

# 棉铃虫 ATP 合酶亚基 $\alpha$ 对 Cry2Ab 毒理的影响

姚雪<sup>1</sup> 马冽扬<sup>2</sup> 张博<sup>1</sup> 常彦鹏<sup>1</sup> 李瑞敬<sup>1</sup> 王明月<sup>1</sup>  
赵文丽<sup>1</sup> 魏纪珍<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 河南省农业科技发展中心, 郑州 450000)

**摘要:** 为探究棉铃虫 *Helicoverpa armigera* ATP 合酶亚基  $\alpha$  (ATP synthase subunit  $\alpha$ , ATPs- $\alpha$ ) 对 Cry2Ab 毒理的影响, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 ATPs- $\alpha$  基因在棉铃虫幼虫不同发育阶段、不同组织及受 Cry2Ab 诱导后的表达量, 并通过在昆虫细胞中过表达和干扰 ATPs- $\alpha$  基因验证其在 Cry2Ab 毒理中的功能。结果显示: ATPs- $\alpha$  基因在棉铃虫各发育阶段和组织中普遍表达, 其中在幼虫的 1 龄和 2 龄期, 以及 5 龄的中肠、头部和表皮中表达较高。棉铃虫取食 Cry2Ab 6 h 后, ATPs- $\alpha$  基因表达量开始显著降低, 一直持续到 36 h; 在 Sf9 细胞系中成功表达 ATPs- $\alpha$  蛋白后, 显著增强了 Cry2Ab 的细胞毒力; 在美洲棉铃虫 *H. zea* 的中肠细胞中干扰 ATPs- $\alpha$  基因后, 显著降低了 Cry2Ab 的细胞毒力。表明棉铃虫 ATPs- $\alpha$  参与 Cry2Ab 的毒理过程。

**关键词:** 棉铃虫; ATP 合酶亚基  $\alpha$ ; Cry2Ab; 细胞毒力

## The effects of ATP synthase subunit $\alpha$ on the toxicity of Cry2Ab to cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Yao Xue<sup>1</sup> Ma Lieyang<sup>2</sup> Zhang Bo<sup>1</sup> Chang Yanpeng<sup>1</sup> Li Ruijing<sup>1</sup> Wang Mingyue<sup>1</sup>  
Zhao Wenli<sup>1</sup> Wei Jizhen<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. Henan Development Center of Agricultural Science and Technology, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

**Abstract:** To explore the role of ATP synthase subunit  $\alpha$  (ATPs- $\alpha$ ) of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in the toxicity of Cry2Ab, the expression levels of ATPs- $\alpha$  in different developmental stages and different tissues of larvae were analyzed by real-time quantitative PCR. Its expression level was determined in larvae fed with Cry2Ab. The functions of ATPs- $\alpha$  in the toxicity of Cry2Ab were analyzed by overexpression and knockdown of ATPs- $\alpha$  in Sf9 cells and in midgut cells, respectively. The results showed that ATPs- $\alpha$  expressed in all growth stages and tissues, though higher expression was detected in the first- and second-instar larvae, and in the midgut, head and epidermis of the fifth-instar larvae. The expression level of ATPs- $\alpha$  was significantly reduced in larvae fed with Cry2Ab from 6 h until 36 h. Overexpression of ATPs- $\alpha$  in Sf9 cells increased Cry2Ab cytotoxicity. Knockdown of ATPs- $\alpha$  by RNAi in MG cells decreased the toxicity of Cry2Ab. These results suggested that *H. armigera* ATPs- $\alpha$  might be involved in the toxicity of Cry2Ab.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; ATP synthase subunit  $\alpha$ ; Cry2Ab protein; cytotoxicity

基金项目: 国家自然科学基金(31802016), 河南省农业领域科技攻关项目(212102110137), 河南农业大学自然科学类青年创新基金(KJCX2018A14), 河南省现代农业产业技术体系(S2014-11-G06), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-27)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: weijizhen1986@163.com

收稿日期: 2021-07-15

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性菌,它能够产生具有杀虫活性伴孢晶体(Li et al., 1991; Raymond et al., 2010; El-Menofy et al., 2014),通过转基因技术将Bt蛋白转入作物中可以对害虫起到很好的防治效果(Wu et al., 2008)。自1996年美国开始种植转基因作物,经过20多年的发展,转基因Bt作物得到了广泛开发和商业化种植,为农业害虫的防治做出了巨大贡献(ISAAA, 2021)。但昆虫抗性的快速进化严重威胁Bt作物的长期应用,目前转多价基因策略是害虫抗性治理的有效方法(Rubio-Infante et al., 2018)。2003年,孟山都公司将Cry1Ac和Cry2Ab两种蛋白转入棉花中,该双价棉花已经在很多国家商业化种植(Ferré et al., 2008)。Cry2Ab作为Bt棉花中的一种重要杀虫蛋白,目前对其分子特性及机制的研究尚不完善。

近些年来,通过毒蛋白与受体结合试验、功能验证,以及抗性遗传方式的研究也发现了一些Cry2Ab功能受体,例如ABC转运蛋白(ABC sub-family C member 1, ABCC1)(Chen et al., 2018)和氨肽酶N5(aminopeptidase N5, APN5)(Pan et al., 2017)。最重要的是,通过抗性突变遗传连锁以及基因编辑等证实ABC转运蛋白ABCA2是Cry2Ab重要的靶标受体(Tay et al., 2015; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019)。但是目前的研究还不足以揭示Cry2Ab的作用模型。Cry2Ab如何与受体互作导致昆虫死亡,仍需要进一步研究。

