

雪腐核盘菌 ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素蛋白功能

曹燕霞¹, 耿士帅², 张恒嘉¹, 李文杰¹, 刘健², 杨舒涵³, 王思钧²,
范三红^{2*}, 胡小平^{1*}

1 西北农林科技大学植物保护学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室 农业农村部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

3 西北农林科技大学化学与药学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 真菌中存在类成孔毒素, 但其功能研究鲜有报道。本研究在分析菌核菌丝差异表达基因时发现, 类成孔毒素基因在雪腐核盘菌菌核中高丰度表达; 通过质谱鉴定菌核可溶性蛋白时进一步明确, 类成孔毒素蛋白在菌核中高丰度存在。序列及结构分析表明, 雪腐核盘菌 SnTB1 编码3种类成孔毒素蛋白 SnCry6Aa1、SnCry6Aa2 和 SnCry6Aa3, 三者均包含 ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素保守结构域, 具有 α -螺旋成孔毒素典型的空间结构。利用原核系统表达纯化获得了可溶性 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2, 并对其红细胞裂解活性及线虫和昆虫毒力进行分析。结果显示: 6.25 ng/mL 以上的 SnCry6Aa1 在酸性环境中表现出显著的溶血活性, 而 SnCry6Aa2 则未检测到类似活性; SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 对秀丽隐杆线虫、棉铃虫、斜纹夜蛾、梨小食心虫及韭菜迟眼蕈蚊幼虫均未表现出明显毒性, 但对异型眼蕈蚊幼虫表现出一定的杀虫活性, 校正死亡率分别为 14% 和 17%。本研究首次发现 ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素在核盘菌菌核高丰度存在, 并对其生物活性进行了初步探索, 为相关蛋白的深入研究及利用奠定了基础。

关键词: 雪腐核盘菌; 菌核; ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素蛋白; 红细胞裂解; 杀虫活性

[引用本文]

曹燕霞, 耿士帅, 张恒嘉, 李文杰, 刘健, 杨舒涵, 王思钧, 范三红, 胡小平, 2026. 雪腐核盘菌 ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素蛋白功能. 菌物学报, 45(4): 250263

Cao YX, Geng SS, Zhang HJ, Li WJ, Liu J, Yang SH, Wang SJ, Fan SH, Hu XP, 2026. Functions of ClyA_Cry6Aa-like pore-forming toxin proteins in *Sclerotinia nivalis*. Mycosystema, 45(4): 250263

资助项目: 国家现代农业(小麦)产业技术体系项目(CARS-03-37); 西北农林科技大学作物病虫害监测与治理创新团队项目(XYTD2023-04)

This work was supported by the China Agriculture Research System (CARS-03-37) and the Innovation Team Project for Crop Disease and Pest Monitoring and Management of Northwest A&F University (XYTD2023-04).

*Corresponding authors. E-mails: HU Xiaoping, xphu@nwsuaf.edu.cn; FAN Sanhong, shfan@nwsuaf.edu.cn

Received: 2025-09-02; Accepted: 2025-09-30

Functions of ClyA_Cry6Aa-like pore-forming toxin proteins in *Sclerotinia nivalis*

CAO Yanxia¹, GENG Shishuai², ZHANG Hengjia¹, LI Wenjie¹, LIU Jian², YANG Shuhan³, WANG Sijun², FAN Sanhong^{2*}, HU Xiaoping^{1*}

1 Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

3 College of Chemistry and Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Pore-forming toxins (PFTs) are present in fungi, but their functions remain poorly understood. In this study, analysis of differentially expressed genes between sclerotia and mycelia of *Sclerotinia nivalis* revealed that genes encoding pore-forming toxin proteins were highly expressed in sclerotia. Further proteomic profiling by mass spectrometry confirmed the abundant accumulation of these proteins in sclerotia. Sequence and structural analyses indicated that three pore-forming toxin proteins SnCry6Aa1, SnCry6Aa2, and SnCry6Aa3 were encoded by *S. nivalis* SnTB1. All of which contain the conserved ClyA_Cry6Aa-like PFTs domain and exhibit the characteristic three-dimensional structure of α -PFTs. The recombinant SnCry6Aa1 and SnCry6Aa2 were successfully expressed and purified using a prokaryotic system, and their hemolytic activity and nematodal/insecticidal toxicity were subsequently assessed. The results showed that SnCry6Aa1 exhibited significant hemolytic activity at concentrations over 6.25 ng/mL under acidic conditions, whereas no similar activity was detected for SnCry6Aa2. Neither SnCry6Aa1 nor SnCry6Aa2 showed notable toxicity against *Caenorhabditis elegans*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Grapholita molesta*, or *Bradysia odoriphaga*. However, both displayed low but detectable insecticidal activity against larvae of *Pnyxia scabiei*, with corrected mortality rates of 14% and 17%, respectively. This study is the first to identify the presence of ClyA_Cry6Aa-like PFTs at high abundance in the sclerotia of *S. nivalis* and provides initial insights into their biological roles, laying a foundation for further functional studies and potential applications of these proteins.

Keywords: *Sclerotinia nivalis*; sclerotium; ClyA_Cry6Aa-like pore-forming toxin protein; erythrocyte lysis; insecticidal efficiency

成孔毒素(pore-forming toxins, PFTs)广泛存在于原核生物和真核生物,通过寡聚化作用在细胞膜上形成孔道结构,破坏细胞膜完整性并导致渗透压失衡,最终引发细胞裂解(贺政新等 2009; 宋超和郭顺星 2013)。成孔毒素作为一种经典的武器参与物种间的生存竞争,可调节免疫应答、诱导细胞凋亡和参与生长发育,也在抗肿瘤药物研发等领域展现出应用潜力(Schachter *et al.* 2005; Li *et al.* 2018; García-Montelongo *et al.* 2021; 杨静 2021)。根据成孔过程中二级结构的差异, PFTs 主要分为 α -螺旋成孔毒素(α -PFT)和 β -桶状成孔毒素(β -PFT)两大类(Parker & Feil 2005; 许炼 2018)。

ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素是 α -PFT 的一个

子类,其代表性成员溶血素 E (HlyE, ClyA)最早在大肠杆菌 K-12 菌株中被鉴定(Oscarsson *et al.* 1996),随后在多种革兰氏阴性菌中发现类似成员(Hunt *et al.* 2010)。电镜研究证实 HlyE 可在人工脂质体膜上形成致密的环形孔结构(Wallace *et al.* 2000),并在特定培养条件下表现出溶解哺乳动物红细胞的生物学活性(Murase *et al.* 2012)。苏云金芽孢杆菌中存在该家族的另一个典型成员 Cry6Aa,其通过 α -螺旋穿孔机制发挥毒性作用(Dementiev *et al.* 2016),该蛋白可通过 ASP-1 介导的特殊坏死途径杀伤秀丽隐杆线虫,展现出与传统 Bt 毒素不同的作用模式(Zhang *et al.* 2016)。

真菌中也存在具有溶血活性的成孔毒素,如

曲霉属 *Asp*-溶血素(Ebina *et al.* 1994)和刺芹侧耳溶血素 PlyA 和 PlyB (Sakurai *et al.* 2004), 这些蛋白在致病过程中发挥重要作用。宋超和郭顺星(2013)发现溶血素基因在猪苓菌核发育早期显著上调, 提示其可能参与菌核形态发育的调控过程。但上述溶血素均不属于 ClyA_Cry6Aa-like 家族。真菌中是否存在 ClyA_Cry6Aa-like 家族成孔毒素? 它们具有哪些生物学活性? 均是尚待解决的科学问题。

