

Vip3Aa 及 Cry1Ac 对棉铃虫幼虫多种酶活力的影响^{*}

张彦^{**} 梁革梅^{***} 高珍

(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 为了明确 Vip3Aa 的作用机制,为其作为新毒素策略重要蛋白的应用提供理论依据,本文比较了 Vip3Aa、Cry1Ac 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 主要蛋白酶、解毒酶、APN 活性的影响,并研究了 Vip3Aa 和 Cry1Ac 共同使用对几种酶活力的作用。室内生测结果表明,Vip3Aa 对棉铃虫的杀虫效果低于 Cry1Ac,但 Vip3Aa 对棉铃虫幼虫生长有明显的抑制作用。取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 饲料的棉铃虫,总蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性很快升高;但经 Cry1Ac 处理 12 h 后这 2 种酶活性与对照差异不显著或低于对照,而取食含 Vip3Aa 饲料的棉铃虫酶活力显著高于对照的时间明显延长,而且类胰蛋白酶活性也显著高于对照;表明 Cry1Ac 降解速度比 Vip3Aa 快,可能是由于降解 2 种蛋白参与的酶系存在差异,同时 Cry1Ac + Vip3Aa 混用可以延长蛋白被酶解的时间。谷胱甘肽 S-转氨酶和 α -萘酚酯酶活性在棉铃虫取食含 Vip3Aa、Cry1Ac 或 Cry1Ac + Vip3Aa 蛋白的饲料后活性升高,说明这 2 种酶可能参与了对 Cry1Ac、Vip3Aa 的解毒作用。但 Cry1Ac、Vip3Aa 对氨肽酶活性影响不大,可能在毒蛋白发挥毒性的过程中与氨肽酶活力变化无关。

关键词 棉铃虫, Vip3Aa, Cry1Ac, 蛋白酶, 解毒酶

Effects of Vip3Aa and Cry1Ac on enzyme activity in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* larvae

ZHANG Yan^{**} LIANG Ge-Mei^{***} GAO Zhen

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract In order to clarify the activity of Vip3Aa and provide a theoretical basis for its application in the “New toxin strategy”, the effects of Vip3Aa and Cry1Ac on protease, detoxification enzymes and aminopeptidase N (APN) activity in larvae of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) were compared and the impacts of Cry1Ac + Vip3Aa on these enzymes were investigated. The lethality of Vip3Aa was lower than that of Cry1Ac, but Vip3Aa had an obvious inhibitory effect on larval development. Total protease and trypsin-like enzyme activity quickly increased in *H. armigera* fed an artificial diet containing either Cry1Ac or Vip3Aa or Cry1Ac + Vip3Aa. However, compared to the control, there was no significant difference in the activity of these two enzymes after 12 h of feeding on the Cry1Ac diet. While the period during which the activity of these two enzymes increased was clearly prolonged in larvae fed on diets containing Vip3Aa, that of the chymotrypsin-like enzyme was also higher than in the control. This indicates that the degradation rate of Cry1Ac was faster than that of Vip3Aa, and that the enzyme systems involved in degradation could be different. Meanwhile, the diet containing Cry1Ac and Vip3Aa together extended the degradation time. The activities of glutathione-S-transferase and α -naphthalene acetate esterase increased in *H. armigera* fed on a diet containing either Cry1Ac or Vip3Aa or Cry1Ac + Vip3Aa. This indicates that these enzymes may be involved in the detoxification of Vip3Aa and Cry1Ac. However, Vip3Aa and Cry1Ac had little effect on aminopeptidase N activities, suggesting that the toxicity of the latter has no relationship to APN enzyme activity.

Key words *Helicoverpa armigera*, Vip3Aa, Cry1Ac, protease, detoxification enzymes

^{*} 资助项目:国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2009ZX08005-007B)、国家自然科学基金项目(30971921)。

^{**}E-mail: yzhang0501@163.com

^{***}通讯作者, E-mail: gmliang@ippcaas.cn

收稿日期:2012-03-01,接受日期:2012-04-18

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是世界性的重要农业害虫, 寄主范围广, 对很多作物都造成严重危害, 转基因棉花的种植有效的控制了棉铃虫的危害 (Wu *et al.*, 2008)。但是随着转 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 基因棉花种植面积的迅速增长, 转入的 Bt 基因在棉花体内持续表达, 使得棉铃虫等靶标害虫在整个生长周期都受到 Bt 杀虫蛋白的高压选择, 因而害虫对 Bt 的抗药性已成为一个不容忽视的问题 (Gunning *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Konasale *et al.*, 2008)。

