

杀虫晶体蛋白的序列特征与其杀小菜蛾活性间关系的定量模型

林毅, 蔡福营, 张光亚

华侨大学生物工程与技术系 工业生物技术福建省高校重点实验室, 泉州 362021

摘要: 采用定点突变技术改造杀虫晶体蛋白, 是提高其杀虫活性的有效途径, 但目前在突变位点和氨基酸种类的选择上还存在很大的盲目性。以杀小菜蛾活性明确的 23 个杀虫晶体蛋白上的 4 个关键结构域为研究对象, 用主成分分析法处理 20 种氨基酸 1369 种性质参数后的第一个主成分的得分向量来表征氨基酸差异, 实现序列数据化。通过逐步回归找到了 6 个关键氨基酸位点: X₃、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₄ 和 X₁₉, 并进一步通过偏最小二乘二次多项式回归寻根最优氨基酸残基 L/X₃、S/X₉、S/X₁₂、T/X₁₃、A/X₁₄ 和 G/X₁₉, 从而建立了杀虫晶体蛋白的序列特征与其杀小菜蛾活性间关系的定量模型。这有助于快速地预测出有利于提高杀小菜蛾活性的氨基酸位点和种类, 从而提高定点突变改造杀虫晶体蛋白的效率。

关键词: 杀虫晶体蛋白, 小菜蛾, 序列特征, 定量模型, 理性设计

Modeling Relationship between Sequence Characteristics of Insecticidal Crystal Proteins and Their Inhibitory against *Plutella xylostella*

Yi Lin, Fuying Cai, and Guangya Zhang

Department of Bioengineering & Biotechnology, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

Abstract: The knowledge of the relationship between sequence characteristics of insecticidal crystal proteins (ICP) and their inhibitory against *Plutella xylostella* provided helpful information for the rational design of ICP with desirable activity against *Plutella xylostella*. The four key loops of ICP with determined activities against *Plutella xylostella* were selected to study the quantitative relationship between sequence characteristics and insecticidal activity. The first principle components' score vectors for 20 amino acids were assigned to converting amino acids into data. The six key sites X₃, X₉, X₁₂, X₁₃, X₁₄ and X₁₉ were predicted by stepwise regression method. The amino acids L/ X₃, S/ X₉, S/ X₁₂, T/ X₁₃, A/ X₁₄ and G/ X₁₉ found by partial least squares regression and second order polynomial models were predicted to increase the activity of ICP against *Plutella xylostella*.

Keywords: insecticidal crystal protein, *Plutella xylostella*, sequence characteristics, modeling, rational design

Received: September 17, 2007; **Accepted:** March 21, 2008

Supported by: the National Natural Sciences Foundation of China (No. 40601046) and the Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (No. 08011012).

Corresponding author: Yi Lin. Tel: +86-595-22692031; Fax: +86-595-22691560; E-mail: lyhxm@hqu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 40601046)和福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划基金(No. 08011012)资助。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)在其芽孢形成过程中会产生晶体蛋白,不少晶体蛋白具有特异的杀虫活性,被称为杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal protein, ICP)^[1]。ICP由3个结构域组成,如图1所示。结构域I由6个 α 螺旋构成,形成管束状,结构域I上的 α_4 -loop- α_5 是1个发夹结构,能启动结构域I在害虫中肠上皮细胞刷状缘膜上钻孔,形成离子通道^[2];结构域II是由3个具有希腊钥匙结构的 β 棱柱组成,在每个 β 棱柱的顶端各有1个loop,可与害虫中肠上皮细胞刷状缘膜上特异的受体结合^[3];结构域III是由 β 折叠片层构成的“三明治”结构,主要起稳定分子结构的作用^[4]。晶体被敏感昆虫取食后,在昆虫中肠内溶解并释放出晶体蛋白,经中肠蛋白酶作用后产生活性片段,穿过围食膜,结构域II与受体结合,晶体蛋白发生构象变化,使结构域I插入膜形成离子通道或孔洞,细胞的渗透失去平衡,中肠的完整性被破坏,导致昆虫死亡^[1]。可见,结构域I上的 α_4 - α_5 loop和结构域II上3个 β 棱柱顶端的3个loop对ICP的杀虫活性起着决定性的作用。

自八十年代中期以来,大量实验数据与统计资料表明,象对付化学农药那样,害虫也会对Bt产生抗性^[5,6]。产生抗性的害虫还会对其他ICP表现出交叉抗性^[7]。小菜蛾(*Plutella xylostella*)是为害十字花科蔬菜的重要害虫,由于其发生世代多且重叠,为

