 PC 毒素相互作用,为进一步完善家蚕病原菌 *Bb* 的致病机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Bb* 菌株和 Sf9 细胞系由本实验室保存。pMD19-T Simple 和 pSL1180 质粒载体购于 TaKaRa。pGEX-4T-1 表达系统、GSTrapFF 纯化柱购于 GE。转染试剂 Cellfectin<sup>®</sup> II Reagent 购于 Invitrogen。Bradford 蛋白质定量试剂盒、LDH Cytotoxicity Assay Kit 购于碧云天。anti-GST 和 anti-Tubulin 购于 Sigma。HRP 标记羊抗兔二抗为北京中衫金桥产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PC 毒素纯化和活化

PC 毒素从 *Bb* 菌株分离获得,并进行胰蛋白酶处理活化毒素蛋白,具体方法参考林平等<sup>[11]</sup>研究。将 *Bb* 菌株接种于含有 5 mL LB 液体培养基 (胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1%,pH 7.2),30 °C 摇床培养,从 34 h 开始取样,油镜观察到伴孢晶体和芽孢产生后,将菌液于 4 °C、7 000 r/min 离心 15 min,用预冷的 NaCl 溶液洗涤,以除去培养基中的杂蛋白。沉淀中加入 100 mL 裂解液 (50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 mmol/L EDTA, 5%巯基乙醇),冰浴轻摇过

夜。离心收集上清,加入 7 mL 4 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH 4.5),静置于冰上 4 h,使蛋白完全沉淀;离心收集沉淀,将所得的沉淀在 4 °C 下溶于 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.5),搅拌至完全溶解,测定纯化获得 PC 蛋白浓度。将纯化的 PC 蛋白与胰蛋白酶以质量比为 25 : 1 混合,37 °C 温育 6 h,加入 1/10 体积 4 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH 4.5),4 °C 静置 15 min,12 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,加入双蒸水振荡溶解,重复该步骤 3 次。最后用 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10.0) 溶解沉淀,得到活化的 PC 毒素蛋白。

#### 1.2.2 BmAPN5 重组表达和纯化

根据 *BmAPN5* 基因 (SilkDB 基因编号: BGIBMGA008062) 和表达序列标签信息,以家蚕中肠 cDNA 为模板,克隆 *BmAPN5* 编码区序列,与 pMD19-T Simple 载体连接,阳性克隆进行测序验证。用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切,经琼脂糖电泳鉴定并回收 *BmAPN5* 酶切片段。同时,用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-4T-1 原核表达载体,获得 pGEX-4T-1 载体酶切片段,*BmAPN5* 酶切片段和 pGEX-4T-1 酶切片段进行连接转化,筛选阳性克隆,获得 pGEX-4T-1[GST-BmAPN5]重组质粒载体;重组质粒 pGEX-4T-1[GST-BmAPN5]转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 后在 37 °C 条件下培养 4 h,进行 BmAPN5 蛋白诱导表达,采用 GSTrapFF (GE Healthcare) 纯化重组蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳检测和 Western blotting 分析。

#### 1.2.3 转染载体构建和细胞毒理实验

以 pSL1180 载体为骨架质粒,将 *BmAPN5* 构建为 pSL1180[hr3-BmAct4-BmAPN5-SV40]转染质粒,采用 Cellfectin II 试剂 (Invitrogen) 转染

Sf9 细胞, 实验操作流程参考 Cellfectin II 试剂的说明书 (Protocol Pub. No. MAN0007821); 转染 48 h 后, 收集细胞, 分别提取总 RNA 和蛋白质, 采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 *BmAPN5* 基因和蛋白表达水平。收集转染 48 h 细胞, PBS 洗涤 3 次, 加入 PC 毒素, 至浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 孵育 6 h 后, 显微观察 Sf9 细胞生长情况, 统计相同放大倍数下的细胞个数。乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测使用 LDH Cytotoxicity Assay Kit (碧云天), 参照标准实验步骤, 测定 LDH 活性。

#### 1.2.4 Far-Western blotting

Far-Western blotting 参照标准流程<sup>[12-13]</sup>, SDS-PAGE 电泳分离活化的 PC 毒素蛋白, 打开转膜板, 依次放入海绵、滤纸、蛋白胶、PVDF 膜、滤纸、海绵, 放于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 恒压 100 V 转移 1 h; 5% BSA 的 TBST 室温封闭 2 h; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 加入纯化获得的 GST-BmAPN5 重组蛋白液 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 anti-GST 抗体 (1:8 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔的二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次; 用 ECL 显色试剂进行显色反应。

