

Cry1Ac 毒素对小菜蛾幼虫中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的影响

赵爱平¹ 展恩玲¹ 孙 聪¹ 刘同先^{1,2*} 李怡萍^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学, 应用昆虫学重点实验室, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学, 农业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)

摘要: 为了明确 Cry1Ac 毒素对小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的影响, 利用蛋白酶专性底物测定其中肠各蛋白酶活性在不同缓冲液中的最适 pH, 并用不同浓度 Cry1Ac 毒素饲喂小菜蛾幼虫后测定该毒素的致死中浓度 LC_{50} , 观察中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的变化, 分析 Cry1Ac 毒素与昆虫中肠酶活性间的关系。结果表明, 小菜蛾幼虫中肠总蛋白酶在 Tris-HCl、 KH_2PO_4 /NaOH 和 Glycine/NaOH 三种缓冲液中最适 pH 均为 11.0; 强碱性胰蛋白酶的最适 pH 分别为 10.0、10.5 和 10.5; 弱碱性胰蛋白酶的最适 pH 均为 8.5; 胰凝乳蛋白酶的最适 pH 分别为 8.5、9.0 和 9.0。Cry1Ac 毒素对小菜蛾的致死中浓度 LC_{50} 为 0.343 $\mu\text{g/mL}$ 。用不同浓度 Cry1Ac 毒素饲喂小菜蛾幼虫后, 其中肠各蛋白酶活性均随时间的变化而变化。弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性明显升高, 且随浓度升高呈上升趋势; 在取食 36~72 h 期间低浓度处理组的羧酸酯酶活性与对照组间无显著差异, 而高浓度处理组羧酸酯酶活性显著高于对照组。表明 Cry1Ac 毒素能够显著影响小菜蛾的中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性。

关键词: 小菜蛾; 蛋白酶; 羧酸酯酶; Cry1Ac 毒素; 酶活性

Effects of Cry1Ac toxin on proteases and carboxylesterase activities in the larval midgut of *Plutella xylostella*

Zhao Aiping¹ Zhan Enling¹ Sun Cong¹ Liu Tongxian^{1,2*} Li Yiping^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Applied Entomology, Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: To clarify the effects of Cry1Ac toxin on midgut protease and detoxification enzyme activities of *Plutella xylostella* larvae, the midgut fluid proteinase activities were detected to obtain the optimum pH value in several buffer solutions by using the specific substrates. The LC_{50} of Cry1Ac was determined, when *P. xylostella* larvae were treated with different concentrations of Cry1Ac, and the insect proteases and carboxylesterase activities were studied. Meanwhile, the relationship between Cry1Ac and these enzyme activities were monitored. The optimum pH levels of midgut total proteases of *P. xylostella* larvae in the three buffers, Tris-HCl, KH_2PO_4 /NaOH, and Glycine/NaOH, were 11.0; those of high-alkaline trypsin were 10.0, 10.5 and 10.5, respectively; those of low-alkaline trypsin were 8.5, 8.5 and 8.5; and those of chymotrypsin were 8.5, 9.0 and 9.0, respectively. The LC_{50} of Cry1Ac for *P. xylostella* was 0.343 $\mu\text{g/mL}$. After feeding *P. xylostella* larvae with different concentrations of Cry1Ac tox-

基金项目: 国家自然科学基金(31071693), 陕西省农业科技创新与攻关项目(2016NY-058), 中央高校基本科研业务费专项项目(2014YB087)

* 通讯作者 (Authors for correspondence), E-mail: txliu@nwsuaf.edu.cn, liyiping@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2017-02-21

in, the protease activities exhibited different trends in feeding time: the low-alkaline trypsin and the chymotrypsin activities of *P. xylostella* were obviously increased and tended to be more active with increasing concentration. The carboxylesterase activities had no significant changes in low concentration toxin treatment groups after 36–72 h. However, the carboxylesterase activities in high concentration toxin treatment groups were greater than that of the control. The study indicated that the Cry1Ac toxin could significantly affect the protease and carboxylesterase activities of *P. xylostella*.

