

钙粘蛋白与苏云金芽胞杆菌晶体毒素 互作机制研究进展

赵新民^{1,2} 周攀登² 刘淑云² 徐玲² 夏莉² 夏立秋¹ 孙运军^{1*}

- (1. 湖南师范大学 生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室 湖南 长沙 410081)
(2. 湖南城市学院 化学与环境工程系 湖南 益阳 413000)

摘要: 昆虫钙粘蛋白是苏云金芽胞杆菌晶体毒素的重要受体之一, 本文简述了昆虫钙粘蛋白种类、结构特征和在昆虫体内的分布, 对昆虫钙粘蛋白与苏云金芽胞杆菌毒素相互结合位点进行了较深入讨论; 详细论述了苏云金芽胞杆菌晶体毒素作用孔洞模式和信号转导模式, 并简要介绍了钙粘蛋白与昆虫抗性的关系。

关键词: 钙粘蛋白, 苏云金芽胞杆菌, 晶体毒素, 互作机制, 抗性

Progress on the mechanism of interaction of cadherin with crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*

ZHAO Xin-Min^{1,2} ZHOU Pan-Deng² LIU Shu-Yun² XU Ling²
XIA Li² XIA Li-Qiu¹ SUN Yun-Jun^{1*}

- (1. Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, College of Life Science,
Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)
(2. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University,
Yiyang, Hunan 413000, China)

Abstract: Cadherin is one of the most important receptors for crystal toxins of *Bacillus thuringiensis* in insects. The type, structure and distribution of cadherin in insects are sketched.

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(No. 12JJ3021); 国家自然科学基金项目(No. 30900037); 国家 863 计划项目
(No. NC2010GA0091)

*通讯作者: Tel: 86-731-88872298; 信箱: syj6325@ hotmail.com

收稿日期: 2012-05-16; 接受日期: 2012-10-17

The binding sites of both crystal toxin and cadherin are discussed in depth. The mechanism of interaction of cadherin with crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* is expounded in detail, and the relations between cadherin and insect resistance are also presented.

Keywords: Cadherin, *Bacillus thuringiensis*, Crystal toxin, Interaction mechanism, Resistance

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性细菌,它在形成芽孢的同时产生晶体包涵体。包涵体主要为 δ 内毒素的杀虫晶体蛋白,又称Bt晶体毒素。晶体毒素被敏感昆虫的幼虫吞食后,在幼虫肠道碱性环境和蛋白酶的作用下释放出活性毒素蛋白,活性毒素蛋白与幼虫中肠上皮细胞的特异受体发生结合,引起细胞内发生一系列变化,进而发挥杀虫作用。Bt的杀虫活性范围包括节肢动物门中的鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)和直翅目(Orthoptera)等多个目的昆虫,同时还发现Bt对线形动物门和原生动物门中某些种类有毒杀活性^[1]。Bt晶体毒素对靶标害虫具有高度的专一性。是目前世界上产量最大、应用最广泛的生物杀虫剂^[2]。

Bt晶体毒素通过与相关受体结合,引起细胞内发生一系列变化,进而发挥杀虫作用,整个过程中,晶体毒素与受体的结合是影响毒力的关键。昆虫体内现已明确的Bt晶体毒素受体主要有钙粘蛋白、氨肽酶N、碱性磷酸酶、糖脂类、270 kD复合糖、 α -葡萄糖苷酶、P252蛋白和ADAM3金属蛋白酶^[3]。

Bt晶体毒素的作用机制还不十分清楚。目前有两种主要的晶体毒素作用模式;孔洞模式和信号转导模式。这两种模式都有着相似的起始步骤,即晶体毒素在中肠溶解,进而被中肠蛋白酶激活并结合在钙粘蛋白受体上,继而引起细胞发生一系列反应,最终导致细胞死亡。在这两种模式中,钙粘蛋白与晶体毒素毒力的发挥密切相关。目前

已对钙粘蛋白与Bt晶体毒素特别是Cry1A的结合方式进行了较为广泛和深入研究^[4-5]。这些研究无疑对进一步了解Bt晶体毒素的杀虫机制以及昆虫对Bt晶体毒素的抗性具有重要意义。

