

棉铃虫 ABCA2 作为 Cry2Ab 受体的功能分析

Ei Thinzar Soe¹ 姚 雪² 杨 朔² 段云鹏² 魏纪珍² 梁革梅^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 为明确棉铃虫 *Helicoverpa armigera* ATP 结合盒转运蛋白家族 A 蛋白亚家族 2 (ATP binding cassette transporter subfamily A member 2, ABCA2) 在 Cry2Ab 杀虫机制中的作用, 利用酵母双杂交技术研究棉铃虫 ABCA2 与 Cry2Ab 的结合特性, 并利用 RNA 干扰 (dsRNA 和 siRNA) 降低 ABCA2 在细胞和幼虫中的表达, 结合细胞毒理学试验分析 ABCA2 的功能。结果表明, 棉铃虫 ABCA2 能与 Cry2Ab 特异性结合; 棉铃虫的 ABCA2 序列与美洲棉铃虫 *H. zea* 相关序列的相似度为 92.86%, 利用 dsRNA 干涉美洲棉铃虫中肠细胞 ABCA2 的表达能显著降低 Cry2Ab 对中肠细胞的毒性; 利用 siRNA 干涉技术降低 ABCA2 在棉铃虫幼虫活体中的表达也显著降低了 Cry2Ab 对幼虫的毒性。表明棉铃虫 ABCA2 不仅是 Cry2Ab 的特异性结合蛋白, 而且参与 Cry2Ab 的杀虫过程, 是 Cry2Ab 的一个重要功能受体。

关键词: ABCA2; Cry2Ab; 棉铃虫; 酵母双杂交; RNA 干涉

Analysis of ABCA2 as a functional receptor for Cry2Ab in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Ei Thinzar Soe¹ Yao Xue² Yang Shuo² Duan Yunpeng² Wei Jizhen² Liang Gemei^{1*}

(1. State key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: To clarify the role of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* ABCA2 (ATP binding cassette subfamily A member 2) in the insecticidal mechanism of Cry2Ab, the binding character between ABCA2 and Cry2Ab was studied using the membrane yeast two-hybrid (MYTH) system, and the function of ABCA2 was further clarified by using RNAi techniques in toxicity tests. The results showed that ABCA2 could specifically bind to Cry2Ab. The amino acid sequence of ABCA2 from *H. armigera* and *H. zea* had 92.86% homology, cytotoxicology tests in *H. zea* midgut cells showed knocking down endogenous ABCA2 using dsRNA significantly reduced the sensitivity of midgut cells to Cry2Ab. Knocking down ABCA2 using siRNA in *H. armigera* larvae also reduced the sensitivity of the larvae to Cry2Ab. The results demonstrated that ABCA2 was not only a specific binding protein of Cry2Ab, but also a major functional receptor of Cry2Ab in *H. armigera*, therefore, played an important role in the insecticidal mechanism of Cry2Ab.

Key words: ABCA2; Cry2Ab; *Helicoverpa armigera*; membrane yeast two-hybrid; RNAi

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是世界上用途最广、产量最大的生物源杀虫剂, 其主要

杀虫活性成分为 δ -杀虫晶体蛋白, 如 Cry 蛋白 (El-Menofy et al., 2014)。自 1996 年转基因作物商业化

以来, Cry蛋白在玉米、棉花等作物中的表达有效防治了多种重要害虫, 截至2019年已有29个国家种植转Bt基因作物, 种植面积每年超过1.904亿 hm^2 (ISAAA, 2021)。与化学杀虫剂相比, Bt具有靶向性强、不杀伤天敌、对人畜无害、不污染环境等优点 (Wu et al., 2008; Lu et al., 2012; Carrière et al., 2015), 同时Bt作物优于其他防治方式的是Bt蛋白能在植株中持续表达, 给植物提供不间断的保护 (Hutchinson et al., 2010; Tabashnik et al., 2010)。然而, 大规模种植转Bt基因作物不可避免地增加了Bt对害虫的选择压力, 加快了害虫抗性进化速度。据报道, 转Bt基因作物田间防治害虫失败的案例截至2019年已上升到19例 (Tabashnik & Carrière, 2019)。我国田间害虫对转Bt作物的抗性水平总体较低, 但近年来棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对Cry1Ac的抗性也在显著增加 (Zhang et al., 2012; Jin et al., 2015)。因此, 害虫抗性严重影响了转Bt基因作物的持续应用和经济效益 (Tabashnik & Carrière, 2019)。

Cry2Ab是用于多基因抗性治理策略中的一种重要Bt蛋白, 与Cry1Ac在棉花中共同表达, 转Cry2Ab+Cry1Ac棉花已在多个国家被广泛种植 (Tabashnik et al., 2013; Fabrick et al., 2014)。Cry2Ab可以延缓害虫对Cry1Ac的抗性, 主要原因是Cry2A类和Cry1A类毒素在目标害虫中缺乏共同的受体或结合位点不同。棉铃虫幼虫中肠刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicle, BBMV) 蛋白的竞争结合试验结果表明Cry1Ac和Cry2Ab之间不存在共同结合位点 (Hernández-Rodríguez et al., 2008; Caccia et al., 2010; Gouffon et al., 2011)。棉铃虫和细点铃夜蛾 *H. punctigera* 中肠与Cry2Ab结合位点的突变与其对Cry2Ab产生的抗性相关, 而这种突变与棉铃虫对Cry1Ac的抗性无关 (Caccia et al., 2010)。此外, 分析相关交互抗性数据发现Cry1A (Cry1Ab或Cry1Ac) 和Cry2A (Cry2Aa或Cry2Ab) 毒素存在较弱的交互抗性 (Carrière et al., 2015; Wei et al., 2015; Welch et al., 2015)。但是在田间和实验室都筛选出了抗Cry2Ab棉铃虫, 这种对Cry2Ab的抗性可能会降低多基因策略的效益 (Welch et al., 2015; Tabashnik & Carrière, 2017; Liu et al., 2017)。已有的研究初步探索了Cry2Ab的杀虫机制及其与Cry1A类蛋白的交互抗性, Cry2Ab的具体杀虫机制仍待深入研究。因此, 为了更好地使用转Bt作物, 必须明确Cry2Ab的受体及其功能。