Key words: *Plutella xylostella*; protease; carboxylesterase; Cry1Ac toxin; enzyme activity

小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 是十字花科蔬菜的主要害虫, 具有种群适应能力强、繁殖速度快、发生世代多、世代重叠严重等特点, 且对多种杀虫剂产生不同程度的抗性, 防治难度大 (Zounos et al., 1999; 冯夏, 2011)。苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 制剂是一种新型生物农药, 已广泛用于小菜蛾的无公害防治中, 对小菜蛾为害具有一定的控制作用。苏云金芽胞杆菌在其生长过程中可形成具有活性的杀虫晶体蛋白或 δ -内毒素 (喻子牛等, 1996), 原毒素被取食后, 在昆虫中肠高 pH 环境下溶解, 后经中肠蛋白水解酶活化为毒素分子, 结合上皮细胞刷状缘毛上的受体, 形成寡聚体, 聚集在细胞上并破坏细胞通透性, 最后导致昆虫死亡 (Schnepf et al., 1998)。说明 Bt 毒素只有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, 并可导致 Bt 抗性的产生 (谭声江等, 2001)。目前主要用于害虫防治的 Bt 毒素有 Cry 和 Cyt 两种蛋白, 其中 Cry 家族蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种昆虫的杀虫作用具有特异性 (Schnepf et al., 1998), 其中 Cry1Ac 毒素应用较为广泛 (彭琦等, 2015)。

取食 Bt 毒素的昆虫可通过调节自身中肠内消化蛋白酶的活性以减缓其活化或加快降解过程, 从而降低 Bt 毒素杀虫活性或抗性 (Forcada et al., 1996; Mohan & Gujar, 2003)。目前, 有很多学者认为丝氨酸蛋白酶在 Bt 毒素的活化和降解中起主导作用, 尤其在鳞翅目昆虫的中肠内 (Oppert et al., 1996; Li et al., 2004), 如张继红等 (2001) 发现棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 中肠类胰蛋白酶在降解 Bt 毒素过程中起主要作用。另外, 昆虫对 Bt 毒素抗性的产生与中肠蛋白酶有关, 研究发现中肠蛋白酶能减缓对 Bt 毒素的活化并加快对其降解, 导致昆虫对 Bt 毒素不敏感, 使其产生抗性 (Forcada et al., 1996; Keller et al., 1996), 如印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hübner) 对 Bt 毒素产生抗性后, 其中肠蛋白酶活性降低, 对原毒素的活化随之减弱, 而且对活化毒素的抗性要低于原毒素 (Candas et al., 2003)。

酯酶是昆虫的解毒酶, 在昆虫解毒、代谢农药作用方面具有重要作用 (王殿轩等, 2010), 其中羧酸酯酶是昆虫对杀虫剂代谢过程中较重要且研究较多的一种酯酶, 昆虫对杀虫剂抵抗能力的强弱在很大程度上受该酶活性的影响 (魏绪强等, 2008), 其在许多昆虫代谢有机磷类和拟除虫菊酯杀虫剂中发挥重要作用 (Brattsten, 1990; 魏绪强等, 2008)。如取食转 Bt 棉第 1–3 代的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 的羧酸酯酶活性显著低于取食常规棉 (吴刚, 2009); 取食 Bt 棉的甜菜夜蛾幼虫和取食转双价基因 (*Bt*+*CpTI*) 抗虫棉的棉蚜种群体内的羧酸酯酶活性显著高于取食普通棉花 (薛明等, 2002; Xue et al., 2011)。

目前, 关于 Cry1Ac 毒素与小菜蛾中肠蛋白酶及羧酸酯酶活性关系的研究鲜有报道。因此, 本研究通过测定小菜蛾中肠各蛋白酶在不同缓冲液中的最适 pH, 并以不同浓度的 Bt 毒素 (Cry1Ac) 饲喂小菜蛾幼虫, 获得 Cry1Ac 毒素对小菜蛾的致死中浓度 LC_{50} , 测定小菜蛾在最适 pH 条件下 Cry1Ac 毒素对中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的影响, 探究昆虫中肠各蛋白酶活性变化与 Cry1Ac 毒素之间的关系, 以期明确 Cry1Ac 毒素的作用机理和昆虫对 Cry1Ac 产生抗性的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 小菜蛾采集于陕西省太白县的极少使用化学农药的无公害蔬菜生产基地, 于温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(70 \pm 10)\%$ 、光周期 14 L: 10 D、光照强度 4 000 lx 的条件下饲养。幼虫用甘蓝饲养, 成虫用 10% 蜂蜜水饲喂。甘蓝品种为秦甘 70, 为西北农林科技大学培育。

试剂及仪器: Cry1Ac 毒素由中国农业科学院植物保护研究所张杰老师提供。氨苯磺胺偶氮酪蛋白、BAPNA、TAME、BTee、2-D Quant Kit 试剂盒、Insect CESELISA Kit 检测试剂盒等, 美国 Sigma 公司; 其它试剂均为国产分析纯。Sunrise 2 全波长酶

