

Cry2Ab 及 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响^{*}

魏纪珍^{1,2**} 梁革梅² 高希武¹ 高 珍² 张万娜² 郭予元^{2***}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院昆虫学系 北京 100193; 2. 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)

摘 要 为明确 Cry2Ab 和 Cry1Ac 2 种 Bt 杀虫蛋白单用与混用对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 中肠主要蛋白酶活性的影响, 本文测定了取食含不同 Bt 蛋白人工饲料后棉铃虫中肠总蛋白酶、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性的差异。结果发现: Cry2Ab 处理 12 h 后对棉铃虫中肠总蛋白酶影响不大; 对类胰蛋白酶的影响最大, 除最高浓度处理外, 其他浓度处理后棉铃虫类胰蛋白酶的活性明显高于对照; 但对类胰凝乳蛋白酶活性的影响呈倒“V”字型, 只有 6.67 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 处理后的棉铃虫酶活力显著高于对照, 其他浓度处理与对照差异不显著或略低于对照; 随着取食含 Cry2Ab 饲料时间的增加, 棉铃虫中肠类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性比对照显著增加; 与对照相比, 处理 36 h 后类胰蛋白酶活性最高可增加到 6.43 倍。Cry1Ac 处理棉铃虫 12 h 后总蛋白酶、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性都明显增加, 而且与处理浓度呈正相关; 但是 24 h 后, 处理后棉铃虫的总蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性明显降低, 只有类胰蛋白酶活性仍高于对照, 但活性增长倍数低于 12 h 时的处理。Cry2Ab 和 Cry1Ac 2 种蛋白混用处理棉铃虫后, 2 种酶的酶活力基本低于 Cry1Ac 和 Cry2Ab 单用的酶活力之和; 只有 2 种蛋白浓度均为 2.22 $\mu\text{g/g}$ 混用时, 处理 12 h 后类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性高于 2 种蛋白单用时酶活力之和, 且都显著的高于对照。

关键词 棉铃虫, Cry1Ac, Cry2Ab, 总酶, 类胰凝乳蛋白酶, 类胰蛋白酶

The effects of Cry2Ab and Cry1Ac insecticidal proteins on protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera*

WEI Ji-Zhen^{1, 2**} LIANG Ge-Mei² GAO Xi-Wu¹ GAO Zhen²
ZHANG Wan-Na² GUO Yu-Yuan^{2 ***}

(1. Department of Entomology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. China State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China)

Abstract Differences in the midgut activity of total protease, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) fed on artificial diets containing different proteins was investigated in order to clarify the effects of Cry2Ab and Cry1Ac insecticidal proteins on protease activity in the midgut of *H. armigera* and provide basic information for the rational utilization of double Bt toxin cotton. The results indicate that although Cry2Ab had little effect on total protease activity after 12 h it had a major effect on trypsin-like enzyme. The trend in chymotrypsin-like enzyme activity was like the reversed letter V. Compared to the control, the activity of the chymotrypsin-like enzyme was significantly higher than the control only when the concentration of Cry2Ab was 6.67 $\mu\text{g/g}$, and other concentrations were either not significantly different, or slightly lower, than the control. Together with feeding time, the activities of trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes increased dramatically compared to the control. After 36 h the activity of the chymotrypsin-like enzyme had increased by 6.43 times relative to the control. The activities of total protease, trypsin-like

* 资助项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题 (2011ZX08011-002)、国家自然科学基金项目 (30971921)。

** E-mail: weijizhen1986@163.com

*** 通讯作者, E-mail: yuyuanguo@hotmail.com

收稿日期: 2012-02-11, 接受日期: 2012-04-12

enzyme and chymotrypsin-like enzyme all increased significantly compared to the control after *H. armigera* had fed on a Cry1Ac diet for 12 h and the trends were correlated with the treatment concentration. However, the activities of the trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes obviously declined to below the control after 24 h. Only the trypsin-like enzyme was still higher than in the control. The activities of these three enzymes in *H. armigera* treated with Cry1Ac + Cry2Ab were lower than the sum of treatment using Cry2Ab and Cry1Ac in isolation. But activities of these enzymes in bollworms fed on a diet containing 2.22 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab and 2.22 $\mu\text{g/g}$ Cry1Ac was significantly higher than the sum of their activities in insects fed on either Cry2Ab or Cry1Ac.