一直以来, 研究者大多采用Ligand blot等方法对昆虫受体进行鉴定 (Pan et al., 2017; Chen et al.,

2018; Wei et al., 2018), 再利用RNAi或CRISPR/Cas9方法验证受体的功能 (Wang et al., 2016; Pan et al., 2017; Wei et al., 2018)。此外, 从抗性的角度出发, 探究与Bt结合的受体蛋白是否发生基因突变或表达水平改变, 也可以揭示Bt的作用机制 (Tay et al., 2015; Yang et al., 2019; Guo et al., 2020)。基于结合试验和功能验证, ABC转运蛋白C1 (ABC subfamily C member 1, ABCC1) (Chen et al., 2018)、氨肽酶N5 (aminopeptidase N 5, APN5) (Pan et al., 2017) 已被鉴定为Cry2Ab的受体。通过抗性突变遗传连锁以及基因编辑也证实ABC转运蛋白A2 (ABC subfamily A member 2, ABCA2) 是昆虫对Cry2Ab产生较高抗性的原因 (Tay et al., 2015; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019)。但ABCA2作为昆虫对Cry2Ab产生抗性的主要原因, 目前还未有直接证据证实Cry2Ab和ABCA2之间的相互作用。

本研究通过酵母双杂交系统检测ABCA2和Cry2Ab的结合特性, 利用ABCA2的小RNA (siRNA) 和双链RNA (double-stranded, dsRNA) 干涉技术降低ABCA2在棉铃虫和美洲棉铃虫 *H. zea* 中肠细胞系中的表达, 并在活虫和体外对其功能进行分析, 以期明确ABCA2是否为棉铃虫Cry2Ab的功能受体。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫、细胞系及质粒: 棉铃虫幼虫购自中国济源白云实业有限公司, 在实验室内使用人工饲料于温度 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $(60\pm 10)\%$ 、光周期16 L: 8 D条件下饲养。美洲棉铃虫中肠细胞系MG由亚利桑那大学李显春教授馈赠, 该细胞系来源于美洲棉铃虫中肠组织 (Goodman et al., 2004), 在 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下用Excell 420无血清昆虫培养基培养 (Wei et al., 2016)。诱饵质粒pBT3-N-Cry2Ab由本试验室构建、保存并提供; EGFP为增强绿色荧光蛋白, 其序列参考Du et al. (2012; 2017)方法设计合成并由本实验室保存。

试剂和仪器: Cry2Ab原毒素和活化Cry2Ab, 北京缙诺思特生物科技有限公司; pPR3-N载体和真核表达菌株NMY51, 瑞士DUALsystems BioTech公司; 胎牛血清、青霉素、链霉素, 美国HyClone公司; 双链试剂盒MEGA Script RNAi Kit、Excell 420无血清昆虫培养基, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Fu GENE HD[®] Transfection Reagent, 美国Promega公司; Trizol Reagent试剂, 美国Invitrogen公司; 反转录试剂盒Primer Script[™] RT Reagent Kit with gDNA

Eraser、TB Green™ Premix Ex Taq II 试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; RNA-Easy™ Isolation Reagent、HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- α -D-galactopyranoside, X- α -gal)、3-氨基-1, 2, 4-三唑 (3-amino-1, 2, 4-triazole, 3-AT), 美国 Clontech 公司; 其他试剂均为国产分析纯。DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂; Nanodrop 1000 分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; Quant Studio 3 Real-Time PCR System, 美国 ABI 公司; PH-070A 干燥箱/培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 12 孔和 96 孔细胞培养板, 美国 Corning Incorporated 公司; IM-3 倒置显微镜, 意大利 Optika 公司; 24 孔养虫盒, 天津市翔宇顺高分子材料技术开发有限公司。

培养基: 酵母筛选 (synthetic dropout, SD) 培养基, 亮氨酸和色氨酸缺陷型酵母 (SD/-Trp/-Leu, SD/-LT) 培养基, 色氨酸、亮氨酸和组氨酸缺陷型酵母 (SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-LTH) 培养基, 亮氨酸、色氨酸、组氨酸和腺嘌呤缺陷型酵母 (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, SD/-LTHA) 培养基, 美国 Clontech 公司。在上述培养基中分别加入 40 mg/L X- α -gal 时, 培养基命名为 SD/-LT/X、SD/-LTH/X 和 SD/-LTHA/X, 在 SD/-LTHA/X 中同时加入 10 mmol/L 3-AT 时命名为 SD/-LTHA/X/3-AT。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫 ABCA2 蛋白的生物信息学分析

使用 NCBI-BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 检索昆虫的 ABCA2 核苷酸和蛋白质序列。从美洲棉铃虫 ABCA2 基因组序列 (GenBank 登录号为 KZ118207.1) 中剪接出 cDNA 基因序列全长, 使用 DNAClub 软件翻译成氨基酸, 利用 DNAMAN 程序对棉铃虫与其他昆虫的 ABCA2 氨基酸序列进行比对分析, 使用 ClustalW 计算氨基酸序列识别率。ABCA2 蛋白的跨膜情况使用在线软件 Split 3.5 (<http://split4.pmfst.hr/split/4/>) 分析。从 NCBI 下载近缘物种 ABCA2 蛋白的氨基酸序列, 导入 MEGA 6.0 软件, 采用邻近法构建其系统进化树, 并对 Bootstrap 值进行 1 000 次重复自展检验。

1.2.2 酵母双杂交验证棉铃虫 ABCA2 和 Cry2Ab 的结合

酵母双杂交的具体步骤包括诱饵和猎物质粒的构建、宿主验证、自激活检测、功能检测和蛋白互作验证 (Wei et al., 2021a, b)。前期本课题组已构建诱饵质粒 pBT3-N-Cry2Ab, 并通过验证证实诱饵质粒 pBT3-N-Cry2Ab、酵母菌株及整个酵母筛选系统正