1 钙粘蛋白在昆虫的分布

钙粘蛋白属于依赖钙离子的跨膜糖蛋白家族中的一类,包括E(Epithelial)-蛋白、N(Neutral)-蛋白、R(Retinal)-蛋白和P(Placental)-蛋白,它们在多细胞有机体中起着细胞间连接和保持细胞完整性的作用。还在细胞增殖、分化过程中起连接蛋白作用,并能调节胞外结构域(Ectodomain, EC)与胞质结构域(Cytoplasmic domain, CPD)的信号转导途径^[6]。

Vadlamudi等^[7]首次在烟草天蛾(*Manduca sexta*)中肠刷状缘膜囊(Brush border membrane vesicles, BBMV)上发现了Cry1A毒素的一种受体与钙粘蛋白的结构很相似,称为钙粘蛋白。鳞翅目昆虫的钙粘蛋白主要位于昆虫中肠柱状上皮细胞膜的绒毛上。在棉铃虫敏感品系中,钙粘蛋白在幼虫中肠上表达量最高,在前肠和后肠有少量表达,在肠道以外的组织中不表达^[8]。烟草天蛾的钙粘蛋白Bt-R1只在昆虫幼虫期表达,在卵和成虫期不表达,幼虫的不同发育时期表达量也不相同。其表达量随着1-5龄的幼虫虫龄增长而增加^[9]。Bt-R1分布在中肠上皮细胞基膜(Basal lamina)、围食膜基质(Peritrophic matrix)和微绒毛的顶点或基部。微绒毛上的Bt-R1暴露于中肠内腔,而不是中肠上皮细胞间的接触区域,这样分

布可能使 Bt-R1 与昆虫中肠内的肠液充分接触, 从而行使 Cry1A 晶体毒素受体的角色^[5]。

目前, 在多种昆虫中发现了钙粘蛋白, 包括烟草天蛾、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、家蚕(*Bombyx mori*)、欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、棉红铃虫(*Pectinophora gossypiella*)和小菜蛾(*Plutella xylostella*)等鳞翅目昆虫^[10], 还包括玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*)、黄粉虫(*Tenebrio molitor*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)等鞘翅目昆虫^[8], 以及冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)等双翅目昆虫中^[11]。

2 钙粘蛋白的结构特征及其与毒素的结合部位

烟草天蛾、烟芽夜蛾、舞毒蛾和棉铃虫等的钙粘蛋白与家蚕钙粘蛋白 Bt-R175 相比较, 氨基酸序列的同源性分别是 69%、64%、68% 和 62%。根据 cDNA 序列推断的编码产物具有共同的结构域。从 N 端至 C 端依次根据钙粘蛋白受体的 cDNA 序列推断的编码产物具有共同的结构域^[12]。从 N 端至 C 端依次是: 一段 N 端信号肽序列(S), 数个数量不等的重复区(Cadherin repeat, CR), 一个近膜区(MPR), 一个跨膜区(TM)和一个较小的胞质区(C)。N 端信号肽由 20 个氨基酸组成, 信号肽序列在蛋白质加工时被切除了。随后是 11 个重复区和较短的近膜结构域, 跨膜结构域由 22 个氨基酸形成的 α 螺旋结构组成, 单次穿膜, C 端的胞质区由 101 个氨基酸组成。整个分子胞外区有 15 个 N 糖基化位点, 胞内区只有一个潜在糖基化位点。棉铃虫和棉红铃虫钙粘蛋白 CR 为 11, 家蚕钙粘蛋白 CR 为 9, 烟草天蛾和烟芽夜蛾钙粘蛋白 CR 均为 12。

钙粘蛋白与晶体毒素结合部位位于其重复区和近膜区, 具有多个结合位点。如在烟草天蛾钙

粘蛋白 Bt-R1 重复区的 12 个重复区中, 其中 CR7 (865–875 位氨基酸残基)、CR11 (1 296–1 362 位氨基酸残基)和 CR12 均可与晶体毒素 Cry1A 结合。其中 CR11 与 Cry1A 结合位点氨基酸序列为₁₃₃₁IPLPASILTVTV₁₃₄₂, CR12 与 Cry1A 结合位点氨基酸序列为₁₄₁₆GVLTLNIQ₁₄₂₃。CR12 结合位点氨基酸序列删除 1 个氨基酸或点突变(I₁₄₂₂R)后, 钙粘蛋白与 Bt Cry1Ac 和 Bt Cry1Ab 的结合能力均下降^[13]。