害隐蔽,加之其容易产生抗药性,对应用Bt控制小菜蛾提出了严重挑战^[8]。目前主要有2条途径可以解决小菜蛾对Bt的抗性,一是筛选与现有ICP不产生交互抗性的新型ICP,二是通过理性设计和非理性设计对现有ICP进行改造。由于现有筛选方法的限制,从自然界中筛选新型ICP越来越困难。与其同时,定点突变等分子改造技术日臻完善,应用定点突变技术对晶体蛋白进行理性改造已成为现实且可大大缩短研发周期和减少研发费用。目前对ICP的结构与其杀小菜蛾活性间的关系还很不了解,因而在定点突变的位置和种类的选取上还有很大的盲目性。本研究初步建立了杀虫晶体蛋白的序列特征与其杀小菜蛾活性间关系的定量模型,可能有助于快速地预测出有利于提高杀小菜蛾活性的氨基酸位点和种类。

1 材料与方法

1.1 23个ICP及其对小菜蛾的LC₅₀

搜集了17条对小菜蛾具有明显杀虫活性和6条没有任何杀虫活性的杀虫晶体蛋白序列,如表1所示。表1中,当LC₅₀(半致死率)为1000时,定义为对小菜蛾无活性。

1.2 杀虫晶体蛋白Loop数据的获得

苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的一级序列来源于Swiss-Prot Release 44.4。Swiss-Prot是一个非冗余

表1 杀小菜蛾活性明确的杀虫晶体蛋白

Table 1 List of insecticidal crystal proteins with determined activities against *Plutella xylostella*

ICP	GenBank Accession No.	LC ₅₀ (μ g/mL)	Homology to Cry1Aa12 (%)	ICP	GenBank Accession No.	LC ₅₀ (μ g/mL)	Homology to Cry1Aa12 (%)
Cry1Aa12	AF384211	0.20	100.0	Cry1Ie1	AF211190	0.20	43.6
Cry1Aa14	AAP40639	0.63	98.1	Cry2Aa9	AF273218	4.60	13.4
Cry1Ab16	AF375608	0.26	92.4	Cry2Ab10	EF157306	95.39	13.9
Cry1Af1	U82003	48.70	86.7	Cry7Ba1	ABB70817	0.10	36.5
Cry1Bd1	U70726	0.13	56.2	Cry9Ca1	Z37527	6.50	37.7
Cry1Cb2	AY007686	7.97	71.0	Cry9Ea2	AF358863	1000.00	34.6
Cry1Ia3	L36338	2.57	43.6	Cry9Ea3	EF157307	1000.00	34.6
Cry1Ia7	AF278797	12.70	43.6	Cry1Ca9	AY078160	1000.00	72.7
Cry1Ia8	AF373207	2.23	43.9	Cry1Ca7	AY015492	1000.00	72.7
Cry1Ia9	AF521013	93.24	43.8	Cry1Db2	AF358862	1000.00	72.9
Cry1Ib1	U07642	147.80	44.1	Cry1Gb2	AF288683	1000.00	73.1
Cry1Id1	AF047579	4.26	44.1				

ICP: Insecticidal crystal protein; GenBank Accession No.: the GenBank ID; LC₅₀: Insecticidal activities of ICP (Half lethality dose); The LC₅₀ value of ICP which showed no activity against *P. xylostella* was defined as 1000

的蛋白质序列与结构数据库; 用 Swiss-model 同源建模方法预测出各杀虫晶体蛋白的初始三维结构 (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>); 利用 Ramachandran plot 评估优化后模型的好坏; 蛋白质的三维结构比对软件采用 Molsoft 公司的 ICMPro; 可视化软件包括 ICMPro, spdbv, chimera 等; 软件运行于 Pentium4 PC 机上。

1.3 逐步回归分析^[9]

逐步回归方法是从一个自变量开始, 视自变量对 Y 作用的显著程度, 从大到小地依次逐个引入回归方程。但当引入的自变量由于后面变量的引入而变得不显著时, 要将其剔除掉。引入一个自变量或从回归方程中剔除一个自变量, 为逐步回归的一步。对于每一步都要进行 F 值检验, 以确保每次引入新的显著变量前回归方程中只包含对 Y 作用显著的变量。这个过程反复进行, 直至既无不显著的变量从回归方程中剔除, 又无显著变量可引入回归方程时为止。

1.4 偏最小二乘二次多项式回归^[10]

