

棉铃虫围食膜中 Bt 抗性相关蛋白的分离与鉴定

李怡萍^{1*}, 刘少凯¹, 袁向群¹, 郭予元^{1,2}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 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, 杨凌 712100;
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 棉铃虫是世界性的重要农业害虫。围食膜作为昆虫抵御病原微生物入侵及有害物质的第一道天然保护性屏障,其上可能存在与 Bt 抗性相关的受体蛋白。本研究以 Bt Cry1Ac 抗性和敏感品系的棉铃虫围食膜为对象,采用 NuPAGE 电泳技术、配体杂交、质谱鉴定和生物信息学分析等技术,测定了围食膜蛋白含量,鉴定了蛋白质的组成及与 Bt Cry1Ac 毒素的结合能力。结果表明敏感品系围食膜中蛋白含量为 22.19%,抗性品系围食膜中蛋白含量为 26.99%。抗、感品系棉铃虫围食膜上存在与 Cry1Ac 毒素结合的 6 个差异蛋白,推测其中棉铃虫羧酸酯酶蛋白和血影蛋白是 2 个有意义的抗性相关蛋白,2 个新蛋白可能参与 Bt 抗性。研究证明棉铃虫围食膜上存在 Bt 结合蛋白且与抗性相关,为进一步明确 Bt 抗性机制、制定合理的 Bt 抗性治理策略提供了理论依据。

关键词 棉铃虫; 围食膜蛋白; Bt 抗性; 分离与鉴定

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2022464

Separation and identification of peritrophic membrane proteins related to Bt resistance in *Helicoverpa armigera*

LI Yiping^{1*}, LIU Shaokai¹, YUAN Xiangqun¹, GUO Yuyuan^{1,2}

(1. 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 China; 2. State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract *Helicoverpa armigera* is an important agricultural pest worldwide. As the first natural protective barrier for insects to resist the invasion of pathogenic microorganisms and harmful substances, many receptor proteins related to Bt resistance may exist on the peritrophic membrane. In this study, we use the peritrophic membrane proteins of Cry1Ac-resistance (BtR) and susceptible strains (96S) of *H. armigera* as the object to analyze the content, compositions and binding ability to Cry1Ac of proteins by using NuPAGE electrophoresis, ligand blot, mass spectrometry identification and bioinformatics analysis technology. The results showed that the protein content of the peritrophic membrane of *H. armigera* in susceptible and resistant strains was 22.19% and 26.99%, respectively. Six peritrophic membrane proteins were found to bind with Cry1Ac by comparing the BtR and 96S strains of *H. armigera*. We speculated that *H. armigera* carboxylesterase protein and spectrin are two meaningful resistance-related proteins, and the other two proteins are suggested to be new proteins which may be related to Bt resistance. This study proves that Bt binding proteins exist in the peritrophic membrane of *H. armigera* and are related to Bt resistance. This study also provides a theoretical basis for clarifying Bt resistance mechanism and formulating reasonable Bt resistance management strategies.

Key words *Helicoverpa armigera*; peritrophic membrane proteins; Bt resistance; separation and identification

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是鳞翅目夜蛾科 国西北内陆棉区、长江流域棉区和黄河流域棉区这
的一种世界性重大农业害虫,其分布范围广泛,在我 三大主要棉区均有分布。棉铃虫寄主范围广,能取

收稿日期: 2022-07-31

修订日期: 2022-08-29

基金项目: 国家自然科学基金(31071693,32172409);国家重点研发计划(2017YFD0200900)

* 通信作者 E-mail:liyiping@nwsuaf.edu.cn

食包括棉花、玉米、大豆等多种农作物及经济作物,具有环境适应能力强、产卵量大、迁飞距离远等特点^[1-2]。在 20 世纪 60 年代至 70 年代,对棉铃虫的防治均以化学防治为主,其中有机磷类、有机氯类等多种化学杀虫剂被先后使用。但是随着杀虫剂的大量使用,20 世纪 80 年代末至 90 年代初期,棉铃虫快速对滴滴涕、硫丹、拟除虫菊酯类等常规杀虫剂产生了抗性,田间防治基本失效,加之适宜的气候条件等原因,棉铃虫在我国黄河流域和长江流域棉区连年暴发成灾,造成了极大的损失,直接经济损失超过百亿元^[3-4]。