将烟芽夜蛾 HevCaLP 钙粘蛋白 CR12 对应序列₁₄₂₃GVLTLNFQ₁₄₃₀的 L₁₄₂₅或 F₁₄₂₉单点突变成精氨酸后, 也影响了其与 Cry1Ac 的结合^[14]。可见, 该氨基酸序列是钙粘蛋白结合 Cry1A 必不可少的。

有研究表明, 棉红铃虫钙粘蛋白 CR10₁₃₀₅LDPVTN₁₃₁₀和 CR11₁₃₄₁IPLPGSLLTVTV₁₃₅₂是 Cry1Ac 的结合区^[15]。此外, 家蚕钙粘蛋白 BtR-175 与 Bt Cry1Aa 的结合区域定位于 CR7 的₈₇₃IIDTNNK₈₇₉位氨基酸残基^[16]。可见, Cry1A 晶体毒素与钙粘蛋白的结合位点在不同种鳞翅目害虫中较保守。

Bt 晶体毒素中, Cry3 家族对鞘翅目害虫高效。玉米根萤叶甲钙粘蛋白 C 端的 3 个重复区 CR8-10、Bt Cry3Aa 和 Cry3Bb 的亲合力很高^[17]。CR8-10 中与 Cry3 毒素结合的氨基酸序列为₁₃₁₁SSLNVTVN₁₃₁₈^[10], 与烟草天蛾钙粘蛋白 Bt-R1 的 CR11 对应结合序列十分相似。此外, 黄粉虫的钙粘蛋白 Bt-R4 片段能够特异地与 BtCry3Aa 结合并促进 Cry3Aa 形成寡聚体, 将 dsRNA 注射到黄粉虫幼虫敲除钙粘蛋白基因后, 钙粘蛋白 Bt-R4 含量显著下降, 处理后幼虫对 Cry3Aa 的抗性明显增强^[18]。结果表明, Cry3A 晶体毒素与鞘翅目昆虫钙类粘蛋白的结合位点与 Cry1A 晶体毒素与鳞翅目昆虫钙粘蛋白的结合位点十分相似。

综上所述可知, 晶体毒素需要与钙粘蛋白结

合后才能毒杀目标害虫, 且其结合部位较为保守, 结合部位位于钙粘蛋白重复区和近膜区。

3 毒素结合钙粘蛋白的部位

Rajamohan 等^[19]采用定点突变技术, 将 Cry1Aa 结构域 II 顶环(Loop)上氨基酸残基₄₃₈GFSNS₄₄₃分别替换为 Ala, 发现突变子 G439A 和 F440A 对烟草天蛾和烟芽夜蛾毒力急剧下降, 与 BBMV 结合实验也表明这两个突变株初始结合明显降低。以上实验结果表明结构域 II 主要影响毒蛋白与受体的结合。

目前已经发现, 在鳞翅目中 Cry1Ab 和 Cry1Aa 可以与钙粘蛋白结合; 在鞘翅目中 Cry3Ab 可以与钙粘蛋白结合; 在双翅目中, Cry11Ab、Cry11Aa 和 Cry11Ba 和 Cry4Ba 可以与钙粘蛋白结合。Griko 等^[20]采取免疫印迹实验表明, Cry1Ab 降解产物 22 kD 可以与 Bt-R1 结合, 这个 N 端片段经测序, 确定氨基酸残基序列为 NSSVSIIRAPMFSWIHR, 相当于 Cry1Ab 毒素结构域 II 顶环 Loop 3 的 442–458 的氨基酸残基。Cry1Ab 毒素结构域 III 也可以与受体结合。通过进一步研究, 已将结合部位缩小到了结构域 II 顶环 Loop 3 和与之靠近的结构域 III 部分。推导的最大可能结合部位为 β 10, Loop 3 和 β 11–16。利用 Pfam 数据库和序列注释 SAS 分析, 发现有 2 个推导的溶剂暴露区(氨基酸残基 432–449 和 480–493)。对 Cry1Ab、Cry3Aa 和 Cry4Ba 多序列比对分析, Loop 3 和 β 11 也是差异最大的区域, 表明它们在决定杀虫特异性方面起重要作用^[21]。