Key words *Helicoverpa armigera*, Cry1Ac, Cry2Ab, midgut total protease, trypsin-like enzyme, chymotrypsin-like enzyme

转 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 基因抗虫棉 (下称: Bt 棉) 的广泛应用有效的控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 等鳞翅目靶标害虫的为害 (Kleter *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008)。然而, 随着第一代 Bt 棉 (转 *Cry1Ac*) 的长期广泛应用, 靶标害虫也产生了抗性。已有研究表明, 美国的东南部棉铃虫在田间对 Bt 棉产生了抗性 (Ali *et al.*, 2006; Tabashnik *et al.*, 2008)。Tabashnik 和 Carrière (2010) 报道印度从 2002 年开始使用第一代转基因棉花, 到 2009 年田间的红铃虫已对 Cry1Ac 产生了抗性。通过室内人工筛选也培育了对 Cry1Ac 具有较高抗性水平的棉铃虫品系, 所以抗性的问题不容忽视 (Kranthi *et al.*, 2000; 梁革梅等, 2000; Akhurst *et al.*, 2003)。

为了延长 Bt 作物的使用寿命, 科学家们提出了很多的防治策略, 包括高剂量/庇护所策略, 新毒素策略, 转双价基因策略等 (Zhao *et al.*, 2003; Bates *et al.*, 2005)。现在使用最广泛的是能够同时能够表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 杀虫蛋白的转基因棉花, 在美国、澳大利亚、南非、墨西哥和菲律宾等国家已开始商业化种植 (James, 2005; Ferré *et al.*, 2008)。尽管前期研究显示 Cry1A 和 Cry2A 杀虫蛋白具有各自独立的受体结合机制 (Karim *et al.*, 2000)。但 2009 年 Tabashnik 等报道 Cry1Ac 和 Cry2Ab 对红铃虫存在“不对称交互抗性”问题, 即对 Cry2Ab 的抗性选择导致了 Cry1Ac 的交互抗性, 而对 Cry1Ac 的抗性选择没有对 Cry2Ab 产生交互抗性 (Tabashnik *et al.*, 2009)。

Bt 被昆虫取食后必须被中肠蛋白酶水解激活, 才能释放出具有杀虫活性的毒素蛋白, 而且如果毒素水解不充分或是被过度水解, 都可能造成昆虫对 Bt 产生抗性 (谭声江等, 2001)。Oppert 等 (1996) 发现丝氨酸蛋白酶类是 Bt 的主要的消化

酶; Bietlot 等 (1990) 研究表明 Bt 杀虫蛋白在中肠的碱性环境中溶解并和靶标昆虫中肠受体位点结合对棉铃虫产生毒杀作用; 张少燕等 (2004) 研究发现棉铃虫幼虫类胰凝乳蛋白酶的活力随 Bt 蛋白浓度增大而显著升高, 在 Bt 蛋白浓度为 2.0 $\mu\text{g/g}$ 时达到最高, 随后下降; 张继红等 (2001) 发现棉铃虫中 24.5 k 类胰蛋白酶与 Bt 的降解有关。Oppert 等 (1996, 1997) 报道 Bt 抗性印度谷螟消化 Bt 原毒素的速度较敏感品系减弱, 而且抗性品系缺失了一条重要的中肠蛋白酶。Li 等 (2004) 比较了欧洲玉米螟抗性和敏感品系蛋白酶的活力, 发现敏感品系可溶性丝氨酸蛋白酶活力高于抗性品系, 抗性品系可溶性丝氨酸蛋白酶提取物处理使 Cry1Ab 前毒素的水解减少 20% ~ 30%。

目前关于 Cry2Ab 的具体杀虫机制还不明确, “不对称交互抗性”出现的原因还不清楚, 还缺乏 Cry1Ac 和 Cry2Ab 同时应用对抗性治理作用的实验依据, 因此本文比较了 Cry1Ac 和 Cry2Ab 这 2 种毒蛋白单用或混用对棉铃虫幼虫中肠内主要消化酶活性的影响, 并测定了随处理时间这几种蛋白酶活性的动态变化, 为进一步明确 Cry2Ab 的作用机制及转双价基因棉花的合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

棉铃虫敏感种群, 1996 年采自河南省新乡县棉田, 在室内用人工饲料饲养至今, 未接触任何杀虫剂。Cry1Ac 和 Cry2Ab 毒素由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供菌株, 应用 Nicholas Staples 法提取毒素蛋白 (Staples *et al.*, 2001)。

1.2 Cry2Ab 及 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫的毒力测定

选用棉铃虫初孵幼虫为试虫,分别将 Cry2Ab 和 Cry1Ac 杀虫蛋白与人工饲料按 0、0.74、2.22、6.67、20、60 和 180 $\mu\text{g/g}$ 的浓度梯度均匀混合。24 头为一个处理,重复 3 次,处理后第 7 天调查并记录幼虫存活情况,使用 DPS 计算杀虫蛋白对棉铃虫初孵幼虫的 LC_{50} 值。