研究表明,与ATP合成、水解和利用相关的蛋白参与Bt蛋白对昆虫的毒理过程。棉铃虫*Helicoverpa armigera*幼虫取食Cry1Ac后,ATP酶的转录会降低(钟丰等, 2016)。Bayyareddy et al.(2009)蛋白质组学研究表明埃及伊蚊*Aedes aegypti*的ATP合酶(ATP synthase, ATPs)可以与Cry4Ba毒素结合,烟蚜夜蛾*Heliothis virescens*的ATPs以及棉铃虫ATP酶可与Cry1Ac结合(Krishnamoorthy et al., 2007; Chen et al., 2010)。而甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*的ATPs亚基A和B不但可与Cry2Aa结合,而且参与Cry2Ab的杀虫毒理过程(Qiu et al., 2017)。此外,ATPs的改变可能参与了昆虫对Bt的抗性(Candas et al., 2003; Tetreau et al., 2012)。

ATPs是一种在细胞质膜、线粒体内膜和叶绿体类囊体膜中发现的ATP合成酶,主要生理功能是合成ATP。ATPs亚基 $\alpha$ (ATP synthase subunit  $\alpha$ , ATPs- $\alpha$ )属于F型ATPs(F-ATPs),3个拷贝的ATPs- $\alpha$ 和

3个拷贝的ATPs- $\beta$ 形成了F1复合体的催化中心, $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基经过一系列的构象变化,使用质子梯度来驱动促使ADP转化成ATP(Leyva et al., 2003)。Schnauffer et al.(2005)研究表明,ATPs的活性与线粒体以及细胞功能呈线性相关,在生命体中发挥着重要作用,从细菌到哺乳动物,ATPs调控ATP合成的工作机制非常保守。此外,在一些寄生虫中,ATPs也发挥着重要功能。例如在刚地弓形虫*Toxoplasma gondii*中,ATPs在线粒体中是形成能量合成复合体的重要蛋白,参与机体能量的合成(Huet et al., 2018);在布氏锥虫*Trypanosoma brucei*中,ATPs影响其生长发育速率和ATP的水解和合成(Schnauffer et al., 2005; Brown et al., 2006; Ziková et al., 2009)。在农业昆虫中,研究发现干扰东亚飞蝗*Locusta migratoria manilensis*的ATPs- $\alpha$ ,东亚飞蝗会在1.5~5 d内死亡,相应的ATP的合成和水解活性及ATP的含量也大幅减少(Hu & Xia, 2016)。

本研究拟克隆1个棉铃虫的ATPs- $\alpha$ 基因,采用实时荧光定量PCR技术分析该基因在棉铃虫幼虫中表达模式,并比较了棉铃虫幼虫取食Cry2Ab后该基因的表达量变化;通过在昆虫细胞中过表达和干扰该基因验证了其对Cry2Ab毒理的影响,以期为明确ATPs- $\alpha$ 在Cry2Ab杀虫机理中的作用提供重要线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫:棉铃虫购于河南济源白云实业,在实验室内使用人工饲料饲养,饲养条件为温度(26±1)℃、相对湿度为(60±10)%、光周期为16 L:8 D。

细胞系及细胞培养基:草地贪夜蛾*S. frugiperda*卵母细胞系(Sf9)和美洲棉铃虫*H. zea*中肠(midgut, MG)细胞系均为亚利桑那大学李显春教授馈赠,保存于(28±1)℃的培养箱中(Wei et al., 2016)。Ex-cell<sup>®</sup> 420培养基,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;Sf-900<sup>™</sup> II SFM培养基,含10%热激失活牛血清,50 U/mL青霉素和50 μg/mL链霉素,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。LB液体培养基成分为2 g NaCl,1 g酵母提取物,2 g蛋白胨、200 mL蒸馏水;在LB液体培养基的基础上加3 g琼脂粉配制LB固体培养基。

试剂与仪器:Cry2Ab原毒素和活化Cry2Ab,北京绽诺思特生物科技有限公司;RNA提取试剂盒、反转录试剂盒HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR

(+gDNA wiper)、双链试剂盒 T7 RNAi Transcription Kit、质粒 DNA 小量提取试剂盒,南京诺维赞生物科技股份有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,北京擎科生物科技股份有限公司;氨苄青霉素、台盼蓝染色液、20 $\times$ PBS 缓冲液、高效 RIPA 裂解液(含一支 PMSF)、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,北京索莱宝科技有限公司;限制性内切酶 *Sac* I 和 *Bgl* II 酶,宝日医生物技术(北京)有限公司;蛋白电泳凝胶制备试剂盒,陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司;转染试剂,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,亚科因(武汉)生物技术有限公司;His 标签的 pIEx-GFP 载体,山东大学赵小凡老师馈赠;增强绿色荧光蛋白 EGFP,其序列参考 Wei et al. (2021) 方法设计合成并由本实验室保存;其他化学试剂均为国产分析纯。NANODROP 1000 全波长微量扫描分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Tanon 4600 化学发光成像分析系统,上海天能科技有限公司;DYY-3C 电泳仪,北京六一仪器厂;SHP-250 生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司;AIR HD25 激光扫描共聚焦显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品制备和 cDNA 合成

选取龄期一致的棉铃虫,收集 1~5 龄幼虫各取 5~10 头,比较其不同发育时期 *ATPs- $\alpha$*  基因的表达量。取 5 龄棉铃虫幼虫解剖头、中肠、表皮、脂肪各组织,比较不同组织 *ATPs- $\alpha$*  基因的表达量。选取龄期一致 4 龄末期棉铃虫(头壳裂开,3~4 h 内会完成蜕皮,进入下一龄期),放入 24 孔养虫盒中饥饿 12 h,然后饲喂含有 100  $\mu$ g/mL Cry2Ab 的饲料(Wei et al., 2021),对照为含有 50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲液的饲料,分别在取食 3、6、12、24 和 36 h 解剖中肠组织,每个样品解剖 4~5 头,3 个生物学重复,比较取食 Cry2Ab 不同时间 *ATPs- $\alpha$*  基因的表达量。