1997 年,我国开始商业化种植转 Bt (*Bacillus thuringiensis*, 苏云金芽胞杆菌) 基因的抗虫棉^[5]。转 Bt 基因棉的种植,以及 Bt 生物杀虫剂的使用,不仅有效防控了棉铃虫等靶标害虫,还减少了很多化学杀虫剂的使用^[4]。我国目前种植的转基因棉花均为表达 *cry1Ac* 基因或 *cry1Ac*+*cry1Ab* 融合基因的 Bt 棉,随着我国棉花种植空间不断向以新疆为主的西北棉区集中,长期使用单价 *cry1A* 家族的 Bt 棉必然会存在田间抗性进化的隐患^[4]。

目前研究表明抗性产生的最主要原因是昆虫中肠的刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上与 Bt 杀虫蛋白结合的受体的改变或突变引起的^[6-8]。昆虫取食 Bt Cry1A 类全长蛋白后,在中肠碱性环境中被胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶水解,N 端去除 40 个左右的氨基酸,C 端去除 500 个左右的氨基酸,原蛋白由 130 kD 左右被活化 65 kD 左右有杀虫活性的核心片段。活化的蛋白片段穿过围食膜 (peritrophic membrane, PM), 进一步与中肠 BBMV 上受体结合,发挥作用。但是 Bt 杀虫蛋白只有穿过中肠围食膜才能达到中肠上皮细胞的作用位点与受体结合,且研究发现昆虫围食膜上也可能存在与 Bt 杀虫蛋白结合的受体蛋白,因此,昆虫围食膜蛋白的改变也可能引起 Bt 抗性的产生^[9-11]。

1762 年在鳞翅目幼虫中发现围食膜结构,1890 年正式命名^[12]。围食膜是中肠前端一直延伸至后肠的一层厚薄均匀的无色透明的非细胞结构薄膜,是由中肠细胞分泌形成的,主要由蛋白质、黏多糖和几丁质组成,是昆虫抵御病原微生物入侵及有害物质的第一道天然保护性屏障,具有保护中肠上皮细胞、阻止病原物入侵等防御功能^[13-17]。有关围食膜

蛋白的组成研究一直是学者们关注的热点,张严峻等^[18]使用 SDS-PAGE 技术在棉铃虫围食膜中发现了 16 种蛋白,Campbell 等^[15]通过质谱技术鉴定出了 41 个棉铃虫幼虫围食膜蛋白质。随着生物技术的发展,梁振普等^[17]通过 LC-MS/MS 技术鉴定了 169 个棉铃虫围食膜蛋白质。其中也包括了碱性磷酸酶 2 (alkaline phosphatase 2)、氨肽酶 N1 (aminopeptidase N1)、ATP 合成酶 β 亚基 (ATP synthase subunit beta)、V 型质子 ATP 酶 D2 亚基 (V-type proton ATPase subunit D2) 等,这些蛋白是 Bt 杀虫蛋白结合的受体,与 Bt 抗性产生有一定的关系。

然而,对棉铃虫围食膜蛋白与 Bt 抗性的关系研究甚少,本研究以棉铃虫抗、感品系围食膜为对象,采用蛋白质分离和配体杂交 (ligand blot) 技术,研究棉铃虫围食膜上与 Bt-Cry1Ac 存在结合能力有差异的蛋白,通过质谱鉴定和生物信息学分析等技术,鉴定可能参与 Bt 杀虫蛋白抗性进化的差异蛋白。研究有助于理解棉铃虫围食膜蛋白与 Bt 杀虫蛋白之间的作用,为进一步明确 Bt 抗性机制、制定合理的 Bt 抗性治理策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及饲养条件

敏感品系棉铃虫 (96S): 于 1996 年采自河南省新乡棉田,室内用人工饲料饲养至今,从未接触任何杀虫剂。棉铃虫 Bt 抗性品系 (BtR): 在室内用 Cry1Ac 蛋白筛选了 175 代,相对抗性倍数为 3 500 倍,筛选方法参见史艳霞等^[19]方法。饲养条件: 温度 (27 ± 2) °C,相对湿度 (75 ± 10) %,光周期为 L//D = 14 h // 10 h。幼虫在指形管 (直径 2 cm, 长度 15 cm) 中用人工饲料^[20]饲养,成虫在产卵笼 (直径 29.5 cm, 高 35 cm) 中用 10% 蜂蜜水饲养。上述所有棉铃虫品系均由中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组馈赠。

1.2 供试 Bt 菌株及抗体

供试 *Bacillus thuringiensis* HD-73 菌株和 Cry1Ac 抗体均由中国农科院植物保护研究所生物技术组馈赠。二抗为山羊抗兔,购自北京中杉金桥公司。