我们前期研究发现雪腐核盘菌是引起西洋参菌核病的病原真菌, 对其生物学特性进行系统研究(王聪浩 2021), 并完成全基因组测序(Fan *et al.* 2023)。本研究拟结合组学技术明确雪腐核盘菌中 ClyA_Cry6Aa-like 成孔毒素的表达模式, 阐明其序列和结构特征, 并测试其生物学活性, 为该类真菌毒素的功能解析及潜在应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga*、异型眼蕈蚊 *Pnyxia scabiei* Hopkins、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、梨小食心虫幼虫 *Grapholita molesta* 及雪腐核盘菌 SnTB1 菌株由西北农林科技大学植物保护学院作物病害监测与治理实验室提供, 无菌脱纤维羊血购自傅宇生物。

1.2 方法

1.2.1 雪腐核盘菌菌核菌丝转录组分析

采集雪腐核盘菌 SnTB1 培养 5 d 的菌丝和 21 d 的菌核各 3 份, 采用磁珠法富集 mRNA, 经片段化处理 and 反转录合成双链 cDNA, 加接测序接头构建获得测序文库, 利用 BGISEQ-500 平台(华大基因)完成双端测序。过滤后的转录组数据经 HISAT2 软件比对到参考基因组(GCA_029531795.1), 使用 StringTie 软件对转录组数据进行组装重构转录本, 使用 DESeq2 软件分析菌核和菌丝之间的差异表达基因。设置显著性阈值为 $P_{adj} \leq 0.01$, 表达差异标准为 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq$

1。对筛选获得的显著上调基因进行 KEGG 通路富集分析, 探究其在菌核形成过程中的潜在生物学功能。

1.2.2 雪腐核盘菌菌核高丰度蛋白鉴定

参照 Saito (1997)的方法提取 SnTB1 菌核可溶性蛋白。每克菌核加入 50 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl 缓冲液 5 mL, 加入石英砂后冰浴研磨, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 后收集上清(可溶性总蛋白)。SDS-PAGE 分离菌核可溶性蛋白, 切胶回收高丰度条带, 胰蛋白酶胶内酶解目标蛋白为肽片段。酶解后的肽片段先通过 UltiMate 3000 UHPLC 进行分离, 随后通过 Q-Exactive HF 质谱仪进行鉴定(华大基因)。以雪腐核盘菌预测蛋白为参考数据库, 使用 Mascot v2.3.02 进行搜索, 使用 Percolator 对搜索进行预处理及打分, 获得显著性鉴定的谱图和肽段列表(PSM-level FDR \leq 0.01), 并计算每一个蛋白的 iBAQ 值进行定量。

1.2.3 雪腐核盘菌类成孔毒素的生物信息学分析

在 NCBI 搜索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)并下载 SnCry6Aa 蛋白同源序列, 并使用 MEGA v12 进行序列比对和系统发育分析。InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/>)用于分析蛋白序列的保守结构域。AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com>)用于预测并分析 SnCry6Aa 蛋白的三级结构。

1.2.4 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 的表达纯化

以 SnCry6Aa1/2/3 编码序列(KAJ8059757、KAJ8064400、KAJ8062921)为参考设计引物(表 1), 通过 RT-PCR 克隆各自 CDS, 并通过无缝克隆与 AlwNI 线性化的表达载体 pMAL-c6T 融合获得原核表达载体。将融合表达载体转化至大肠杆菌 BL21 菌株, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 分别于 25 °C 或 16 °C 进行过夜诱导表达。收集菌体并超声破碎, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清。使用 Amylose 柱纯化获得融合蛋白, 然后按照酶与底物 1:25 的比例加入 TEV 蛋白酶切除标签, 再经镍柱纯化去除标签获得目标蛋白, 液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.2.5 雪腐核盘菌类成孔毒素溶血活性分析

将无菌脱纤维羊血与 PBS (pH 7.2)缓冲液按 1:7 比例混合, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,

表 1 研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物 Primer	序列 Sequences (5'→3')
pMAL-c6T-SnCry6Aa1-F	GCGATATCGTTCGACGGATCCATGGCTACTTCAGCTGGCG
pMAL-c6T-SnCry6Aa1-R	CCTGCAGGGAATTCGGATCCTCAAGCTTTAGCCGCATTGGC
pMAL-c6T-SnCry6Aa2-F	GAACCTGTACTTCCAGATGAGTGGTATAACTGACGATCCGG
pMAL-c6T-SnCry6Aa2-R	GCCGCCATCAGCATTTATTTCTTCTCAAGTTTCAGTATTAACCTGCCTG
pMAL-c6T-SnCry6Aa3-F	GAACCTGTACTTCCAGATGTCGTTTCGATCCCTCAAGG
pMAL-c6T-SnCry6Aa3-R	GCCGCCATCAGCATCAACATCTTCTCGCGACGAAAAC

继续重复加入相同比例 PBS 缓冲液洗至上清不显示红色为止, 获得红细胞积液。将红细胞积液与不同 pH 的醋酸-醋酸钠或磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液按照 1:9 比例配成 pH 为 4.6–8.0 的 10% 红细胞悬液, 将 500 μ L 不同 pH 的 10% 红细胞悬液、400 μ L 对应 pH 缓冲液及 100 μ L 待测样品混合, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 1 h, 于 2 500 r/min 离心 5 min 后观察溶血情况。阳性对照用水代替不同 pH 的缓冲溶液, BSA 为对照蛋白。参照章宝娟(2007)的方法判断结果: 上清呈红色表明溶血; 沉淀完整且上清无色说明无溶血; 出现棕红色絮状沉淀且振荡不散则为凝集。

1.2.6 雪腐核盘菌类成孔毒素对线虫毒力分析

参照 Bischof *et al.* (2006) 的报道, 将含空载体 pMAL-c6T 及重组质粒 pMAL-c6T-SnCry6Aa 的大肠杆菌 HT115 分别接种于含 50 μ g/mL 氨基青霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日转接至新鲜培养基继续培养 1 h, 加入 IPTG 于 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 3 h。测定 OD_{600} 后统一调整菌液浓度至 2.0 左右。分别取 30 μ L 空载体对照及 3 种毒素表达菌液涂布于 60 mm ENG 平板, 25 $^{\circ}$ C 过夜培养。随后将约 20 条同步化 L4 期线虫转移至各平板, 20 $^{\circ}$ C 条件下培养, 并于 96 h 内定期观察线虫存活情况, 统计存活率。

1.2.7 雪腐核盘菌类成孔毒素对昆虫毒力分析

利用混合饲料法, 将一定剂量的 SnCry6Aa 蛋白与人工饲料充分混匀。将 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 蛋白设置 0、200 μ g/g 这 2 个浓度梯度。每个处理设 3 个重复, 每个重复约 20 头试虫。以溶解蛋白的缓冲液和 BSA 为对照, 在 1–8 d 观察棉铃虫等 5 种害虫的死亡率, 通过体壁溶解等特征判定死亡情况, 评估蛋白毒力。

死亡率(%)=(处理死亡总虫数/处理总虫数) \times 100。

校正死亡率(%)=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率) \times 100。

1.3 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行绘图, 并利用 SPSS Statistics 进行统计分析, 数据以 mean \pm SD 表示, $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 雪腐核盘菌菌核菌丝特异表达基因筛选

2.1.1 菌核菌丝基因差异表达分析

菌核是核盘菌发育的特殊阶段及休眠结构, 为了筛选菌核特异表达基因, 本研究利用 RNA-seq 技术对菌核菌丝两种发育状态下的转录组展开分析(图 1)。共筛选出 4 407 个差异表达基因, 其中 2 463 个基因在菌核中上调表达, 1 944 个基因在菌核中下调表达。KEGG 通路富集结果显示, 不同环境中的微生物代谢(microbial metabolism in diverse environments)、芳香族化合物降解(degradation of aromatic compounds)、半乳糖代谢(galactose metabolism)、黑色素生成(melanogenesis)和甜菜碱生物合成(betalain biosynthesis)等相关通路基因在菌核中上调表达。菌核环境适应性强, 通过降解复杂有机物(如芳香烃、氯代烷)和利用多样碳源在恶劣环境中存活。次级代谢(如甜菜碱、黑色素)相关基因上调表达则可增强其致病性或抗逆性。