营养期杀虫蛋白 (Vips) 是在 Bt 晶体孢子形成过程中产生的一种新型杀虫蛋白。Vip3 对多种农业害虫的毒杀效果明显 (Estrueh *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2007), 能够提高对杀虫晶体蛋白不敏感害虫的敏感性, 而且在进化上和杀虫晶体蛋白没有同源性, 存在交互抗性的可能性很低 (Lee *et al.*, 2003, 2006), 作为害虫综合治理中的“新毒素策略”正在广泛应用, 可以有效地延缓靶标害虫抗性发展。Vip3A 已经成功转入了转基因棉花中, 作为一项抗性治理的新措施, 已在澳大利亚等国家开始种植 [VipCot (Syngenta Company) (Cry1Ab and Vip3A)] (James, 2009)。

全长 88 ku 的 Vip3A 类蛋白无法直接与上皮细胞结合, 形成孔洞, 发挥毒杀作用, 必须在中肠蛋白的酶解作用下得到 62 ku 的核心片段才能发挥活性 (Lee *et al.*, 2003)。这一点与 Bt 杀虫晶体蛋白一致, Bt 原毒素在进入昆虫体内后, 经过溶解、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; 如果毒素水解不充分 (deficient proteolysis) 或是被过度水解, 所产生的毒素片段就不具有杀虫活性, 这可能是抗性产生的原因之一 (谭声江等, 2001)。

酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶等是昆虫对农药进行分解的主要解毒代谢酶, 在昆虫对各种杀虫剂的抗性中都有一定作用, 并且是具有不同作用靶标的杀虫剂之间存在交互抗性的主要因素 (Prapanthadara *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002, 2003; Kim *et al.*, 2004)。而氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 是一组肽链端解酶, 能够促进蛋白质和多肽 N 末端的中性氨基酸的水解, 参与氨基酸的转运。APN 也是第一个被报道的、在 Bt 毒素杀虫机制中起作用的毒素受体蛋白。

目前, 已有一些关于 Bt 对昆虫中肠蛋白酶、解毒酶、APN 表达量等影响的报道 (Oppert *et al.*, 1996, 1997; Li *et al.*, 2004; Gunning *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009), 但关于营养期蛋白 Vip3A 的作用机制等还研究较少。由于昆虫体内多种酶都可能是影响毒素活性的重要因素 (Fortier *et al.*, 2007), 因此本文比较了 Vip3Aa、Cry1Ac 对棉铃虫中肠主要蛋白酶、解毒酶、APN 酶活性的影响, 并研究了 Vip3Aa 与 Cry1Ac 共同作用对几种酶活力的作用, 为进一步明确 Vip3Aa 的作用机制, 作为新毒素策略的重要蛋白在棉铃虫综合防治中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

棉铃虫敏感品系 96S:1996 年采自河南新乡, 一直在室内用人工饲料饲喂, 未接触任何 Bt 毒素蛋白和杀虫剂。

Cry1Ac、Vip3Aa 菌株由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供; Cry1Ac 由 HD-73 菌株提取得到, Vip3Aa 利用 *Escherichia coli* (*E. coli*) 诱导表达获得。

酶活性测定主要试剂: 总蛋白酶底物 (Azocasein)、胰蛋白酶底物 (BAPNA)、胰凝乳蛋白酶底物 (SAAPFpNA)、还原性谷胱甘肽、CDNB、 α -乙酸萘酯、固蓝 RR 均购自 sigma 公司。试验中使用的其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 生物测定

将 Vip3Aa 和 Cry1Ac 蛋白分别以不同的浓度梯度与人工饲料混合, 充分混匀, 将饲料切成小块置于 24 孔板中, 每孔接 1 头初孵棉铃虫幼虫。之后放入 25℃ 光照培养箱中, 培养 6 d 后检查幼虫死亡情况。以清水作为对照, 每个处理重复 3 次。利用 POLO 软件计算棉铃虫的致死中浓度 (LC₅₀) 值。

1.3 样品制备

将 4 龄末敏感品系棉铃虫幼虫饥饿 24 h 后, 分别饲喂含 20 μ g/g 的 Vip3Aa、2 μ g/g 的 Cry1Ac、同时含有 20 μ g/g Vip3Aa 和 2 μ g/g Cry1Ac 的人工饲料, 在处理 2、6、12、24、36、48、72 h 后每次取 3 头幼虫, 经液氮冷冻后 -80℃ 保存。以饲喂正常饲料的处理为对照, 每处理重复 3 次。将冷冻保存的棉铃虫幼虫放入玻璃匀浆器中, 加 500 μ L 预

冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液在冰上匀浆。匀浆液 4℃、12 000 g 离心 15 min, 取上清液置于 2 mL 的离心管中加过滤器过滤, 4℃、12 000 g 离心 2 min, 滤液作为酶液备用。

1.4 几种主要酶活性的测定

1.4.1 总蛋白酶活性测定 参照王琛柱和钦俊德(1996)的方法, 并做适当修改。将偶氮酪蛋白(Azocasein)溶解于 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中, 配制成 2 mg/mL 的溶液。在 1.5 mL 离心管中分别加入 10 μ L 酶液、100 μ L 偶氮酪蛋白溶液和 40 μ L 50 mmol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0), 置于 25℃ 水浴锅中温育 2 h, 然后加入预冷的 10% (v/v) 三氯乙酸 65 μ L 中止反应, 4℃、12 000 g 离心 20 min, 取 60 μ L 上清溶液和 40 μ L 1 mmol/L 的 NaOH 溶液加入酶标板点样孔中在酶标仪 410 nm 处测定吸光值。

1.4.2 类胰蛋白酶活性测定 以 BAPNA 作为底物, 将 BAPNA 以 1 mg/mL 的浓度溶于 DMSO (二甲基亚砜) 中。在 96 孔酶标板加样孔中依次加入 100 μ L 底物、40 μ L 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0) 和 20 μ L 酶液, 迅速置于酶标仪下, 于 410 nm 处开始读取吸光值, 每 30 s 读取一个点, 持续 15 min。

1.4.3 类胰凝乳蛋白酶活性测定 类胰凝乳蛋白酶以 SAAPFpNA 作为底物, 将 SAAPFpNA 溶解于 50 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0) 中, 终浓度为 1 mg/mL。在酶标板点样孔中分别依次加入 100 μ L 底物、40 μ L 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0) 和 20 μ L 酶液, 迅速置于酶标仪下, 于 410 nm 处开始读取吸光值, 每 30 s 读取一个点, 持续 15 min。

1.4.4 α -乙酸萘酯酶活力测定 参考 Han 等(1998)方法, 于 96 孔酶标板加样孔中依次加入 200 μ L 底物与显色剂的混合液(α -NA 1 mg、固蓝 RR 盐 2 mg 溶于 2 mL 丙酮, 用缓冲液 PBS 定容至 25 mL, 过滤器过滤), 90 μ L 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.6), 最后加入 10 μ L 酶液。后迅速置于酶标仪下, 在 410 nm 波长下读取吸光值, 每隔 30 s 记录 1 次, 共记录 15 min。

1.4.5 谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)活力测定 (微量板酶动力学法) 在 96 孔酶标板中每孔依次加入 90 μ L 0.1 mol/L、pH 7.6 的磷酸缓冲液

(PBS)、10 μ L 酶液(GSTs)、100 μ L 1.2 mmol/L 的 CDNB 和 100 μ L 的 6 mmol/L 的 GSH。用酶标仪在 340 nm 波长下, 每隔 30 s 记录 1 次吸光值, 记录 15 min。

1.4.6 氨肽酶活性测定 称取一定量的 L-PNA 溶于甲醇中, 配制成 1 mg/mL 的底物。在酶标板点样孔中分别依次加入 200 μ L 的 L-PNA 底物、95 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 10.0) 和 10 μ L 酶液后立即置于酶标仪, 于 410 nm 处开始读取吸光值, 每隔 30 s 读取一个点, 持续 15 min。

1.5 可溶性总蛋白含量测定

以牛血清蛋白 BSA 为标准蛋白, 参照 Bradford 方法(1976)测定, 每处理重复 3 次。

1.6 数据分析

采用 DPS 软件进行统计学分析, 显著性差异通过 PROC ANOVA 进行 LSD 分析。

2 结果与分析

2.1 Vip3Aa 和 Cry1Ac 对棉铃虫幼虫的致死效果

Vip3Aa 和 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的 LC₅₀ 值分别为 8.23 μ g/g 和 0.97 μ g/g, 说明 Vip3Aa 蛋白对棉铃虫的致死效果不如 Cry1Ac 蛋白, 但试验中发现 Vip3Aa 对棉铃虫幼虫生长有明显的抑制作用。