#### 1.2.5 免疫共沉淀 (Co-IP)

将 100  $\mu\text{g}$  蛋白与相应的抗体在室温下孵育 1 h, 然后在室温条件下与 Protein A magnetic bead (Thermo Fisher Scientific) 孵育 1 h, 之后用 BS3 (Thermo Fisher Scientific) 进行交联, 洗涤 5 次, 再与 PC 毒素 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗涤 5 次后进行洗脱。

#### 1.2.6 酶联免疫吸附 (ELISA)

ELISA 实验流程参照 Pacheco 等<sup>[3]</sup>方法, 将

1  $\mu\text{g}$  纯化的重组蛋白 BmAPN5 置于 100 mL PBS/孔板, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  PBS-M, 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 0.1 nmol/L 活化 PC 毒素, 加入 anti-GST 抗体和二抗, 450 nm 检测, GraphPad Prism (version 5.0b) 软件用于数据分析。

#### 1.2.7 免疫荧光

将载玻片置于 12 孔板中, 加入 Sf9 细胞后经 Cellfectin II 试剂转染 48 h, PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 5 min, PBS 冲洗 3 次, 加 5% BSA 封闭液室温封闭 2 h, 加 BmAPN5 一抗稀释液 (1:1 000), 室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 荧光标记二抗 (1:500) 稀释液于室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 显微观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 BmAPN5 重组表达和纯化

*BmAPN5* 基因全长 3 313 bp, 包括 16 个外显子和 15 个内含子, ORF 全长 2 862 bp, 起始密码 ATG 位于第二外显子上, 终止密码 TAG 位于第 16 外显子, 共编码 953 个氨基酸, 含有一个保守的锌金属肽酶 M1 和 ERAP1\_C 结构域 (图 1A)。 *BmAPN5* 基因在中肠特异高量表达<sup>[5]</sup>, 将该基因的编码序列克隆到 pGEX-4T-1 载体, 构建带有 GST 标签的 APN5 重组表达载体 (图 1B)。转化大肠杆菌 BL21 菌株, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  诱导的条件下以可溶形式表达, 采用 GSTrapFF 纯化重组蛋白, 获得 GST-BmAPN5 重组表达蛋白 (图 1C)。

### 2.2 PC 毒素与 BmAPN5 相互作用

为了研究 PC 毒素与 BmAPN5 是否存在相互作用的关系, 参考林平等<sup>[11]</sup>的研究, 从 *Bb* 菌株

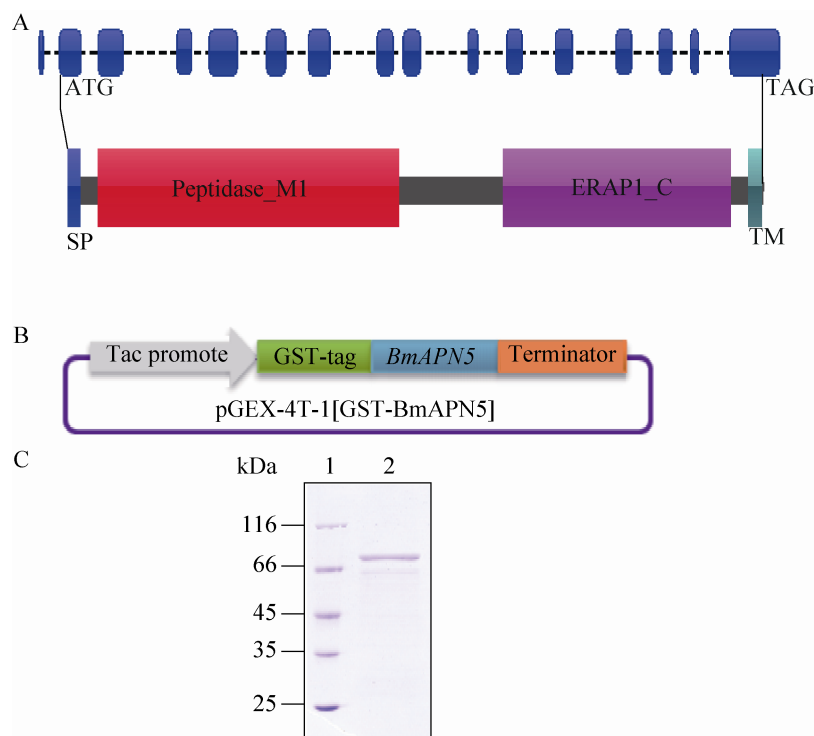


图1 *BmAPN5* 基因结构 (A)、表达载体构建 (B) 和重组蛋白表达纯化 (C)

Fig. 1 Gene structure of *BmAPN5* (A) and *in vitro* expression vector (B) and purification of GST-BmAPN5 recombinant protein (C). 1: molecular marker; 2: GST-BmAPN5 recombinant protein.