利用 RNA 提取试剂盒分别提取各个处理样品的总 RNA,参照反转录试剂盒 HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)说明书合成 cDNA 模板备用。

### 1.2.2 载体构建

以棉铃虫 cDNA 为模板,利用特异性引物 *ATPs-F/R* (表 1) 对 *ATPs- $\alpha$*  基因编码区(sequence coding for aminoacids in protein, CDS) (登录号:XM\_

021337525.1) 进行扩增,本试验中所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成,50  $\mu$ L PCR 反应体系:Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 聚合酶 1  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、dNTPs 1  $\mu$ L、上下游引物各 2  $\mu$ L、2 $\times$ Phanta Max Buffer 缓冲液 25  $\mu$ L 和 ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 50 s,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,对 PCR 产物纯化并连接到克隆载体。采用热激法转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中,通过氨苄青霉素进行抗性筛选,获得的阳性重组子进行菌液 PCR 验证。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 50 s,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,将筛选获得的阳性克隆菌液在 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养,之后提取质粒并送北京擎科生物科技股份有限公司测序。利用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Bgl* II 酶切测序正确的质粒,酶切产物切胶回收纯化后插入含 His 标签的 pIEx-GFP 载体,连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中,筛选阳性克隆提取 *ATPs- $\alpha$* -pIEx-GFP 质粒 DNA 并送北京擎科生物科技股份有限公司测序,进一步确定基因连接正确。

### 1.2.3 荧光定量 RT-PCR 反应

用特异性引物 *ATPs-qF/qR* (表 1) 对不同龄期幼虫、不同组织和处理后组织的 *ATPs- $\alpha$*  基因表达量检测,以 *EF-1 $\alpha$*  (U20129.1) 和  *$\beta$ -actin* (HM629442.1) 为内参基因设计内参引物  *$\beta$ -actin-F/R* 和 *EF-1 $\alpha$ -F/R* (表 1)。20  $\mu$ L PCR 反应体系包括 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 预混物 10  $\mu$ L、正反向引物各 0.4  $\mu$ L、模板 cDNA 1  $\mu$ L、双蒸水 8.2  $\mu$ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,56 $^{\circ}$ C 退火 15 s,68 $^{\circ}$ C 退火 20 s,38 个循环。每个样品设 3 个生物学重复,每个重复设计 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  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法分析试验结果(Liu et al., 2015)。

### 1.2.4 *ATPs- $\alpha$* 基因序列比对

登陆 NCBI 使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 检索昆虫的 *ATPs- $\alpha$*  核苷酸序列。利用 BioEdit 软件从美洲棉铃虫 *ATPs- $\alpha$*  基因组序列(NFMG01023594.1) 中剪接出 cDNA 基因全长,利用 DNAClub 对棉铃虫与美洲棉铃虫的 *ATPs- $\alpha$*  序列比对进行分析。



表1 本研究所用的引物信息  
Table 1 List of primers in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'→3')	扩增长度 Size of amplicon/ bp	扩增效率 Amplifica- tion effi- ciency/%	作用 Application
ATPs-qF	CATCATCTACTGTGGTGTCC	189	97	荧光定量 PCR
ATPs-qR	GCCAAGAAGTCTGATACGAT			
$\beta$ -actin-F	CCTGGTATTGCTGACCGTATGC	144	100	RT-PCR
$\beta$ -actin-R	CTGTTGGAAGGTGGAGAGGGAA			
EF-1 $\alpha$ -F	GCCTGGTACCATTGTCGTCT	154	98	
EF-1 $\alpha$ -R	GTAACCACGACGCAACTCCT			
ATPs-F	<u>GAGCTC</u> ATGTCTCTCATCTCCGCCCGT	1 677	/	载体构建 Vector construction
ATPs-R	<u>AGATCT</u> GCGCGAGGCAGCCTGGGT			
ATPs-T7-F	GCGTAATACGACTCACTATAGGGGATCGTGAAGAGGTTGACTG	484	/	双链RNA 合成
ATPs-T7-R	GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATCTACACGGGATACAG			
EGFP-T7-F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTGCACCAC	538		dsRNA syn- thesis
EGFP-T7-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGATC			

下划线的序列为酶切位点。The underlined sequences are the restriction sites.

### 1.2.5 dsRNA的合成

首先合成含有T7聚合酶位点的ATPs- $\alpha$  dsRNA和对照组增强绿色荧光蛋白EGFP dsRNA的特异性引物ATPs-T7-F/R和EGFP-T7-F/R(表1)。以构建好的ATPs- $\alpha$ -pIEx-GFP质粒和增强绿色荧光蛋白EGFP质粒为模板,使用含有T7聚合酶位点的基因特异性引物进行PCR,扩增合双链的模板ATPs- $\alpha$ (484 bp)和EGFP(538 bp),扩增体系同1.2.1,扩增程序:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,38个循环。并对PCR产物进行酚氯仿抽提后电泳检测,以确保扩增出单一的目的条带后进行后续试验。根据双链试剂盒T7 RNAi Transcription Kit说明书合成ATPs- $\alpha$ 和EGFP的dsRNA,溶解于DEPC水中,并用分光光度计分别测定相应浓度。