标仪, Tecan Austria 公司; PHSJ-3F 实验室 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小菜蛾幼虫中肠各蛋白酶最适 pH 的测定

试验设置 3 种不同 pH 的缓冲溶液, 分别为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 6.0~11.0; 0.1 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 缓冲液, pH 6.0~11.0; 0.1 mol/L Glycine/NaOH 缓冲液, pH 6.0~11.0。在不同 pH 条件下测定中肠各蛋白酶活性, 确定其活性的最适 pH, 重复 3 次。

中肠酶液的制备: 将小菜蛾 3 龄中期幼虫在冰上迅速解剖, 截取中肠及其内含物, 置于 1.5 mL 离心管中, 液氮冷冻, -20°C 储存备用。在冷冻样品中加 0.15 mol/L NaCl 溶液, 研磨成匀浆, 4°C 、12 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液作为中肠酶提取液。根据 Bradford (1976) 方法进行蛋白浓度测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 根据 2-D Quant Kit 试剂盒说明书测定中肠酶提取液中可溶性总蛋白含量。

总蛋白酶活性的测定: 将 20 mg/mL 底物氨苯磺胺偶氮酪蛋白溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液即为氨苯磺胺偶氮酪蛋白液, 4°C 保存备用。在 1.5 mL 离心管中加氨苯磺胺偶氮酪蛋白液 100 μL 、中肠酶提取液 10 μL 及 0.1 mol/L 反应缓冲液 90 μL , 混匀后在 30°C 温箱孵育反应 3 h, 加入 150 μL 预冷的 30% (m/V) 三氯乙酸终止反应。反应混合物在 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清液加入至 96 孔板点样孔中, 于 415 nm 处读取吸光度值 (王琛柱和钦俊德, 1996)。

类胰蛋白酶活性测定: 采用 BAPNA 和 TAME 两种专性底物。20 mg/mL BAPNA 溶于二甲基亚砜中, 在 1.5 mL 离心管中加混合 BAPNA 溶液 100 μL 、中肠酶提取液 10 μL 及 0.1 mol/L 的反应缓冲液 90 μL , 混匀后 30°C 孵育反应 20 min, 加入至 96 孔板点样孔中, 于 405 nm 处读取吸光度值 (王琛柱和钦俊德, 1996)。TAME 粉末溶于 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中, 配制成浓度为 2 nmol/L 的底物混合溶液, 在 1.5 mL 离心管中加底物混合溶液 100 μL 、中肠酶提取液 10 μL 及 0.1 mol/L 的反应缓冲液 90 μL , 混匀后加入至 96 孔板点样孔中, 30°C 孵育反应 20 min, 于 247 nm 处读取吸光度值 (Wirnt, 1974)。

类凝乳蛋白酶活性测定: 以 BTEE 为反应底物, 将 BTEE 粉末溶于含 10% (V/V) 甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中, 配制成浓度为 1 mmol/L 的底物混合溶液, 在酶标仪点样孔中加入底物混合溶液 100 μL 、中肠酶提取液 10 μL 及 0.1 mol/L 缓冲液 90 μL , 30°C

孵育反应 20 min, 于 256 nm 处读取吸光度值 (Wirnt, 1974)。

1.2.2 Cry1Ac 毒素对小菜蛾的 LC_{50} 测定

采用郭磊等 (2013) 方法测定 Cry1Ac 毒素对小菜蛾的 LC_{50} 。取大小一致、相对平整的甘蓝叶片, 在清水中浸泡 10~20 min, 除去表面的蜡层, 以利于药剂浸润叶片, 悬挂晾干备用。将 Cry1Ac 毒素活化蛋白用 PBS 缓冲液配制浓度为 10.8、54、95、190、475、540、2 700、5 400 ng/mL 的溶液, 以 PBS 溶液作对照。将甘蓝叶片浸入各 Cry1Ac 毒素溶液中 10 s, 于阴凉通风处晾干, 用不同浓度处理过的甘蓝叶片饲喂小菜蛾 3 龄初期幼虫, 每处理 20 头幼虫, 重复 3 次。1 周后调查其存活状况, 轻轻触碰供试昆虫, 无生存迹象为死亡, 计算小菜蛾的毒力方程和致死中浓度 LC_{50} 。

1.2.3 饲喂 Cry1Ac 毒素后小菜蛾幼虫的中肠酶活性

根据小菜蛾的毒力方程和致死中浓度 LC_{50} , 将 Cry1Ac 毒素活化蛋白用 PBS 缓冲液配制浓度为 0.038、0.114、0.343、1.03、3.0、9.3 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液各 100 mL。将甘蓝叶片分别浸入各 Cry1Ac 毒素溶液中 10 s, 以 PBS 缓冲液作对照, 于阴凉通风处晾干备用。