2.1.2 菌核超量表达基因及功能注释

为了筛选出菌核中超量表达基因, 我们进一步将 TPM 阈值提高 300 以上, 将 \log_2 FC 阈值提高到 7 以上, 筛选结果见表 2。其中 3 种类成孔毒素 E 蛋白和蓖麻毒素型 β 三叶凝集素等毒素蛋白编码基因在菌核中超量表达, 这些蛋白是否有助于保护休眠期菌核免受土壤害虫侵害需要

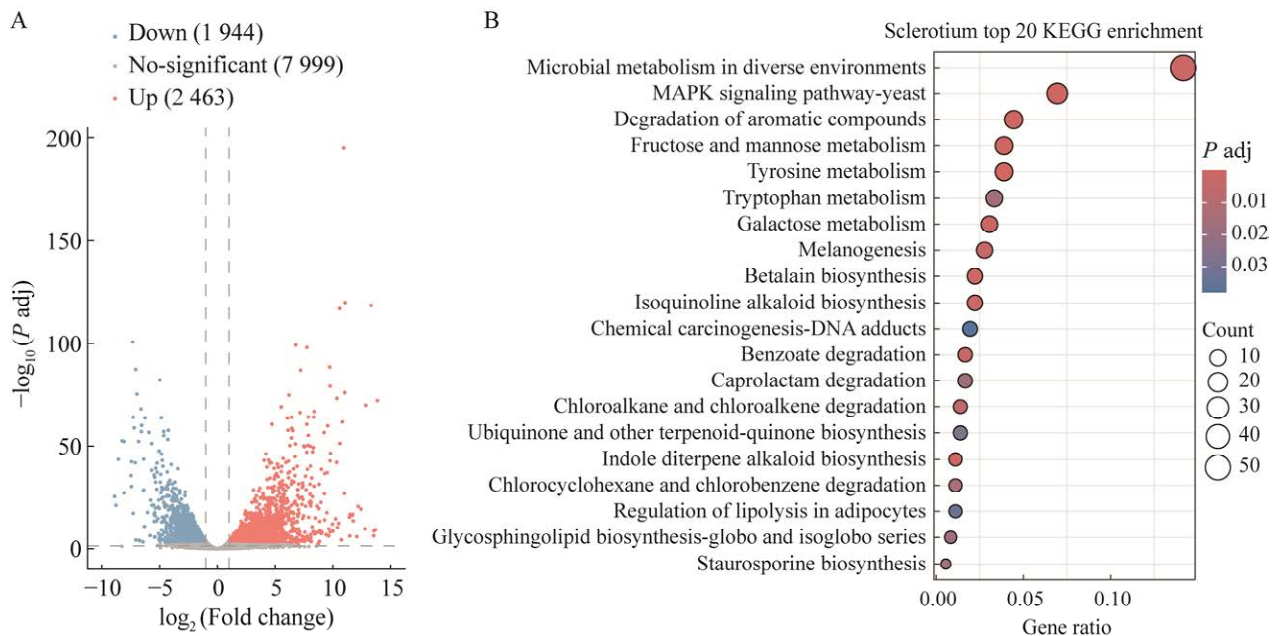


图 1 雪腐核盘菌菌核菌丝转录组分析 A: 菌核菌丝差异基因火山图; B: 菌核上调基因 KEGG 聚类分析

Fig. 1 Transcriptomic analysis of sclerotia and mycelia in *Sclerotinia nivalis*. A: Volcano plot of differentially expressed genes between sclerotia and mycelia; B: KEGG enrichment analysis of upregulated genes in sclerotia.

表 2 菌核表达显著上调基因功能注释

Table 2 Functional annotation of significantly upregulated genes in sclerotia

基因编号 Gene ID	TPM (菌核) TPM (Sclerotium)	TPM (菌丝) TPM (Hypha)	log ₂ 倍数 变化 log ₂ FC	校正 P 值 P adj	功能 Function
<i>SnTb1_005973</i>	2 977.38	0.71	11.06	1.12E-120	致病有关胞外膜蛋白 Virulence-associated extracellular membrane protein
<i>SnTb1_000527</i>	1 598.48	0.61	10.94	8.95E-196	磷脂酰丝氨酸脱羧酶 Phosphatidylserine decarboxylase
<i>SnTb1_006744</i>	1 095.97	0.06	13.30	2.75E-119	类成孔毒素 Pore-forming toxin-like protein
<i>SnTb1_011404</i>	1 288.80	0.57	10.60	8.36E-118	类成孔毒素 Pore-forming toxin-like protein
<i>SnTb1_008171</i>	723.02	2.29	7.76	1.03E-98	类成孔毒素 Pore-forming toxin-like protein
<i>SnTb1_003450</i>	1 443.23	1.03	9.76	8.47E-80	未知 Unknown
<i>SnTb1_000525</i>	1 861.74	0.70	11.03	1.35E-76	肽酶二聚结构域 Peptidase dimerisation domain
<i>SnTb1_006429</i>	596.80	0.02	13.85	1.23E-72	类黏附蛋白 Adhesin-like protein
<i>SnTb1_005038</i>	3 270.00	0.42	12.85	2.18E-70	发育特异性蛋白 Ssp2 Development-specific protein Ssp2
<i>SnTb1_005909</i>	322.66	1.50	7.16	8.74E-67	富含脯氨酸的细胞壁蛋白 Proline-rich cell wall protein
<i>SnTb1_012547</i>	918.42	0.97	9.24	3.56E-57	果胶酸裂解酶超家族蛋白 Pectate lyase superfamily protein
<i>SnTb1_008710</i>	567.49	0.48	9.79	3.00E-47	富半胱氨酸真菌跨膜蛋白 Cysteine-rich fungal transmembrane protein
<i>SnTb1_008805</i>	686.14	1.67	8.07	5.16E-41	糖转运蛋白 Sugar transporters
<i>SnTb1_002061</i>	3 241.40	11.55	7.38	8.28E-33	蓖麻毒素型 β 三叶凝集素 Ricin-type beta-trefoil lectin

后续实验验证。其次编码类黏附蛋白、发育特异性蛋白 Ssp2、富含脯氨酸的细胞壁蛋白、富半胱氨酸真菌跨膜蛋白等结构性蛋白的基因在菌核中超量表达，它们可能参与菌核的形成和发育。另外编码磷脂酰丝氨酸脱羧酶、肽酶、果胶裂解酶、糖转运蛋白等代谢相关基因在菌核中高表达，可能参与菌核特异代谢和物质转化。

2.2 雪腐核盘菌菌核高丰度蛋白鉴定

雪腐核盘菌菌核可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析结果见图 2，其中有 3 个条带的丰度显著高于其他条带，B1 条带的分子量约为 43 kDa，B2 和 B3 条带的分子量约为 36 kDa 和 34 kDa。为了明确 3 个条带对应的蛋白，我们对 3 个条带分别进行了回收和质谱鉴定(表 3)。基于表示相对丰度的 iBAQ 数值可以判断，B1 条带对应于蛋白 SnTb1_011404 和 SnTb1_006744，两种蛋白均编码类成孔毒素；B2 条带对应于蛋白 SnTb1_005038，该蛋白对应于油菜核盘菌中参与发育的 Ssp2 蛋白；B3 条带对应于蛋白 SnTb1_010643，该蛋白对应于油菜核盘菌中参与发育的 Ssp1 蛋白。该结果和转录组结果一致表明，类成孔毒素蛋白和发育特异蛋白在菌核中超量表达。