常可用 (Wei et al., 2021a, b)。本研究需构建猎物质粒 pPR3-N-ABCA2。参照 Wei et al. (2021a) 方法设计引物 (表 1), 所有引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。ABCA2-pUC57 质粒由生工生物工程 (上海) 股份有限公司根据棉铃虫 ABCA2 基因序列设计合成。利用合成的引物从 ABCA2-pUC57 质粒中分别扩增出 ABCA2 的开放阅读框, 并分别克隆到带有 Sfi I 酶切位点的 pPR3-N 载体中, 获得猎物质粒 pPR3-N-ABCA2。然后将诱饵质粒 pBT3-N-Cry2Ab 和猎物质粒 pPR3-N-ABCA2 各取 100 ng 分别共转化到 NMY51 菌株中, 在 SD 培养基上培养 3~5 d 后, 观察共转化酵母菌板的生长状况, 并从中挑取单菌落, 重悬后分别滴加到 SD/-LT/X、SD/-LTH/X、SD/-LTHA/X 和 SD/-LTHA/X/3-AT 培养基上, 于 30℃ 倒置培养 4 d, 观察、拍照并记录结果。

1.2.3 棉铃虫 ABCA2 dsRNA 合成及细胞毒理测定

利用双链试剂盒 MEGA Script RNAi Kit 参照说明书合成棉铃虫 ABCA2 dsRNA。首先设计合成含有 T7 聚合酶位点的棉铃虫 ABCA2 和 EGFP 的 dsRNA 特异性引物 (表 1) (Du et al., 2012; 2017)。解剖 10 头棉铃虫 5 龄幼虫中肠细胞, 采用 Trizol 法按照试剂 RNA-Easy™ Isolation Reagent 说明书提取 RNA, 并依照 HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper) 说明书反转录合成 cDNA 模板。利用合成的棉铃虫中肠 cDNA 和实验室保存的 EGFP 质粒, 扩增棉铃虫 ABCA2 (417 bp) 和 EGFP 的 dsRNA 目的序列。20 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 预混物 10 μ L、正反向引物各 0.4 μ L、模板 cDNA 1 μ L、双蒸水 8.2 μ L; 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 36 个循环。对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以确保扩增出单一目的条带进行后续试验。之后使用含有 T7 聚合酶位点的基因特异性引物进行第 2 轮 PCR 扩增, 反应体系和程序同上, 仅退火温度调为 62℃。最终合成 ABCA2 和 EGFP 的 dsRNA, 溶解于 DEPC 水中并用分光光度计分别测定其浓度 (Du et al., 2012; 2017)。

将美洲棉铃虫中肠细胞铺入 12 孔细胞培养板中, 每个孔约 9×10^5 个, 过夜培养使细胞充分贴壁。然后每孔加入 FuGENE HD 转染试剂 8 μ L, 每孔分别转染 50 nmol/L 的 EGFP dsRNA 和 ABCA2 dsRNA, 转染 5 h 后更换成含 10% 牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 μ g/mL 链霉素的 Excell 420 昆虫培养基, 在 (28 ± 1) ℃ 下培养 64 h。之后将转染后的美洲棉铃虫中肠细胞重新接入 96 孔细胞培养板上充分贴壁 1 h, 在

倒置显微镜 200 倍视野下观察,每孔观察 2 个视野,记录 Cry2Ab 毒素处理前的存活细胞数量,从一侧轻轻抽出所有培养基,用 20 $\mu\text{g/mL}$ 已活化的 Cry2Ab 毒素处理美洲棉铃虫中肠细胞,28 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 h,从一侧轻轻抽出 30 μL 培养基后加入 7 μL 台盼蓝染液,在倒置显微镜 200 倍视野下,统计每个视野中未被

染成蓝色的细胞个数,记录 Cry2Ab 毒素处理后的存活细胞数量。中肠细胞死亡率采用 Abbott 公式进行计算,死亡率=(处理前细胞数量-处理后细胞数量)/处理前细胞数量 $\times 100\%$ 。收集剩余中肠细胞并按照上述方法提取 RNA 备用。每次独立转染重复 3 次,每次毒力测定重复 3 次。

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Application
ABCA2-F	TGTCCATGCAGTTGTCCTCT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ABCA2-R	ACCCGATGACATCAAAAGCG	
18S-F	GCATCTTTCAAATGTCTGC	
18S-R	TACTCATTCCGATTACGAG	
EF1a-F	GCCTGGTACCATTGTCGTCT	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
EF1a-R	GTAACCACGACGCAACTCCT	
ABCA2-ds-F	AGGTGGTTGTCGTTGGAAGA	
ABCA2-ds-R	CTGCACGTCCTCTGATCTATG	
ABCA2-T7-F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTGGTTGTCGTTGGAAGA	酵母双杂载体构建 Vector construction of MYTH
ABCA2-T7-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCACGTCCTCTGATCTATG	
EGFP-ds-F	CCTGAAGTTCATCTGCACCAC	
EGFP-ds-R	CTCCAGCAGGACCATGTGATC	
EGFP-T7-F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTGCACCAC	
EGFP-T7-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGATC	
pBT3-N-Cry2Ab-F	ATCGAATTCCTGCAGGGCCATTACGGCCATGAATAGTGTATTGAATAGCGG	
pBT3-N-Cry2Ab-R	TACTTACCATGGGGCCGAGGCGGCCTTAATAAAGTGGTGAAATATTAGTTGG	
pPR3-N-ABCA2-F	ATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCATGAGATTAGAAACGAGGCAC	
pPR3-N-ABCA2-R	GAATTCTCGAGAGGCCGAGGCGGCCTTATAACGTCGTTCCCTTCTCTC	

1.2.4 siRNA 干涉棉铃虫幼虫 *ABCA2* 基因及生物测定

棉铃虫 *ABCA2* siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成。*ABCA2* siRNA 与阴性对照 Ncontrol siRNA 进行 2OMe+5Chol 化学修饰,以提高其稳定性和效率,并最大限度地减少其潜在的脱靶效应(Jackson & Linsley, 2010)。