### 1.2.6 细胞转染和毒理测定

Sf9细胞系和MG细胞系分别使用Sf-900™ II SFM培养基和Ex-cell® 420培养基进行培养。将Sf9和MG细胞平铺在12孔板上,浓度均为 $9 \times 10^5$ 个/孔,过夜培养使细胞充分贴壁。用不含血清和抗生素的细胞培养基清洗细胞1~2次后,每孔加入800  $\mu$ L不含血清和抗生素的细胞培养基备用,分别将8  $\mu$ L转染试剂、2  $\mu$ g质粒或50 nmol/L的dsRNA用不含血清和抗生素的细胞培养基补足体系至100  $\mu$ L,混合均匀后,将混合液滴加到细胞中,在(28 $\pm$ 1)℃培养箱培养孵育5 h,更换细胞培养基,每孔加入1.5 mL含抗

生素和血清的细胞培养基。培养24 h后在激光共聚焦下观察转入pIEx-GFP和ATPs- $\alpha$ -pIEx-GFP细胞并拍照。转染64 h后收集细胞并使用细胞计数板计数,使用96孔细胞板每孔接种100  $\mu$ L(含 $1 \times 10^4$ 个细胞),置于28℃生化培养箱中贴壁生长2 h;在倒置显微镜200倍视野下,每孔选择2个视野,记录Cry2Ab毒素处理前的存活细胞数量。使用移液枪从一侧轻轻抽出每孔中细胞培养基,加入100  $\mu$ L含有已活化的30  $\mu$ g/mL Cry2Ab毒素且不含血清和抗生素的细胞培养基,置于28℃培养箱中处理5 h;从一侧轻轻抽出30  $\mu$ L细胞培养基后加入7  $\mu$ L台盼蓝染液进行染色,在倒置显微镜200倍视野下统计每孔2个视野中的未被染成蓝色细胞的个数,记录Cry2Ab毒素处理后的存活细胞数量。收集剩余细胞用于后续RNA提取和蛋白的检测。每次独立重复转染3次,每次毒理测定重复3次。死亡率采用Abbott公式,死亡率=(处理前的细胞数目-处理后的细胞数目)/处理前的细胞数目 $\times 100\%$ (Abbott, 1925)。

### 1.2.7 ATPs- $\alpha$ 蛋白的提取和Western-blot鉴定

将转染后的细胞收集到离心管中,1 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入1 mL 1 $\times$ PBS缓冲液清洗细胞,重复2次,离心弃上清,加入高效RIPA裂解液100  $\mu$ L,终浓度为1 mmol/L PMSF 1  $\mu$ L、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液25  $\mu$ L并混匀,煮沸5 min,-20℃保存备用。

根据蛋白电泳凝胶制备试剂盒说明书配制SDS-Page胶,并进行凝胶电泳检测目的蛋白的表达。将

目的蛋白转到硝酸纤维素膜上;用5%脱脂奶粉室温封闭1 h;加入1:2 000稀释的His标签小鼠单克隆抗体(一抗),室温孵育1 h;1×PBS缓冲液洗5次,加入1:10 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体(二抗),室温孵育1 h;1×PBS缓冲液洗5次,在化学发光成像分析系统仪器中拍照。

### 1.3 数据分析

试验数据使用Excel 2019和DPS 7.05软件进行统计分析,不同处理间的比较采用单因素方差分析,

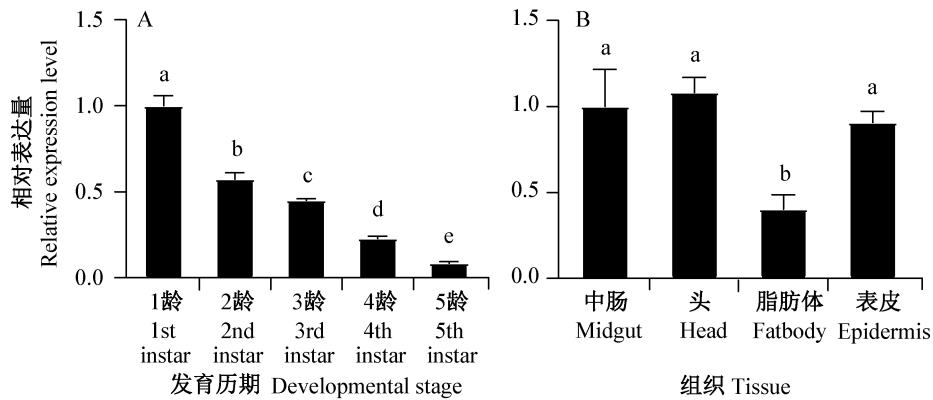


图1 在棉铃虫不同发育历期(A)及幼虫不同组织(B)中 $ATPs-\alpha$ 的表达量

Fig. 1 The expression level of *ATPs-α* in different developmental stages (A) and tissues (B) of *Helicoverpa amigera* 图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Tukey法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Tukey test.