1.3 棉铃虫围食膜蛋白的提取分离

1.3.1 围食膜样品的获取

分别取抗、感品系健康的 5 龄棉铃虫幼虫,置

于冰上 10 min,剖取围食膜,用冷却的生理盐水(0.7% NaCl)冲洗去掉里面的食物,在滤纸上快速吸干多余液体,每 1 条围食膜放入 1 个 EP 管中,液氮中快速冷却,使用 FD5508 冷冻干燥机(美国 SIM 公司)冷冻干燥 48 h 后,置-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 棉铃虫围食膜蛋白的分离纯化

参考 Campbell 等^[15]和李怡萍等^[21]的方法,称取冷冻干燥的抗、感品系棉铃虫围食膜样品各 1 mg,进行无水三氟利克酸(anhydrous trifluoromethanesulfonic acid, TFMS)处理,用 GlycoPr-file TM IV,Chemical Deglycosylation Kit(美国 Invitrogen 公司)进行总蛋白的提取,再用 2D Clean-Up Kit(美国 GE Biosciences 公司)纯化提取的总蛋白。

1.3.3 棉铃虫围食膜蛋白质含量的测定

取 1.3.2 中纯化的抗、感品系围食膜蛋白沉淀(指初始取的冷冻干燥围食膜为 1 mg,经 TMFS 处理与纯化后获得的总蛋白沉淀),分别用 200 μL 上样缓冲液 IEF 溶解。12 000 r/min、4℃,离心 5 min (5145D 台式离心机,德国 Eppendorf Corporation),除去不溶物质和泡沫,取上清液,用 2D Quant Kit(美国 GE Biosciences 公司)测定蛋白浓度。根据测定的蛋白浓度计算出 1 mg 干燥的围食膜样品中蛋白质总重和蛋白质含量。每样品重复 3 次,测定数据使用 DPS 9.50 中独立样本 *t* 测验进行差异显著性分析。

1.3.4 棉铃虫围食膜蛋白的 NuPAGE 电泳

取 1.3.2 中纯化的抗、感品系围食膜蛋白沉淀,使用 NuPAGE 4%~12% Bis-Tris Mini Gel 预制梯度胶(美国 Invitrogen 公司)及 NuPAGE 电泳槽(美国 Stragene 公司)进行电泳,电泳电压为 200 V,电泳时长为 50 min。电泳完成后进行考染。

1.3.5 棉铃虫围食膜蛋白与活化 Cry1Ac 的结合能力检测

采用 1.3.4 中的方法对抗性和敏感品系的围食膜蛋白进行电泳检测。上样之前要测其蛋白浓度,使二者保持相同的蛋白浓度。电泳结束后的胶块不染色,直接进行 ligand blot,先加活化的 Cry1Ac,再分别加一抗 Cry1Ac 抗体和二抗山羊抗兔,最后使用 Eagle Eye System 凝胶成像仪系统(美国 Stragene 公司)进行曝光检测。

1.4 抗、感品系棉铃虫围食膜差异蛋白的鉴定分析

1.4.1 棉铃虫围食膜蛋白的蛋白胶内酶解及质谱鉴定

在考染胶上用挖胶笔挖出选定的有显著差异的蛋白条带,尽可能避免切到胶以外的部分,放入离心管中。蛋白胶内酶解和质谱鉴定由华大蛋白公司完成。

1.4.2 棉铃虫围食膜蛋白的质谱数据生物学分析

将质谱鉴定过程中,由 MALDI-TOF(基质辅助激光解吸电离离子源和飞行时间质量分析器联用)质谱仪(新加坡 ABSciex 公司)获得肽指纹图谱(peptide-mass fingerprint, PMF),用 MASCO(<http://mascot.proteomics.com.cn/>)Aldente 软件搜索 NCBI nr 和 Swiss-Prot 数据库,并参考了中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组的棉铃虫 cDNA 文库数据,进行 BLAST,比对 PMF 的结果。比较数据库中相应多肽序列的质量数及其 MS/MS 图谱的相关性,由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组束长龙老师帮助检索。

2 结果与分析

2.1 抗、感品系棉铃虫围食膜蛋白含量

由表 1 可以看出,敏感品系棉铃虫的围食膜蛋白含量为 22.19%,抗性品系棉铃虫的围食膜蛋白含量为 26.99%,抗性品系蛋白含量显著高于敏感品系($P<0.05$)。

表 1 棉铃虫围食膜蛋白质含量¹⁾

Table 1 Protein content on the peritrophic membrane of <i>Helicoverpa armigera</i>		
供试品系 Insect strain		蛋白质含量/% Content of protein
敏感品系	Susceptible strain	(22.19±0.23)b
抗性品系	Resistant strain	(26.99±0.73)a

1) 不同小写字母代表不同品系间有显著差异(独立样本 *t* 测验, $P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level between different insect strains (the independent samples *t*-test).