选取大小均匀且健康的 3 龄初期小菜蛾幼虫, 饥饿 4 h, 饲喂经不同浓度 Cry1Ac 毒素溶液处理过的甘蓝叶片, 分别于 0、4、12、24、36、48、60、72 h 后测定各处理组的死亡率, 并取样提取其中肠酶, -20°C 保存备用, 以未取食毒素的幼虫作对照。每处理重复 3 次。

在各蛋白酶的最佳缓冲液和最适 pH 条件下, 测定经不同浓度 Cry1Ac 毒素饲喂后小菜蛾幼虫中肠内总蛋白酶 (Glycine/NaOH, pH 11.0)、强碱性类胰蛋白酶 (Tris-HCl, pH 10.5)、弱碱性类胰蛋白酶 (Tris-HCl, pH 8.5)、类胰凝乳蛋白酶 (Glycine/NaOH, pH 9.0) 和羧酸酯酶的活性, 前 3 种酶活性的测定方法同 1.2.1。

羧酸酯酶活性的测定: 按照 Insect CES ELISA Kit 试剂盒说明进行测定。从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出 12 孔塑料板条, 设置标准品孔和样品孔, 标准品孔各加浓度为 0、62.5、125、250、500、1 000 nmol/mL 的标准品 50 μL ; 样本孔先加中肠酶提取液 10 μL , 再加样本稀释液 40 μL ; 标准品孔和样品孔中每孔加辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL , 封板膜封住反应孔, 37°C 温育 1 h; 弃去液体, 在吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1 min, 弃去洗涤液, 在吸水纸上拍干, 重复洗板 5 次; 每孔

加显色液A、B各50 μL , 37℃避光孵育15 min; 每孔加终止液50 μL , 15 min内在450 nm波长处测定各孔OD值。绘制出标准品线性回归曲线, 按照曲线方程计算各样本的浓度。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析, 采用Tukey多重比较进行差异显著性检验, 采用GraphPad Prism 5软件进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾幼虫中肠各蛋白酶活性的最适pH

不同pH条件下小菜蛾幼虫中肠各蛋白酶活性的测定结果表明, 小菜蛾幼虫中肠总蛋白酶在Tris-HCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 和Glycine/NaOH三种缓冲液中最适pH均为11.0; 强碱性胰蛋白酶的最适pH

分别为10.0、10.5和10.5; 弱碱性胰蛋白酶的最适pH均为8.5; 胰凝乳蛋白酶的最适pH分别为8.5、9.0和9.0。

小菜蛾幼虫中肠总蛋白酶活性随pH的增大而增加, 其中在pH 11.0时活性最大, 在Tris-HCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 和Glycine/NaOH三种缓冲溶液中的活性分别为0.1628、0.1525和0.1638 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (图1-A); 在pH 6.0~8.5之间, 强碱性胰蛋白酶活性上升较快, 而在pH 8.5~10.0之间上升缓慢, 当pH大于10.0时, 酶活性下降 (图1-B); 弱碱性胰蛋白酶活性随pH的增加表现为先增加后降低, 在pH 6.0~7.5和pH 9.5~11.0范围内, 酶活性在Tris-HCl和 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 缓冲液中无显著差异 (图1-C); 弱碱性胰蛋白酶活性在3种缓冲溶液中差异显著, 但均随pH的增加呈现先增加后降低趋势 (图1-D)。