也有研究表明^[22], Loop 2 和 Loop α -8 参与了与钙粘蛋白的结合。其中 Loop 2 与烟草天蛾钙粘蛋白 BT-R1₈₆₉HITDTNNK₈₇₆ 结合, 位置相当于 CR7, Loop α -8 与 BT-R1₁₃₃₁PLPASILTVTV₁₃₄₂ 结合, 位于 CR11。

You 等^[23]报道 Cry1Aa 结构域 II 的 F328 的突

变导致其与家蚕钙粘蛋白 Bt-R175 的结合降低 4 倍。说明 Cry1Ab 的 F₃₂₈ 可能是与家蚕钙粘蛋白 Bt-R175 结合的关键氨基酸残基。最近, Obata 等^[24]的研究表明, 晶体毒素与 Bt-R175 结合时, 毒素结构域 II 顶环 Loop 1 的 R311, Loop 2 的 N376 和 Loop 3 的 G442 处于毒素与受体的接触面。Loop 2 N 端的₃₆₅LYRRIILG₃₇₂ 作为肽片段直接与 Bt-R175 结合。

总之, 较多的研究支持晶体毒素的结构域 II 特别是顶环是受体的主要结合部位, 但结构域 III 也可能与受体结合有关。

4 钙粘蛋白与苏云金杆菌晶体毒素互作机制

在鳞翅目昆虫烟草天蛾中, 钙粘蛋白与 Cry1A 毒素互作机制为孔洞模式^[3]或又称顺序结合模式。主要步骤为 Cry1A 毒素首先被中肠蛋白酶水解, 然后是 Cry1A 毒素单体在细胞膜上与糖基磷脂酰肌醇锚定(GPI)的氨肽酶 N、碱性磷酸酶结合, 单体毒素与钙粘蛋白结合后, 进一步促进 Cry1A 毒素结构域 I 中的 α 1 螺旋被切除, α 1 螺旋被切除的 Cry1A 毒素可以自发地形成寡聚体, 寡聚体与氨肽酶 N、碱性磷酸酶受体结合, 寡聚体毒素插入细胞膜, 细胞膜由此产生孔洞并导致细胞死亡。这一模式涉及到多个受体和步骤^[3](图 1), 目前已经得到许多实验支持^[24–25]。

孔洞模式引人注目的地方在于能够较好地解释改变钙粘蛋白和氨肽酶与 Bt 毒素的结合能力, 或者改变它们的表达水平都能够使昆虫对晶体毒素产生抗性^[26–27], 即使是抗性不是由于受体的修饰而导致的^[28]。但该模式也有不尽人意的地方, 如只表达两种受体的一种, 也能够导致细胞对一种或多种毒素产生抗性^[29–30]; 并且无法说明在毒素非常低浓度下有大量的 ⁸⁶Rb⁺ 从富含部分纯化氨肽酶 N 受体的磷脂囊泡中流出的实验现象^[31]。

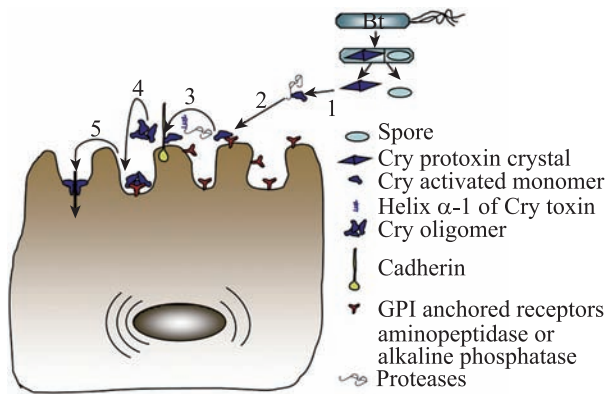


图1 Cry1A 在鳞翅目昆虫烟草天蛾中的作用模式^[3]
Fig. 1 Mode of action of Cry1A toxins in the lepidopteran *Manduca sexta*^[3]

