

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白 Cry1Ba 结构域 II 中 Loops 结构与功能关系研究

王广君¹, 张杰¹, 孙东辉¹, 宋福平¹, 黄大昉²

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 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 为了明确杀虫晶体蛋白中各个 Loop 的结构与功能的关系, 以及 Loop 突变对 Cry1Ba 蛋白杀虫活性的影响, 首先通过三维结构模拟以及同源序列分析的方法, 找到 Cry1Ba 蛋白三个结构域及三个 Loop 相对应的氨基酸片段; 然后通过重叠引物 PCR 将编码 Cry1Ba 蛋白结构域 II 中的三个 Loop 进行了相应的突变, 共获得了 5 个突变体 M1 (Loop1: 340WSNTR344—缺失 (Cry1A)), M2 (Loop2: 402Y—G), M3 (Loop2: 400GIYLEP405—PSAV (Cry3A)), M4 (400GIYLEPIH407—ILGS (Cry1A)), M5 (Loop3: 472LQSRV476—AGAVYTL (Cry1A))。将这些突变体在大肠杆菌 BL21 中进行了诱导表达, 提取蛋白, 分别对小菜蛾进行了生物活性测定。生测结果表明, Loop1 的缺失突变 M1 的毒力, 与 Cry1Ba (LC₅₀ 0.96 μg/mL) 相比, 显著降低, LC₅₀ 为 35.51 μg/mL; 在 Loop2 的突变中, 单个氨基酸的突变 M2 (Y/G) 的毒力略有下降 (LC₅₀ 为 1.31 μg/mL); 而另两种突变 (M3 和 M4) 对小菜蛾的毒力明显下降, LC₅₀ 值分别为 11.56 μg/mL、34.81 μg/mL; Loop3 的突变 M5 对小菜蛾的毒力略有提高 (LC₅₀ 0.81 μg/mL), 但差异不显著。对 Cry1Ba 蛋白突变前后结构与功能之间关系的分析结果表明, Loop 区突变对 Cry1Ba 蛋白的结构和功能影响非常显著; Loop1 和 Loop2 在决定 Cry1Ba 对小菜蛾的毒性方面起着重要作用。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, Cry1Ba, Loop, 基因突变

Relationship between Structure and Function of Loops from *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein Cry1Ba

Guangjun Wang¹, Jie Zhang¹, Donghui Sun¹, Fuping Song¹, and Dafang Huang²

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 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: To indicate the relationship between structure and function of loops from *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1Ba, and the influence of amino acids mutation on toxicity against diamond back moth *Plutella xylostella*, five mutations at the loops of Cry1Ba were constructed by overlapping primer PCR, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Bioassay results showed that the toxicity of mutation M1 (loop1: 340WSNTR344-deletion), compared with that of Cry1Ba (LC₅₀ 0.96 μg/mL), decreased significantly with LC₅₀ 35.51 μg/mL. And the toxicity of mutation M2 (402Y-G), M3 (400GIYLEP405-PSAV), M4

Received: January 23, 2008; **Accepted:** July 1, 2008

Supported by: the National Significant Basic Project (No. 2003CB114201) and the National High Tech Research and Development Program (No. 2006AA10A212).

Corresponding author: Tel: +86-10-62896113; E-mail: dfhuang@ippcaas.cn

国家 973 项目 (No. 2003CB114201) 和国家 863 项目 (No. 2006AA10A212) 资助。

(400GIYLEPIH407-ILGS) was also reduced to some extent respectively. Only M5 (mutation at loop3: 472LQSRV476 - AGAVYTL) showed slightly increased activity against *P. xylostella*, but not significantly (LC_{50} 0.81 $\mu\text{g/mL}$). Referring to the structures of Cry1Ba which was predicted using Swiss-Model software, and bioassay data, we can conclude that loop1 and loop2 play a important role on determining the activity of Cry1Ba against *P. xylostella*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Cry1Ba, Loop, Mutation

杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Protein, ICP)是由苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在芽胞形成过程中产生的一种或几种对昆虫具有毒杀活性的物质。已经发现其可以对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目、直翅目、食毛目的多种昆虫,以及一些线虫、螨类和原生动物具有特异性的杀虫活性^[1]。蛋白晶体被敏感昆虫取食后,原毒素在昆虫中肠碱性条件下溶解;然后在昆虫中肠蛋白酶的作用下,酶解为有活性的毒蛋白核心(毒素);活化后的毒素随后与昆虫中肠上皮刷状缘膜上特异的受体相结合;蛋白分子的构象发生改变,插入到细胞膜中,形成离子渗透性的孔洞,细胞的渗透平衡被破坏;细胞裂解,昆虫死亡^[1-3]。迄今为止,已经登记注册的杀虫晶体蛋白有 411 种,根据氨基酸序列的同源性分为 Cry 和 Cyt 两大类,共 168 模式蛋白 (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, 2007. 11.20)。通过对 Cry3A, Cry1A 等蛋白的三维结构以及 Cry 杀虫晶体蛋白氨基酸的同源性分析,推测激活后的 Cry 晶体蛋白在总体结构上非常相似,他们都由 3 个结构域 (Domain) 组成^[4-9]。Domain I 位于毒性多肽的 N 端,由 7 个 α -螺旋组成,主要参与在昆虫中肠上皮细胞形成孔洞; Domain II 主要由 β -折叠片组成,决定毒素的专一性和与受体的特异性结合; Domain III 位于 C 端由 β -折叠片组成一个“三明治”结构,主要功能包括保持毒素的稳定性、调节毒素的活性、以及与受体的结合等^[1,10]。

不同的杀虫晶体蛋白之间 Domain II 的差异最大^[5],尤其是位于顶端的 Loop 部分,在氨基酸序列、长度、构象等方面都存在很大的不同,如 Cry2Aa 与 Cry4Ba 之间的差异就极其显著^[11]。正是由于不同杀虫晶体蛋白之间的这些差异, Domain II 被认为是决定蛋白杀虫特异性的重要因子。在 Domain II 顶端的 3 个 Loop 结构形成一个类似于免疫球蛋白的抗原决定区^[4]。大量的研究表明 Domain II 顶端的 3 个 Loop 对与中肠受体的特异性结合具有决定性作

用^[12]。1996 年, Rajamohan 等发现将 Cry1Ab 蛋白 Loop2 上的第 372 位的天冬酰胺残基突变为丙氨酸或甘氨酸后,突变体对 gypsy moth (*Lymantria dispar*) 幼虫的毒力提高 8 倍以上,同时对其 BBMV(Brush Border Membrane Vesicle)中受体的亲和力增加了 4 倍^[13]。Wu 等将 Cry3Aa 的 Loop3 (481MQSGRG486) 突变成 AAAAAA, 其对黄粉甲 (*Tenebrio molitor*) 的活性增加 2.4 倍,表明不可逆结合增强,导致相应的毒性提高^[14]。Jurat-Fuentes 和 Adang 研究了 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ja 和 Cry1Fa 与美洲烟夜蛾 (*Heliothis virescens*) BBMV 的结合,发现这些毒蛋白 Domain II Loop 结构能够决定对美洲烟夜蛾的特异性^[12]。此外,通过对 Cry4Aa、Cry4Ba 蛋白的结构以及 Loop 突变的研究表明,不同的 Loop 在决定蛋白的杀虫特异性方面所起的作用可能存在一定的差异^[5, 6, 11]。

Cry1Ba3 是由本实验室发现的对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 高毒力的杀虫晶体蛋白,而 Cry1A 和 Cry3A 是已经证明分别对鳞翅目和鞘翅目害虫高毒力的杀虫蛋白。本研究将 Cry1Ba 蛋白 Loop 序列分别突变为 Cry1A 和 Cry3A 蛋白 Loop 的氨基酸序列,来研究 Loop 突变对杀虫晶体蛋白毒力的影响,进一步揭示杀虫晶体蛋白结构与功能之间的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒见表 1

1.2 LB 液体、固体培养基

参见文献[15]。

1.3 抗生素

氨苄青霉素 (Ampicillin) 100 mg/mL 水溶液, -30°C 保存,使用浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.4 生化试剂