中分离纯化得到了 PC 毒素,并用胰蛋白酶消化获得活性毒素。采用 far-Western blotting 方法,将活性 PC 毒素蛋白转移至 PVDF 膜,加入纯化获得的 GST-BmAPN5 重组表达蛋白,过夜孵育,其中 GST 标签蛋白和牛血清蛋白 (BSA) 作为阴性对照;结果显示 PC 与 GST-BmAPN5 相结合 (图 2A)。同时,采用 Co-IP 方法,将重组蛋白 GST-BmAPN5、GST 抗体孵育,再与磁珠孵育后,加入活性 PC 毒素孵育过夜,洗脱蛋白,SDS-PAGE 电泳检查,结果显示 PC 毒素与 BmAPN5 结合(图 2B)。采用 ELISA 方法,将活性 PC 与 BmAPN5 进行孵育,在 450 nm 吸收光值检查发现, BmAPN5 吸收光值显著高于对照

( $P < 0.01$ , 图 2C)。综合上述 far-Western blotting、Co-IP 和 ELISA 三个实验结果,表明 BmAPN5 与 PC 毒素存在相互作用。

### 2.3 Sf9 细胞表达 BmAPN5

为了进一步验证 BmAPN5 是否参与 PC 毒素的致病过程,首先,构建转染质粒载体 pSL1180[hr3-BmAPN5-SV40] (图 3A),转染 Sf9 细胞 48 h 后,提取细胞总 RNA 和总蛋白,分别采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 BmAPN5 的表达情况,结果显示, BmAPN5 在 Sf9 细胞中稳定表达 (图 3B)。采用免疫荧光定位,荧光信号主要位于细胞质和细胞膜 (图 3C),结果表明 Sf9 细胞系表达的 BmAPN5 能定位于细胞膜。

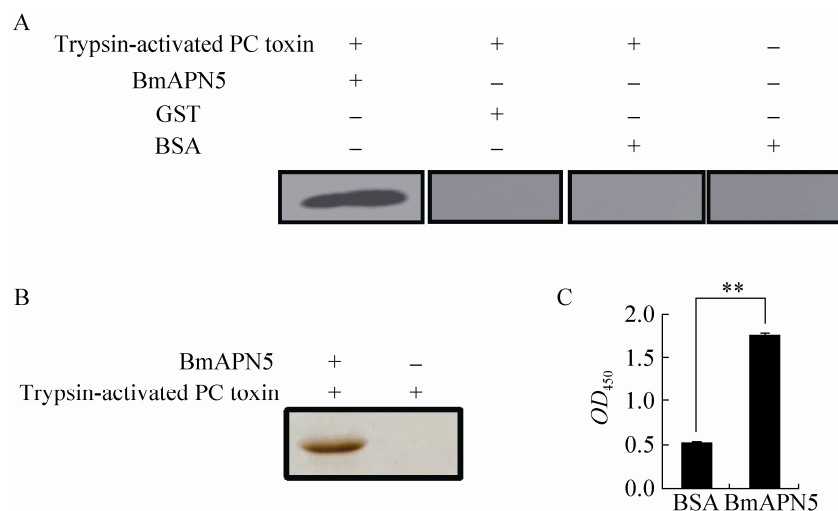


图 2 BmAPN5 与胰蛋白酶活化的 PC 毒素相互作用

Fig. 2 Binding assays for trypsin-activated PC with BmAPN5. (A) Far-Western blotting analysis of trypsin-activated PC and BmAPN5. (B) A Co-IP assay for trypsin-activated PC and BmAPN5. (C) ELISA binding saturation assays of trypsin-activated PC and BmAPN5. Error bars  $\bar{x} \pm s$ . Statistically significant differences from the control samples are indicated; \*\* $P < 0.01$ .