注: 1: 蛋白溶解和水解; 2: 单体 Cry1A 在细胞膜上与糖基磷脂酰肌醇锚定(GPI)的氨肽酶 N 和碱性磷酸酶结合; 3: 单体毒素与钙粘蛋白结合后, 进一步促进 Cry1A 毒素结构域 I 中的 α 1 螺旋被切除; 4: Cry1A 毒素形成寡聚体, 寡聚体再与氨肽酶 N 和碱性磷酸酶受体结合; 5: 寡聚体毒素插入细胞膜。

Note: 1: Solubilization and proteolytic processing of Cry1A protoxin; 2: Binding of monomeric Cry1A to highly abundant GPI-anchored aminopeptidase-N and alkaline phosphatase; 3: Binding of monomeric Cry1A to cadherin and further proteolysis of domain I α -helix 1; 4: Oligomer formation and binding of the oligomeric structure to GPI-anchored aminopeptidase-N and alkaline phosphatase receptors; 5: Insertion of the oligomeric Cry1A structure into the membrane.

Griko 等^[20]采取同源建模的方法, 以 Cry1Ab 为模板, 构建了 Cry1Ab 和钙粘蛋白重复区的三维结构, 再采取分子对接的方法, 研究了 Cry1Ab 与钙粘蛋白结合的分子模式^[20]。结果显示, Cry1Ab 表面暴露的 F₄₄₀ 与 Bt-R1 的 L₁₃₅₈、Y₁₄₅₃ 和 V₁₄₅₅ 发生疏水作用, Cry1Ab 带正电的 R₄₃₇ 与 Bt-R1 的钙粘蛋白 E₁₃₅₇ 发生静电作用力。定点突变研究已经证实毒素的 R₄₃₇ 和 F₄₄₀ 的重要性^[32]。

信号转导模式完全不同于细胞渗透压破坏的孔洞模式^[31]。晶体毒素单体与钙粘蛋白特异结合, 激活 Mg²⁺-依赖的信号转导路径, 导致细胞死亡(图 2)。该模式表明, 晶体毒素在细胞膜上的寡聚化与细胞毒性没有直接联系。晶体毒素单体与钙粘蛋白特异结合引发级联反应导致类似细胞胀亡(Oncosis)发生。首先晶体毒素与钙粘蛋白特异

结合, 产生分子信号, 激活异源三聚体的 G 蛋白和腺苷酸环化酶(AC), 产生大量的环磷酸腺苷(cAMP), 环磷酸腺苷激活蛋白激酶 A (PKA), 引发一系列细胞发生变化, 包括细胞骨架重排、离子流动, 第二信号途径的加快导致细胞死亡。同时, 晶体毒素与受体结合引发的信号, 反过来可以增加钙粘蛋白从细胞内膜小囊泡通过胞吐作用(Exocytosis)定向运输到细胞膜。这一模式涉及 Mg²⁺ 的依赖, 有实验表明, 利用二价阳离子螯合剂可以阻止 Cry1Ab 对表达钙粘蛋白的昆虫 S5 细胞的破坏^[33]。并观察到了 Cry1Ab 导致 S5 细胞形态学的改变^[34]。特别是近期观察到昆虫细胞对杀线虫 Bt 晶体毒素和杀昆虫 Bt 晶体毒素的信号转导防御机制^[35-36]。但这一模式忽略其他受体的作用, 也不能很好地解释有些毒素的突变子没有改变与受体的结合能力却失去了毒力。

5 钙粘蛋白与昆虫抗性

由于这两种作用模式都涉及到钙粘蛋白, 所以钙粘蛋白与昆虫对 Bt 的抗性有密切关系^[15-16]。Gahan 等^[37]发现, 对 Cry1Ac 毒素抗性比为 10 128 倍的烟蚜夜蛾 YHD2 品系的 Cry1A 毒素受体钙粘蛋白基因发生了插入突变, 导致合成的蛋白质缺失 C 端的 1 110 个氨基酸残基。该缺失蛋白只有部分的重叠子, 缺少钙粘蛋白的其他结构。实际上这种突变是由于反向转座子介导的插入使烟蚜夜蛾 YHD2 品系钙粘蛋白基因的结构遭到了破坏。在烟芽夜蛾 YHD2 抗性品系中, 钙粘蛋白基因表达的缺失蛋白已经没有晶体毒素结合区。