Restriction Enzymes、Ligase、Agarose 等生化试剂购自 TaKaRa、Promega、上海生工等公司。

1.5 质粒提取

碱裂解法提取质粒,参见文献[15]。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Name	Characterization	Source
<i>E. coli</i>		
JM110	<i>dam, dcm, supE44, hsdR17, thi, leu, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, Δ(lac-proAB) /F' [traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	Store in this lab
BL21	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B (r_B⁻m_B⁻)</i> , gal (λ c I 857, <i>ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1</i>), <i>dcm</i> (DE3)	Store in this lab
Plasmids		
pET-21b	Expressional vector, 5.4 kb Amp ^r	Store in this lab
pET-1Ba	Containing <i>cry1Ba</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	Store in this lab
pET-1Bam1	Containing <i>cry1Ba -m1</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	This study
pET-1Bam2	Containing <i>cry1Ba -m2</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	This study
pET-1Bam3	Containing <i>cry1Ba -m3</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	This study
pET-1Bam4	Containing <i>cry1Ba -m4</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	This study
pET-1Bam5	Containing <i>cry1Ba -m5</i> gene, 6.3 kb Amp ^r	This study

1.6 感受态的制备和转化, 大肠杆菌感受态的制备和转化

参见文献[15]。

1.7 实验所用引物及序列

见表 2。

1.8 Cry1Ba 及突变蛋白结构的计算机模拟

通过 Swiss-Model 软件对 Cry1Ba3 蛋白的 Domain II 进行同源三维结构模拟以及能量优化^[16-18], 同时采用 Vector NTI suite 9 AlignX 软件(Informax, Frederick, MD)将 Cry1Ba 结构域 II 的氨基酸序列与

Cry3A、Cry1A 进行比较, 找到 Loop1、Loop2、Loop3 分别对应的氨基酸。

1.9 基因突变

首先以 *cry1Ba* 基因为模板, 用设计好的的引物对分别扩增 *cry1Ba* 基因的 5'和 3'端基因片段。进行引物设计时, 在 *cry1Ba* 5'端片段的上游引物和 3'端片段的下游引物中分别插入 *Bam*H I 和 *Sal* I 的酶切位点; 在 5'端片段的下游引物和 3'端片段的上游引物中同时插入相应的突变核苷酸。然后分别以第一次 PCR 获得的 *cry1Ba* 5'端片段和 3'端片段的混合物(摩尔比 1:1)为模板, 以 5'端片段的上游引物和 3'端片段的下游引物组成引物对, 通过 PCR 扩增突变基因。不同的突变引物所对应的突变基因见表 3。PCR 程序: 94°C, 1 min; 54°C, 1 min; 72°C, 3 min; 32 个循环; 72°C, 10 min; 4°C 保温。

1.10 PCR 产物的回收和酶切

PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳后, 在紫外灯下切下目的条带。用 DNA 纯化试剂盒(购自鼎国生物工程有限公司)回收 PCR 产物。并用 *Bam*H I 和 *Sal* I(购自宝生物工程有限公司)双酶切, 然后进行电泳回收。

1.11 表达载体质粒 pET-21b 的提取、酶切和回收

碱解法提取 pET-21b 载体质粒, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳后, 回收, 方法同上。

1.12 重组质粒的构建和检测

酶切后的表达载体 pET-21b 片段和突变基因片

表 2 引物及其序列

Table 2 Primers used in this study

Name	Sequences
S1Ba5	CG <u>GGATCC</u> GAT GGA TCT ATT ACC AGA TG
1BaD33H	ACGC <u>GTCGAC</u> AGT AAA CAG AGC
cry1ba3-1Aaloop2-3	TGAACCAAGT ATCCATAGAA GCA CTCC
Cry1ba3-1Aaloop2-5	TATGGATACTTGGTTCAGGTGTCCC TACTGTTAGG
cry1ba3-1Aaloop3-3	CAAGGTGTAAACTGCTCCAGCAAT TATACCTATATGAG
cry1ba3-1Aaloop3-5	GCTGGAGCAGTTTACACCTTGAAT GTACCGGTATATTCTTG
cry1ba3-3Aaloop2-3	TACAGCGGAC GGCCATAGAA GC ACTCCTGC
cry1ba3-3Aaloop2-5	TATGG CCGTCCGCTGTA ATTCAT GGTGTCCTACTG
cry1ba3-delloop1-3	TCGTGATGAA GCGCT AAAAATTG TAAG
cry1ba3-delloop1-5	TTAGCGCTTC ATCACGA CATATGA CTTATTGGCGGGGGCGC
cry1ba3-loop2Y-G-3	GGTTCAAGAC CAATTCCCCA TAG AAGC
cry1ba3-loop2Y-G-5	GGGGAATTGGTCTTGAACCTATTC ATGG