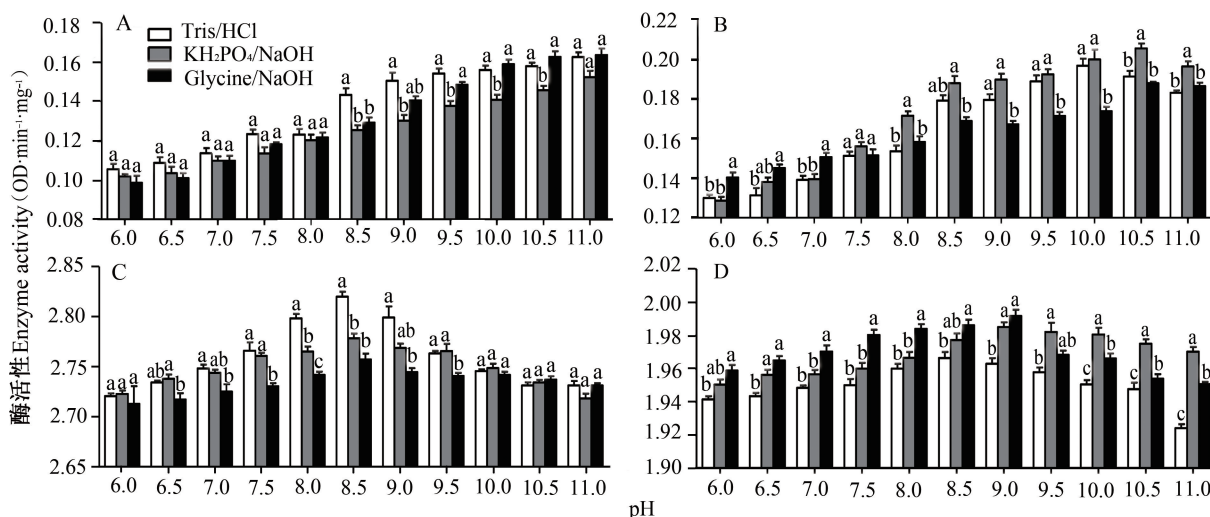


图1 不同pH缓冲液中小菜蛾3龄幼虫中肠蛋白酶活性

Fig. 1 Protease activities of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* in the midgut in different pH buffer solutions

A: 总蛋白酶; B: 强碱性胰蛋白酶; C: 弱碱性胰蛋白酶; D: 胰凝乳蛋白酶。图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同一pH条件下不同小写字母表示经Tukey法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。A: Total protease; B: high-alkaline trypsin; C: low-alkaline trypsin; D: chymotrypsin. Data are mean $\pm$ SE. Different letters at the same pH condition indicate significant difference at $P<0.05$ level by Tukey test.

2.2 Cry1Ac毒素对小菜蛾的 LC_{50}

用不同浓度的Cry1Ac毒素饲喂小菜蛾3龄初期幼虫, 获得不同浓度Cry1Ac毒素饲喂条件下小菜蛾的死亡数, 拟合得到Cry1Ac毒素对小菜蛾的致死中浓度 LC_{50} 为0.343 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 毒力回归方程为 $y=0.838x-2.125$ 。经浓度为0.114、0.343、1.030、3.100、9.300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Cry1Ac毒素处理后, 小菜蛾的死亡率分别为35.0%、50.2%、68.0%、78.5%和88.0%, 对照组的死亡率为1.0%, 表明小菜蛾的死亡率随Cry1Ac毒素浓度的提高而升高。

2.3 Cry1Ac毒素对小菜蛾蛋白酶活性的影响

经不同浓度Cry1Ac毒素饲喂后, 提取小菜蛾幼虫中肠酶液在各蛋白酶最适pH条件下的测定结果显示, 不同处理间各蛋白酶活性均存在显著差异。除强碱性胰蛋白酶活性外, 其它3种酶的活性均随Cry1Ac毒素浓度的增大呈增强趋势 (图2)。

取食4 h时, 除0.114 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和9.300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的总蛋白酶活性低于对照组外, 其它浓度处理组均高于对照组, 1.030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的总蛋白酶活性最高为0.0899 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 且显著高于对照组; 从取

食 12 h 开始,各浓度处理组的总蛋白酶活性均升高,且均高于对照(图 2-A)。取食 0~12 h 时,1.030、3.100 和 9.300 $\mu\text{g/mL}$ 处理组的强碱性胰蛋白酶活性均低于对照组,而在取食 12 h 后酶活性均显著高于对照组,其中 3.100 $\mu\text{g/mL}$ 处理组的强碱性胰蛋白酶活性高于对照组的现象持续到 72 h;0.114 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.343 $\mu\text{g/mL}$ 处理组在整个饲喂过程中的强碱性胰蛋白酶活性均低于对照组(图 2-B)。取食 36~60 h 各浓度处理组的弱碱性胰蛋白酶活性均高于对照组,在整个取食过程中高浓度处理组活性到达最高的时间迟于低浓度处理组(图 2-C)。取食 4 h 后,

1.030、3.100 和 9.300 $\mu\text{g/mL}$ 处理组的胰凝乳蛋白酶活性均高于对照组(图 2-D)。

2.4 Cry1Ac 毒素对小菜蛾羧酸酯酶活性的影响

经不同浓度的 Cry1Ac 毒素饲喂小菜蛾幼虫后,其羧酸酯酶活性的测定结果显示,在取食 0~4 h 时低浓度 0.038 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.114 $\mu\text{g/mL}$ 处理组的羧酸酯酶活性明显升高,显著高于对照组;在取食 12~24 h 时酶活性开始下降,在取食 36~72 h 时酶活性与对照组接近。高浓度 1.030 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.100 $\mu\text{g/mL}$ 处理组在取食 12 h 时羧酸酯酶活性低于对照组,而在取食 24~72 h 时酶活性显著高于对照组(图 3)。