2.2 不同处理对棉铃虫幼虫各种主要酶活性的影响

2.2.1 对总蛋白酶活性的影响 与对照相比, 不管是取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 还是取食 Cry1Ac + Vip3Aa 蛋白人工饲料的棉铃虫, 6 h 后总蛋白酶活性都出现明显升高的现象; 但 12 h 后只有 Vip3Aa 处理的棉铃虫总蛋白酶活性高于对照, 而且这种显著高于对照的现象持续到 36 h 的处理; 到 48 h 后各处理与对照间差异都不显著或低于对照(图 1)。

2.2.2 对类胰蛋白酶活性的影响 与对照相比, 取食含 Vip3Aa 饲料的棉铃虫类胰蛋白酶活性的变化最为显著, 酶活性从处理 2~48 h 一直高于对照, 而且除 2、12 h 与对照差异不显著外, 其他时间都显著高于对照。但 Cry1Ac 或 Cry1Ac + Vip3Aa 的处理, 类胰蛋白酶活性一直与对照差异不显著或低于对照(图 2)。

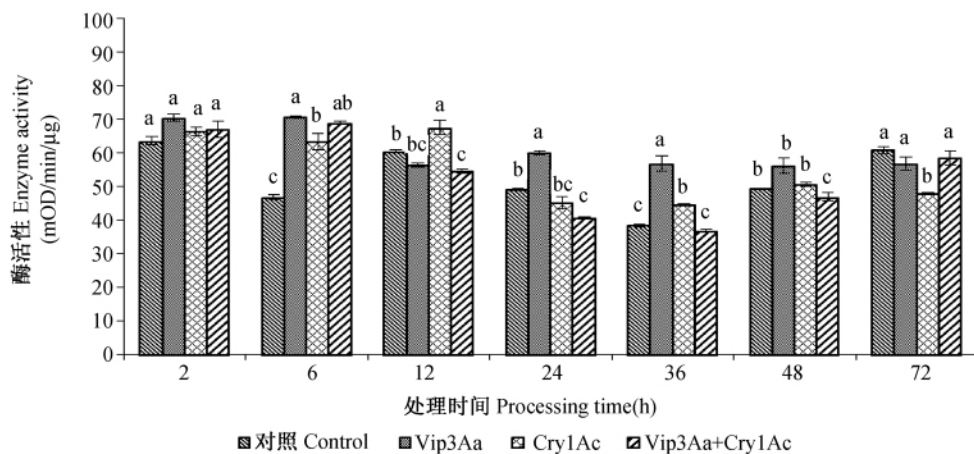


图1 不同处理棉铃虫幼虫总蛋白酶活性的变化

Fig.1 The activity changes of total protease in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

注:图中数据为平均值±标准误。不同的小写字母表示不同处理在0.05水平差异显著。下图同。
Data are mean ± SE. Histograms with different small letters indicate significantly different at 0.05 level.
The different among the same time is tested only within different insecticidal proteins. The same below.

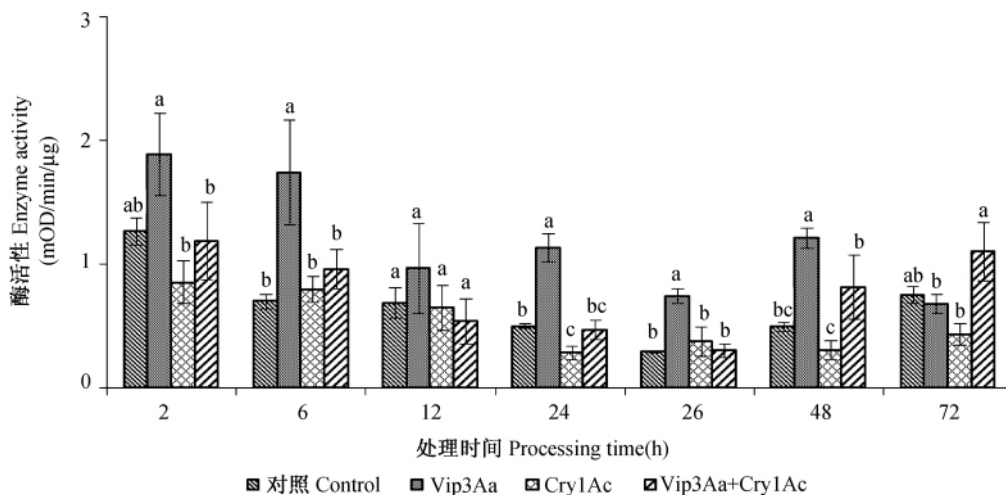


图2 不同处理棉铃虫幼虫类胰蛋白酶活性的变化

Fig.2 The activity changes of trypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