段进行连接,用连接产物转化感受态的 *E. coli* JM110 细胞,筛选含有 Amp^r 的转化子。然后从转化子中提取质粒,进行酶切和 PCR 检测、以及序列测定。

1.13 突变基因的诱导表达和蛋白提取

将经检测无误的重组质粒转入受体菌 *E. coli* BL21 中,同样通过氨苄青霉素抗性进行筛选。将分别含有重组质粒的 BL21 转化子菌株活化过夜 (37°C, 230 r/min Amp^r), 1%接种于 1000 mL 的液体 LB 培养基中, 37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5, 然后加入 IPTG (终浓度为 0.7 mmol/L) 诱导表达, 4~6h (30°C, 230 r/min Amp^r)。离心收集菌体, 重悬于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的缓冲液中, 超声波处理细胞, 离心, 收集上清, 将沉淀悬浮于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中。SDS-PAGE 检测上清和沉淀中目的蛋白含量。

1.14 生物活性测定

将提取的各种蛋白按 10×、20×、40×、80×、160×、320×、640×、1280×、2560× 的浓度梯度进行稀释。以大肠杆菌表达的 Cry1Ba 活性区蛋白片段作为阳性对照, 以含有空载体 pET-21b 的 BL21 所表达的蛋白作为阴性对照, 采用浸叶法, 分别测定了各突变蛋白对鳞翅目害虫小菜蛾的毒力。具体操作方法参见文献[19]。

1.15 Cry1Ba 蛋白结构与功能关系分析

结合各蛋白的生物学功能与 Cry1Ba 蛋白的结

构, 分析 Cry1Ba 蛋白各 Loop 与功能之间的关系。

2 结果与分析

2.1 Cry1Ba3 蛋白 Domain II 的结构模型以及 Loop 的序列分析

以 Cry3Bb1 (1ji6A) 为模板, 通过 Swiss-model 软件对 Cry1Ba3 蛋白结构域 II 的三维结构进行模拟和能量优化, 最后获得了 Cry1Ba3 蛋白结构域 II 的三维结构模型, 如图 1 所示。同时通过与 Cry3A、Cry1Aa 蛋白的氨基酸序列比对分析, 找到了 3 种蛋白结构域 II 中 Loop1、Loop2、Loop3 分别对应的氨基酸, 见表 3。

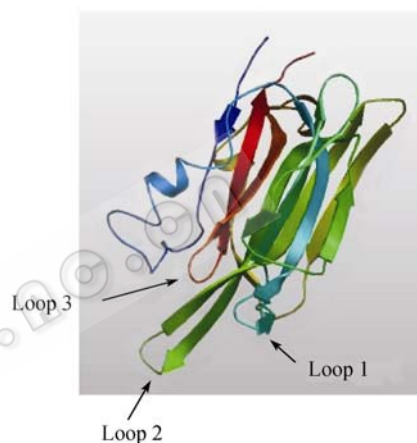


图 1 Cry1Ba 蛋白 Domain II 的三维结构模型
Fig. 1 The three dimensional structure model of Cry1Ba Domain II

表 3 Cry1Ba、Cry3A、Cry1A 蛋白之间 Loop1、Loop2、Loop3 氨基酸组成的比较
Table 3 Amino acid sequences of Loop1, Loop2, Loop3 from Cry1Ba, Cry3A, Cry1A respectively

	Loop1	Loop2	Loop3
Cry3A	358YYGND362	450PSAV453	489MQGSRG494
Cry1Ba	338SRWSNTR344	340GIYLEPIH347	471ILQSRV476
Cry1A	308DVHRG312	367RRRIILGSGP375	440AAGAVYTL447

表 4 各突变体突变前后 Loop 的氨基酸序列及杀虫活性
Table 4 Amino acid sequences of mutants at loops and their toxicity against *P. xylostella*