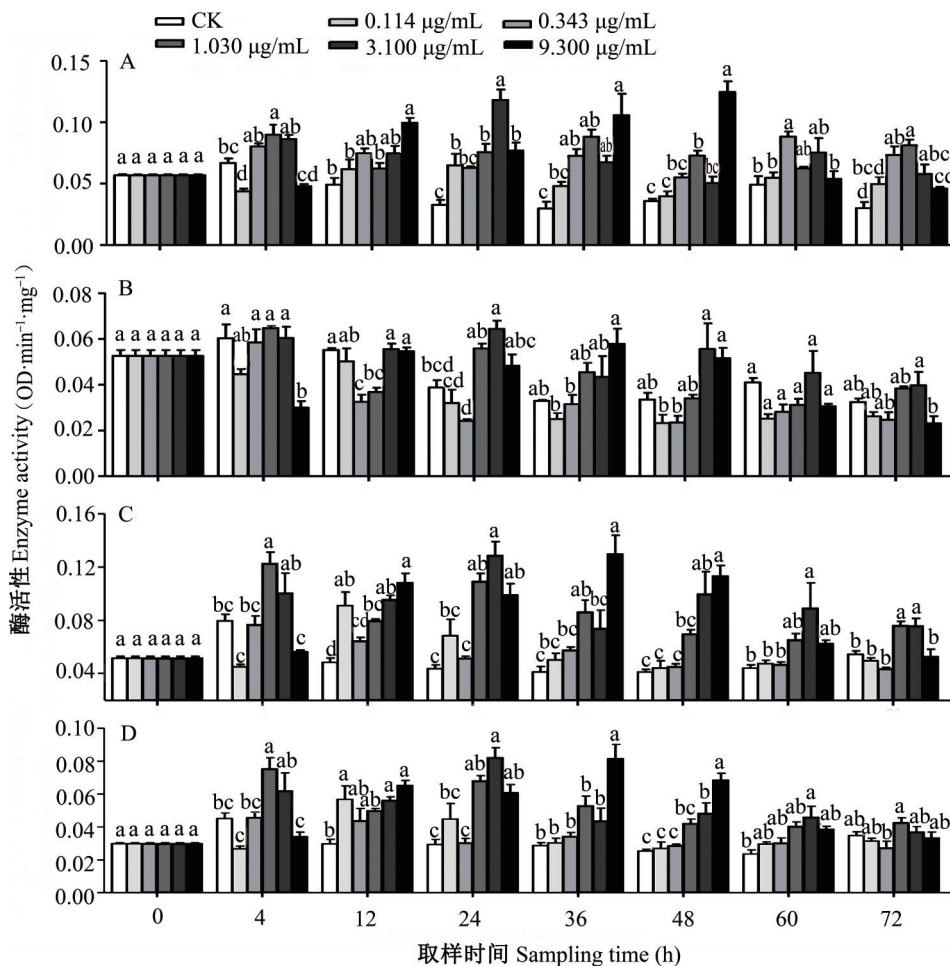


图 2 不同浓度 Cry1Ac 毒素对小菜蛾中肠蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Cry1Ac toxin on the activity of *Plutella xylostella* protease

A: 总蛋白酶; B: 强碱性胰蛋白酶; C: 弱碱性胰蛋白酶; D: 胰凝乳蛋白酶。图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同一取样时间下不同小写字母表示经 Tukey 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。A: Total protease; B: high-alkaline trypsin; C: low-alkaline trypsin; D: chymotrypsin. Data are mean $\pm$ SE. Different letters at the same sampling time indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey test.

3 讨论

本研究测定结果表明,小菜蛾幼虫中肠总蛋

白酶在 Tris-HCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 和 Glycine/NaOH 三种缓冲液中最适 pH 均为 11.0,强碱性胰蛋白酶的最适 pH 分别为 10.0、10.5 和 10.5,弱碱性胰蛋白

酶的最适 pH 均为 8.5,胰凝乳蛋白酶的最适 pH 分别为 8.5、9.0 和 9.0,说明小菜蛾各消化蛋白酶在不同缓冲溶液中的最适 pH 不同。小菜蛾幼虫中肠强碱性胰蛋白酶活性的最适 pH 与总蛋白酶活性的最适 pH 较接近,这与赵爱平等(2016)对梨小食