2.2.3 对类胰凝乳蛋白酶活性的影响 棉铃虫取食含有 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 的饲料 2 和 6 h 后,类胰凝乳蛋白酶活性比对照明显增加。取食 24、36、48 h 后,Vip3Aa 处理的棉铃虫类胰凝乳蛋白酶活性一直显著高于对照,到 72 h 时表现为酶活力降低;Cry1Ac + Vip3Aa 处理 24 h 后,棉铃虫类胰凝乳蛋白酶活性一直高于对照,而且在 36、48、72 h 达到显著水平。而取食含 Cry1Ac 蛋白饲料的棉铃虫自处理 24 h 后类胰蛋

白酶活性就低于对照(图 3)。

2.2.4 对 α-乙酸萘酯酶活性的影响 与对照相比,Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 各处理对 α-乙酸萘酯酶活性的影响表现在取食 36 h 后,显著差异出现在处理 72 h,此时各处理棉铃虫的 α-乙酸萘酯酶活性明显高于对照,但各处理间差异不显著(图 4)。

2.2.5 对谷胱甘肽 S-转移酶活性的影响 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 各处理对谷胱

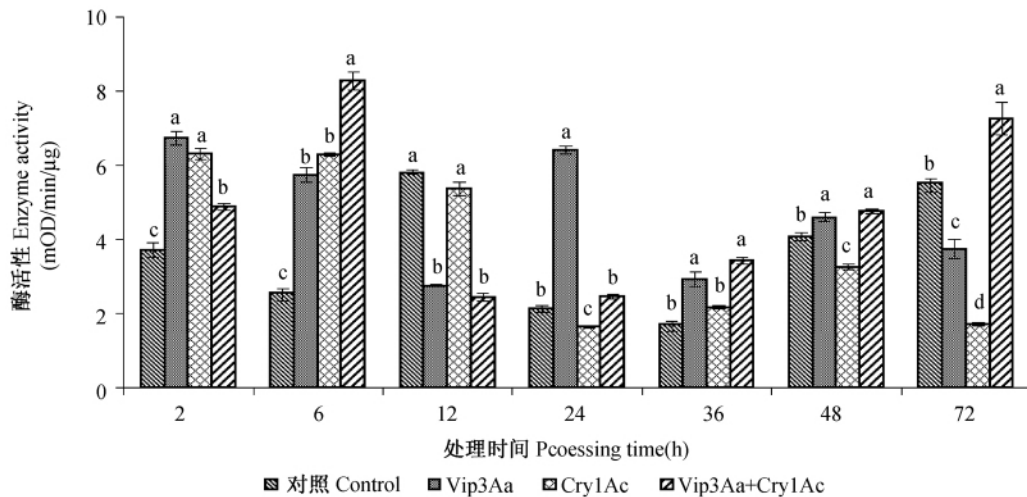


图 3 不同处理棉铃虫幼虫类胰凝乳蛋白酶活性的变化

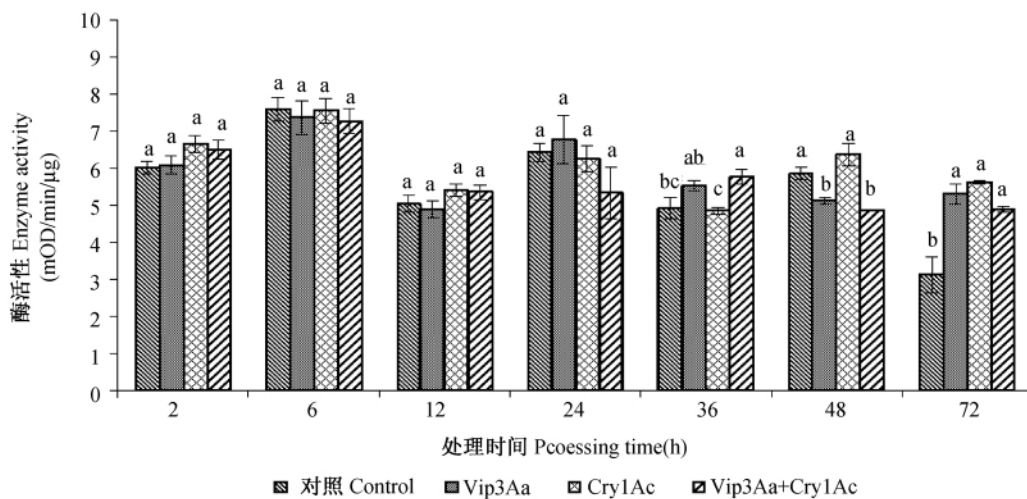
Fig. 3 The activity changes of chymotrypsin-like enzyme in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