2.2 棉铃虫围食膜蛋白的 NuPAGE 电泳分离

NuPAGE 电泳分离结果(图 1)显示,重复 3 次的结果可以看出,分离效果清晰,可以分离出大约 30 种围食膜蛋白,且所有蛋白包括大分子量 220 kD 和小分子量 10 kD 都能分离出来。

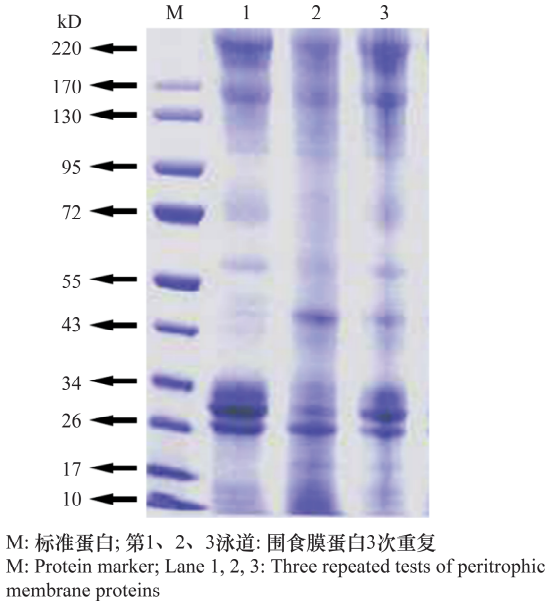
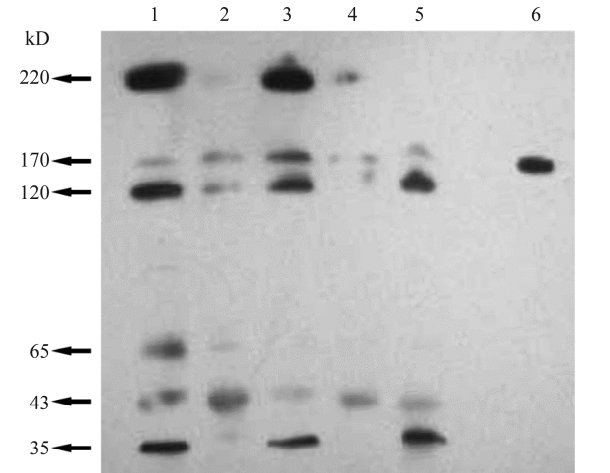


图 1 棉铃虫围食膜蛋白质 NuPAGE 电泳结果
Fig. 1 NuPAGE analysis of the peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera*

2.3 抗、感品系围食膜蛋白与 Cry1Ac 的结合能力比较

运用 ligand blot 检测分离纯化的抗、感品系棉铃虫围食膜蛋白与 Cry1Ac 的结合能力,结果发现蛋白大小分别为 220、170、120、65、43、35 kD 的 6 个围食膜蛋白可与 Cry1Ac 结合,而且不同品系中结



第 1、3、5 泳道: 敏感品系; 第 2、4 泳道: 抗性品系; 第 6 泳道: 活化的 Cry1Ac
Lane 1, 3, 5: Susceptible strain; Lane 2, 4: Resistant strain; Lane 6: Biotinylated Cry1Ac

图 2 Ligand blot 检测 Cry1Ac 结合蛋白
Fig. 2 Detection of Cry1Ac-binding proteins by ligand blot

合能力差异明显(图 2)。由 ligand blot 结果可知, Cry1Ac 与敏感品系的围食膜蛋白结合较强,与抗性品系结合弱。说明围食膜蛋白上可能存在 Cry1Ac 的受体。

2.4 棉铃虫抗、感品系围食膜差异蛋白分析及鉴定

运用 NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels 电泳比较 Bt 抗、感品系棉铃虫围食膜蛋白,敏感品系(S)得到了 220、170、120、60 kD 左右的 4 个差异明显的蛋白条带,而在抗性品系(R)上很少或者几乎没有(图 3)。