1.3 中肠蛋白酶提取液的制备

选取棉铃虫 4 龄初幼虫为试虫,处理前,供试幼虫均饥饿 12 h,然后接入准备好的人工饲料中。Cry2Ab、Cry1Ac 单用或混用,与人工饲料充分混匀,杀虫蛋白含量分别以 0、0.74、2.22、6.67 和 13.34 $\mu\text{g/g}$ (w/w 鲜重) 的系列浓度并相互配比组成 25 个浓度梯度处理。每隔 12 h,取幼虫 10 头在冰浴上解剖,用 4℃ 预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲去体液,截取幼虫中肠,置于玻璃匀浆器中,加入 1 mL 0.15 mol/L NaCl 溶液在冰浴上匀浆。匀浆液 4℃、10 000 g 离心 15 min,取上清液作为酶提取液备用。以清水加入人工饲料为对照,每处理重复 3 次。

1.4 中肠主要蛋白酶活性测定

1.4.1 总蛋白酶活性测定 参照王琛柱和钦俊德(1996)的方法,并进行适当修改。将偶氮酪蛋白(azocasein)溶解于 0.15 mol/L NaCl 溶液配制成 2 mg/mL 的溶液。在 1.5 mL 离心管中分别加 10 μL 中肠酶液、100 μL 偶氮酪蛋白溶液和 40 μL 的 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0),置于 30℃ 培养箱温育 3 h,然后加入冰预冷的 10% (v/v) 三氯乙酸 150 μL 中止反应,12 000 g 离心 15 min,取 200 μL 上清溶液加入酶标板点样孔中在酶标仪(Bio-Tek USA) 415 nm 处测定吸光值。

1.4.2 类胰蛋白酶活性测定 类胰蛋白酶活性用专性底物(BAPNA)测定。在酶标板点样孔中分别依次加入 100 μL 底物、40 μL 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0)和 10 μL 中肠酶液后立即置于酶标仪,于 405 nm 处开始读取吸光值,每 10 s 读取一个点,持续 15 min。

1.4.3 类胰凝乳蛋白酶活性测定 参照王琛柱和钦俊德(1996)的方法,以 SAAPFpNA 作为底物,将 SAAPFpNA 以 2 mg/mL 的浓度溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液。在酶标板点样孔中分别依次加入 45 μL 底物、90 μL 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲

液(pH 10.0)和 5 μL 中肠酶液后立即置于酶标仪,于 405 nm 处开始读取吸光值,每 10 s 读取一个点,持续 15 min。

1.4.4 中肠提取液总可溶性蛋白含量测定 以牛血清蛋白 BSA 为标准蛋白,参照 Bradford(1976)方法测定,每处理重复 3 次。

1.5 数据分析

本试验数据利用 DPS 进行数据分析,用 Tukey 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 Cry2Ab 和 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的致死效果

Cry2Ab 和 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫初孵幼虫的 LC_{50} 分别为 16.25 $\mu\text{g/g}$ (95% 置信区间为 12.25 ~ 22.24 $\mu\text{g/g}$) 和 0.93 $\mu\text{g/g}$ (95% 置信区间为 0.35 ~ 1.77 $\mu\text{g/g}$)。

2.2 Cry2Ab 和 Cry1Ac 对棉铃虫 4 龄幼虫中肠主要蛋白酶活性的影响

2.2.1 总蛋白酶活性的变化 棉铃虫取食 12 h 后总蛋白酶的变化见图 1。单用 Cry2Ab 处理后,棉铃虫幼虫中肠总蛋白酶的活性较对照略有降低,但在各浓度处理间差异不显著。单用 Cry1Ac 时,棉铃虫总蛋白酶的活性呈上升趋势;除 0.74 $\mu\text{g/g}$ 处理外,均显著的高于对照,而且随着 Cry1Ac 杀虫蛋白浓度的增加活性增强。Cry2Ab 和 Cry1Ac 混用时,各处理总蛋白酶活性总体低于单用 Cry1Ac,而高于单用 Cry2Ab 杀虫蛋白时的活性;只有当 2.22 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 与 6.67 $\mu\text{g/g}$ Cry1Ac 杀虫蛋白混用时,总蛋白酶的活性高于 Cry1Ac 单用时的酶活力,但差异不显著。