偏最小二乘二次多项式回归的思路是先从自变量集合 X 中提取成分 $th(h = 1, 2, \dots)$ 个成分相互独立, 然后建立这些成分和自变量 X 的回归方程, 完成偏最小二乘回归, 并在偏最小二乘回归的基础上引进二次多项式极值模型, 预测出极值, 并通过还原分析, 寻根最优自变量组合。偏最小二乘二次多项式回归可以有效地实现观测数据信息的浓缩处理并寻根出最优自变量参数组合与对应的因变量极值, 将解释变量空间和反应变量空间分解成几个少数的解释变量与反应潜变量, 相应地建立它们之间的回归关系; 并且, 解释潜变量与反应潜变量之间的关系比较稳定、明确, 不会随着变量选取标准不同而变化。它具有计算量小、收敛快、简单稳健等优点。

逐步回归分析和偏最小二乘多项式回归均采用 Data Processing System(DPS)软件处理。

2 结果与分析

2.1 杀虫晶体蛋白关键氨基酸的空间定位

根据前文的介绍, 我们知道 Domain I 上的 α_4 - α_5 loop 和 Domain II 上顶端的 3 个 loop 与杀虫活性相关性很大, 故而我们选取这 4 个 loop 为分析区域, 按照它们从 N 端到 C 端的顺序分别标为 Loop1、

Loop2、Loop3 和 Loop4, 如图 1 所示。4 个 Loop 上的氨基酸残基按照它们在序列上的位置分别表示为 X_1 、 $X_2 \dots X_{20}$, 如表 2 所示。

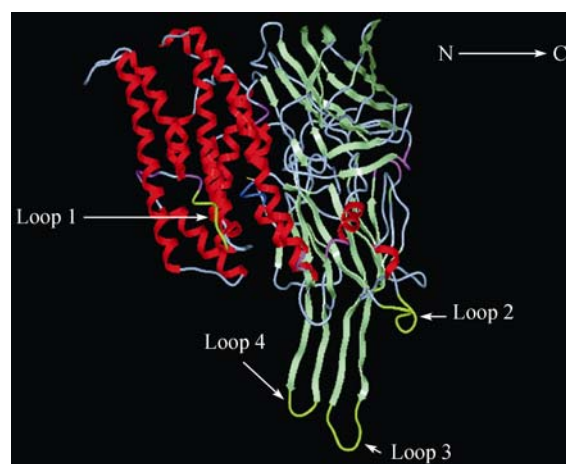


图 1 杀虫晶体蛋白的空间结构与四个关键 Loop 的定位

Fig. 1 Structure of ICP and the four key loops

The known ICP structures, regardless of insect specificities, show a common topology composed of three domains. Domain I is an α -helix bundle, which is believed to be responsible for pore formation. Domain II is a β -prism of three antiparallel sheets with loops ending at its apex, which is thought to be involved in receptor binding. Domain III is a lectin-like β -sandwich, which is important to the stability of ICP

Loop1 (indicated by arrow), α_4 - α_5 loop in domain I, is crucial to pore formation. Loop2, Loop3 and Loop4 (indicated by arrow), the surface-exposed loops at the apices of the three β -sheets of domain II, are involved in receptor binding

2.2 氨基酸序列特征的数字处理

梁桂兆等^[11]共收集了 20 种天然氨基酸的 1369 个描述子变量, 包括 31 个 0 D 描述子、69 个 1 D 描述子、640 个 2 D 描述子、629 个 3 D 描述子。采用主成分分析(Principle component analysis, PCA)压缩描述子数量, 经 PCA 变换后, 其前 13 个主成分得分矩阵累计解释了原始变量数据矩阵(20×1369) 96.19% 的方差。因此, 可用此 13 个主成分得分矩阵替代原始变量矩阵。我们为了区分 20 种氨基酸的差异, 选用第一个主成分来表征氨基酸, 如表 3 所示。

2.3 关键氨基酸位点的定位

以杀虫晶体蛋白 4 个 Loop 上的氨基酸残基 X_1 、 $X_2 \dots X_{20}$ 为自变量, 以半致死率 LC_{50} 为因变量建立逐步回归模型。在逐步回归分析时, DPS 系统首先在 0.1 的置信水平下挑选自变量, 并自动调整 F 值以保证入选一个自变量因子。以调整相关系数 R 最大原则, 获得以下方程

$$Y_1 = 53.2 + 23.3X_3 - 20.3X_9 + 4.6X_{12} - 20.5X_{13} + 4.9X_{14} - 7.8X_{19} \quad (1)$$