2.3 类成孔毒素的序列及结构特征

转录组数据显示 *SnTb1_011404*、*SnTb1_006744* 和 *SnTb1_008171* 这 3 个编码类成孔毒素蛋白的基因在菌核中超量表达，其编码蛋白依据功能分别命名为 SnCry6Aa1、SnCry6Aa2 和 SnCry6Aa3。菌核可溶性高丰度蛋白分析结果显

示 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 在菌核中高丰度存在。同源搜索结果显示，三者的同源序列在部分细菌和真菌中有分布，其中核盘菌属中均有分布。系统发育分析结果见图 3A，SnCry6Aa1 与 SnCry6Aa2 具有较高的序列同源性，在进化树上聚为同一分支，而 SnCry6Aa3 则单独形成一个分支。利用 InterProScan 对保守结构域进行分析，结果显示三者均包含 ClyA_Cry6Aa-like 结构域，均归属于细菌溶血素超家族(图 3B)。通过 AlphaFold3 预测获得三者的三维结构(图 3C)，三者的空间结构高度相似，且与来自苏云金杆菌的成孔毒素 Cry6Aa 相似(Dementiev *et al.* 2016)。

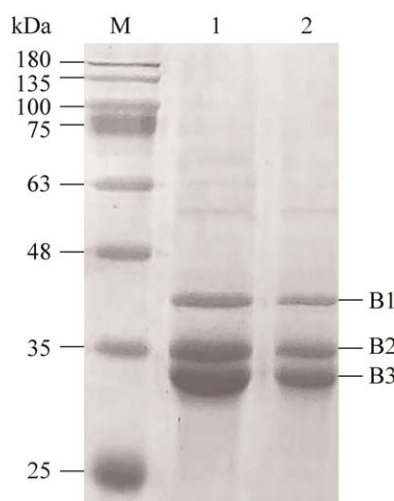


图 2 雪腐核盘菌菌核蛋白 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白 Marker; 1: 点样量 10 μ L; 2: 点样量 5 μ L
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of sclerotial proteins from *Sclerotinia nivalis*. M: Protein marker; 1: 10 μ L; 2: 5 μ L.

表 3 高丰度蛋白条带质谱鉴定结果

Table 3 Identification results of high abundance protein bands by mass spectrometry

条带	蛋白编号	分子量	iBAQ 数值	功能
Band	Protein ID	Molecular weight/kDa	iBAQ value	Function
B1	SnTb1_011404	43.04	5.21E+09	类成孔毒素 Pore-forming toxin-like protein
	SnTb1_006744	43.37	1.11E+09	类成孔毒素 Pore-forming toxin-like protein
	SnTb1_009877	43.00	2.79E+08	甘露醇-1-磷酸 5-脱氢酶 Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
	SnTb1_001633	43.76	2.30E+07	半胱氨酸脱硫酶样蛋白 Cysteine desulfurase-like protein
B2	SnTb1_005038	36.51	1.92E+09	发育特异性蛋白 Ssp2 Development-specific protein Ssp2
	SnTb1_009444	36.75	8.29E+08	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
B3	SnTb1_010643	34.88	3.39E+09	发育特异性蛋白 Ssp1 Development-specific protein Ssp1
	SnTb1_002438	35.20	1.98E+08	转醛醇酶 Transaldolase
	SnTb1_003941	34.52	1.19E+07	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase

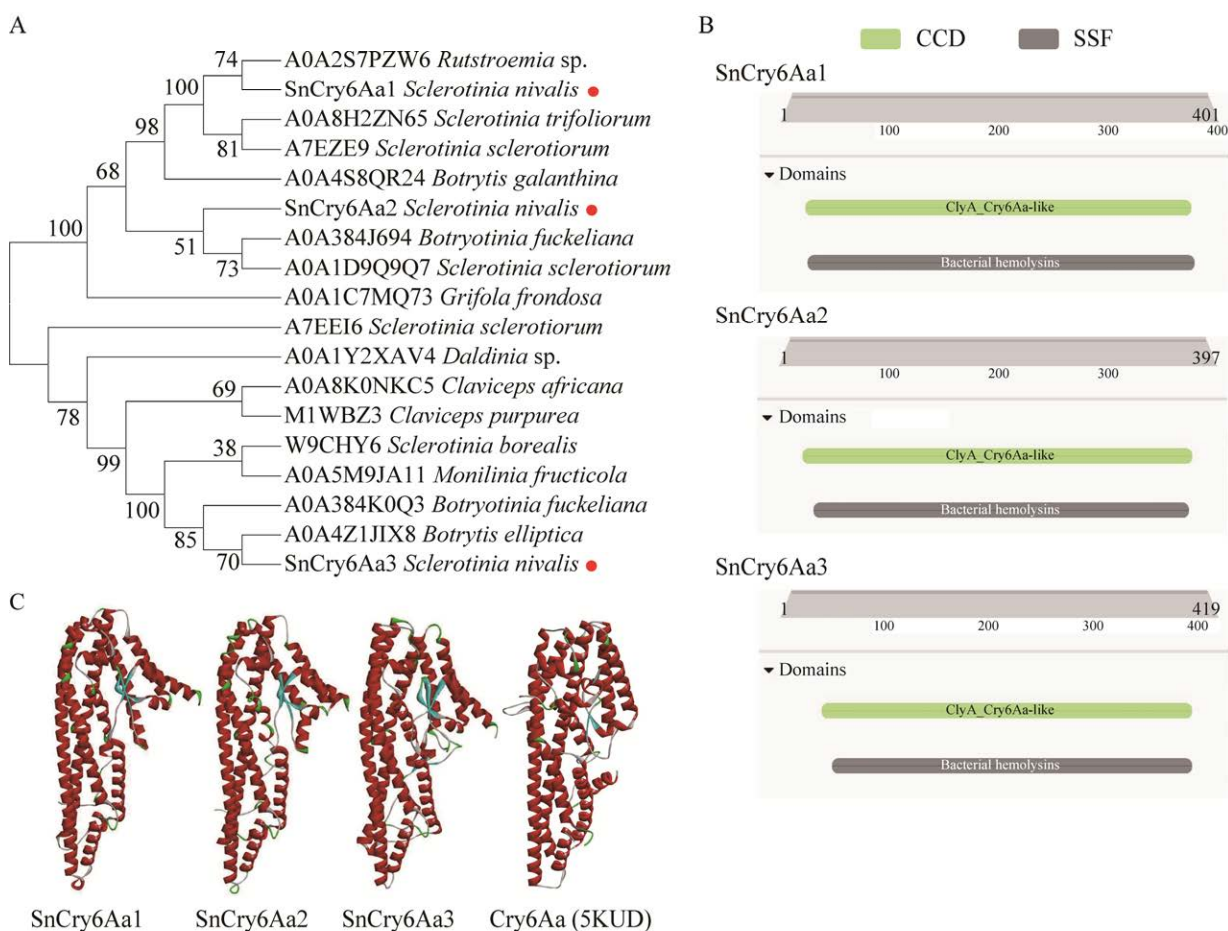


图 3 类成孔毒素 SnCry6Aa 的生物信息学分析 A: SnCry6Aa 系统发育分析; B: SnCry6Aa 蛋白结构域分析; C: SnCry6Aa 蛋白三维结构预测

Fig. 3 Bioinformatics analysis of pore-forming toxin-like SnCry6Aa proteins. A: Phylogenetic analysis of SnCry6Aa proteins; B: Domain analysis of SnCry6Aa proteins; C: The predicted three-dimensional structure of SnCry6Aa proteins.