但取食 24 h 后,与对照相比,单用 Cry1Ac 处理的棉铃虫总蛋白酶活性显著降低;取食只含有 Cry2Ab 饲料的棉铃虫总蛋白酶活性仍较对照偏低,但高于 Cry2Ab 和 Cry1Ac 混用下总蛋白酶的活性(图 2:A)。取食 36 h 后的总蛋白酶变化趋势与 24 h 相似,只是单用 6.67 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 时总蛋白酶活性显著增加(图 2:B)。

棉铃虫取食 48 h 后,各处理棉铃虫总蛋白酶活性基本与对照相同,变化不明显。

2.2.2 类胰蛋白酶的活性变化 棉铃虫取食 12 h 后,类胰蛋白酶的活性随 Cry2Ab 浓度的升高显

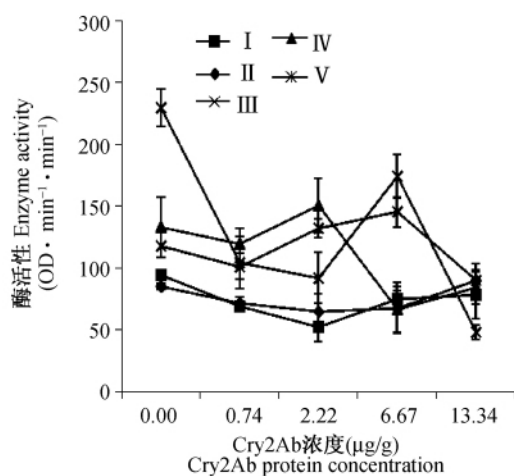


图1 取食 12 h 后棉铃虫中肠内总蛋白酶活性的变化

Fig. 1 The activity changes of total protease in *Helicoverpa armigera* larvae after 12 h

注:图中数据为平均值 $\pm$ 标准误。I 表示 Cry1Ac 浓度 0 $\mu\text{g/g}$; II 表示 Cry1Ac 浓度 0.74 $\mu\text{g/g}$; III 表示 Cry1Ac 浓度 2.22 $\mu\text{g/g}$; IV 表示 Cry1Ac 浓度 6.67 $\mu\text{g/g}$; V 表示 Cry1Ac 浓度 13.34 $\mu\text{g/g}$ 。下图同。

Data are mean $\pm$ SE. I represents the concentration of Cry1Ac is 0 $\mu\text{g/g}$; II represents the concentration of Cry1Ac is 0.74 $\mu\text{g/g}$; III represents the concentration of Cry1Ac is 2.22 $\mu\text{g/g}$; IV represents the concentration of Cry1Ac is 6.67 $\mu\text{g/g}$; V represents the concentration of Cry1Ac is 13.34 $\mu\text{g/g}$. The same below.

著增加,浓度为 6.67 $\mu\text{g/g}$ 时酶活性达到最高,随后开始降低。单用 Cry1Ac 时,随着 Cry1Ac 浓度的增加,棉铃虫幼虫中肠类胰蛋白酶的活性呈显著上升趋势。Cry2Ab 和 Cry1Ac 混用时,类胰蛋白

酶的活性变化大多低于两者单用之和;但当 Cry2Ab 和 Cry1Ac 的浓度均为 2.22 $\mu\text{g/g}$ 时,类胰凝乳蛋白酶的活性最高,显著高于对照且高于 2 种蛋白单用后酶活力之和(图 3)。

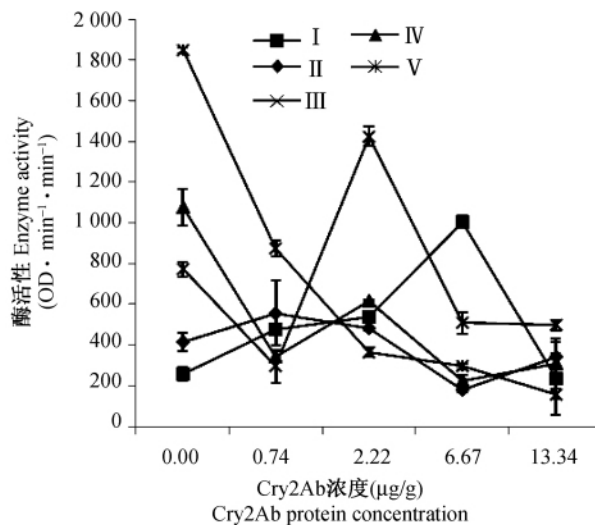


图3 取食 12 h 后棉铃虫中肠内类胰蛋白酶活性的变化

Fig. 3 The activity changes of trypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 12 h