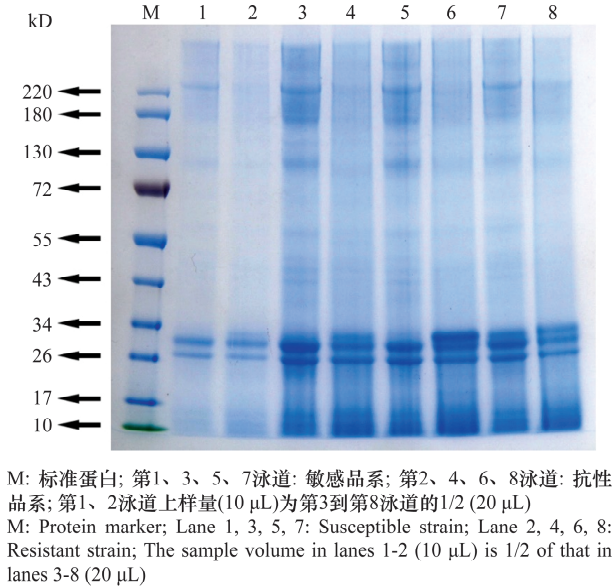


图 3 棉铃虫抗感品系围食膜蛋白 NuPAGE 电泳分析图
Fig. 3 NuPAGE analysis of peritrophic membrane proteins of the susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*

2.5 棉铃虫抗、感品系围食膜差异蛋白的质谱鉴定

用 MALDI-TOF 质谱分析鉴定了 2.4 中筛选到的 4 个蛋白,获得肽指纹图谱 PMF,通过比对成功鉴定得到了 4 个相关蛋白并获得相关生物学信息(表 2)。

经 NCBI blastn 比对,蛋白 1 虽然有一定数量匹配结果,但是检索覆盖率都较低,认为属于新蛋白。蛋白 4 与数据库中序列的一致性较低,也属于新蛋白。蛋白 2 与棉铃虫羧酸酯酶(carboxyl/choline esterase, 61.7 kD)有较好的一致性。蛋白 3 与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的血影蛋白(spectrin beta chain-like, 266.2 kD)有较好一致性(表 2)。

表 2 4 种棉铃虫围食膜蛋白 BLAST 比对结果

Table 2 BLAST comparison results of four *Helicoverpa armigera* peritrophic membrane proteins

蛋白编号 Protein number	匹配得分 Max score	总得分 Total score	覆盖率/% Query coverage	匹配蛋白名称 Protein name	匹配蛋白登录号 Accession number
1	58.5	58.5	35	—	—
2	2 637	2 637	99	Carboxyl/choline esterase	ADF43492.1
3	129	129	43	Spectrin beta chain-like	XP_001950095
4	无	无	无	—	—

3 结论与讨论

关于棉铃虫围食膜蛋白质分离与鉴定的研究比较多。张严峻等^[18]采用 SDS-PAGE 不连续胶(3%分离胶,10%浓缩胶)发现很多不同分子量大小的蛋白质,分离出比较清晰的 16 个条带,蛋白质分子量一般在 97.4 kD 以下,很多蛋白质的分子量很接近。张小霞^[22]研究发现使用 12%分离胶和 5%浓缩胶可以分离的围食膜蛋白质种类较多,至少有 14 种蛋白质,并且小分子量的蛋白质含量较高,分子量一般在 97 kD 以下,蛋白质的分子量也比较接近。Campbell 等^[15]以棉铃虫、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和烟芽夜蛾 *Helicoverpa virescens* 为试虫,发现利用无水三氟甲烷磺酸(TMFS)可以溶解包括几丁质在内的全部围食膜组分,可将蛋白从几丁质中解离,获得几乎所有的围食膜蛋白,并以此鉴定出了 41 种蛋白。梁振普等^[17]参考 Campbell 等^[15]的研究,利用 TMFS 与 LC-MS/MS 技术鉴定出了 169 个棉铃虫围食膜蛋白质。其中也包括了 ALP、APN、ATP 合成酶 β 亚基、ABC 转运蛋白等可能为 Bt 杀虫蛋白受体的蛋白质,这也说明了棉铃虫围食膜蛋白确实与 Bt 抗性产生有一定的关系^[23-26]。本研究运用 Campbell 等^[15]和李怡萍等^[21]的方法,将围食膜样品冷冻干燥后用 TMFS 法处理,然后进行 NuPAGE 梯度胶电泳,结果分离到约 30 种围食膜蛋白,分离效果较好。没有达到 Campbell 报道的 41 种蛋白,推测可能是因为选用的棉铃虫品系不同,存在地理差异,从而导致了分离出的蛋白数目不同。