分别取 75 μL DEPC 水、400 nmol/L Ncontrol siRNA 或 400 nmol/L *ABCA2* siRNA 均匀涂布于已凝固的每孔加有 1 mL 棉铃虫人工饲料的 24 孔养虫盒中,于超净工作台中静置干燥,将初孵棉铃虫幼虫转移到 24 孔养虫盒中,每孔 5 头。饲养 4 d 后每个处理随机选取 10 头幼虫,在液氮中快速冷冻,重复 3 次。取各处理样品研磨充分后利用 1.2.3 中合成的 RNA 反转录合成第一链 cDNA,利用特异性引物(表 1)对 *ABCA2* 基因表达量进行 qPCR 检测,以 18S 和 *EF1a* 为内参基因设计内参引物(表 1)。20 μL PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR PCR 预混物 10 μL 、正反向引物各 1 μL 、模板 cDNA 1 μL 、双蒸水 7 μL ;反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,共 40 个循环。设 3 个技术重复,用循环数的平均数和扩增效率计算所有基因的表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析

试验结果。待验证 *ABCA2* 在棉铃虫幼虫中干涉成功后,取 100 $\mu\text{g/mL}$ Cry2Ab 原毒素 75 μL (前期预试验对 3 龄初幼虫进行生物测定,该浓度下幼虫死亡率约为 50%)涂布于已凝固的每孔加有 1 mL 棉铃虫人工饲料的 24 孔养虫盒中,同时涂布等量的 Na_2CO_3 (pH 10)作为对照。将上述试验中饲喂 4 d 的棉铃虫幼虫转移到新的饲料上单头饲喂,每组 3 次重复。饲喂 7 d 后统计幼虫死亡情况并计算死亡率,以毛刷轻拨幼虫不动者视为死亡。

1.3 数据分析

使用 DPS 7.05 软件对数据进行单因素方差分析,采用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

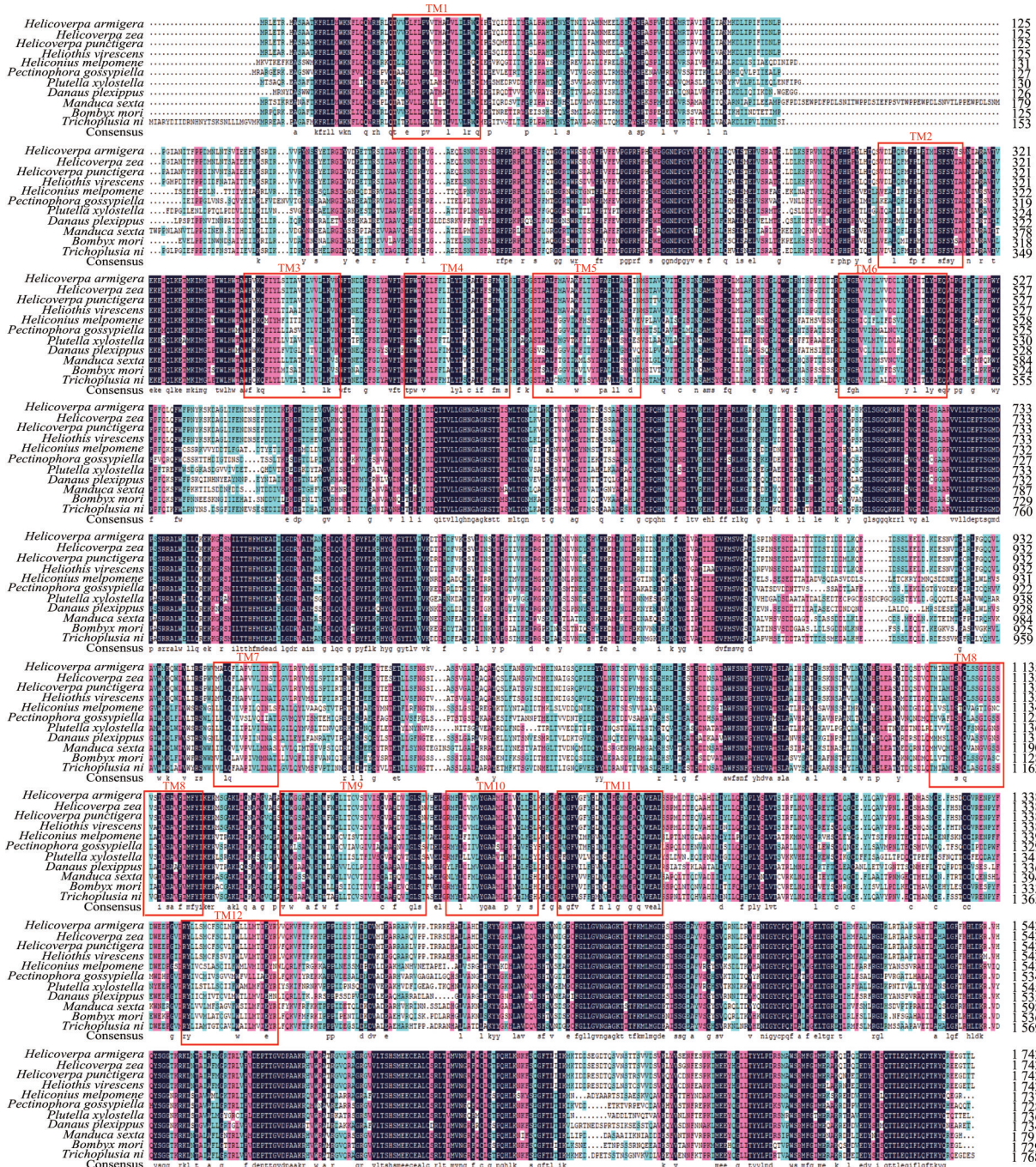
2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *ABCA2* 的鉴定及系统发育分析