棉铃虫取食含 Cry2Ab 饲料 24 h 后,棉铃虫中肠类胰蛋白酶活性比对照显著增加,且有随处理浓度升高而增加的趋势;Cry1Ac 处理棉铃虫 24 h 后,类胰蛋白酶活性仍高于对照,但与对照相比增加的比值比 12 h 时低。Cry2Ab 和 Cry1Ac 所有混用处理类胰蛋白酶的活性均低于单用 Cry2Ab 相同浓度的处理(图 4:A)。

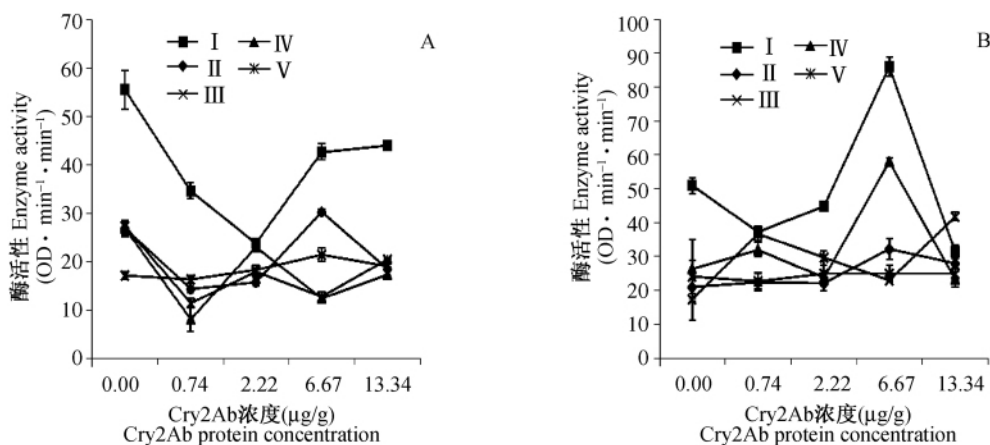


图2 取食 24 h (A) 及 36 h (B) 后棉铃虫中肠内总蛋白酶活性的变化

Fig. 2 The activity changes of total protease in *Helicoverpa armigera* larvae after 24 h (A) and 36 h (B)

随着取食含 Cry2Ab 饲料时间的增加,棉铃虫中肠类胰蛋白酶活性增加显著,与对照相比,处理 36 h 后类胰蛋白酶活性最高可增加到 6.43 倍。

其他处理后酶活性的变化趋势与 24 h 时相同(图 4:B)。

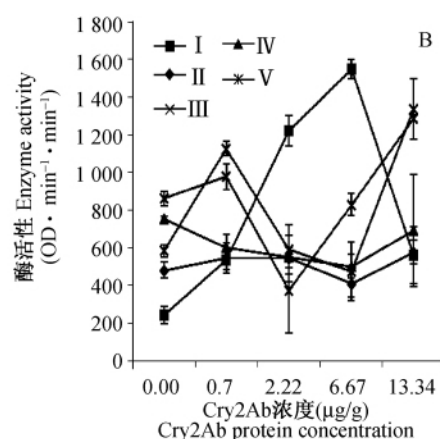
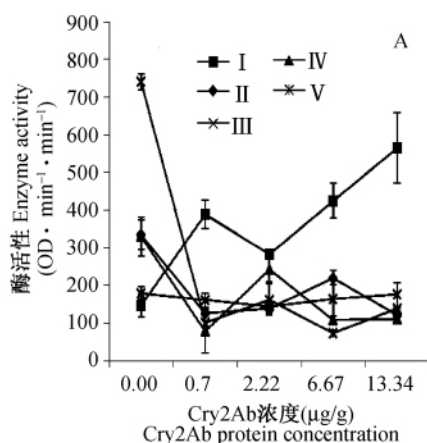


图 4 取食 24 h (A) 及 36 h (B) 后棉铃虫中肠内类胰蛋白酶活性的变化

Fig.4 The activity changes of trypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 24 h (A) and 36 h (B)

2.2.3 类胰凝乳蛋白酶活性变化 棉铃虫幼虫取食含 Cry2Ab 的人工饲料 12 h 后,类胰凝乳蛋白酶活性的变化呈倒“V”字型,只有 6.67 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 处理后的棉铃虫酶活性显著高于对照,其他浓度处理与对照差异不显著或略低于对照。类胰凝乳蛋白酶的活性随 Cry1Ac 浓度的增加,呈显著升高趋势。Cry2Ab 和 Cry1Ac 混用时,大部分处理类胰凝乳蛋白酶的活性低于二者单用后处理的棉铃虫酶活性之和,但 Cry2Ab 和 Cry1Ac 的浓度均为 2.22 $\mu\text{g/g}$ 时,类胰凝乳蛋白酶的活性最高,显著高于对照且高于二者单用酶活性之和(图 5)。