有报道表明 Bt Cry 活化蛋白与中肠上皮细胞受体的结合,是 Bt 杀虫蛋白发挥作用的主要过程。类钙黏蛋白(cadherin-like protein,CAD)、氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)和 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette sub family C)等都是重要的 Bt 杀虫蛋白受体^[27-28]。其中 APN 为昆虫中肠 BBMV 中含量最高的蛋白酶(约占 55%),在中肠的功能行使过程中发挥着重要作用^[29]。

已有研究表明抗、感品系中肠上受体蛋白的差异表达可能是昆虫产生抗性的直接原因^[6,11,14]。本研究使用 2D Quant Kit 测定总蛋白浓度,发现抗性品系蛋白含量显著高于敏感品系,其中敏感品系围食膜中蛋白含量为 22.19%,抗性品系围食膜中蛋白含量为 26.99%,推测围食膜中蛋白含量增加很可能和抗性的产生相关。其次,本研究测定的敏感品系棉铃虫围食膜蛋白含量和张严峻等^[18]测定的 34.47%的结果差距较大,推测可能是由于本研究使用的 TMFS 处理方法与张严峻等^[18]使用的酸水解、碱水解以及 Folin-酚处理方法不同,使得中间过程中损耗了蛋白质。

为了进一步验证围食膜上蛋白质的功能,本研究运用配体杂交技术比较了抗、感品系棉铃虫围食膜蛋白与 Cry1Ac 的结合特性。结果发现 6 个围食膜蛋白(大小为 220、170、120、65、43、35 kD 左右)可与 Cry1Ac 结合,且敏感品系上结合强度明显大于抗性品系。其中 120 kD 大小的蛋白推测可能是 APN 蛋白,65 kD 大小的蛋白推测可能是 ALP 蛋白,大小与已有报道的棉铃虫中肠上的 APN、ALP 等 Bt 杀虫蛋白受体大小也基本一致^[30-33]。Zhang 等^[34]发现 APN 基因突变导致棉铃虫对 Cry1Ac 抗性增加,Agrawal 等^[35]也发现减少斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 体内 APN 基因的表达,也会显著降低虫体对 Cry1C 的敏感性。也有报道表明,在部分鳞翅目抗性品系昆虫的中肠组织中,ALP 的表达量有所下降^[36-37]。

本研究利用 NuPAGE 电泳技术比较了抗、感品系围食膜蛋白的差异,获得了 4 种差异明显的蛋白,这 4 种蛋白只存在于敏感品系,在抗性品系中缺失;通过质谱鉴定和生物信息学分析方法,确定了其中 2 种为棉铃虫羧酸酯酶和血影蛋白,推测另外 2 种蛋白可能是新蛋白。羧酸酯酶是能水解含羧基官能团的酸酯、酰胺和硫酯类化合物的一类酯酶^[38-39]。大部分羧酸酯酶与化学信息素代谢和杀虫剂抗性产生有关,如拟除虫菊酯类、氨基甲酸酯类、有机磷类等杀虫剂在昆虫体内的解毒过程中羧酸酯酶均发挥着重要作用^[5]。也有文献报道棉铃虫中肠中有着较

高活性的羧酸酯酶,在棉铃虫解除毒素毒性的过程中起着重要的作用^[15]。血影蛋白(spectrin)是红细胞细胞骨架中最重要的蛋白质,它与锚蛋白(ankyrin)和跨膜阴离子交换蛋白(anion exchanger1, AE1)共同维持红细胞膜结构的稳定性和柔韧性^[40-41]。而围食膜也是由中肠细胞分泌的一层非细胞组织,其中围食膜蛋白也有维持围食膜弹性和伸缩特性的功能,维持着围食膜的结构。综合以上研究结果,推测本研究中鉴定出的这两种蛋白很可能与 Bt 抗性有关。

本研究证明棉铃虫围食膜蛋白质中,存在能与 Bt 杀虫蛋白结合的蛋白,可能与 Bt 抗性相关,研究结果对于进一步明确 Bt 抗性机制、制定合理的 Bt 抗性治理策略提供了理论依据。