2.4 类成孔毒素蛋白表达和纯化

为了获得可溶性的 SnCry6Aa, 本研究采用了 MBP 融合表达系统, 并试图通过诱导表达温度的改变提高蛋白的可溶性。将重组质粒 pMAL-c6T-SnCry6Aa1/2 导入 BL21 菌株, 并分别在 16 °C 和 25 °C 进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果显示(图 4A, 4B), 融合蛋白 MBP-SnCry6Aa1 和 MBP-SnCry6Aa2 均主要以可溶性形式存在, 且 16 °C 的溶解性略高于 25 °C。通过淀粉亲和层析纯化后, 在电泳图谱中可观察到明显的目标蛋白条带(图 4C, 第 1 和 6 泳道)。随后采用 TEV 蛋白酶处理切除 MBP 标签, 并通过镍柱纯化去除标签, 最终获得 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 蛋白(图 4C, 第 10 和 5 泳道)。

2.5 类成孔毒素蛋白体外活力测定

2.5.1 SnCry6Aa1/2 的溶血活力

溶血是细菌溶血素家族成员的典型特征, 由于 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 属于细菌溶血素超家族, 因而本研究以无菌脱纤维羊血为材料, 测试了两者在不同 pH 下的溶血活性。结果显示, SnCry6Aa1 仅在 pH 4.6–5.0 范围内表现出明显的溶血活性, 而 SnCry6Aa2 在所测的整个 pH 范围内均未显示任何溶血现象(图 5A)。为了进一步分析 SnCry6Aa1 发生溶血所需的蛋白浓度, 将 SnCry6Aa1 进行逐级稀释后测试其在酸性条件下的溶血能力, 结果显示, 6.25 ng/mL 以上的 SnCry6Aa1 呈现出明显的红细胞裂解能力(图 5B)。

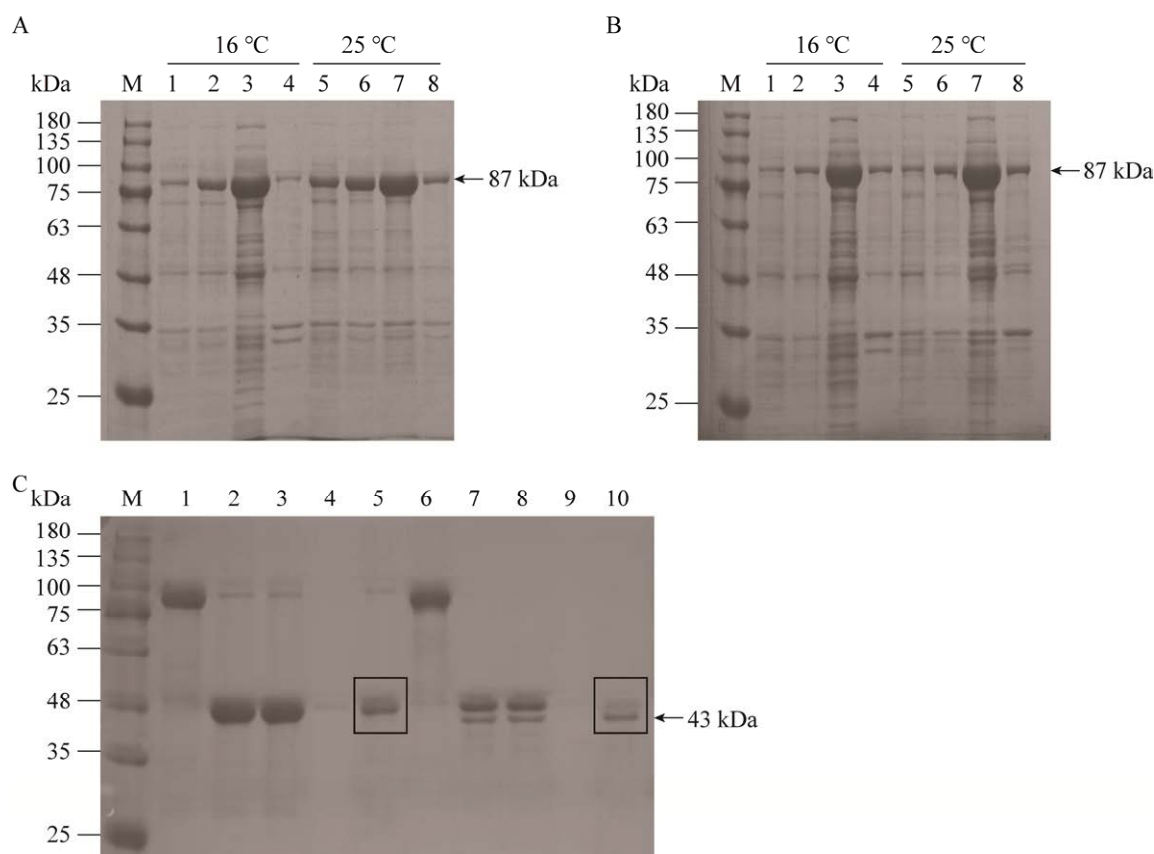


图4 类成孔毒素蛋白 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析 A: 类成孔毒素蛋白 MBP-SnCry6Aa1 的表达及 SDS-PAGE 分析, M: 蛋白 Marker, 1 和 5 为诱导前, 2 和 6 为诱导后, 3 和 7 为上清, 4 和 8 为沉淀; B: 类成孔毒素蛋白 MBP-SnCry6Aa2 的表达及 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 Marker, 1 和 5 为诱导前, 2 和 6 为诱导后, 3 和 7 为上清, 4 和 8 为沉淀; C: 类成孔毒素蛋白 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 的纯化及 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 Marker, 1 和 6 分别为 MBP-SnCry6Aa2 和 MBP-SnCry6Aa1, 2 和 7 分别为切割后得到的 MBP 标签与 SnCry6Aa2 和 SnCry6Aa1 的总上清, 3 和 8 分别为离心后得到的上清, 4 和 9 分别为离心后得到的沉淀, 5 和 10 分别为纯化后得到的 SnCry6Aa2 和 SnCry6Aa1; 箭头表示融合蛋白的位置, 方框表示去除标签后的目标蛋白的位置

Fig. 4 Expression, purification and SDS-PAGE analysis of the pore-forming toxin-like proteins SnCry6Aa1 and SnCry6Aa2. A: Expression and SDS-PAGE analysis of the pore-forming toxin-like protein MBP-SnCry6Aa1, M: Protein marker, lanes 1 and 5: Before induction, lanes 2 and 6: After induction, lanes 3 and 7: Supernatant, lanes 4 and 8: Precipitate; B: Expression and SDS-PAGE analysis of the pore-forming toxin-like protein MBP-SnCry6Aa2, M: Protein marker, lanes 1 and 5: Before induction, lanes 2 and 6: After induction, lanes 3 and 7: Supernatant, lanes 4 and 8: Precipitate; C: Purification and SDS-PAGE analysis of the pore-forming toxin-like proteins SnCry6Aa1 and SnCry6Aa2, M: Protein marker, lanes 1 and 6: MBP-SnCry6Aa2 and MBP-SnCry6Aa1, respectively; lanes 2 and 7: Total supernatant containing the cleaved MBP tag and SnCry6Aa2/SnCry6Aa1, lanes 3 and 8: Supernatant after centrifugation, lanes 4 and 9: Precipitate after centrifugation, lanes 5 and 10: Purified SnCry6Aa2 and SnCry6Aa1, respectively. The arrow indicates the position of the fusion proteins, and the box indicates the position of the target proteins after the tag is removed.