### 2.2 取食Cry2Ab后降低 $ATPs-\alpha$ 的表达量

棉铃虫5龄幼虫取食含有亚致死剂量的Cry2Ab毒素后,中肠组织 $ATPs-\alpha$ 表达量显著降低(图2)。具体在取食Cry2Ab 3 h后,中肠组织 $ATPs-\alpha$ 表达量开始下降,在6 h后下降到显著水平( $P<0.05$ ),显著下降的趋势一致保持到36 h( $P<0.05$ )。

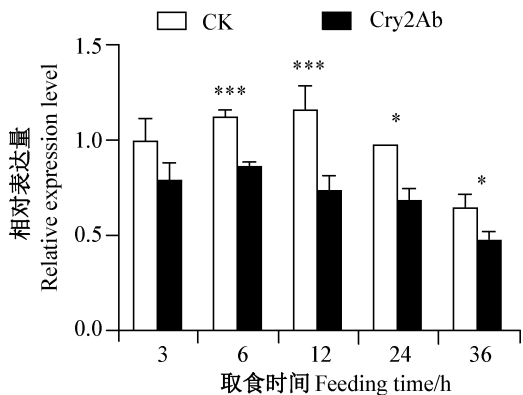


图2 棉铃虫5龄幼虫取食Cry2Ab毒素后 $ATPs-\alpha$ 的表达量

Fig. 2 The expression level of *ATPs-α* of the 5th-instar *Helicoverpa amigera* larvae fed with Cry2Ab toxin 图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*\*分别表示不同处理经 $t$ 检验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.001$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. \* and \*\*\* on the bar indicate significant difference at  $P<0.05$  and  $P<0.001$  levels by  $t$  test.

采用 $t$ 检验法或Tukey法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 $ATPs-\alpha$ 基因的时空表达谱

荧光定量PCR检测结果表明, $ATPs-\alpha$ 基因在1、2、3、4和5龄各龄期均有表达,其中1龄时表达量最高( $P<0.05$ ,图1-A);在头、中肠组织、脂肪体、表皮中也均有表达,其中在头、中肠和表皮中表达量最高( $P<0.05$ ,图1-B)。

### 2.3 表达 $ATPs-\alpha$ 蛋白增强了Cry2Ab的细胞毒力

将 $ATPs-\alpha$ -pIEx-GFP和pIEx-GFP质粒分别转染Sf9细胞。荧光显微镜下观察到绿色荧光,说明相应蛋白已成功表达于细胞中,主要在细胞中亚细胞器膜(图3-A~B)。并通过Western blot确定了 $ATPs-\alpha$ 蛋白在细胞内的表达(图3-C)。过表达后,用30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 活化的Cry2Ab处理细胞,Sf9细胞的死亡率与对照组相比提高了26.8%( $P<0.05$ ,图3-D)。结果表明,过表达 $ATPs-\alpha$ 可以增加细胞对Cry2Ab的敏感性。

### 2.4 降低 $ATPs-\alpha$ 表达减弱Cry2Ab细胞毒理

将棉铃虫 $ATPs-\alpha$ 基因的核苷酸序列与美洲棉铃虫的核苷酸进行序列比对,分析发现两者间的同源性极高,相似性达98.69%(图4)。因此,本研究选取棉铃虫 $ATPs-\alpha$ 基因片段合成dsRNA(图5-A),并在美洲棉铃虫中肠细胞系中干扰 $ATPs-\alpha$ 基因进行了功能验证。通过荧光定量PCR检测细胞分别转染 $ATPs-\alpha$  dsRNA、EGFP dsRNA和DEPC水后 $ATPs-\alpha$ 基因的转录变化,结果表明转染后中肠细胞 $ATPs-\alpha$ 表达量降低了40.58%( $P<0.05$ ,图5-B),说明 $ATPs-\alpha$ 基因被成功干扰。

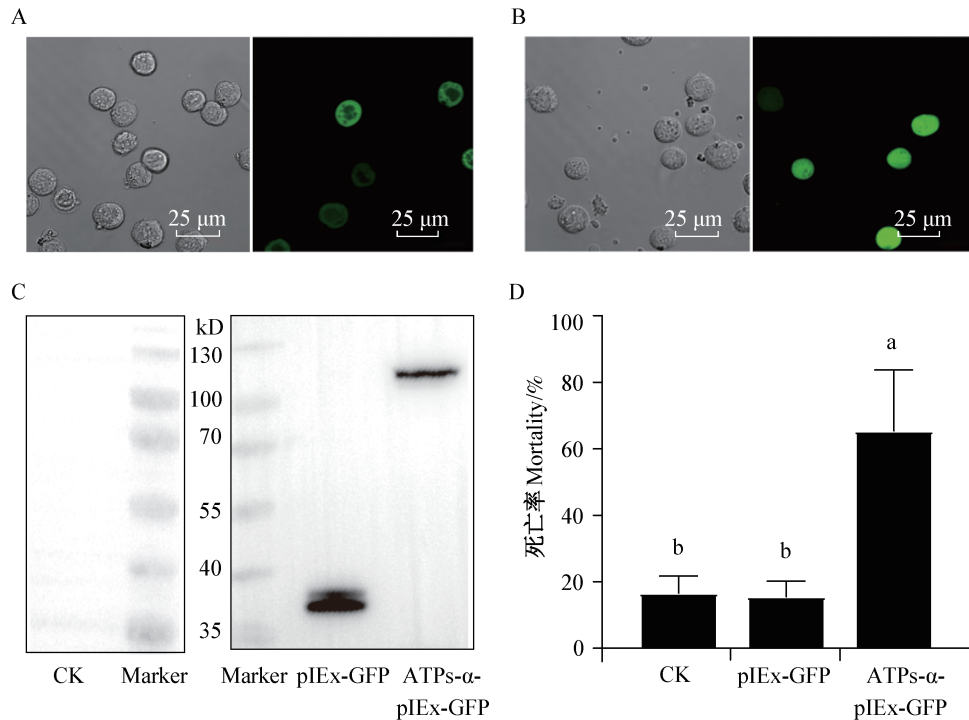


图3 表达ATPs- $\alpha$ 对Sf9细胞毒性的影响

Fig. 3 Effects of overexpression of ATPs- $\alpha$  on the cytotoxicity in Sf9 cells