参考文献

- [1] 郭予元. 棉铃虫的研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] 李冬梅, 陈蓉. 棉铃虫发生为害特点及防治措施[J]. 农业科技通讯, 2018, 103(4): 270-271.
- [3] 吴孔明, 郭予元. 我国 20 世纪棉花害虫研究的主要成就及展望[J]. 应用昆虫学报, 2000, 37(1): 45-49.
- [4] 陆宴辉. 与时俱进的中国棉花害虫治理研究[J]. 植物保护学报, 2021, 48(5): 937-939.
- [5] WU Kongming, LU Yanhui, FENG Hongqiang, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton [J]. Science, 2008, 321(5896): 1676-1678.
- [6] 刘晨曦, 李云河, 高玉林, 等. 棉铃虫对转 Bt 基因抗虫棉花的抗性机制及治理[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 106(10): 920-928.
- [7] WEI Jizhen, GUO Yuyuan, LIANG Gemei, et al. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 7714. DOI: 10.1038/srep07714.
- [8] 吴益东, 管放, 沈慧雯, 等. 我国棉铃虫对 Bt 蛋白 Cry1Ac 抗性现状及分子机制研究进展[J]. 植物保护学报, 2021, 48(5): 958-963.
- [9] ZHAO Xinming, LIU Shuyun, ZHOU Pandeng, et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins [J]. Plant Protection, 2013, 39(1): 1-7.
- [10] ADANG M J, CRICKMORE N, JURAT-FUENTES J L. Chapter two-diversity of *Bacillus thuringiensis*, crystal toxins and mechanism of action [J]. Advances in Insect Physiology, 2014, 47(2): 39-87.
- [11] HAYAKAWA T, SHITOMI Y, MIYAMOTO K, et al. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori* [J]. FEBS Letters, 2004, 576(3): 331-335.
- [12] TERRA W R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2001, 47(2): 47-61.
- [13] TABASHNIK B E, ZHANG Min, FABRICK J A, et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 15107. DOI: 10.1038/srep15107.
- [14] 郭巍. 粉纹夜蛾对苏云金杆菌 Cry1Ac 的抗性及其防御体系的研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [15] CAMPBELL P M, CAO A T, HINES E R, et al. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera* [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 38(10): 950-958.
- [16] 李杰. 棉铃虫中肠靶标蛋白的分离与鉴定[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [17] 梁振普, 王亮, 李鹏娟, 等. 棉铃虫围食膜的蛋白质组鉴定[J]. 昆虫学报, 2019, 62(2): 181-192.
- [18] 张严峻, 谭军, 林玉清. 棉铃虫围食膜的结构和组成[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 140-143.
- [19] 史艳霞, 张永军, 王桂荣, 等. Bt 抗性和敏感棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的变化[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(3): 394-398.
- [20] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进[J]. 植物保护, 1999, 25(2): 15-17.
- [21] 李怡萍, 仵均祥, 梁革梅, 等. 棉铃虫围食膜蛋白的电泳分离技术[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(6): 1753-1759.
- [22] 张小霞. ClanGV 的分子生物学特性和棉铃虫 PM 的研究[D]. 武汉: 中国科学院, 2005.
- [23] 钟丰, 王亚楠, 谢丙堂, 等. 棉铃虫 V-ATP 酶亚基 A 基因克隆及表达谱分析[J]. 植物保护学报, 2016, 43(5): 705-712.
- [24] PAN Zhizhen, XU Lian, LIU Bo, et al. PxAPN5 serves as a functional receptor of Cry2Ab in *Plutella xylostella* (L.) and its binding domain analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(Pt 1): 516-521.
- [25] QIU Lin, ZHANG Boyao, LIU Lang, et al. Proteomic analysis of Cry2Aa-binding proteins and their receptor function in *Spodoptera exigua* [J/OL]. Scientific Reports, 2017, 7: 40222. DOI: 10.1038/srep40222.
- [26] CHEN Lin, WEI Jizhen, LIU Chen, et al. Specific binding protein ABCC1 is associated with Cry2Ab toxicity in *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 745. DOI: 10.3389/fphys.2018.00745.
- [27] XU Chengchen, WANG Bicheng, YU Ziniu, et al. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins [J]. Toxins, 2014, 6(9): 2732-2770.
- [28] JIN Lin, ZHANG Haonan, LU Yanhui, et al. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 169-174.
- [29] LOSEVA O, IBRAHIM M, CANDAS M, et al. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. Insect Biochemistry and Molecular

Biology, 2002, 32(5): 567–577.