2.5.2 SnCry6Aa1/2/3 对线虫毒力分析

为了明确类成孔毒素蛋白 SnCry6Aa 对线虫是否具有毒力, 将重组质粒 pMAL-c6T-SnCry6Aa1/2/3 (实验组)和空载体 pMAL-c6T (对照组)分别导入大肠杆菌 HT115, 并进行诱导表达, SDS-PAGE 分析结果显示菌株中均已包含目标蛋白(图 6A)。使用包含不同目标蛋白的 HT115 饲喂

线虫, 体型大小、体色等表观特征也无明显区别(图 6B), 且对照组和实验组的线虫存活率无明显差异(图 6C)。

2.5.3 SnCry6Aa1/2 对昆虫毒力分析

通过饲喂实验评估 SnCry6Aa1/2 蛋白对棉铃虫、斜纹夜蛾、梨小食心虫及韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性发现, 在摄入含毒素蛋白饲

料后, 实验组与对照组的存活率均在 90% 以上, 未表现出显著差异(图 7A-7D), 表明 SnCry6Aa1/2 蛋白对这些昆虫不具有毒性。但异型眼蕈蚊对该蛋白表现出一定敏感性。经

SnCry6Aa1 处理的校正死亡率为 14%; 而 SnCry6Aa2 处理的校正死亡率为 17% (图 7E), 表明 SnCry6Aa1/2 蛋白对异型眼蕈蚊有一定毒杀作用。

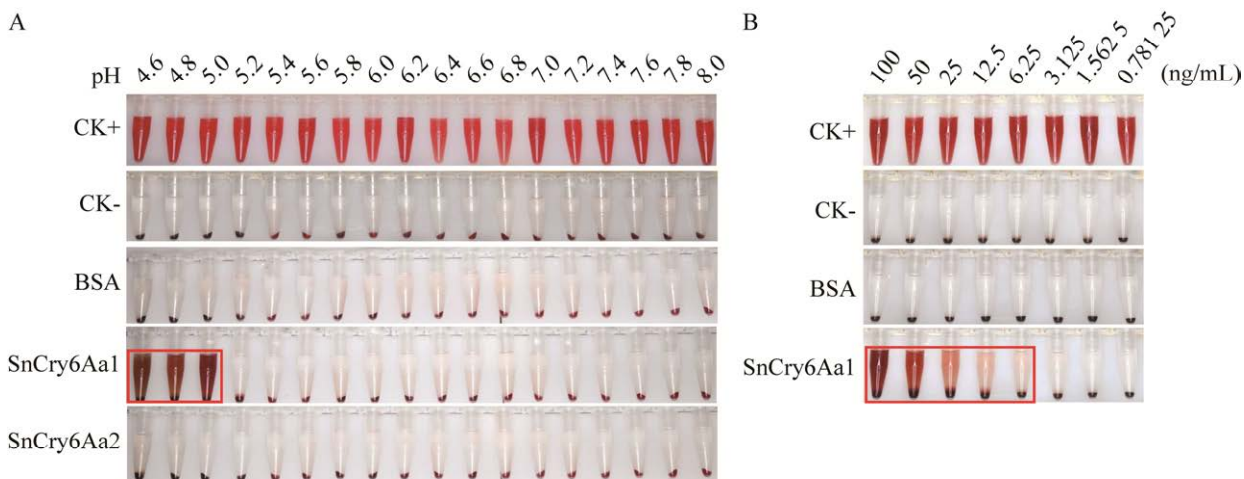


图 5 SnCry6Aa 蛋白的溶血结果 A: 不同 pH 条件下的 SnCry6Aa 蛋白的溶血结果; B: 酸性条件下(pH 5.0)不同浓度 SnCry6Aa1 蛋白的溶血结果

Fig. 5 Hemolysis results of SnCry6Aa protein. A: Hemolysis results of SnCry6Aa protein under different pH conditions; B: Hemolysis results of different concentrations of SnCry6Aa1 protein under acidic conditions (pH 5.0).

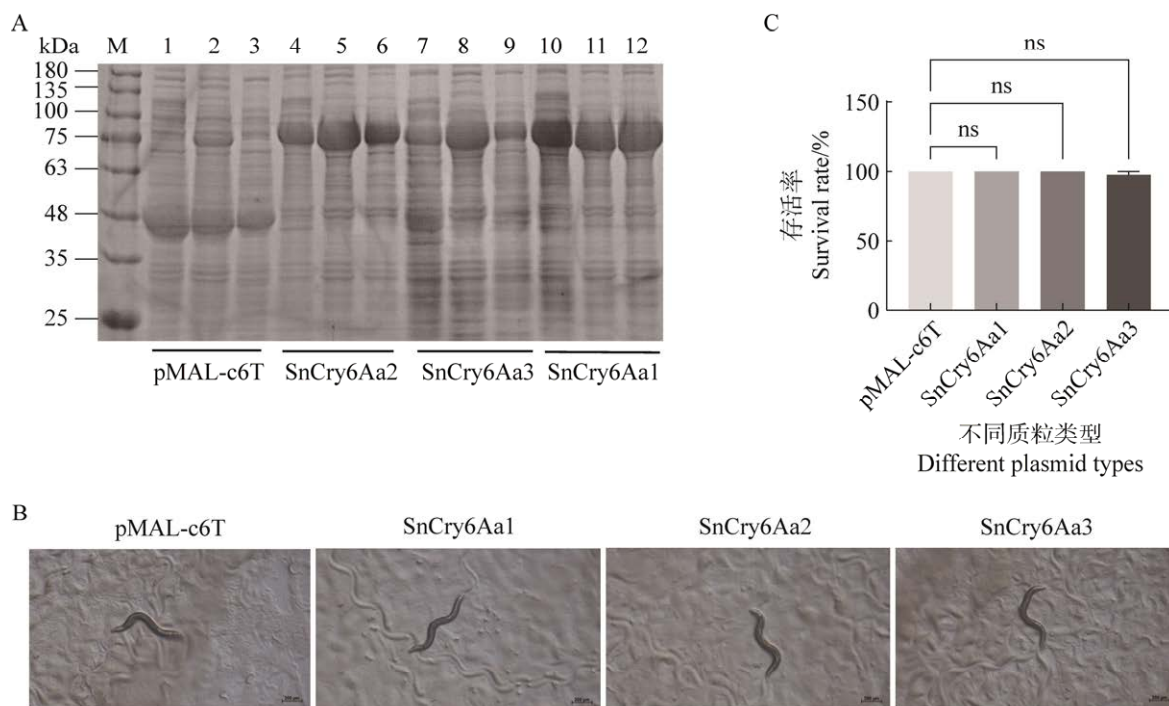


图 6 SnCry6Aa 蛋白对线虫毒力分析 A: 携带不同质粒的大肠杆菌 HT115 菌株中已包含目标蛋白; B: 饲养 96 h 后线虫的存活情况; C: 饲养 96 h 后线虫的存活率; ns: 差异不显著

Fig. 6 Analysis of nematode virulence of SnCry6Aa protein. A: *Escherichia coli* HT115 strains carrying different plasmids all contain the target protein; B: Survival of nematodes after 96 h feeding; C: Survival rate of nematodes after 96 h feeding; ns: No significant difference.