图 4 不同处理棉铃虫幼虫 α-乙酸萘酯酶活性的变化

Fig. 4 The activity changes of α-acetic acid naphthalene ester enzyme in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

甘肽 S-转移酶活性的影响在取食 2 h 后就表现明显,各处理谷胱甘肽 S-转移酶活性比对照明显升高。取食 6 h 后,各处理的棉铃虫酶活力也明显高于对照。但是取食 12 h 后,处理组棉铃虫的酶活力显著低于对照。继续取食后酶活力的变化呈不规则现象(图 5)。

2.2.6 对氨肽酶活性的影响 不同处理棉铃虫氨肽酶活性变化见图 6。从图 6 结果可以看出,棉铃虫取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 饲料后,氨肽酶活性升高,但由于重复间误差较

大,与对照的差异不显著(图 6)。

3 结论与讨论

Vip3A 蛋白对多种鳞翅目昆虫和鞘翅目昆虫都具有杀虫活性(Estruch *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 2001; Selvapandiyan *et al.*, 2001; Franco-Rivera *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2005),同时表达 Cry1A 和 Vip3A 蛋白的转基因棉花(如 VipCot)扩大了转单基因棉花的杀虫谱;而且由于同时转入作用机理不同的 2 种基因,也起到了延缓抗性的

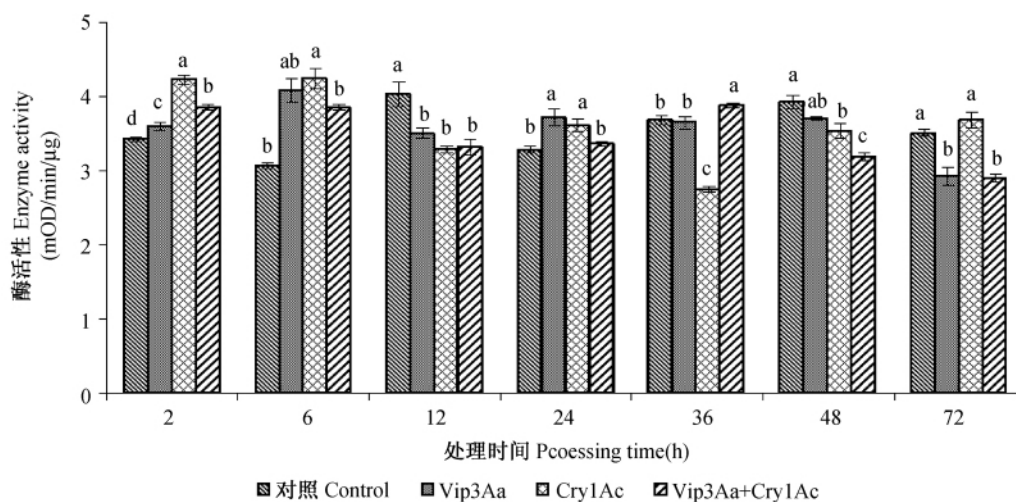


图5 不同时间棉铃虫幼虫谷胱甘肽S-转移酶活性的变化

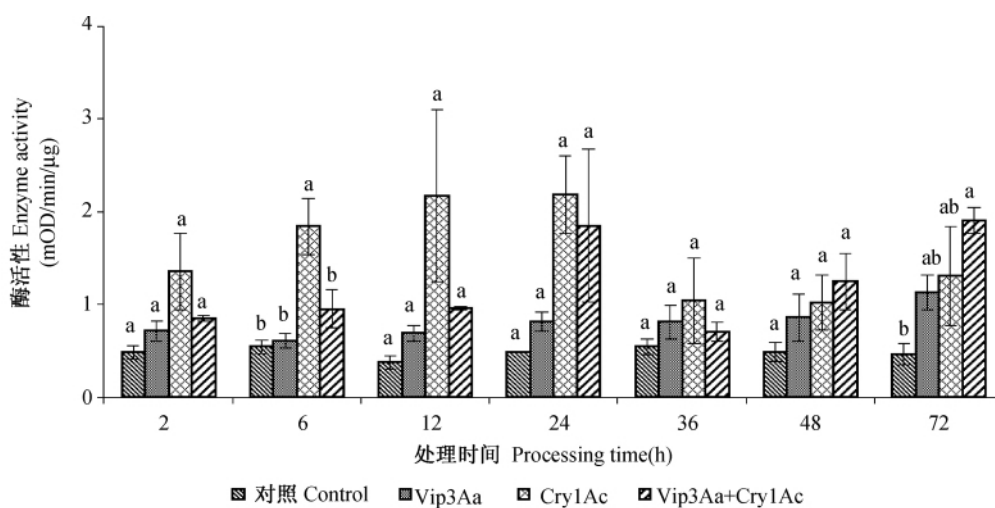
Fig. 5 The activity changes of glutathione S-transferase in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