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

用30  $\mu\text{g/mL}$ 活化的Cry2Ab处理ATPs- $\alpha$ 被成功干涉的中肠细胞,结果表明,ATPs- $\alpha$  dsRNA组与EGFP dsRNA和DEPC水对照组相比,细胞的死亡率分别降低了32.41%和21.98% ( $P < 0.05$ ,图5-C)。以上结果表明,干扰ATPs- $\alpha$ 表达可以使中肠细胞对Cry2Ab的耐受性增强。

### 3 讨论

ATPs- $\alpha$ 是重要的ATP合成酶的亚基之一,它在各组织和各发育阶段普遍表达,对昆虫的生长发育有着重要意义(Ziková et al., 2009; Hu & Xia, 2016; Huet et al., 2018)。比较其表达变化,发现其在1龄中表达量最高,这可能与卵刚孵化成幼虫,活动量增加,机体各种运动需能增加有关。取食Cry2Ab后,虫体ATPs- $\alpha$ 的表达量显著降低。这与钟丰等(2016)报道的V-ATP酶在棉铃虫取食Cry1Ac后转录水平降低的结果一致。分析其原因,一方面可能与适合度代价有关,昆虫在取食Cry2Ab后表现出一定的拒食现象,由于取食量减少,导致能量合成减少;此外也可能是由于Cry2Ab中毒后,活动能力减弱,昆虫可能通过降低能量生成来谋取生存。另一方面,也可能是昆虫对Cry2Ab的一种抵御调节,这类类似于Chauhan et al. (2021)报道的蓖麻夜蛾

*Achaea janata*取食亚致死剂量的Cry蛋白后,受体APN2的表达量降低。本研究在细胞水平上的功能验证,结果表明升高或降低ATPs- $\alpha$ 表达,能够分别增强或降低Cry2Ab的毒力,因此推测ATPs- $\alpha$ 可能是Cry2Ab的一个靶标受体,昆虫通过降低受体表达来减弱Bt蛋白带来的伤害。总之,本研究首次揭示了ATPs- $\alpha$ 影响Cry2Ab的毒力,其是否是Cry2Ab中发挥受体还有待进一步验证。

ATPs- $\alpha$ 主要分布在细胞质膜和线粒体内膜上(胡旭初等, 2009; Xu et al., 2015),本研究也表明棉铃虫ATPs- $\alpha$ 主要是在昆虫细胞内的细胞器膜上表达。很多研究表明ATPs可与Bt蛋白结合(Krishnamoorthy et al., 2007; Bayyareddy et al., 2009),已报道Bt受体主要也集中在昆虫中肠细胞膜上。根据本研究数据及文献报道推测在细胞内细胞器膜上的ATPs与Cry2Ab蛋白互作的方式可能有2种,一种是ATPs- $\alpha$ 与进入细胞内的Cry2Ab蛋白互作,整个活化的Cry蛋白或者它们的主要蛋白结构域都可以透过细胞膜进入细胞(Tomimoto et al., 2006; Nair & Dean, 2008),进入细胞内的Bt蛋白可以与ATPs- $\alpha$ 结合,进而扰乱ATPs- $\alpha$ 的正常活性,干扰能量的合成,导致昆虫死亡;另一种是ATPs- $\alpha$ 与插入膜上的Bt蛋白结构互作,Gazit et al. (1998)报道Cry蛋白环



状结构中,  $\alpha 4$  和  $\alpha 5$  可以与膜内表的小叶互作, 而活化后的 Cry2A 类蛋白仍具有  $\alpha 4$  结构域 (Ohsawa et al., 2012), 这些插入膜上的结构可以与锚定在内膜上的或细胞质内的 ATPs- $\alpha$  结合, 除了影响能量合