随着取食含 Cry2Ab 饲料时间的增加,棉铃虫中肠类胰凝乳蛋白酶的活性比对照显著增加;在 36 h 时表现最明显,酶活力比对照处理增加了 3.93 倍。而 Cry1Ac 处理的棉铃虫,类胰凝乳蛋白酶的活性自 24 h 后明显降低。Cry2Ab 和 Cry1Ac 2 种蛋白混用处理棉铃虫 24 h 后,类胰凝乳蛋白酶的活性一直低于 2 种蛋白单用时酶活力之和(图 6)。

2.2.4 Bt 蛋白对 3 种酶活性影响的比较 将 Cry1Ac、Cry2Ab 对 3 种酶活性的影响进行比较,作者发现:棉铃虫幼虫取食含 Cry1Ac 人工饲料 12 h 后的总蛋白酶、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性都随蛋白浓度的增加而升高;且类胰蛋白酶

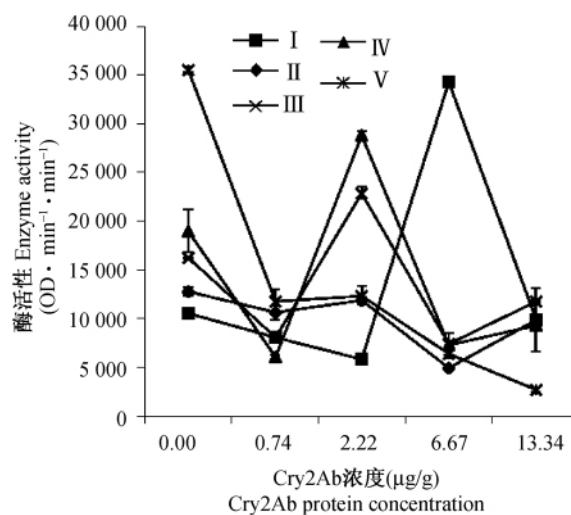


图 5 取食 12 h 后棉铃虫中肠类胰凝乳蛋白酶活性的变化

Fig.5 The activity changes of chymotrypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 12 h

的变化最大,13.34 $\mu\text{g/g}$ Cry1Ac 处理的棉铃虫类胰蛋白酶活力是对照的 6.43 倍(图 7)。

而 Cry2Ab 对 3 种酶的影响在 36 h 时表现最明显,尤其是对类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的影响都在 36 h 达到最高,6.67 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 处理

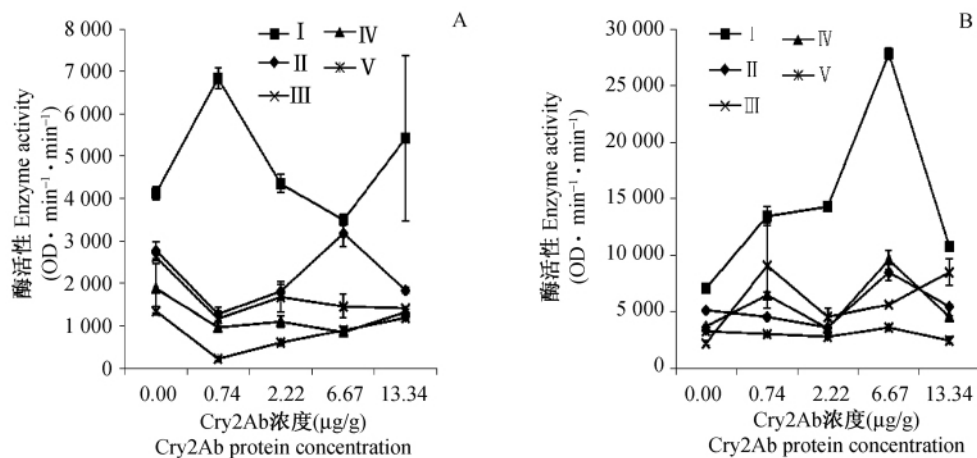


图 6 取食 24 h (A) 及 36 h (B) 后棉铃虫中肠内类胰凝乳蛋白酶活性的变化

Fig. 6 The activity changes of chymotrypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 24 h (A) and 36 h (B)