表 2 四个关键 Loop 上的氨基酸残基
Table 2 The amino acids of the four key loops

ICP	Loop1					Loop2					Loop3					Loop4				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀
Cry1Aa12	I	P	S	F	R	I	G	R	N	Q	P	W	P	A	G	T	P	F	L	T
Cry1Aa14	I	P	S	F	R	I	G	R	N	Q	P	W	P	A	G	T	P	F	L	T
Cry1Ab16	I	P	L	L	R	V	A	S	Y	N	P	V	A	G	G	P	R	I	A	G
Cry1Bd1	I	P	L	F	A	V	R	G	E	N	I	G	I	N	F	S	N	S	S	V
Cry1Ia3	I	P	L	F	A	V	R	G	F	L	G	S	G	P	A	G	A	V	Y	T
Cry1Ia7	V	P	L	M	A	I	R	G	I	G	A	N	I	I	R	N	A	E	P	L
Cry1Ia8	L	P	Q	F	Q	M	G	A	R	R	S	W	L	D	R	N	I	A	S	P
Cry1Ia9	L	P	Q	F	Q	I	G	T	R	R	S	W	L	D	R	N	I	E	S	P
Cry1Ib1	M	P	S	F	A	I	S	S	Q	G	H	F	G	V	E	E	Y	S	H	R
Cry7Ba1	L	P	S	F	A	V	S	N	T	V	D	F	H	W	S	H	V	K	A	L
Cry9Ca1	L	P	S	F	A	V	S	N	T	V	D	F	H	W	H	V	K	A	L	V
Cry9Ea3	I	P	L	F	R	I	S	S	T	A	R	F	N	F	T	L	R	A	P	V
Cry1Ca9	M	P	S	F	G	T	T	A	P	D	S	R	A	R	T	T	Q	G	G	P
Cry1Db2	I	P	L	F	A	V	P	V	S	I	E	S	T	A	T	N	Q	A	G	S

Loop1, α₄-α₅ loop in domain I, is crucial to pore formation. Loop2, Loop3 and Loop4, the surface-exposed loops at the apices of the three β-sheets of domain II, are involved in receptor binding

The redundant data such as Cry1Gb2, Cry1Af1, Cry1Cb2, Cry1Id1, Cry1Ie1, Cry2Aa9, Cry2Ab10, Cry9Ea2, Cry1Ca7, were not included because their four loops were entirely identical to other ICPs listed in the table

表 3 经 PCA 处理的 20 种天然氨基酸的 1369 种性质参数后的第一个主成分的得分向量

Table 3 The first principle components' score vectors by PCA for 20 amino acids

AA	AB	FPC	AA	AB	FPC
Ala	A	-32.27	Met	M	3.84
Glu	E	1.85	Trp	W	62.17
Leu	L	0.71	Asp	D	-10.09
Ser	S	-26.53	His	H	15.31
Arg	R	24.44	Phe	F	28.81
Gln	Q	3.87	Tyr	Y	38.59
Lys	K	10.56	Cys	C	-23.81
Thr	T	-15.66	Ile	I	-0.20
Asn	N	-7.95	Pro	P	-12.00
Gly	G	-47.81	Val	V	-11.85

AA: amino acid; AB: abbreviated words; FPC: the first principle components' score vectors

线性方程(1) 表明, 具有较高显著水平的氨基酸位点共 6 个, 分别为 X₃、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₄ 和 X₁₉, 其中正相关氨基酸位点为 X₃、X₁₂ 和 X₁₄, 负相关位点为 X₉、X₁₃ 和 X₁₅。在逐步回归过程中, 因为氨基酸位点之间是相互独立的, 所以并没有考虑氨基酸位点之间的交互影响。方程经检验后, 相关系数 R=0.97832, 达到最大, F 值=26.0342, 显著水平 P=0.0002(P<0.05), 回归方程具有较好的显著水平。

2.4 关键氨基酸的还原寻优

通过逐步回归分析可以定位关键氨基酸, 从而为定点突变在杀虫晶体蛋白上找到了突变位置。但是这些位点是什么氨基酸时才能使杀虫晶体蛋白具有最大的杀虫活性呢? 如果把以上 14 条杀虫晶体蛋白的 6 个关键氨基酸 X₃、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₄ 和 X₁₉ 看成为 14 水平 6 因素的实验, 就可以把寻找最优氨基酸组合转变成寻找实验中最优因素参数组合的问题。重新建立数据集如表 4 所示。