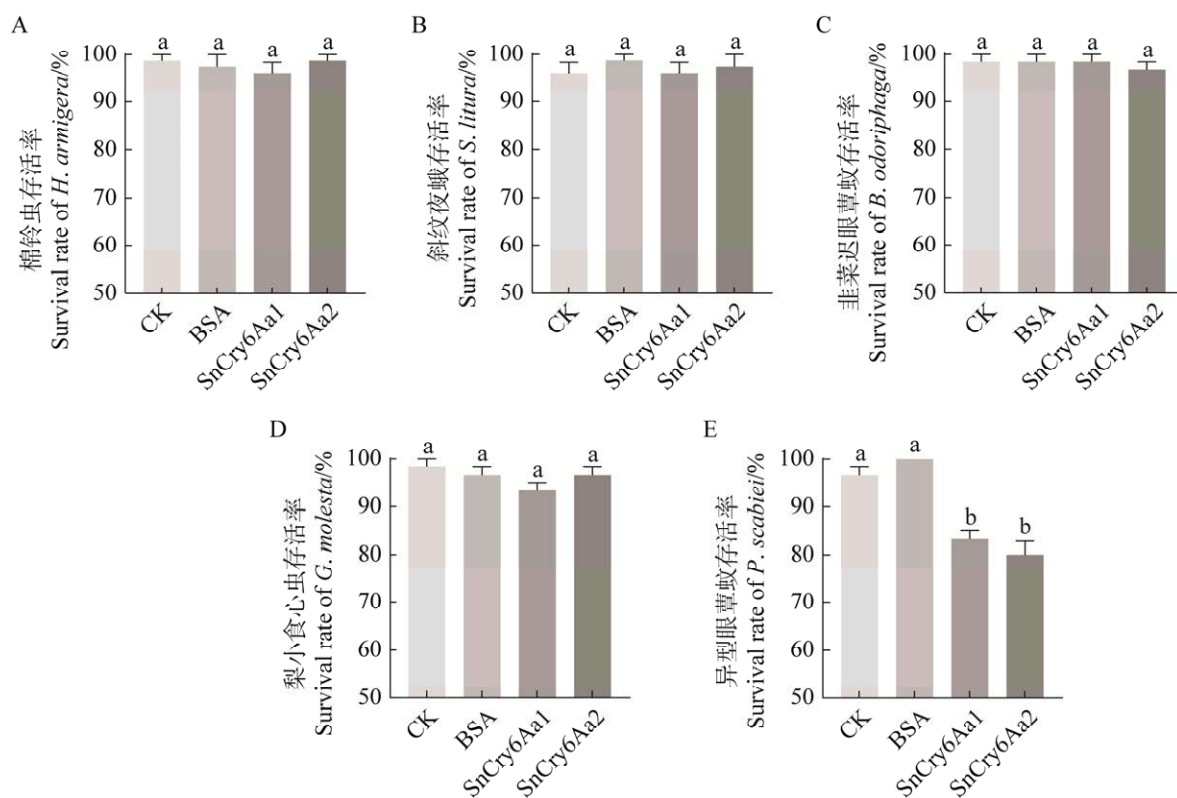


图 7 不同昆虫幼虫在喂食含有类成孔毒素蛋白饲料后的存活率 A: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 喂食类成孔毒素蛋白饲料后 8 d 存活率; B: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 喂食类成孔毒素蛋白饲料后 8 d 存活率; C: 非菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 喂食类成孔毒素蛋白饲料后 7 d 存活率; D: 梨小食心虫 *Grapholita molesta* 喂食类成孔毒素蛋白饲料后 7 d 存活率; E: 异型眼蕈蚊 *Pnyxia scabiei* 喂食类成孔毒素蛋白饲料后 2 d 存活率; CK: 溶蛋白 buffer; SnCry6Aa1、SnCry6Aa2 和 BSA: 200 $\mu\text{g/g}$; 不同小写字母表示存在显著性差异($P<0.05$)

Fig. 7 Survival rates of different insect larvae after feeding on diets containing pore-forming toxin-like proteins. A: Survival rate of *Helicoverpa armigera* after 8 days of feeding on pore-forming toxin-like protein diet; B: Survival rate of *Spodoptera litura* after 8 days of feeding on pore-forming toxin-like protein diet; C: Survival rate of *Bradysia odoriphaga* after 7 days of feeding on pore-forming toxin-like protein diet; D: Survival rate of *Grapholita molesta* after 7 days of feeding on pore-forming toxin-like protein diet; E: Survival rate of *Pnyxia scabiei* after 2 days of feeding on pore-forming toxin-like protein diet. CK: Protein solubilization buffer; SnCry6Aa1, SnCry6Aa2 and BSA: 200 $\mu\text{g/g}$; Different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$).

3 讨论

成孔毒素在原核和真核生物中均有分布。原核生物通过分泌成孔毒素,作用于宿主或其他微生物,从而在资源有限的环境中占据优势,促进自身的快速增殖与生存竞争(Yang *et al.* 2021; 杨静 2021)。成孔毒素在真核系统中作用多样,机制复杂,可诱发免疫与线粒体损伤,并参与神经病变(Hassan *et al.* 2021; Shwe *et al.* 2021; 杨静 2021)。本研究通过 RNA-seq 技术在雪腐核盘菌中鉴定出编码成孔毒素的基因,类成孔毒素基因在雪腐核盘菌 SnTB1 菌核中高丰度表达,通过

质谱鉴定菌核可溶性蛋白时进一步明确在菌核中高丰度存在。菌核形成阶段特异性高表达的基因主要参与细胞壁生物合成及应激化合物生物合成,这种表达模式可能与其增强环境抗性密切相关。溶血毒素相关基因的显著上调表达可能形成了一种保护机制,使菌核能够有效抵御土壤生物的危害(马碧书等 2018)。

序列特征及结构域分析表明,成孔毒素蛋白 SnCry6Aa1、SnCry6Aa2 和 SnCry6Aa3,具有 α -螺旋成孔毒素典型的空空间结构,包含 ClyA_Cry6Aa-like 保守结构域,归属于细菌溶血素超家族。为了探究其生物学功能,本研究利用原核

系统实现了 SnCry6Aa1 和 SnCry6Aa2 的可溶性表达。研究表明, ClyA 家族成员可以裂解哺乳动物红细胞(Murase *et al.* 2012)。同样, SnCry6Aa1 也显示出显著的膜穿孔活性,在酸性条件下可以裂解羊的红细胞,这一特性与病原菌适宜在酸性条件下生长较为一致(王聪浩 2021)。苏云金芽孢杆菌产生成孔毒素 Cry6Aa, Cry6Aa 通过 α -螺旋穿孔机制发挥毒性作用(Dementiev *et al.* 2016),该蛋白可通过 ASP-1 介导的特殊坏死途径杀伤线虫(Zhang *et al.* 2016)。研究发现,与苏云金芽孢杆菌 Cry6Aa 蛋白不同,来自雪腐核盘菌的 SnCry6Aa 对秀丽隐杆线虫没有表现出显著的毒杀作用,两种成孔毒素虽然结构类似,可能具有不同的靶标和作用机制(余子全 2008)。刘臣等(2017)研究表明, Cry 蛋白对测试的 6 种鳞翅目昆虫具有显著的毒杀作用, Cry2Ab4 对棉铃虫和斜纹夜蛾毒力显著。SnCry6Aa 蛋白对昆虫毒性测试结果显示,虽然该蛋白对棉铃虫、斜纹夜蛾等多数测试昆虫幼虫无毒性,但对异型眼蕈蚊幼虫却显示出特异性的低毒活性。异型眼蕈蚊是西洋参田间发现的一种昆虫, SnCry6Aa1/2 对异型眼蕈蚊的这种选择性毒性可能源于二者在西洋参病害中长期协同进化形成的特殊互作关系。不同昆虫、不同发育阶段、不同生理条件下肠道 pH 值有所差异,肠道 pH 是影响杀虫效果的重要因素,可能是造成饲喂结果显示毒杀效果不强的原因。本研究结果表明 SnCry6Aa1 在弱酸条件下有一定溶血活性,后续可选择一些肠道 pH 酸性的昆虫进行更广泛的毒力测试。成孔毒素研究多集中于细菌与宿主的互作,真菌领域较少。解析雪腐核盘菌中此类蛋白的结构与功能,将为其开发利用奠定基础。