Amino acid sequences of loops before and after mutation		LC ₅₀ (μg/mL)	95% Confidence Limits	Relative toxicity
Cry1Ba		0.96 ^{a*}	0.7138–1.0451	1
M1	Loop1 340WSNTR344(Deletion)(Cry1A)	35.51 ^b	29.376–43.555	0.027
M2	Loop2 342Y/G	1.31 ^a	0.9465–1.7896	0.73
M3	Loop2 340GIYLEP345/PSAV (Cry3A)	11.56 ^c	9.8125–14.794	0.08
M4	Loop2 340GIYLEPIH347/ILGS (Cry1A)	34.81 ^b	31.024–38.473	0.028
M5	Loop3 472LQSRV476/AGAVYTL (Cry1A)	0.81 ^a	0.7013–0.9864	1.19

* the same letter indicates that there is no significant difference

2.2 基因突变及重组质粒的构建

通过重叠引物 PCR 共获得了 5 个 1.9 kb 的 *cry1Ba* 突变基因片段, 分别命名为 *cry1Ba-m1*、*cry1Ba-m2*、*cry1Ba-m3*、*cry1Ba-m4*、*cry1Ba-m5*。将上述突变基因片段分别插入表达载体 pET-21b 中, 得到了五种重组质粒 pET-1Bam1、pET-1Bam2、pET-1Bam3、pET-1Bam4、pET-1Bam5。序列测定结果也表明插入的外源基因是正确的, 突变后各 Loop 的氨基酸序列见表 4。

2.3 突变蛋白的表达与提取

将五种重组质粒 pET-1Bam1、pET-1Bam2、pET-1Bam3、pET-1Bam4、pET-1Bam5 分别导入大肠杆菌 BL21 中, 进行诱导表达。SDS-PAGE 检测结果表明, 突变基因都可以在大肠杆菌 BL21 中正常表达, 形成约 70 kD 的蛋白(如图 2), 将突变后得蛋白分别命名为 M1、M2、M3、M4、M5。分别将各种突变蛋白 SDS-PAGE 定量后, 稀释至 1 mg/mL, 4°C 保存, 备用。

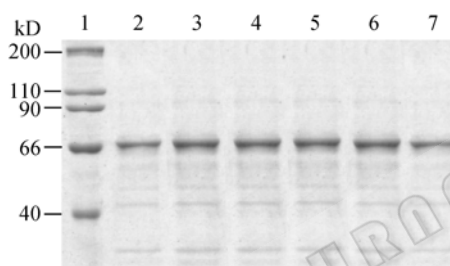


图 2 突变蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of mutant proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3)

1: Marker; 2: Cry1Ba; 3: M1; 4: M2; 5: M3; 6: M4; 7: M5

2.4 突变蛋白的生物活性测定

生测结果表明, Loop1 的缺失突变 M1 的毒力, 与 Cry1Ba (LC_{50} 0.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比, 显著降低, LC_{50} 为 35.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 在 Loop2 的突变中, 单个氨基酸的突变 (Y/G) M2 的毒力 (LC_{50} 1.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与 Cry1Ba 相比, 略有下降, 但差异不显著; 而另两种突变 (M3 和 M4) 对小菜蛾的毒力明显降低, LC_{50} 值分别为 11.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、34.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Loop3 的突变 M5 对小菜蛾的毒力略有提高 (LC_{50} 0.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与 Cry1Ba 相比, 差异也不显著 (表 4)。

2.5 Cry1Ba 蛋白结构与功能关系分析

通过分析突变后 Cry1Ba 蛋白的结构与杀虫活性之间的关系, 发现 Loop3 的突变 (M5) 即将

Cry1Ba 蛋白的 Loop3 突变为 Cry1A 蛋白相应的氨基酸序列, 对 Cry1Ba 蛋白 (对小菜蛾) 的活性影响不大, 在一定程度上说明 Loop3 的改变对于 Cry1Ba 蛋白与受体的结合没有太大的影响; 而 Loop1 和 Loop2 的突变对 Cry1Ba 蛋白毒力的影响则明显较大, 表明 Loop2 (或与 Loop1 一起) 对 Cry1Ba 与小菜蛾受体的结合起决定性作用。同时 Loop2 中单个氨基酸的改变 M5 (342Y/G) 对 Cry1Ba 蛋白的活性也没有显著降低。研究发现由酪氨酸突变为甘氨酸后, 氨基酸的侧链基团减小, 氨基酸的极性发生了改变, 但通过结构模拟 (图略) 发现该 Loop 的碳链骨架走向没有明显的变化, 因此对于活性没有明显的影响。