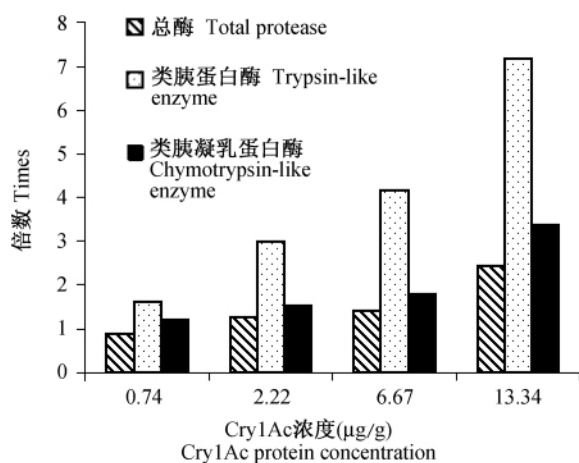


图 7 取食 12 h 后 3 种酶活性影响的比较

Fig. 7 The activity comparison of total protease, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 12 h

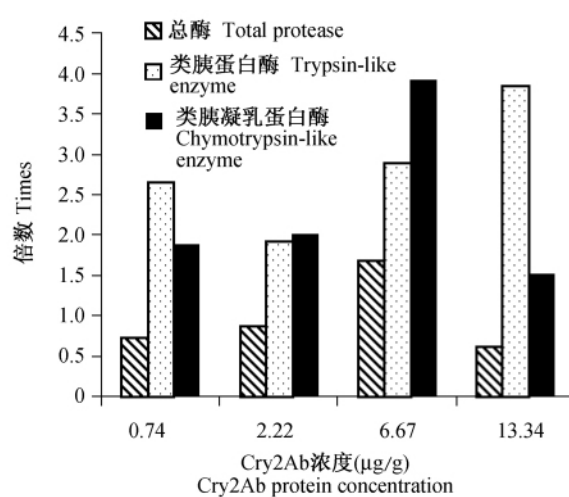


图 8 取食 36 h 后对 3 种酶活性影响的比较

Fig. 8 The activity comparison of total protease, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larvae after 36 h

的棉铃虫类胰凝乳蛋白酶活力是对照的 3.93 倍；13.34 $\mu\text{g/g}$ Cry2Ab 处理的棉铃虫类胰蛋白酶活力是对照的 3.85 倍(图 8)。

3 讨论

转双价基因抗虫棉花不仅可以延缓靶标害虫抗性的产生,而且可以起到扩大杀虫谱的作用。如陆琼等(2009)发现 Cry2Ab、Cry1Ac 杀虫蛋白对小地老虎初孵幼虫的 LC_{50} 分别为 5.79 和 202.5 $\mu\text{g/g}$,Cry2Ab 杀虫蛋白的致死效果显著高于 Cry1Ac 杀虫蛋白。因此与原来的单价抗虫棉相比,转双价基因抗虫棉防治发生日益严重的小地

老虎的效果明显增加。虽然作者的研究结果显示 Cry2Ab 对棉铃虫的毒杀效果比 Cry1Ac 低,可能对棉铃虫的毒杀主要是 Cry1Ac 起作用,但通过中肠主要蛋白酶活性的比较,作者发现这 2 种蛋白在棉铃虫中肠的降解速率是不同的,Cry1Ac 处理后酶活力变化主要表现在 12 h,而 Cry2Ab 处理后酶活力最高的变化出现在 36 h,表明 Cry1Ac 的降解速度明显快于 Cry2Ab。因此,Cry1Ac 与 Cry2Ab 同时表达时会延长 Bt 毒素对靶标害虫的作用时间,从而起到增强毒性的作用。

昆虫中肠蛋白酶不仅与 Bt 发挥毒性密切相

关,而且蛋白酶的变化与昆虫对 Bt 产生抗性相关。关于棉铃虫对 Bt 产生抗性后酶活性的变化也有报道,如史艳霞等(2009)发现抗性棉铃虫中起溶解 Bt 蛋白作用的类胰蛋白酶活力减弱; Karumbaiah 等(2007)也发现抗 Cry1Ac 的棉铃虫缺少活性的类胰蛋白酶,抗 Cry2Aa 的棉铃虫缺少活性的类胰凝乳蛋白酶。从本文结果看出, Cry1Ac 主要是造成类胰蛋白酶活性明显增加,而 Cry2Ab 对类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的影响都较大,而且酶解所需时间也不同。因此,虽然 Cry2Ab 的作用机制还不明确,但作者可以发现 Cry2Ab 与 Cry1Ac 被昆虫中肠蛋白酶酶解是存在差异的,同时表达 2 种蛋白的转基因棉花可以延缓棉铃虫抗性的发展。