从美洲棉铃虫 *ABCA2* 基因组序列(GenBank 登录号 KZ118207.1)中剪接出的 cDNA 基因序列全长为 5 229 bp,经 DNAMAN 比对发现棉铃虫 *ABCA2* 氨基酸序列(GenBank 登录号 ALF46272.1)与美洲棉铃虫 *ABCA2* 氨基酸序列(GenBank 登录号 KZ118207.1)的一致性最高,为 92.86%,与细点铃夜蛾 *ABCA2* 氨

氨基酸序列(GenBank 登录号 ALF46273.1)、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 KP219765.1)、红带袖蝶 *Heliconius melpomene* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 ALE60405.1)、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 AXZ96960.1)、小菜蛾 *Plutella xylostella* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 ALE60398.1)、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* ABCA2

氨基酸序列(GenBank 登录号 EHV70360.1)、烟草天蛾 *Manduca sexta* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 XP_030022234.1)、家蚕 *Bombyx mori* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 ALE60402.1)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* ABCA2 氨基酸序列(GenBank 登录号 QBP34374.1)的一致性分别为 89.45%、87.13%、57.82%、62.03%、55.22%、57.44%、61.98%、63.12% 和 73.50%(图 1)。



黑色阴影: 100% 一致性; 粉色阴影: 75% 一致性; 蓝色阴影: 50% 一致性; TM1~TM12: 跨膜区 1~12。Black shadow: 100% identity; pink shadow; 75% identity; blue shadow: 50% identity; TM1~TM12: transmembrane domain 1~12.

图1 棉铃虫与其他昆虫的 ABCA2 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of ABCA2s from *Helicoverpa armigera* and other insects

使用在线分析软件对棉铃虫 ABCA2 蛋白进行跨膜和拓扑结构分析,共发现 2 个跨膜结构域,包括了 12 次跨膜(TM1~TM12)(图 1)。选取上述 11 个物种的 ABCA2 序列用于构建系统发育树,发现棉铃虫 ABCA2 与美洲棉铃虫 ABCA2 聚为一支,置信度为 100;然后与澳大利亚棉铃虫 ABCA2 聚为一支,最后与烟芽夜蛾 ABCA2 聚为一大分支(图 2)。

2.2 棉铃虫 ABCA2 与 Cry2Ab 的相互作用

酵母双杂交系统检测结果显示, pBT3-N-Cry2Ab 和 pPR3-N-ABCA2 在 SD/-LT/X、SD/-LTH/X、SD/-LTHA/X 和 SD/-LTHA/X/3-AT 平板上的 β -半乳糖苷酶检测结果均为蓝色(图 3),表明 Cry2Ab 和棉铃虫 ABCA2 可以相互作用。

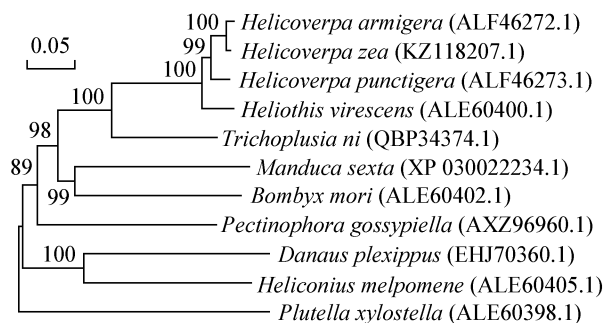
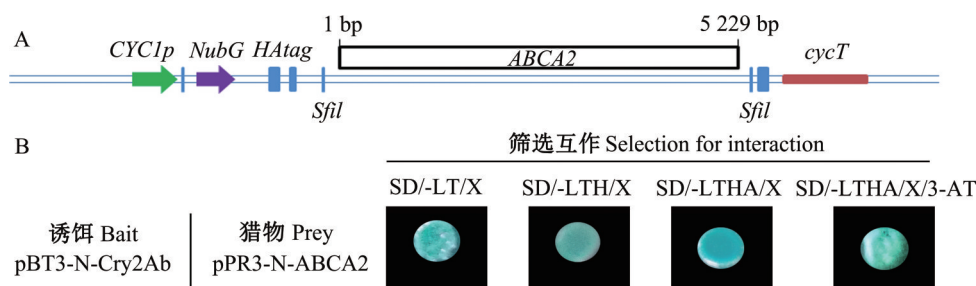


图 2 基于 ABCA2 氨基酸序列采用邻接法构建的棉铃虫及其他昆虫的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ABCA2s from *Helicoverpa armigera* and other insects based on amino acid sequences with neighbor-joining method



A: 棉铃虫 ABCA2 猎物质粒构建; B: 棉铃虫 ABCA2 与 Cry2Ab 在 NMY51 酵母细胞中的互作。A: Diagrammatic representation of the cry2Ab bait constructs; B: interaction of NMY51 yeast cells co-transformed with ABCA2 and Cry2Ab.

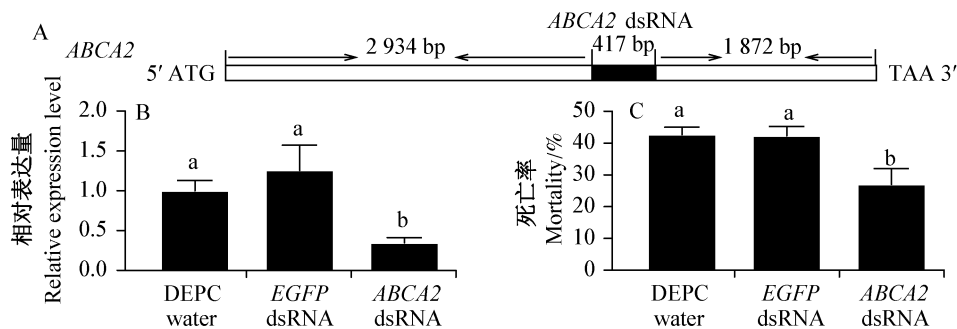
图 3 基于酵母双杂交系统的棉铃虫 ABCA2 与 Cry2Ab 的相互作用

Fig. 3 Interactions between ABCA2 of *Helicoverpa armigera* and Cry2Ab based on yeast two-hybrid system