图6 不同处理棉铃虫幼虫氨肽酶活性的变化

Fig. 6 The activity changes of the aminopeptidase in *Helicoverpa armigera* larva fed on artificial diet containing different Bt toxin

作用。我们的生测结果显示,虽然 Vip3Aa 对棉铃虫的杀虫效果低于 Cry1Ac,但 Vip3Aa 对棉铃虫幼虫生长有明显的抑制作用,也可以增加对原来 Cry1Ac 的主要靶标害虫—棉铃虫的控制效果。因此,同时表达 Cry1A 和 Vip3A 蛋白的转基因棉花具有进一步推广应用的优势。

已有研究证明,参与 Bt 毒素活化的中肠酶被认为主要是胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶 (Terra and Ferreira, 1994),而且蛋白酶活性的改变与昆虫对 Bt 产生抗性相关。如 Oppert 等 (1996, 1997) 发现

抗性印度谷螟中肠蛋白酶活性降低,消化 Bt 原毒素的速度较敏感品系减弱,抗性品系缺失了一类重要的中肠蛋白酶。Huang 等 (1999) 报道,欧洲玉米螟对 Bt 杀虫剂产生抗性的原因和类胰蛋白酶对 Bt 水解效率下降有关。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。我们的试验结果表明:取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 饲料的棉铃虫,总蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性很快升高,说明这 2 种

酶参与了 Cry1Ac 和 Vip3Aa 的降解。Cry1Ac 处理 12 h 后这 2 种酶活性与对照差异不显著或低于对照,说明 Cry1Ac 很快被降解,12 h 后与取食正常饲料的棉铃虫差异不大;而 Vip3Aa 与 Cry1Ac 相比差异较大,取食含 Vip3Aa 饲料的棉铃虫酶活力显著高于对照的时间明显延长,而且类胰蛋白酶活性也显著高于对照,说明类胰蛋白酶参与了 Vip3Aa 的降解。这些结果不仅说明 Vip3Aa 与 Cry1Ac 在中肠被降解的方式不同、作用方式不同,而且也可能是造成 Cry1Ac 杀虫活性高、Vip3Aa 显著抑制棉铃虫生长的原因。从试验结果我们还可以看出,Cry1Ac + Vip3Aa 混用处理的棉铃虫总蛋白酶、类胰蛋白酶活力变化趋势与 Cry1Ac 类似,但类胰凝乳蛋白酶活性在处理 24 h 后一直显著高于对照,证明 2 种蛋白混用延长了被酶解的时间。

酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶在有机磷和拟除虫菊酯等杀虫剂的代谢中起到重要作用,而且是引起昆虫对杀虫剂抗性的一个重要因素。Gunning 等(2005)认为,棉铃虫中肠酯酶与 Cry1Ac 前毒素能发生非特异性的结合,从而导致棉铃虫对 Cry1Ac 抗性的产生,抗性棉铃虫在取食 Cry1Ac 后,体内酯酶活力下降,说明酯酶与棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性有明显的相关性,并且这种相关性是因为酯酶对 Cry1Ac 前毒素的非特异性结合导致的。梁革梅等(2001)也发现,与敏感品系相比,棉铃虫抗性品系中肠内的 α -乙酸萘酯酶活性增加。Candas 等(2003)发现,抗 Bt 印度谷螟幼虫中肠上皮细胞中存在谷胱甘肽利用率上升以及氧化能力加强,从而导致还原性下降的特点。本文研究发现取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 或 Cry1Ac + Vip3Aa 饲料的棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶活性很快上升,在处理 2 h 后就比对照显著升高,但在 12 h 后明显降低;而对 α -乙酸萘酯酶活性的影响则出现在处理 72 h 后。说明这 2 种酶可能参与了棉铃虫取食 Cry1Ac、Vip3Aa 后的解毒作用,而且谷胱甘肽 S-转移酶活性升高是在处理早期, α -乙酸萘酯酶活性升高表现在后期。但是这 2 种酶是否参与棉铃虫对 Cry1Ac、Vip3Aa 抗性的产生有待于今后进一步研究。