以 6 个关键氨基酸为自变量, 以 Y2 值(半致死率倒数)为因变量, 建立偏最小二乘二次多项式回归极大值模型, 获得线性方程如下

$$Y_2=0.6337971+0.025436X_1+0.002456X_2-0.020477X_3+0.008425X_4-0.001795X_5-0.020721X_6+0.001993X_1X_1-0.000118X_2X_2+0.000243X_3X_3-0.000020X_4X_4+0.000318X_5X_5-0.000289X_6X_6+0.001077X_1X_2-0.000873X_1X_3-0.001260X_1X_4-0.000566X_1X_5+0.000266X_1X_6-0.000364X_2X_3-0.000631X_2X_4-0.000443X_2X_5-0.000202X_2X_6-0.000302X_3X_4+0.000117X_3X_5+0.000248X_3X_6+0.000609X_4X_5-0.000080X_4X_6-0.000528X_5X_6 \quad (2)$$

对表 4 得到的回归方程 (2) 进行步长为 0.002 的寻找 Y 最大值, 结果如表 5 所示。预测 Y2 最大值为 8.487, 得到各个因素最佳值的结果经还原为 X₁=0.71, X₂=-26.53, X₃=-26.53, X₄=-15.66, X₅=-32.27,

$X_6 = -47.81$ 。按照得出的数值在表 3 中找到对应的氨基酸种类为: L/X3, S/X9, S/X12, T/X13, A/X14 和 G/X19, 此时可获得最大杀虫活性 $LC_{50} = 0.118 \mu\text{g/mL}$ 。模型拟合的决定系数 R^2 为 0.748, 表明回归模型的拟合程度不是很好。其原因至少有以下 4 个方面: 一是现有的 ICP 杀小菜蛾 LC_{50} 数据是世界各地不同的实验室采用不同的小菜蛾品系由不同的人在不同的时间测定的, 活性测定条件的差异使各 ICP 的 LC_{50} 数据可能与真实值存在偏差; 二是现阶段仅有少量的杀虫晶体蛋白被测定过杀小菜蛾活性 (LC_{50}), 使本文所能搜集的数据量非常有限; 三是对小菜蛾无杀虫活性时其 LC_{50} 数值定为多少比较合适, 目前并没有统一的说法, 在本文中我们将其定为 1000, 这可能与真实值存在较大差异; 四是采用同源建模对各 ICP 进行关键 loop 定位可能与实际情况存在偏差。

表 4 关键氨基酸残基与半致死率倒数表
Table 4 Key amino acids and the reciprocal of LC_{50}

ICP	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Y_2
Cry1Aa12	-26.53	-7.95	62.17	-12.00	-32.27	0.71	4.926
Cry1Aa14	-26.53	-7.95	62.17	-12.00	-32.27	0.71	1.580
Cry1Ab16	0.71	38.59	-11.85	-32.27	-47.81	-32.27	3.876
Cry1Bd1	0.71	1.85	-47.81	-0.20	-7.95	-26.53	8.000
Cry1Ia3	0.71	28.81	-26.53	-47.81	-12.00	38.59	0.389
Cry1Ia7	0.71	-0.20	-7.95	-0.20	-0.20	-12.00	0.079
Cry1Ia8	3.87	24.44	62.17	0.71	-10.09	-26.53	0.448
Cry1Ia9	3.87	24.44	62.17	0.71	-10.09	-26.53	0.011
Cry1Ib1	-26.53	3.87	28.81	-47.81	-11.85	15.31	0.007
Cry7Ba1	-26.53	-15.66	28.81	15.31	62.17	-32.27	10.526
Cry9Ca1	-26.53	-15.66	28.81	15.31	62.17	0.71	0.154
Cry9Ea3	0.71	-15.66	28.81	-7.95	28.81	-12	0.001
Cry1Ca9	-26.53	-12.00	24.44	-32.27	24.44	-47.81	0.001
Cry1Db2	0.71	-26.53	-26.53	-15.66	-32.27	-47.81	0.001

X: the prediction key amino acid by stepwise regression method;
 Y_2 : the reciprocal of LC_{50}

表 5 偏最小二乘二次多项式回归结果
Table 5 Results of partial least squares regression and second order polynomial model

X_3	X_9	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{19}	$LC_{50}(1/Y_2)$
0.71	-26.53	-26.53	-15.66	-32.27	-47.81	8.487
L	S	S	T	A	G	0.118