2.3 干涉 ABCA2 后 Cry2Ab 对中肠细胞毒性的变化

选取棉铃虫 ABCA2 基因片段(2 935~3 352 bp 和 417 bp)合成 dsRNA(图 4-A),该片段与美洲棉铃虫 ABCA2 的序列基本一致,分别检测转染 ABCA2 dsRNA、EGFP dsRNA 和 DEPC 水后 ABCA2 基因的 mRNA 水平,结果表明转染 ABCA2 dsRNA 后美洲棉铃虫中肠细胞 ABCA2 表达量显著降低(图 4-B)。

ABCA2 在 mRNA 水平低表达后,用 20 μ g/mL Cry2Ab 处理美洲棉铃虫中肠细胞,与 EGFP dsRNA 和 DEPC 水对照相比,ABCA2 dsRNA 使美洲棉铃虫中肠细胞的死亡率显著降低了 15.04% 和 15.17% (图 4-C)。表明干涉 ABCA2 表达可以诱导美洲棉铃虫中肠细胞对 Cry2Ab 的抗性。



A: 棉铃虫 ABCA2 干涉片段示意图; B: ABCA2 在中肠细胞中的干涉效果; C: Cry2Ab 对中肠细胞死亡率的影响。A: Schematic diagram of ABCA2 interference segment; B: RNAi efficiency of ABCA2 in midgut cells; C: cell mortalities caused by activated Cry2Ab.

图 4 干涉 ABCA2 后 Cry2Ab 对美洲棉铃虫中肠细胞毒性的变化

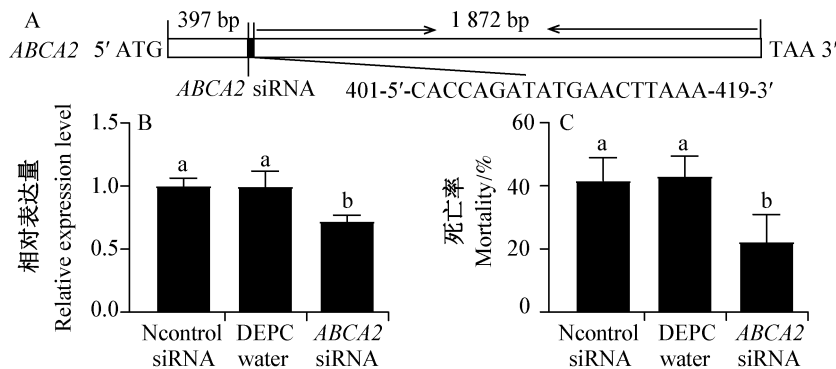
Fig. 4 Impact of knocking down ABCA2 on the cytotoxicity of Cry2Ab to midgut cells of *Helicoverpa zea*

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。柱上不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.4 干涉 ABCA2 后 Cry2Ab 对棉铃虫毒性的变化

用 ABCA2 siRNA 饲喂棉铃虫幼虫干涉其 ABCA2 表达后,与饲喂含 DEPC 水或阴性对照 siRNA 的幼虫相比,ABCA2 siRNA 处理组棉铃虫幼虫 ABCA2 的转录水平显著降低(图 5-A~B)。

ABCA2 在 mRNA 水平低表达后,用 100 $\mu\text{g/mL}$ Cry2Ab 原毒素饲喂棉铃虫幼虫,与 DEPC 水或阴性对照 siRNA 对照相比,经 ABCA2 siRNA 处理的棉铃虫幼虫死亡率显著降低,表明干涉 ABCA2 表达后棉铃虫幼虫对 Cry2Ab 的敏感性显著降低(图 5-C)。



A: ABCA2 干涉片段示意图; B: ABCA2 在棉铃虫中的干涉效果; C: Cry2Ab 对棉铃虫死亡率的影响。A: Schematic diagram of ABCA2 interference segment; B: RNAi efficiency of ABCA2 in *H. armigera*; C: *H. armigera* mortalities caused by Cry2Ab.

图 5 沉默 ABCA2 后 Cry2Ab 对棉铃虫幼虫毒性的变化

Fig. 5 Impact of knocking down ABCA2 on toxicity of Cry2Ab to larvae of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。柱上不同字母表示经 LSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by LSD test.

3 讨论

ABC 转运蛋白是多次跨膜蛋白,很难用传统的 Ligand blot 技术验证昆虫中肠受体蛋白与 Bt 蛋白的结合。这可能是因为提取跨膜蛋白时导致其结构发生变化,使得 ABCA2 和 Bt 毒素的相互作用难以被识别。与其他结合方法相比,酵母双杂交系统可以快速识别和检测自然状态下溶解蛋白或膜蛋白之间的相互作用 (Stagljar et al., 1998; Stagljär & Fields, 2002; Reinders et al., 2002)。本课题组前期利用酵母双杂交系统证实了 Cry1Ac 和 ABCC2 的相互作用(未发表数据),与已有研究结果一致 (Tanaka et al., 2013; 2017; Bre-tschneder et al., 2016)。此外,棉铃虫钙调磷酸酶 (calcineurin, CAN) 是一种蛋白磷酸酶,通过影响棉铃虫的发育参与其免疫缺陷 (innate immune deficiency, IMD) 途径 (Wei et al., 2019a)。然而,并没有直接证据证明棉铃虫 CAN 是 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的受体,Wei et al. (2021a, b) 利用酵母双杂交系统证实了 Cry1Ac 和 Cry2Ab 与棉铃虫 CAN 之间没有相互作用。综上所述,酵母双杂交系统可用于鉴定 Bt 毒素与受体之间的相互作用。ABCA2 参与了 Cry2Ab 的抗性 (Tay et al., 2015; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019),但没有直接证据证明 ABCA2 可以与 Bt 毒素结合。本研究利用酵母双杂系统验证了棉铃虫 ABCA2 与 Bt 蛋白 Cry2Ab 毒素的结合特性。这是国际上首次提