心虫 *Grapholita molesta* (Busck) 幼虫中肠蛋白酶最适 pH 的研究结果一致,也与王琛柱和钦俊德(1996)认为强碱性胰蛋白酶可能是棉铃虫幼虫消化道内的一种重要消化酶的结论一致。说明强碱性胰蛋白酶可能是昆虫中肠的一种重要消化酶。

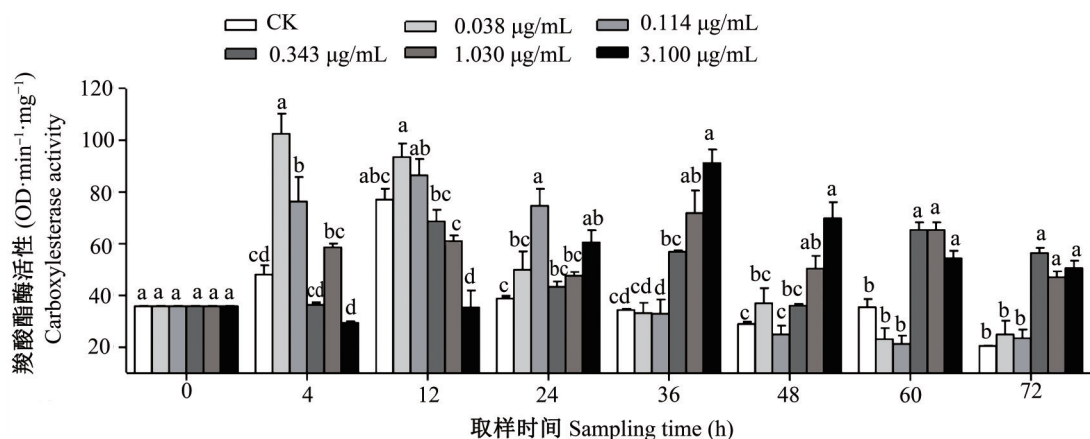


图3 不同浓度 Cry1Ac 毒素对小菜蛾中肠羧酸酯酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of Cry1Ac toxin on the activity of *Plutella xylostella* carboxyl esterase (CarE)

图中数据为平均数±标准误。同一取样时间下不同小写字母表示经 Tukey 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters at the same sampling time indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey test.

小菜蛾和印度谷螟幼虫中肠的类胰凝乳蛋白酶可激活 Bt 原毒素 (Oppert et al., 1994; Mohan & Gujar, 2003); 棉铃虫幼虫中肠内类胰凝乳蛋白酶活性随 Bt 毒素蛋白浓度增大而显著升高,经不同浓度的 Cry1Ac 毒素处理后小菜蛾幼虫中肠内的蛋白酶活性随饲喂时间而变化 (张少燕等, 2004)。在本研究中,取食 Cry1Ac 毒素后,小菜蛾幼虫胰凝乳蛋白酶活性明显升高,并且随浓度升高呈上升趋势,这一结果与 Shao et al. (1998) 试验结果相似,表明 Bt 毒素在鳞翅目幼虫中肠内的降解与胰凝乳蛋白酶活性有重要关系。徐艳玲等 (2006) 和解娜等 (2012) 发现粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 取食 Cry1Ac 毒素后,其中肠蛋白酶活性下降,而本研究结果与其存在分歧,这可能与昆虫种类有关,该方面还有待进一步研究。

本试验结果显示,总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性随饲喂 Cry1Ac 毒素时间的增加而变化,高浓度处理组的各蛋白酶活性高于低浓度处理组,且高浓度处理组酶活性到达最高的时间迟于低浓度处理,这可能是由于高浓度 Cry1Ac 毒素发挥作用的持效期长,说明丝氨酸蛋白酶需要更多的时间来降解高浓度 Cry1Ac 毒素,从而增加了 Cry1Ac 毒素对昆虫的作用时间,增强了毒素的作用效果,此结果与魏纪珍等 (2012)

研究结果一致。本研究还发现 Cry1Ac 毒素浓度越高,小菜蛾中肠蛋白酶活性越高,且死亡率也越高,说明蛋白酶活性与 Cry1Ac 毒素的杀虫活性密切相关。王问学等 (2000) 发现昆虫取食毒素后,其蛋白酶活性上升。说明昆虫中肠蛋白酶在 Cry1Ac 毒素发挥活性中具有重要作用。