3 讨论

Loops 突变所引起的生物学功能 (杀虫活性) 改变的原因可能是 Loop 区结构的改变引起蛋白与受体结合效应发生变化, 从而导致突变蛋白的毒性发生改变。在受体昆虫中肠中, 杀虫晶体蛋白活化后, 通过结构域 II 中的 Loop 与昆虫中肠上皮细胞膜上的受体结合, 进而形成孔洞, 造成昆虫死亡。据报道, 受体结合的效应与毒性正相关, 受体结合影响小, 对毒性影响也小; 受体结合的正效应和负效应越强, 相应的对毒性影响也越强^[1]。不同 Cry1Ba 突变体蛋白之间毒性的差异, 可能就是由于这种结合效应的不同所造成的。

另一方面, 将 Cry1Ba 蛋白的 Loops 部分氨基酸序列突变为 Cry1A 和 Cry3A 蛋白相应的氨基酸序列后, 大部分突变蛋白的毒力下降, 而非预期的突变为 Cry1A 的 Loop 后, 蛋白与受体的结合能力增强, 毒力提高; 突变为 Cry3A 的 Loop 后, 蛋白与受体的结合能力下降, 毒力降低。说明单一 Loop 与蛋白的杀虫特异性并不一定是简单相关的关系; 通过具有不同杀虫特异性的蛋白之间 Loop 互换来改造杀虫蛋白是一条有益的途径, 但需要进行大量的探索。

2006 年, Boonserm 在研究 Cry4Aa 蛋白的结构时, 发现 Loop 长度的变化对蛋白的杀虫活性有一定的影响^[6]。本研究在生测过程中也发现, Loop 的长度没有发生改变的突变体 M2、M5, 对小菜蛾的毒力没有明显改变; 随着 Loop 的长度的降低, 突变蛋白的毒力也明显下降。在缺少两个氨基酸的情况下,

毒力降低约 12 倍;而在缺少 4 个氨基酸的情况下,毒力降低了约 35 倍;删除 Loop1 后(缺失 5 个氨基酸)突变蛋白对小菜蛾的毒力降低了近 36 倍。这些结果表明 Loop 的长度也可能是影响 Cry1Ba 蛋白杀虫活性的一个因素。

REFERENCES

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 775–806.
- [2] Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 2007, **49**: 423–435.
- [3] Whalon ME, Wingerd BA. Bt: Mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2003, **54**: 200–211.
- [4] Li J, Carrol J, Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. *Nature*, 1991, **353**: 815–821.
- [5] Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, *et al.* Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol*, 2005, **348**: 363–382.
- [6] Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, *et al.* Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. *J Bacteriol*, 2006, **188**: 3391–3401.
- [7] Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, *et al.* Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst Allogr D*, 2001, **57**: 1101–1109.
- [8] Grochulski P, Masson L, Borisova S, *et al.* *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*, 1995, **254**: 447–464.
- [9] Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 2001, **9**: 409–417.
- [10] Jenkins JL, Dean DH. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *Genet Eng*, 2000, **22**: 33–54.
- [11] Abdullah MA, Alzate O, Mohammad M, *et al.* Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**, 5343–5353.
- [12] Jurat-Fuentes J, Adang L. Importance of Cry1 delta-endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(1): 323–329.
- [13] Rajamohan F, Alzate O, Cottrill J A, *et al.* Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 14338–14343.
- [14] Wu SJ, Dean DH. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa δ -endotoxin. *J Mol Biol*, 1996, **255**: 628–640.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**: 3381–3385.
- [17] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2714–2723.
- [18] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, **22**: 195–201.
- [19] Wang GJ, Zhang J, Song FP, *et al.* Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests. *Appl Microbiol Biot*, 2006, **72**(5): 924–930.