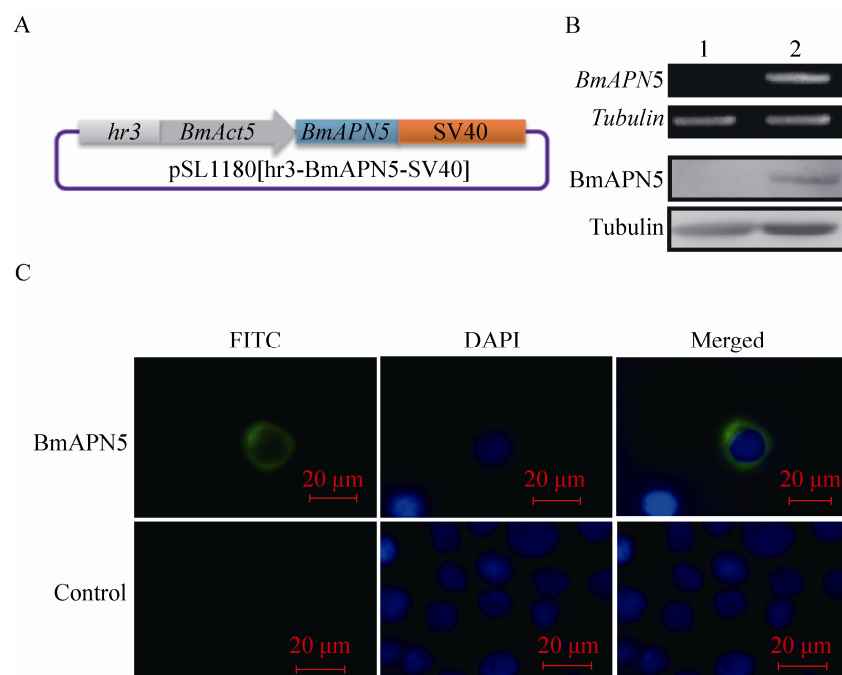


图 3 BmAPN5 在 Sf9 细胞表达和定位

Fig. 3 Expression and location of BmAPN5 in Sf9 cell line. (A) Structures of transient expressing vector. (B) RT-PCR and Western blotting analysis of BmAPN5 in a Sf9 cell line. (C) Immunocytochemical analysis of BmAPN5 in Sf9 cells. Signals for Sf9 cells and BmAPN5 were detected under blue and red fluorescence.

## 2.4 BmAPN5 参与 PC 毒素致病过程

为了验证 BmAPN5 参与 PC 毒素的致病过程,在细胞水平进行 PC 毒素毒理学实验。设置 3 个阴性实验对照组: Sf9 细胞 (图 4Aa)、转染 BmAPN5 但没有与 PC 毒素孵育 (图 4Ab)、Sf9 细胞与 PC 毒素孵育 (图 4Ac),结果显示细胞形态和细胞数目并未发生明显变化。在实验组中,PC 毒素与转染了 BmAPN5 的 Sf9 细胞孵育,结果显示 Sf9 细胞形态改变、细胞裂解死亡和细胞数量显著减少 (图 4Ad 和 4B)。根据细胞培养基中乳酸脱氢酶含量与细胞死亡数目成正比的原理,测定实验组中的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性,PC 毒素导致转染 BmAPN5 的细胞培养基中的乳

酸脱氢酶的含量显著高于对照 (图 4C),暗示 BmAPN5 参与 PC 毒素蛋白致病过程,导致细胞裂解死亡,从而使细胞质中的 LDH 释放到培养基中。

## 3 讨论

细菌合成分泌的毒素是其致病的毒力因子<sup>[14]</sup>。细菌毒素通过与宿主细胞的受体蛋白相结合,使毒素蛋白发生低聚反应,形成多聚体,插入细胞膜上导致细胞穿孔,导致细胞裂解死亡<sup>[15]</sup>。在本文中,我们克隆 *BmAPN5* 基因,重组表达并纯化获得 GST-BmAPN5 蛋白。通过 far-Western blotting、Co-IP 和 ELISA 证明了 BmAPN5