成, 甚至导致细胞膜的穿孔, 最终导致昆虫中毒死亡。这些推测未来可以首先通过验证 ATPs- $\alpha$  与 Cry2Ab 的结合特性来逐步验证。

H.a	ATGTCTCTCAICTCCGCCGCTATCGCCGGCTCAGTAGCCAGGCGTTTGCCTAATGCTGCTTCGCAGGTAT	70
H.z	-----	70
H.a	CGAAGGTCGCGGGTGTGCGCGCGCCCGCTGCTGTTGCTCGCGCAACTTCCACGCGACTCCCACCCA	140
H.z	-----a-----	140
H.a	GAAGGCCGCCGAAATCTCCACTATTTTGGAGGAAAGGATCCTGGTTCGCTCCCAAGGCTGATTTGGAA	210
H.z	-----	210
H.a	GAGACTGGCCGCTATTGAGCATTGGAGATGGTATCGCCCGTGTCTATGGTCTCAAGAACATCCAGGCCG	280
H.z	-----	280
H.a	AGGAGATGGTGGAAATCTCTCTGGTCTTAAGGGTATGGCCCTTAACTTGGAGCCCGACAACTCGGTGT	350
H.z	-----a-----	350
H.a	GGTAGTATTCGGTAACGACAGACACATCAAGGAGGGTGACATCGTCAAGCGTACCGCGCCATCGTGGAC	420
H.z	-----	420
H.a	GTGCCGTCGGTGAACAGCTGCTGGGTGCGTCTGGGACGCTCTGGTAATGCCATCGACGGCAAGGGCC	490
H.z	-----a-----c-----	490
H.a	CCGTCGACACCAAGAGCCGCAATGCGTGTGCGTATCAAGGCTCCCGGTATCATCCCCGTGTCTGTGCG	560
H.z	-----t-----	560
H.a	CGAGCCTATGCGACTGGTATCAAGCCGTCGACTCCCTGGTACCCATCGGTCGTTGGACAGCGTGAAGCTG	630
H.z	-----t-----	630
H.a	ATCATTGGTACCGTCAAGCCGCAAGACTGCCCTGGCCATCGACACCATCATCAACCAGCAGCGTTTCA	700
H.z	-----	700
H.a	ACAAGGGAGACGACGAGAAGAAGCTGTACTGCATCTACGTCGCCATCGGACAGAAGAGTCCACCGT	770
H.z	-----t-----	770
H.a	CGCCGATCGTGAAGAGTTGACTGATGCTGGTCCATCAACTACACCATCATCGTGTCTGCCACGGCC	840
H.z	-----	840
H.a	TCCGAGCCGCTCCCTGCGACTACCTCGCCCCCTACTCGGGCTGCGCCATGGGAGAGTTCTTCCGTGACA	910
H.z	-----	910
H.a	ACGGCAAGCACGCCCTCATCATCTACGACGACTTGTCCAAGCAGGCTGTGCGCTACCGTCAAGTGTCTCT	980
H.z	-----t-----c-----	980
H.a	GCTGCTGCGTGTGCTCCCTGGTGTGAGGCGCTACCCCGGTGATGTGTTCTACCTCCACTCTCGTCTGCTC	1 050
H.z	-----c-----	1 050
H.a	GAGCGTGCCGCTAAGATGTCCGACAAGATGGTGGTGGTTCCCTGACCGCCCTGCCCCATCGAGACCC	1 120
H.z	-----t-----	1 120
H.a	AGGCTGGTGAAGTGTCCGCTACATTCTTACCAACGATGATTTCCATCACTGACGGCCAGATCTTCTTGA	1 190
H.z	-----	1 190
H.a	GACTGAGCTGTTTACAAGGGTATCCGCCCGCCATCAACGTCGGTCTGTCTGTATCCCGTGTAGGATCT	1 260
H.z	-----c-----g-----	1 260
H.a	GCTGCCAGACCAAGGCCATGAAGCAGGTGGCCGGTTCCATGAAGCTGGAGTTGGCCAGTACCGTGAGG	1 330
H.z	-----t-----	1 330
H.a	TCGCTGCCCTCGCCAGTTCGGTTCGGACTTGGACGCGCTACCCAGCAGCTGCTGAACCGTGGTATGCG	1 400
H.z	-----t-----	1 400
H.a	TCTGACTGAGCTGCTGAAGCAGGGACAGTACGTCGCCATGGCCATTGAGGAACAGGTGCGCCATCATCTAC	1 470
H.z	-----t-----t-----	1 470
H.a	TGTGGTGTCCGTGGTCACTCGACAACTTGACCCAGCAAGATCACCGCTTTCGAGAAGGAGTTACCC	1 540
H.z	-----a-----a-----	1 540
H.a	AGCACATCAAGACCAGCCACCGGGTCTGTTGGCCACCATCGCCAAAGGACGGTCAAGTACCCCTGAGTC	1 610
H.z	-----a-----t-----c-----	1 610
H.a	TGACGCTTCACTCAAGAAGATCGTATCAGACTTCTGGCTACCTTACCCAGGCTGCTCGCGCTAA	1 677
H.z	-----	1 677

图中 H.a 和 H.z 分别为棉铃虫和美洲棉铃虫。H.a, H.z indicate *Helicoverpa armigera* and *H. zea*, respectively.

图 4 棉铃虫 ATPs- $\alpha$  基因与美洲棉铃虫的核苷酸进行序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of ATPs- $\alpha$  genes from *Helicoverpa armigera* and *H. zea*

此外, ATPs- $\alpha$  也可能不通过与 Cry2Ab 的结合来影响其毒理。近几年来, 众多报道揭示 ABC 转运蛋白是 Bt 蛋白的主要受体, 他们的突变也引起了普

遍的高水平昆虫抗药性。ABC 转运蛋白具有 2 个主要的跨膜区和 2 个主要的 ATP 结合区, 是一种重要的跨膜转运蛋白, 以主动转运方式消耗 ATP 完成转

运功能。ATPs- $\alpha$  的重要功能就是参与合成 ATP。在棉铃虫中, 两类 ABC 转运蛋白已经被证实是 Cry2Ab 的受体 (Tay et al., 2015; Chen et al., 2018;

Yang et al., 2019), 后续研究 ABC 转运蛋白中 ATP 的利用在 Cry2Ab 毒理中的作用也有利于揭示 ATPs- $\alpha$  在 Cry2Ab 毒理过程中的作用。