Morin 等在室内通过 Cry1Ac 筛选到 3 个棉红铃虫抗性品系, 发现棉红铃虫对 Cry1Ac 的抗性与受体类钙粘蛋白基因编码区的 3 个缺失突变位点(*r1*、*r2* 和 *r3*)有关。这 3 个虫系能够在转基因棉花植株上存活, 它们的杂交后代中带有任意组合的 2 个突变等位基因的个体都表现抗性, 杂合型和野生型的个体对 Cry1Ac 敏感^[38]。

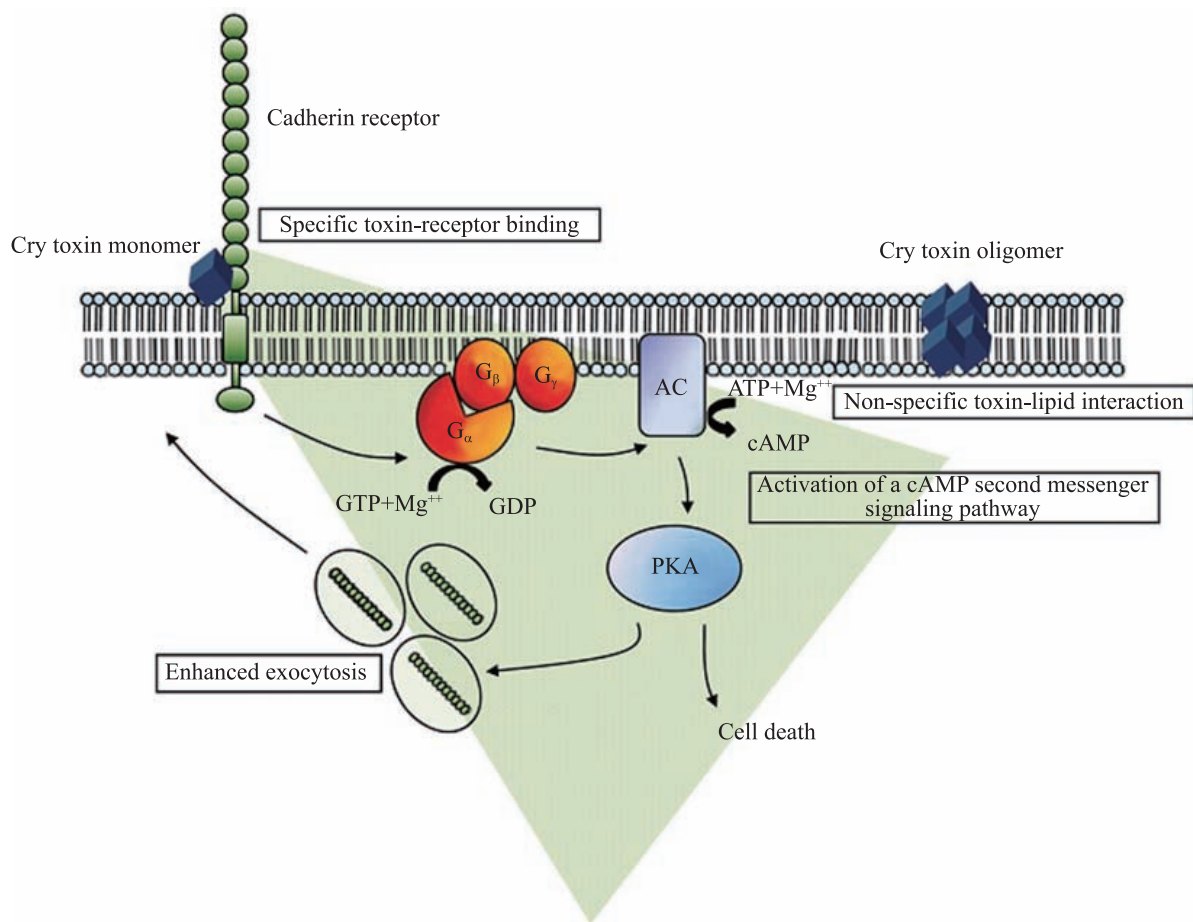


图 2 晶体毒素作用的信号转导模式^[33]

Fig. 2 Cry toxin action model of signal transduction pathway^[33]