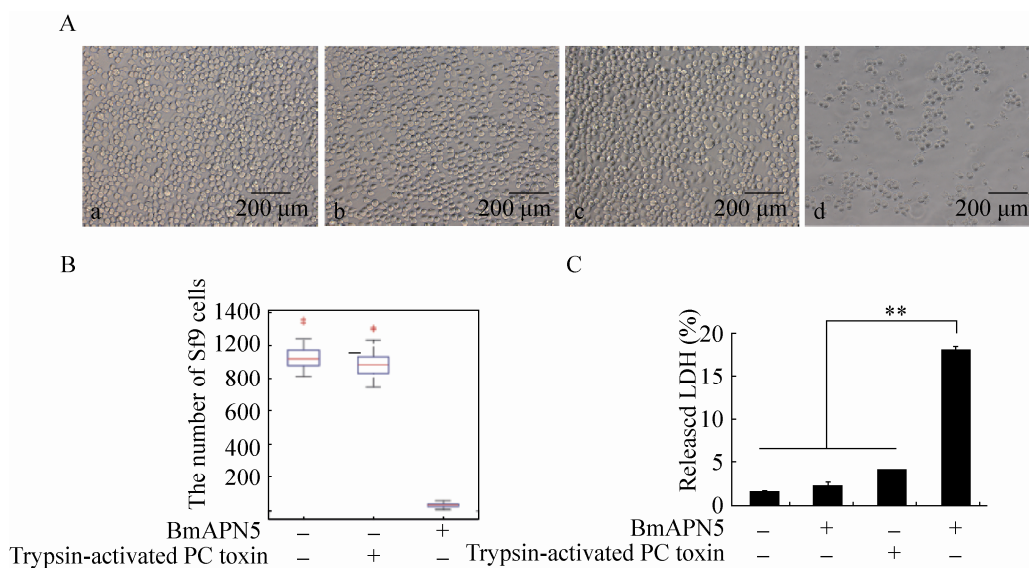


图 4 细胞水平检测 PC 毒素蛋白的作用

Fig. 4 Cytotoxic activity of trypsin-activated PC-induced BmAPN5-expressing Sf9 cells death. (A) The cytotoxic activity of trypsin-activated PC proteins on Sf9 cells transfected with the gene encoding the BmAPN5. Photomicrographs of healthy uninfected cells. (B) The number of cells with such alterations after PC-treated healthy and BmAPN5-expressing Sf9 cells is shown. (C) Trypsin-activated PC-induced cell death was measured based on the extracellular release of LDH activity after incubation for 6 h. Error bars  $\bar{x} \pm s$ . Statistically significant differences from the control samples are indicated.  $**P < 0.01$ .

与 PC 毒素存在相互作用。同时,细胞毒理实验证实了 BmAPN5 作为一种功能性受体,参与 PC 毒素对 Sf9 细胞的致病过程。

昆虫中肠是抵抗病原微生物入侵的第一道防线,能够触发多种免疫应答机制来抵抗病原菌的侵染。同时,在中肠细胞上也存在多种病原菌的受体,参与病原菌及其毒素的致病过程,这在病原菌的感染和疾病的发生过程中起着至关重要的作用<sup>[16]</sup>。昆虫中肠细胞含有丰富的 APN,并且 APN 是通过 GPI-anchor 锚定在细胞膜上<sup>[17]</sup>。在家蚕中,7 个 APN 基因在中肠特异表达或高量表达<sup>[5]</sup>。家蚕中肠刷状缘膜囊泡中存在许多可以与 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 结合的 APN 异构体,这些异构体分子量在 93 kDa 到 110 kDa 之间,分别是 93 kDa、96 kDa、100 kDa、105 kDa 和 110 kDa,其中 96 kDa 的异构体只与 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 中的 Cry1Ac 结合<sup>[9]</sup>。细菌毒素既可与一个受体蛋白相互作用,也可以与多个受体蛋白相互作用<sup>[18-21]</sup>。在家蚕中,已有研究表明 BmAPN4 和 BtR-175 也可以与 PC 毒素相互作用<sup>[11]</sup>。BmAPN5 与 BmAPN4 结构非常类似,且也可与 PC 毒素相互作用,参与毒素的致病过程。PC 毒素和 *Bt* 类毒素通常都有低聚化过程<sup>[10]</sup>,绝大部分中肠刷状缘膜囊上含有丰富的多种 APN 受体都可与毒素类蛋白相互作用,起到富集毒素蛋白而促进毒素蛋白发生低聚反应的作用。目前这仅是一种推测,还需进一步深入研究。