- [30] LIANG Gemei, WANG Guirong, XU Guang, et al. Purification of aminopeptidase n protein and differences in cDNAs encoding APN1 between susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* strains to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(6): 456–467.
- [31] 宁长明. 棉铃虫中肠碱性磷酸酯酶的基因克隆及其功能分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2009.
- [32] 陆琼. 不同 Bt 毒素对四种鳞翅目害虫中肠 BBMV 的作用机制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [33] 牛琳琳. 棉铃虫 APNs 在不同 Bt 杀虫机制中的作用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [34] ZHANG Shaoping, CHENG Hongmei, GAO Yulin, et al. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(7): 421–429.
- [35] AGRAWAL N, MALHOTRA P, BHATNAGAR R K. Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4583–4592.
- [15] WEI Jizhen, YANG Shuo, CHEN Lin, et al. Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2018, 9(2211): 1653. DOI: 10.3389/fphys.2018.01653.
- [16] WEI Jizhen, LIANG Gemei, WU Kongming, et al. Cytotoxicity and binding profiles of activated Cry1Ac and Cry2Ab to three insect cell lines [J]. Insect Science, 2017, 25(4): 655–666.
- [17] CAO Guangchun, FENG Hongqiang, GUO Fang, et al. Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Scientific Reports, 2014, 4: 5629. DOI: 10.1038/srep05629.
- [18] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进 [J]. 植物保护, 1999, 25(2): 16–18.
- [19] LIU Sisi, WANG Mo, LI Xiaochun. Overexpression of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua* [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 11273. DOI: 10.1038/srep11273.
- [20] WEI Jizhen, YAO Xue, YANG Shuo, et al. Suppression of calcineurin enhances the toxicity of Cry1Ac to *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 634619. DOI: 10.3389/FMICB.2021.634619.
- [21] WEI Jizhen, ZHANG Min, LIANG Gemei, et al. APN1 is the functional receptor of Cry1Ac, but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea* [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 19179. DOI: 10.1038/srep19179.
- [22] ABBOTT W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide [J]. Journal of Economic Entomology, 1925, 18

- [36] JURAT-FUENTES J L, KARUMBIAIAH L, JAKKA S R, et al. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* [J/OL]. PLoS ONE, 2011, 6(3): e17606. DOI: 10.1371/journal.pone.0017606.
- [37] JAKKA S R K, GONG Liang, HASLER J, et al. Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(4): 1023–1034.
- [38] WHEELLOCK C E, SHAN Guomin, OTTEA J, et al. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides [J]. Journal of Pesticide Science, 2005, 30(2): 75–83.
- [39] 赵彩霞. 棉铃虫 3 个羧酸酯酶基因的时空表达差异研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [40] AMLAN D, CHRISTINE B, SRILAKSHMI D, et al. Spectrin functions upstream of ankyrin in a spectrin cytoskeleton assembly pathway [J]. The Journal of Cell Biology, 2006, 175(2): 325–335.
- [41] 林雪桂. 红细胞质膜内血影蛋白与脂质微环境之间相互作用的分子模拟研究 [D]. 金华: 浙江师范大学, 2021.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 131 页)

- (2): 265–267.
- [23] 段云鹏, 姚雪, 李品, 等. 棉铃虫 V-ATPase 亚基 B 是 Cry1Ac 的功能受体 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(5): 1094–1102.
- [24] QIU Lin, ZHANG Boyao, LIU Lang, et al. Proteomic analysis of Cry2Aa-binding proteins and their receptor function in *Spodoptera exigua* [J/OL]. Scientific Reports, 2017, 7: 40222. DOI: 10.1038/srep40222.
- [25] 钟丰, 王亚楠, 谢丙堂, 等. 棉铃虫 V-ATP 酶亚基 A 基因克隆及表达谱分析 [J]. 植物保护学报, 2016, 43(5): 705–712.
- [26] XIE Chao, XIONG Lei, YE Min, et al. Genome-wide analysis of V-ATPase genes in *Plutella xylostella* (L.) and the potential role of PxVHA-G1 in resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 11(169): 74–83.
- [27] QIU L, SUN Y, JIANG Z, et al. The midgut V-ATPase subunit A gene is associated with toxicity to crystal 2Aa and crystal 1Ca-expressing transgenic rice in *Chilo suppressalis* [J]. Insect Molecular Biology, 2019, 28(4): 520–527.
- [28] 姚雪, 马洌扬, 张博, 等. 棉铃虫 ATP 合酶亚基 α 对 Cry2Ab 毒理的影响 [J]. 植物保护学报, 2021, 48(5): 1034–1042.
- [29] WEI Jizhen, ZHANG Min, LIANG Gemei, et al. Alkaline phosphatase 2 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea* [J]. Insect Molecular Biology, 2019, 28(3): 372–379.
- [30] 李晨. V-ATPaseH 亚基对东亚飞蝗蜕皮和存活的影响 [D]. 重庆: 重庆大学, 2012.

(责任编辑: 杨明丽)