3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来, 在研究作用机理的同时, 科学家希望通过定点突变, 对 Bt 杀虫晶体蛋白进行理性设计, 提高其杀虫力和扩大其杀虫谱。1995 年, Chen 等^[12]将 Cry1Ab 结构域 I 中 α_4 -loop- α_5 上的 Y153 突变为 R, 发现在结构稳定性、受体的亲和力和结合浓度方面与野生型都没有任何差异, 但是却减弱了膜插入, 从而降低了杀虫活性。1996 年, Rajamohan 等^[13]对 Cry1Ab 结构域 II 中 Loop2 上的三位点进行定点突变 ($N^{372}A$ 、 $N^{292}G$ 和 $L^{283}S$), 发现突变后的晶体蛋白对舞毒蛾幼虫的杀虫作用比野生型提高了 36 倍。之后, 科学家对杀虫晶体蛋白分子上不同部位的氨基酸残基进行突变, 但突变位点的选取都存在一定的盲目性, 有的突变不同程度地提高了杀虫活性, 但大多数突变降低了杀虫活性或是并没有改变杀虫活性, 这是因为还没有一种有效的方法可用来预测能提高杀虫活性的突变位点和氨基酸类型。如果能找到一种方法, 可以快速地预测出定点突变的位点和将要突变的氨基酸类型, 将会大大提高定点突变提高杀虫活性的成功率。

本研究以对小菜蛾活性明确的 23 个杀虫晶体蛋白上的 4 个关键 loop 为研究对象, 用 PCA 处理的 20 种天然氨基酸的 1369 种性质参数后的第一个主成分的得分向量来表征氨基酸差异, 实现蛋白质序列的数据化。通过逐步回归找到了 6 个关键氨基酸位点, 并进一步通过偏最小二乘二次多项式回归寻根最优氨基酸残基。但是, 所建立的模型还比较粗糙, 拟合度较低, 预测的效果如何, 还有待检验。因而本研究的出发点是进行方法上的探讨。今后, 为建立一个行之有效的预测模型, 可从以下 2 方面来开展工作: 一是对本研究的模型进行定点突变实验, 检验模型的可信度, 同时实验数据可用来对模型作进一步修正; 二是在相同的活性测定条件下测定尽可能多的杀虫晶体蛋白对小菜蛾的杀虫活性, 获得其 LC_{50} 数据, 在此基础上重新建立一个更为可靠的模型。

REFERENCES

- [1] Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 1989, **53** (36):

- 242-255.
- [2] Masson L, Tabashni BE, Liu YB, *et al.* Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J Biol Chem*, 1999, **274** (45): 31996-32000.
- [3] 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-angstrom resolution. *J Bacteriol*, 2006, **189**(9): 3391-3401.
- [4] Li J, Carroll J, Ellar DJ. Crystal structure of insecticide δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 1991, **353**(25): 815-821.
- [5] Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback moth. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(12): 4627-4629.
- [6] Tabashnik BE, Liu YB, Malvar T, H *et al.* Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, **353**(3): 1751-1756.
- [7] Tabashnik BE, Malvar T, Liu YB, *et al.* Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(6): 2839-2844.
- [8] Cao Y. Progress of study on resistance to the action of diamondback moth. *J Changjiang Vegetables*, 2001, **25**(1): 4-6.
曹毅. 小菜蛾抗药性研究进展. 长江蔬菜, 2001, **25**(1): 4-6.
- [9] Thompson B. Stepwise regression and stepwise discriminant analysis need not apply here: A guidelines editorial. *Educ Psychol Meas*, 1995, **55** (4): 525-534.
- [10] Wold S, Bisani ML, Albano C. Principal components and partial least-squares analysis of the geochemistry of volcanic rocks from the aeolian archipelago. *Analytica Chimica Acta*, 1984, **150**(27): 129-143.
- [11] Liang GZ, Li ZL, Zhou Y, *et al.* A new peptide sequences representation technique and support vector machine for quantitative structure retention modeling of peptides in HPLC. *Acta Phys Chim Sin*, 2006, **22**(9): 1052-1055.
梁桂兆, 李志良, 周原, 等. 一种新多肽表征方法及支持向量机用于肽 HPLC 定量结构-保留建模预测. 物理化学学报, 2006, **22**(9): 1052-1055.
- [12] Chen X, Curtiss A, Alcantara E. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ab reduce the irreversible binding of toxin to *manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J Biol Chem*, 1995, **270**(6): 6412-6419.
- [13] Rajamohan F, Alzate O, Cotrill JA, *et al.* Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(25): 14338-14343.



2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。



《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。



《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。



《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>