由于 APN 是 Bt 毒素重要的受体蛋白,因此关于 APN 在 Bt 作用过程、昆虫抗性产生中的作用研究较多,通常认为 APN 的突变或表达量的变化与昆虫对 Bt 产生抗性相关(Zhu *et al.*, 2000;

Herrero *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2009)。关于酶活性变化的报道较少,只有 Loseva 等(2002)发现对 Cry3Aa 蛋白产生抗性的马铃薯甲虫中肠氨肽酶的活性高于敏感品系。我们的试验结果显示棉铃虫取食含 Cry1Ac、Vip3Aa 饲料后,氨肽酶活性变化不明显,个体间差异较大。因此,氨肽酶可能在毒蛋白发挥毒性的过程中与其酶活力关系不大。

参考文献(References)

- 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.
- Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA Jr, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Prot.*, 2(1):19—28.
- Donovan WP, Donovan JC, Engleman JT, 2001. Gene knockout demonstrates that Vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78(1):45—51.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *PNAS*, 93(11):5389—5394.
- Fang J, Xu XL, Wang P, 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3):956—961.
- Fortier M, Vachon V, Frutos R, Schwartz JL, Laprade R, 2007. Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:6208—6213.
- Franco-Rivera A, Benintende G, Cozzi J, Baizabal-Aguirre VM, Valdez-Alarcón JJ, López-Meza JE, 2004. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1):87—92.
- Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD, 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5):2558—2563.
- Han ZJ, Moores JD, Devonshire A, Denholm I, 1998. Association between biochemical marks and insecticide

- resistance in the cotton aphid *Aphis gossypii*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 62 (3) :164—171.
- Herrero S, Oppert B, Ferré J, 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (3) :1085—1089.
- Huang F, Buschman LL, Higgins RA, McGaughey WH, 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 284 (5416) :965—967.
- Huang FN, Leonard BR, David AA, 2007. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* Maize. *J. Econ. Entomol.*, 100 (1) :164—171.
- James Clive, 2009. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY.
- Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and-resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 146 (1) :139—146.
- Kim YJ, Lee SH, Lee SW, Ahn YJ, 2004. Fenpyroximate resistance in Tetranychusurticae (Acari: Tetranychidae) : cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manage. Sci.*, 60 (10) :1001—1006.
- Konasale JA, Ana RS, Juan F, 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (2) :462—469.
- Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (8) :4648—4657.
- Lee MK, Paul M, Chen LS, 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339 (4) :1043—1047.
- Li H, Oppert B, Higgins RA, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (8) :753—762.
- Liao CY, Trowell SC, Akhurst R, 2005. Purification and characterization of Cry1Ac toxin binding proteins from the brush border membrane of *Helicoverpa amigera* midgut. *Curr. Microbiol.*, 51 (6) :367—371.
- Loseva O, Ibrahim M, Koller CN, 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (5) :567—577.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, 1997. Proteinase mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.*, 272 (38) :23473—23476.
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, 1996. Luminal proteinase from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26 (6) :571—583.
- Prapanthadara LA, Promtet N, Koottathep S, Somboon P, Suwonkerd W, McCarroll L, Hemingway J, 2002. Mechanisms of DDT and permethrin resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bull.*, 26 :185—189.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Soca LA, 2003. Cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* from Cuba induced by the selection with organophosphate malathion. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 55 (2) :105—111.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz MA, Soca A, 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.*, 39 (6) :882—888.
- Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, 2001. Toxicity analysis of N-and C-terminus deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (12) :5855—5858.
- Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109 (1) :1—62.
- 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.
- Yang YH, Yang YJ, Gao WY, Guo JJ, Wu YH, Wu YD, 2009. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1A. *Bull. Entomol. Res.*, 99 (2) :175—181.
- Zhu YC, Kramer KJ, Oppert B, 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (3) :215—224.
- 梁草梅, 谭维嘉, 郭予元, 2001. 棉铃虫 Bt 抗感种群间数种解毒酶和中肠蛋白酶活性的比较. 植物保护学报, 28

- (2):133—138.
- 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.
- 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, 38(1):12—17.