供了棉铃虫 ABCA2 能够与 Cry2Ab 结合的直接证据。

RNAi 技术 (dsRNA 或 siRNA) 常被用来降低昆虫靶标受体的表达以验证受体功能。但是,鳞翅目昆虫中肠内的相关核酸酶能通过降解 dsRNA 来抑制 RNAi 的效果 (Guan et al., 2018; Cooper et al., 2020; Giesbrecht et al., 2020)。本研究分别采用了基于 dsRNA 或 siRNA 的体外和体内干涉相结合的试验来验证 ABCA2 在 Cry2Ab 毒理中的功能。首先,在中肠细胞系进行 dsRNA 干涉试验,这可以避免核酸酶对 dsRNA 的降解,进而对受体进行成功干涉,评价受体的功能。其次,在活体棉铃虫中,本研究采用合成的 siRNA 进行干涉试验,这种 siRNA 经过 2OMe+5Chol 的化学修饰增加了其稳定性,并将脱靶效应降至最低 (Jackson & Linsley, 2010)。这种 siRNA 在鳞翅目昆虫中能够成功实现干涉 (Mao et al., 2019; Li et al., 2019; Wei et al., 2019b)。

本研究用到了美洲棉铃虫中肠细胞系,美洲棉铃虫和棉铃虫属于姐妹种,基因序列同源性很高。通过 BLASTN 对棉铃虫受体基因 *cadherin*、*ALP*、*APN1* 和 *ABCC2* 的全长 cDNA 进行序列比对,发现棉铃虫与美洲棉铃虫的相关序列具有高达 94% 的相似性 (Zhang, 2014)。本研究基于 ABCA2 系列构建的系统发育树和氨基酸序列比对结果也表明来源于棉铃虫和美洲棉铃虫的 ABCA2 序列相似性极高

(>92%)。因此本研究分别用棉铃虫 *ABCA2* 的 dsRNA 在美洲棉铃虫中肠细胞系中对 *ABCA2* 的功能进行了验证,在中肠细胞中干扰 *ABCA2* 后,美洲棉铃虫中肠细胞中 *ABCA2* 的表达显著降低, Cry2Ab 对美洲棉铃虫中肠细胞的毒力也降低。Wei et al. (2021a,b) 研究结果也显示,在美洲棉铃虫中肠细胞系中采用 dsRNA 的 RNAi 技术可以降低棉铃虫 *CAN* 基因的表达并影响 Bt 的毒力。

本试验采用基于 siRNA 的 RNAi 方法通过干扰 *ABCA2* 基因在棉铃虫幼虫中的表达来检测其功能,结果表明 siRNA 可显著降低 *ABCA2* 的表达,并降低 Cry2Ab 对幼虫的毒力,通过体外和体内降低 *ABCA2* 的表达可导致中肠细胞和幼虫对 Cry2Ab 毒素的敏感性降低,这与 Wang et al. (2017) 通过 CRISPR/Cas9 系统使 *ABCA2* 突变而引起棉铃虫对 Cry2Ab 产生高水平抗性(抗性倍数约 100 倍)的结果一致。因此,体外和体内功能缺失以及 CRISPR/Cas9 基因组编辑试验的结果都表明 *ABCA2* 是棉铃虫 Cry2Ab 的主要功能受体(Wang et al., 2017)。

参 考 文 献 (References)

- Bretschneider A, Heckel DG, Pauchet Y. 2016. Three toxins, two receptors, one mechanism: mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 109–117
- Caccia S, Hernández-Rodríguez CS, Mahon RJ, Downes S, James W, Bautsoens N, van Rie J, Ferré J. 2010. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 5(4): e9975
- Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE. 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology*, 33(2): 161–168
- Chen L, Wei JZ, Liu C, Zhang WN, Wang BJ, Niu LL, Liang GM. 2018. Specific binding protein ABCC₁ is associated with Cry2Ab toxicity in *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Physiology*, 9: 745
- Cooper AMW, Song HF, Shi XK, Yu ZT, Lorenzen M, Silver K, Zhang JZ, Zhu KY. 2020. Molecular characterizations of double-stranded RNA degrading nuclease genes from *Ostrinia nubilalis*. *Insects*, 11(10): 652
- Du MF, Liu XG, Ma NN, Liu XM, Wei JZ, Yin XM, Zhou ST, Rafaeli A, Song QS, An SH. 2017. Calcineurin-mediated dephosphorylation of acetyl-coA carboxylase is required for pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN)-induced sex pheromone biosynthesis in *Helicoverpa armigera*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(12): 2138–2152
- Du MF, Zhang SD, Zhu B, Yin XM, An SH. 2012. Identification of a diacylglycerol acyltransferase 2 gene involved in pheromone biosynthesis activating neuropeptide stimulated pheromone production in *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 58(5): 699–703
- El-Menofy W, Osman G, Assaeedi A, Salama M. 2014. A novel recombinant baculovirus overexpressing a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin enhances insecticidal activity. *Biological Procedures Online*, 16: 7
- Fabrick JA, Ponnuraj J, Singh A, Tanwar RK, Unnithan GC, Yelich AJ, Li XC, Carrière Y, Tabashnik BE. 2014. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. *PLoS ONE*, 9(5): e97900
- Giesbrecht D, Heschuk D, Wiens I, Boguski D, LaChance P, Whyard S. 2020. RNA interference is enhanced by knockdown of double-stranded RNases in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insects*, 11(6): 327
- Goodman CL, Wang AA, Nabli H, McIntosh AH, Wittmeyer JL, Grase-la JJ. 2004. Development and partial characterization of heliothine cell lines from embryonic and differentiated tissues. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Animal*, 40(3/4): 89–94
- Gouffon C, Van Vliet A, van Rie J, Jansens S, Jurat-Fuentes JL. 2011. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10): 3182–3188
- Guan RB, Li HC, Fan YJ, Hu SR, Christiaens O, Smagghe G, Miao XX. 2018. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*, 293(16): 6011–6021
- Guo ZJ, Kang S, Sun D, Gong LJ, Zhou JL, Qin JY, Guo L, Zhu LH, Bai Y, Ye F, et al. 2020. MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host. *Nature Communications*, 11: 3003
- Hernández-Rodríguez CS, van Vliet A, Bautsoens N, van Rie J, Ferré J. 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24): 7654–7659
- Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, Fleischer SJ, Abrahamson M, Hamilton KL, Steffey KL, Gray ME, et al. 2010. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. *Science*, 330(6001): 222–225
- ISAAA. 2021. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019: biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the New Frontier. ISAAA Brief No. 55. Ithaca, NY: ISAAA
- Jackson AL, Linsley PS. 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(1): 57–67
- Jin L, Zhang HN, Lu YH, Yang YH, Wu KM, Tabashnik BE, Wu YD. 2015. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. *Nature Biotechnology*, 33(2): 169–174
- Li SY, Hussain F, Unnithan GC, Dong SL, UlAbdin Z, Gu SH, Mathew LG, Fabrick JA, Ni XZ, Carrière Y, et al. 2019. A long non-coding RNA regulates cadherin transcription and susceptibility to Bt