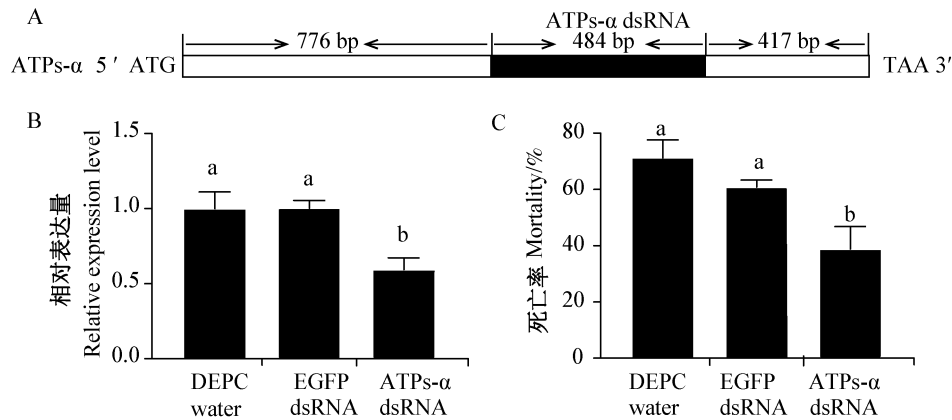


图5 干扰 ATPs- $\alpha$  对中肠细胞毒性的影响

Fig. 5 Effects of silencing ATPs- $\alpha$  on the cytotoxicity in midgut cells

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

### 参考文献 (References)

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267
- Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ. 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4): 279–286
- Brown SV, Hosking P, Li JL, Williams N. 2006. ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 5(1): 45–53
- Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla Jr. LA. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. *Molecular Cell Proteomics*, 2(1): 19–28
- Chauhan VK, Dhanika NK, Lokya V, Bhuvanachandra B, Padmasree K, Dutta-Gupta A. 2021. Midgut aminopeptidase N expression profile in castor semilooper (*Achaea janata*) during sublethal Cry toxin exposure. *Journal of Biosciences*, 46: 29
- 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
- Chen LZ, Liang GM, Zhang J, Wu KM, Guo YY, Rector BG. 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73(2): 61–73
- 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
- Ferré J, van Rie J, MacIntosh SC. 2008. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). // Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Dordrecht: Springer
- Gazit E, Rocca PL, Sansom MS, Shai Y. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21): 12289–12294
- Hu J, Xia YX. 2016. F<sub>1</sub>-ATP synthase  $\alpha$ -subunit: a potential target for RNAi-mediated pest management of *Locusta migratoria manilensis*. *Pest Management Science*, 72(7): 1433–1439
- Hu XC, Zhou HJ, Hu FY, Ma CL, Zhao JH, Huang C, Zheng XL, Xu J, Yu XB. 2009. Tissue and subcellular localization of the ATP synthase B subunit in *Clonorchis sinensis*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, 27(2): 95–101 (in Chinese) [胡旭初, 周红娟, 胡凤玉, 马长玲, 赵俊红, 黄灿, 郑小凌, 徐劲, 余新炳. 2009. 华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基的组织亚细胞定位. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 27(2): 95–101]
- Huet D, Rajendran E, van Dooren GG, Lourido S. 2018. Identification of cryptic subunits from an apicomplexan ATP synthase. *eLife*, 7: e38097
- 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. ISAAA, Ithaca, NY.
- Krishnamoorthy M, Jurat-Fuentes JL, McNall RJ, Andacht T, Adanga MJ. 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3): 189–201



- Leyva JA, Bianchet MA, Amzel LM. 2003. Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F<sub>1</sub>-ATPase. *Molecular Membrane Biology*, 20(1): 27–33
- Li J, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(6347): 815–821
- Liu SS, Wang M, Li XC. 2015. Overexpression of tyrosine hydroxylase and Dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua*. *Science Reports*, 5: 11273
- Nair MS, Dean DH. 2008. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39): 26324–26331
- Ohsawa M, Tanaka M, Moriyama K, Shimazu M, Asano S, Miyamoto K, Haginoya K, Mitsui T, Kouya T, Taniguchi M, et al. 2012. A 50-Kilodalton Cry2A peptide is lethal to *Bombyx mori* and *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13): 4755–4757
- 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 (Pt 1): 516–521
- Qiu L, Zhang BY, Liu L, Ma WH, Wang XP, Lei CL, Chen L. 2017. Proteomic analysis of Cry2Aa-binding proteins and their receptor function in *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports*, 7: 40222
- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5): 189–194
- Rubio-Infante N, Ilhuicatzí-Alvarado D, Torres-Martínez M, Reyes-Grajeda JP, Nava-Acosta R, González-González E, Moreno-Fierros L. 2018. The macrophage activation induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin involves ERK1/2 and p38 pathways and the interaction with cell-surface-HSP70. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1): 580–598
- Schnauffer A, Clark-Walker GD, Steinberg AG, Stuart K. 2005. The F<sub>1</sub>-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *The EMBO Journal*, 24(23): 4029–4040
- 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
- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones CM, Stalinski R, Riaz MA, Paris M, David JP, Adang MJ, Després L. 2012. Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics*, 13(1): 248
- Tomimoto K, Hayakawa T, Hori H. 2006. Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 144(4): 413–422
- 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 *HaABC2* confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 147–153
- Wei JZ, Liang GM, Wang BJ, Zhong F, Chen L, Khaing MM, Zhang J, Guo YY, Wu KM, Tabashnik BE. 2016. Activation of Bt protoxin Cry1Ac in resistant and susceptible cotton bollworm. *PLoS ONE*, 11(6): e0156560
- Wei JZ, Yang S, Zhou S, Liu SK, Cao P, Liu XG, Du MF, An SH. 2021. Suppressing calcineurin activity increases the toxicity of Cry2Ab to *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 77 (4): 2142–2150
- 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
- Xu T, Pagadala V, Mueller DM. 2015. Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microbial Cell*, 2(4): 105–125
- 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
- Zhong F, Wang YN, Xie BT, Zhang WN, Liang GM, Guo YY. 2016. Cloning and expression analysis of V-ATPase subunit A gene in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Journal of Plant Protection*, 43(5): 705–712 (in Chinese) [钟丰, 王亚楠, 谢丙堂, 张万娜, 梁革梅, 郭予元. 2016. 棉铃虫 V-ATP 酶亚基 A 基因克隆及表达谱分析. *植物保护学报*, 43(5): 705–712]
- Ziková A, Schnauffer A, Dalley RA, Panigrahi AK, Stuart KD. 2009. The F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 5(5): e1000436

(责任编辑:王璇)