作者贡献

曹燕霞: 实验、数据分析处理与论文撰写; 耿士帅、张恒嘉、李文杰、刘健、杨舒涵、王思钧: 实验; 范三红: 研究指导、试验核验与论文修改。胡小平: 经费获取, 研究方案设计、研究指导及监督、论文修改。

利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Bischof LJ, Huffman DL, Aroian RV, 2006. Assays for toxicity studies in *C. elegans* with Bt crystal proteins. *Methods in Molecular Biology*, 351: 139-154
- Dementiev A, Board J, Sitaram A, Hey T, Kelker MS, Xu X, Hu Y, Vidal-Quist C, Chikwana V, Griffin S, McCaskill D, Wang NX, Hung SC, Chan MK, Lee MM, Hughes J, Wegener A, Aroian RV, Narva KE, Berry C, 2016. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. *BMC Biology*, 14(1): 71
- Ebina K, Sakagami H, Yokota K, Kondo H, 1994. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219(1): 148-150
- Fan S, Wang C, Jiang J, Geng S, Xu X, Shang W, Hu X, 2023. Genome resource of *Sclerotinia nivalis* strain SnTB1, a plant pathogen isolated from American ginseng. *PhytoFrontiers*TM, 3(4): 920-923
- García-Montelongo M, González-Villarreal SE, del Rincón-Castro MaC, Ibarra JE, 2021. Use of RNAi as a preliminary tool for screening putative receptors of nematocidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 203(4): 1649-1656
- Hassan AA, Youssef MA, Elashtokhy MMA, Ismail IM, Aldayel M, Afkar E, 2021. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains native of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1): 6
- He ZX, Zheng YL, Jiang YQ, 2009. Recent advance on the pore forming toxins. *Advances in Modern Biomedicine*, 9(15): 2941-2943 (in Chinese)
- Hunt S, Green J, Artymiuk PJ, 2010. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 677: 116-26
- Li J, Shalev-Benami M, Sando R, Jiang X, Kibrom A, Wang J, Leon K, Katanski C, Nazarko O, Lu YC, Südhof TC, Skiniotis G, Araç D, 2018. Structural basis for teneurin function in circuit-wiring: a toxin motif at the synapse. *Cell*, 173(3): 735-748
- Liu C, Chen L, Wang BJ, Zhao M, Liang GM, Guo YY, 2017. Insecticidal activity of four different Bt toxins against six important lepidopteran pests. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(6): 774-779 (in Chinese)

- Ma BS, Ma LN, Lin XA, Yan J, 2018. Advance in toxic and pathogenic mechanisms of bacterial hemolysins. Chinese Journal of Zoonoses, 34(2): 175-181 (in Chinese)
- Murase K, Ooka T, Iguchi A, Ogura Y, Nakayama K, Asadulghani M, Islam MR, Hiyoshi H, Kodama T, Beutin L, Hayashi T, 2012. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. Microbiology, 158(3): 746-758
- Oscarsson J, Mizunoe Y, Uhlin BE, Haydon DJ, 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. Molecular Microbiology, 20(1): 191-199
- Parker MW, Feil SC, 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 88(1): 91-142
- Saito I, 1997. *Sclerotinia nivalis*, sp. nov., the pathogen of snow mold of herbaceous dicots in northern Japan. Mycoscience, 38(2): 227-236
- Sakurai N, Kaneko J, Kamio Y, Tomita T, 2004. Cloning, expression, and pore-forming properties of mature and precursor forms of pleurotolysin, a sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1679(1): 65-73
- Schachter EN, Zuskin E, Goswami S, Castranova V, Arumugam U, Whitmer M, Siegel P, Chiarelli A, Fainberg J, 2005. Pharmacological study of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. Lung, 183(1): 63-67
- Shwe SM, Wang Y, Gao Z, Li X, Liu S, Bai S, Zhang T, He K, Wang Z, 2021. Toxicity of Cry1-Class, Cry2Aa, and Vip3Aa19 Bt proteins and their interactions against yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Invertebrate Pathology, 178: 107507
- Song C, Guo SX, 2013. Molecular cloning and characterization of a hemolysin gene from medicinal fungus *Polyporus umbellatus*. Mycosystema, 32(4): 690-697 (in Chinese)
- Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, Artymiuk PJ, 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. Cell, 100(2): 265-276
- Wang CH, 2021. The etiology and integrated control of white rot of american ginseng caused by *Sclerotinia nivalis*. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling. 1-123 (in Chinese)
- Xu L, 2018. Research on proteolysis and oligomerization mechanism of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. PhD Dissertation, Xiamen University, Xiamen. 1-120 (in Chinese)
- Yang J, 2021. Study on the insecticidal mechanism of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2A series protein. MS Thesis, Xiamen University, Xiamen. 1-67 (in Chinese)
- Yang Y, Huang X, Yuan W, Xiang Y, Guo X, Wei W, Soberón M, Bravo A, Liu K, 2021. *Bacillus thuringiensis* cry toxin triggers autophagy activity that may enhance cell death. Pesticide Biochemistry and Physiology, 171: 104728
- Yu ZQ, 2008. Negative regulation of *Bacillus thuringiensis* nematocidal *Cry6Aa* gene expression, the ingestion mode of nematocidal crystal protein by root-knot nematode. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-120 (in Chinese)
- Zhang BJ, 2007. Research progress on hemolysis testing methods for traditional Chinese medicine injections. Strait Pharmaceutical Journal, 19(8): 79-81 (in Chinese)
- Zhang F, Peng D, Cheng C, Zhou W, Ju S, Wan D, Yu Z, Shi J, Deng Y, Wang F, Ye X, Hu Z, Lin J, Ruan L, Sun M, 2016. *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry6Aa triggers *Caenorhabditis elegans* necrosis pathway mediated by aspartic protease (ASP-1). PLoS Pathogens, 12(1): e1005389

[附中文参考文献]

- 贺政新, 郑玉玲, 姜永强, 2009. 细菌成孔毒素研究进展. 现代生物医学进展, 9(15): 2941-2943
- 刘臣, 陈琳, 王冰洁, 赵曼, 梁革梅, 郭予元, 2017. 四种 Bt 蛋白对六种重要鳞翅目害虫的杀虫活性评价. 中国生物防治学报, 33(6): 774-779
- 马碧书, 马丽娜, 林旭媛, 严杰, 2018. 细菌溶血素毒性和致病机制研究进展. 中国人兽共患病学报, 34(2): 175-181
- 宋超, 郭顺星, 2013. 药用真菌猪苓溶血素基因克隆和序列分析. 菌物学报, 32(4): 690-697
- 王聪浩, 2021. 西洋参菌核病病原学及综合防治技术研究. 西北农林科技大学博士论文, 杨凌. 1-123
- 许炼, 2018. 苏云金芽孢杆菌毒素 Cry2Ab 的活化及寡聚化机制研究. 厦门大学博士论文, 厦门. 1-120
- 杨静, 2021. 苏云金芽孢杆菌毒素 Cry2A 系列蛋白杀虫机制的研究. 厦门大学硕士论文, 厦门. 1-67
- 余子全, 2008. 苏云金芽孢杆菌杀线虫蛋白基因 *Cry6Aa* 的表达负调控及杀线虫蛋白进入根结线虫体内的模式. 华中农业大学博士论文, 武汉. 1-120
- 章宝娟, 2007. 中药注射剂溶血性试验方法的研究概述. 海峡药学, 19(8): 79-81