注: 毒素与受体结合导致 G 蛋白、腺苷酸环化酶和蛋白激酶 A 激活; 信号途径的激活导致含有钙粘蛋白的细胞内膜小囊泡通过胞吐作用定向细胞膜; 钙粘蛋白的增加可以结合更多毒素, 反过来可以放大级联反应; 蛋白激酶 A 调节下游生化反应导致细胞死亡。

Note: G protein ($G\alpha$) adenylyl cyclase (AC) and protein kinase A (PKA) are activated. Activation of the signaling pathway mediates exocytosis of the cadherin receptor from intracellular vesicles to the cell membrane. The resulting enhanced display of cadherin on the cell surface facilitates recruitment of additional toxin molecules which, in turn, amplifies the original signal in a cascade-like fashion. The signaling kinase PKA modifies downstream molecules that promote the biochemical activities that destroy the cell.

国内对钙粘蛋白与昆虫对 Bt 的抗性关系进行了深入研究, 确定在棉花 3 个主要害虫对 Bt 棉花的抗性基因存在遗传多样性, 既有基于钙粘蛋白基因缺失突变的隐性基因, 也存在基于钙粘蛋白氨基酸点突变或其他抗性机制的非隐性基因^[39]。

近来研究人员将 Cry1A 进行去掉 N 端包括 $\alpha 1$ 在内的部分氨基酸残基, 发现这种修饰了的

毒素 Cry1A 能够跳过钙粘蛋白与毒素的相互作用, 并且能够毒杀钙粘蛋白基因突变了抗性昆虫, 为此提出了对毒素采用蛋白质工程技术, 保留毒素寡聚化和跳过其与钙粘蛋白相互作用的环节应对昆虫对 Bt 的抗性^[40-41]

6 结语

Bt 能够在多种生态环境下生存, 晶体毒素从

氨基酸残基序列、杀虫谱及三维结构特征上表现出高度的广泛性。晶体毒素不同于常规的化学杀虫剂,毒素与昆虫靶标之间的相互作用在进化过程已达到一个相当复杂的水平。首先,晶体毒素是一种致病毒力因子,毒力发挥需要多种因素的协同作用。其次,昆虫对晶体毒素的反应是有多种对付方法。Bt 作为一种昆虫的病原物生物,其晶体毒素受体特别是钙粘蛋白功能的完全解读,将进一步揭示 Bt 晶体毒素与昆虫的作用机理,将延缓昆虫对 Bt 晶体毒素产生抗性,有效地控制害虫、延长转 Bt 基因植物使用寿命等方面提供新的思路。最近研究人员通过表达钙粘蛋白部分片段可以保护毒素在昆虫中肠不受蛋白酶的降解或者增强孔洞形成能力^[42-43],这一研究具有启示意义。

此外,研究还发现部分钙粘蛋白与晶体毒素并非 Bt 毒力的限制性步骤^[44],也有昆虫的抗性产生并未与钙粘蛋白结构改变有关^[45]。随着更多晶体毒素作用受体的发现,晶体毒素与受体的相互作用机制必然呈现高度的复杂性,这又对我们进一步了解晶体毒素的杀虫机制提出了新的挑战。

参 考 文 献

- [1] Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(5): 189-194.
- [2] Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 283-300.
- [3] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemical and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431.
- [4] 韩岚岚, 赵奎军, 张杰. 昆虫类钙粘蛋白与 Bt Cry1A 蛋白之间的相互作用[J]. 昆虫知识, 2009, 46(2): 203-209.
- [5] 韩岚岚. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白 Cry1Ac 与昆虫互作机理的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2008.
- [6] Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function[J]. Journal of Cell Science, 2001, 114(4): 629-641.
- [7] Vadlamudi RK, Ji TH, Bulla LA Jr. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Berliner*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(17): 12334-12340.
- [8] Wang GR, Wu KM, Liang GM, et al. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region[J]. Science in China Series C, Life Sciences, 2005, 48(4): 346-356.
- [9] Midboe EG, Candas M, Bulla LA Jr. Expression of a midgut-specific cadherin BT-R1 during the development of *Manduca sexta* larva[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B, Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 135(1): 125-137.
- [10] Sayed A, Nekl ER, Siqueira HAA, et al. A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue[J]. Insect Molecular Biology, 2007, 16(5): 591-600.
- [11] Hua G, Zhang R, Abdullah MAF, et al. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity[J]. Biochemistry, 2008, 47(18), 5101-5110.
- [12] Nagamatsu Y, Toda S, Koike T, et al. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(a) toxin[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1998, 62(4): 727-734.
- [13] Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. Bt-R_{1a} extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(27): 28051-28056.
- [14] Xie R, Zhuang M, Ross LS, et al. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis*

- virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(9): 8416–8425.
- [15] Fabrick JA, Tabashnik BE. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(2): 97–106.
- [16] Gómez I, Oltean DI, Gill S, et al. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins interaction using phage display[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(31): 28906–28912.
- [17] Park Y, Abdullah MA, Taylor MD, et al. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(10): 3086–3092.
- [18] Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, et al. A novel *tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(27): 18401–18410.
- [19] Rajamohan F, Hussain SR, Cottrill JA, et al. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(41): 25220–25226.
- [20] Griko NB, Rose-Young L, Zhang XB, et al. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R₁[J]. Biochemistry, 2007, 46(35): 10001–10007.
- [21] Ibrahim MA, Griko NB, Junker M, et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective[J]. Bioengineered Bugs, 2010, 1(1): 31–50.
- [22] Gómez I, Dean DH, Bravo A, et al. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin[J]. Biochemistry, 2003, 42(35): 10482–10489.
- [23] You TH, Lee MK, Jenkins JL, et al. Blocking binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to *Bombyx mori* cadherin receptor results in only a minor reduction of toxicity[J]. BMC Biochemistry, 2008, 9(1): 3.
- [24] Obata F, Kitami M, Inoue Y, et al. Analysis of the region for receptor binding and triggering of oligomerization on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin[J]. The FEBS Journal, 2009, 276(20): 5949–5959.
- [25] Tigue NJ, Jacoby J, Ellar DJ. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5715–5720.
- [26] Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, et al. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(7): 421–429.
- [27] Xu XJ, Yu LY, Wu YD. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 948–954.
- [28] Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, et al. Identification of a novel aminopeptidase P-like gene (*OnAPP*) possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*)[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23983.
- [29] Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins[J]. Biochemistry, 2006, 45(32): 9688–9695.
- [30] Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, et al. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(10): 7312–7319.
- [31] Sangadala S, Walters FS, English LH, et al. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and

- phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+$ - K^+ efflux in vitro[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(13): 10088–10092.
- [32] Abdul-Rauf M, Ellar DJ. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes[J]. Current Microbiology, 1999, 39(2): 94–98.
- [33] Zhang XB, Candas M, Griko NB, et al. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells[J]. Cell Death and Differentiation, 2005, 12(11): 1407–1416.
- [34] Zhang XB, Candas M, Griko NB, et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(26): 9897–9902.
- [35] Chen CS, Bellier A, Kao CY, et al. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9494.
- [36] Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R. Response of midgut epithelial cells to Cry1Aa is toxin-dependent and depends on the interplay between toxic action and the host apoptotic response[J]. FEBS Journal, 2012, 279(6): 1071–1079.
- [37] Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*[J]. Science, 2001, 293(5531): 857–860.
- [38] Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(9): 5004–5009.
- [39] Zhang H, Tian W, Zhao J, et al. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(26): 10275–10280.
- [40] Soberón M, Rodríguez-Almázan C, Muñoz-Garay C, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012. doi:10.1016/j.pestbp.2012.05.003.
- [41] Tabashnik BE, Huang FN, Ghimire MN, et al. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(12): 1128–1131.
- [42] Lu Q, Zhang YJ, Cao GC, et al. A fragment of cadherin-like protein enhances *Bacillus thuringiensis* Cry1B and Cry1C toxicity to *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(4): 28–638.
- [43] Rahman K, Abdullah MAF, Ambati S, et al. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 78(2): 354–362.
- [44] Rodríguez-Almazán C, Reyes EZ, Zúñiga-Navarrete F, et al. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae[J]. The Biochemical Journal, 2012, 443(3): 711–717.
- [45] Zhang X, Tiewisiri K, Kain W, et al. Resistance of *Trichoplusia ni* to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac is independent of alteration of the cadherin-like receptor for Cry toxins[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35991.