- toxin Cry1Ac in pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 158: 54–60
- Liu LP, Gao MJ, Yang S, Liu SY, Wu YD, Carrière Y, Yang YH. 2017. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab and survival on single-toxin and pyramided cotton in cotton bollworm from China. *Evolutionary Applications*, 10(2): 170–179
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N. 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362–365
- Mao SS, Huang T, Chen YY, Shen LX, Zhou SS, Zhang SS, Yu B. 2019. Circ-Spindr enhances axon regeneration after peripheral nerve injury. *Cell Death & Disease*, 10(11): 787
- Pan ZZ, Xu L, Liu B, Zhang J, Chen Z, Chen QX, Zhu YJ. 2017. PxA-PN₅ serves as a functional receptor of Cry2Ab in *Plutella xylostella* (L.) and its binding domain analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105: 516–521
- Reinders A, Schulze W, Kühn C, Barker L, Schulz A, Ward JM, Frommer WB. 2002. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell*, 14(7): 1567–1577
- Stagljär I, Fields S. 2002. Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(11): 559–563
- Stagljär I, Korostensky C, Johnsson N, Heesen TS. 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9): 5187–5192
- Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6): 510–521
- Tabashnik BE, Carrière Y. 2017. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology*, 35(10): 926–935
- Tabashnik BE, Carrière Y. 2019. Global patterns of resistance to Bt crops highlighting pink bollworm in the United States, China, and India. *Journal of Economic Entomology*, 112(6): 2513–2523
- Tabashnik BE, Sisterson MS, Ellsworth PC, Dennehy TJ, Antilla L, Liesner L, Whitlow M, Staten RT, Fabrick JA, Unnithan GC, et al. 2010. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nature Biotechnology*, 28(12): 1304–1307
- Tanaka S, Endo H, Adegawa S, Iizuka A, Imamura K, Kikuta S, Sato R. 2017. *Bombyx mori* ABC transporter C2 structures responsible for the receptor function of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 91: 44–54
- Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, Jurat-Fuentes JL, Yoshizawa Y, Endo H, Sato R. 2013. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, 280(8): 1782–1794
- Tay WT, Mahon RJ, Heckel DG, Walsh TK, Downes S, James WJ, Lee SF, Reineke A, Williams AK, Gordon KHJ. 2015. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. *PLoS Genetics*, 11(11): e1005534
- Wang J, Wang HD, Liu SY, Liu LP, Tay WT, Walsh TK, Yang YH, Wu YD. 2017. CRISPR/Cas9 mediated genome editing of *Helicoverpa armigera* with mutations of an ABC transporter gene *HaABCA2* confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 147–153
- Wang J, Zhang HN, Wang HD, Zhao S, Zuo YY, Yang YH, Wu YD. 2016. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 11–17
- Wei JZ, Guo YY, Liang GM, Wu KM, Zhang J, Tabashnik BE, Li XC. 2015. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Scientific Reports*, 5: 07714
- Wei JZ, Li LH, Yao SY, Yang S, Zhou S, Liu XG, Du MF, An SH. 2019a. Calcineurin-modulated antimicrobial peptide expression is required for the development of *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1312
- Wei JZ, Liang GM, Wu KM, Gu SH, Guo YY, Ni XZ, Li XC. 2018. Cytotoxicity and binding profiles of activated Cry1Ac and Cry2Ab to three insect cell lines. *Insect Science*, 25(4): 655–666
- Wei JZ, Yang S, Zhou S, Liu SK, Cao P, Liu XG, Du MF, An SH. 2021a. Suppressing calcineurin activity increases the toxicity of Cry2Ab to *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 77(4): 2142–2150
- Wei JZ, Yao X, Yang S, Liu SK, Zhou S, Cen JJ, Liu XG, Du MF, Tang QB, An SH. 2021b. Suppression of calcineurin enhances the toxicity of Cry1Ac to *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Microbiology*, 12: 634619
- Wei JZ, Zhang M, Liang GM, Li XC. 2019b. Alkaline phosphatase 2 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Insect Molecular Biology*, 28(3): 372–379
- Wei JZ, Zhang M, Liang GM, Wu KM, Guo YY, Ni XZ, Li XC. 2016. APN₁ is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Scientific Reports*, 6: 19179
- Welch KL, Unnithan GC, Degain BA, Wei JZ, Zhang J, Li XC, Tabashnik BE, Carrière Y. 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 149–156
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678
- Yang XW, Chen WB, Song XZ, Ma XL, Cotto-Rivera RO, Kain W, Chu H, Chen YR, Fei ZJ, Wang P. 2019. Mutation of ABC transporter ABCA2 confers resistance to Bt toxin Cry2Ab in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 112: 103209
- Zhang HN, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu CH, Yang YH, Wu SW, Wu KM, Cui JJ, et al. 2012. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26): 10275–10280
- Zhang M. 2014. Mechanisms of field-evolved Cry1Ac resistance in *Helicoverpa zea*. Ph. D thesis. Tucson: University of Arizona

(责任编辑:李美娟)