*Bb* 感染家蚕幼虫后,电镜结果显示中肠上皮细胞产生 PC 毒素积累,上皮细胞受到破坏,形成大小不一的孔洞<sup>[10]</sup>,这类似于 *Bt* 毒素的致病过程<sup>[9]</sup>。*Bt* 毒素的“pingpong”结合机制涉及毒素优先与含量丰富但亲和力低的 APN 结合,

之后与含量少但亲和力高的钙粘蛋白结合<sup>[3]</sup>。在家蚕中,已报道受体 APN 和 BtR-175 与 *Bt* 毒素结合相关<sup>[22]</sup>,与 BtR-175 相结合后,单体 *Bt* 毒素发生低聚反应,形成预穿孔的低聚体结构,*Bt* 低聚体与 APN 结合,插入膜上,形成孔洞导致宿主死亡<sup>[3]</sup>。结合先前家蚕 APN4 和 BtR-175 参与 PC 毒素致病机制的研究<sup>[11]</sup>,PC 毒素被家蚕中肠蛋白酶消化形成有活性的单体毒素,穿过穿透围食膜,优先与中肠上皮细胞上含量丰富但亲和力低的多种 APN 受体结合,如 APN4 和 APN5,之后与含量低但亲和力高的钙粘蛋白结合,使 PC 毒素蛋白构象发生改变,低聚反应形成预穿孔的低聚体。该低聚体插入膜上形成孔洞,导致膜电压和离子平衡改变,破坏细胞,从而在中肠形成孔洞,细菌及其毒素通过孔洞进入血淋巴,导致家蚕中毒性败血病,引起家蚕死亡<sup>[11]</sup>。由此可见,毒素与受体相结合是细菌毒素致病的关键步骤,就经济昆虫家蚕而言,可以通过基因组编辑技术对靶标受体遗传操作实现抗性素材创新。

## REFERENCES

- [1] Pigott CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 255–281.
- [2] Griffiths JS, Haslam SM, Yang TL, et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 2005, 307(5711): 922–925.
- [3] Pacheco S, Gomez I, Arenas I, et al. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32750–32757.
- [4] Vachon V, Laprade R, Schwartz JL. Current



- models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol*, 2012, 111(1): 1–12.
- [5] Lin P, Cheng TC, Jin SK, et al. Structural, evolutionary and functional analysis of *APN* genes in the Lepidoptera *Bombyx mori*. *Gene*, 2014, 535(2): 303–311.
- [6] Atsumi S, Mizuno E, Hara H, et al. Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7): 3966–3977.
- [7] Ibiza-Palacios MS, Ferré J, Higurashi S, et al. Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*. *Biochem J*, 2008, 409(1): 215–221.
- [8] Nakanishi K, Yaoi K, Nagino Y, et al. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*-their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett*, 2002, 519(1/3): 215–220.
- [9] Shitomi Y, Hayakawa T, Hossain DM, et al. A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem*, 2006, 139(2): 223–233.
- [10] Huang LL, Cheng TC, Xu PZ, et al. A genome-wide survey for host response of silkworm, *Bombyx mori* during pathogen *Bacillus bombysepticus* infection. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8098.
- [11] Lin P, Cheng TC, Jin SK, et al. PC, a novel oral insecticidal toxin from *Bacillus bombysepticus* involved in host lethality via APN and BtR-175. *Sci Rep*, 2015, 5: 11101.
- [12] Wu YL, Li Q, Chen XZ. Detecting protein-protein interactions by far-Western blotting. *Nat Protoc*, 2007, 2(12): 3278–3284.
- [13] Sato Y, Kameya M, Arai H, et al. Detecting weak protein-protein interactions by modified far-Western blotting. *J Biosci Bioeng*, 2011, 112(3): 304–307.
- [14] Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(4): 302–313.
- [15] Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, et al. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(3): 493–507.
- [16] Soberon M, Fernandez LE, Perez C, et al. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, 2007, 49(5): 597–600.
- [17] Upadhyay SK, Singh PK. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(10): 2027–2036.
- [18] Head GP, Greenplate J. The design and implementation of insect resistance management programs for *Bt* crops. *GM Crops Food*, 2012, 3(3): 144–153.
- [19] Hasuwa H, Shishido Y, Yamazaki A, et al. CD9 amino acids critical for upregulation of diphtheria toxin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(4): 782–790.
- [20] Scobie HM, Rainey GJA, Bradley KA, et al. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5170–5174.
- [21] Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, et al. Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin. *Infect Immun*, 2003, 71(2): 739–746.
- [22] Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(1): 3–22.

(本文责编 陈宏宇)