试验中作者还发现酶活力并不总是随着处理浓度的增加而上升,尤其是 Cry1Ac 与 Cry2Ab 蛋白混用时,酶活力的变化有明显的浓度选择性,只有 2 种蛋白浓度均为 $2.22 \mu\text{g/g}$ 混用时,处理 12 h 后类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性高于 2 种蛋白单用时酶活力之和,且都显著的高于对照。张少燕等(2004)也发现了棉铃虫幼虫类胰凝乳蛋白酶的活力随 Bt 蛋白浓度增大而显著升高、在 Bt 蛋白浓度为 $2.0 \mu\text{g/g}$ 时达到最高,随后下降这种现象。也许 Bt 引起酶活力变化也存在饱和现象,2 种蛋白在特定浓度混用时只与酶活力相关,还是也与毒力存在一定的联系有待进一步验证。

参考文献 (References)

- Akhurst RJ, James W, Bird LJ, Beard C, 2003. Resistance to the Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 96(4):1290—1299.
- Ali MI, Luttrell RG, Young SY III, 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.*, 99(1):164—175.
- Bates SL, Zhao JZ, Roush RT, Shelton AM, 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat. Biotechnol.*, 23:57—62.
- Bietlot HP, Vishnubhatla I, Carey PR, Pozsgay M, Kaplan H, 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.*, 267(2):309—315.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle the protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248—254.
- Ferré J, Van Rie J, Macintosh SC, 2008. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM) // Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (eds.). *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Dordrecht, Netherlands: Springer Science + Business Media B. V. 1—459.
- James C, 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops:2005. Brief 34.
- Karim S, Riazuddin S, Gould F, Dean DH, 2000. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 67(3):198—216.
- Karumbaiaha L, Opperte B, Jurat-Fuentesa JL, Adang MJ, 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and-resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *CBP Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 146(1):139—146.
- Kleter GA, Bhula R, Bodnaruk K, Carazo E, Felsot AS, Harris CA, Katayama A, Kuiper HA, Racke KD, Rubin B, ShevahY, Stephenson GR, Tanaka K, Unsworth J, Wauchope RD, Wong SS, 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. *Pest Manage. Sci.*, 63(11):1107—1115.
- Kranthi KR, Kranthi S, Ali S, Kranthi S, 2000. Resistance to Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in a laboratory selected strain of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Curr. Sci.*, 78:1001—1004.
- Li H, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY, Buschman LL, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistance and-susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(8):753—762.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Donovan J, McGaughey WH, 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.*, 272:23473—23476.
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson D, Upton SJ, McGaughey WH, 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(6):571—583.
- Staples N, Ellar D, Crickmore N, 2001. Cellular localization

- and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. *Curr. Microbiol.*, 42(6):388—392.
- Tabashnik BE, Carrière Y, 2010. Field-evolved resistance to Bt cotton: Bollworm in the U. S. and pink bollworm in India. *Southw. Entomol.*, 35(3):417—424.
- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y, 2008. Insect resistance to Bt crops: Evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.*, 26:199—202.
- Tabashnik BE, Unnithan GC, Masson L, Crowder DW, Li XC, Carrière Y, 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *PNAS*, 106(29):11889—11894.
- 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.
- Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM, 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat. Biotechnol.*, 21(12):1493—1497.
- 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2000. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. *中国农业科学*, 33:46—53.
- 陆琼, 张永军, 于洪春, 曹广春, 陆宴辉, 郭予元, 2009. Cry2Ab 杀虫蛋白对小地老虎幼虫致死效果及体内酶活性的影响. *植物保护学报*, 36(1):16—20.
- 史艳霞, 张永军, 窦宝峰, 梁革梅, 高继国, 2009. Bt 抗性和敏感棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的变化. *应用与环境生物学报*, 14(31):394—398.
- 谭声江, 陈晓峰, 李典谟, 2001. 昆虫对 Bt 毒素的抗性机理研究进展. *昆虫知识*, 39(1):12—17.
- 王琛柱, 钦俊德, 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. *昆虫学报*, 39(1):7—13.
- 张继红, 王琛柱, 钦俊德, 2001. 棉铃虫中肠类胰蛋白酶的部分纯化和性质测定及其对苏云金杆菌 δ -内毒素的降解作用. *昆虫学报*, 44(3):282—289.
- 张少燕, 李典谟, 谢宝瑜, 2004. Bt 毒蛋白对棉铃虫的生长发育和相关酶活性的影响. *昆虫知识*, 41(6):536—540.