本研究结果表明,小菜蛾幼虫中肠内的羧酸酯酶活性随饲喂 Cry1Ac 毒素时间的延续而发生改变,在取食 36~72 h 时,低浓度处理组的羧酸酯酶活性与对照组接近,而高浓度处理组的羧酸酯酶活性显著高于对照组,这与张少燕等 (2004) 和张彦等 (2012) 的研究结果类似,推测小菜蛾幼虫可能因摄入 Cry1Ac 毒素后,通过提高中肠的羧酸酯酶活性,增加与毒素分子的结合,阻断或降低了毒素分子与靶标位点的结合,从而达到虫体自身的解毒作用。同时,随着 Cry1Ac 毒素浓度升高羧酸酯酶活性升高,小菜蛾死亡率增高,说明羧酸酯酶活性对 Cry1Ac 毒素的杀虫效力有一定的促进作用,其解毒作用不是很明显,但与 Bt 抗性产生之间的关系还需深入研究。本研究是短期饲喂 Cry1Ac 毒素的结果,后续还需增加饲喂时间和代数,探究长期饲喂 Cry1Ac 毒素对小菜蛾中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的影响。

参考文献 (References)

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2): 248–254
- Brattsten LB. 1990. Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides.//Green MB, Lebaron HM, Moberg WK. *Managing Resistance to Agrochemicals*. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 42–60
- 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. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(1): 19–28
- Feng X, Li ZY, Wu QJ, Chen AD, Wu YD, Hou YM, He YY, Li JH, Xie SH, Zhang JM, et al. 2011. Research progress of the resistance management and sustainable control of diamondback moth (*Plutella xylostella*) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 247–253 (in Chinese) [冯夏, 李振宇, 吴青君, 谌爱东, 吴益东, 侯有明, 何余容, 李建洪, 谢圣华, 章金明, 等. 2011. 小菜蛾抗性治理及可持续防控技术研究与示范. *应用昆虫学报*, 48(2): 247–253]
- Forcada C, Alcácer E, Garcera MD, Martínez R. 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens*, strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 31(3): 257–272
- Guo L, Bian QL, Zhang HJ, Gao XW, Liang P. 2013. Bioassay technique for *Plutella xylostella*: Leaf-dip method. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 556–560 (in Chinese) [郭磊, 边全乐, 张宏军, 高希武, 梁沛. 2013. 小菜蛾抗药性监测方法—叶片药膜法. *应用昆虫学报*, 50(2): 556–560]
- Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prodovsky E, Regev A, Koncz C, Schell J, Zilberstein A. 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instars larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(4): 365–373
- Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY, Buschman LL. 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8): 753–762
- Mohan M, Gujar GT. 2003. Characterization and comparison of midgut protease of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(1): 1–11
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, Macintosh SC, Mcgaughey WH. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis*, resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 198(3): 940–947
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, Upton SJ, Mcgaughey WH. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella*, and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis*, CryIA(c) protoxin. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 26(6): 571–583
- Peng Q, Zhou ZS, Zhang J. 2015. Research prospects in insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(5): 712–722 (in Chinese) [彭琦, 周子珊, 张杰. 2015. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白研究进展. *中国生物防治学报*, 31(5): 712–722]
- Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775–806
- Shao Z, Cui Y, Liu X, Yi H, Ji J, Yu Z. 1998. Processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(1): 73–81
- Tan SJ, Chen XF, Li DM. 2001. Research progresses on mechanism of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Entomological Knowledge*, 38(1): 12–17 (in Chinese) [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]
- Wang CZ, Qin JD. 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7–13 (in Chinese) [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): 7–14]
- Wang DX, Yuan K, Gao XW. 2010. Comparison of carboxylesterase activity between the resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* to phosphine. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 275–280 (in Chinese) [王殿轩, 原锴, 高希武. 2010. 赤拟谷盗的磷化氢敏感和抗性品系体内羧酸酯酶的活性比较. *昆虫知识*, 47(2): 275–280]
- Wang WX, Liao FY, Mo JC. 2000. The effect of genkwanin active extraction digest enzymes and tissue structures of *Pieris rapae*. *Scientia Sinica*, 36(5): 69–72 (in Chinese) [王问学, 廖飞勇, 莫建初. 2000. 茺花乙醇粗提物对菜粉蝶幼虫消化酶系的影响. *林业科学*, 36(5): 69–72]
- Wei JZ, Liang GM, Gao XW, Gao Z, Zhang WN, Guo YY. 2012. The effects of Cry2Ab and Cry1Ac insecticidal proteins on protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 839–846 (in Chinese) [魏纪珍, 梁革梅, 高希武, 高珍, 张万娜, 郭予元. 2012. Cry2Ab及Cry1Ac杀虫蛋白对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响. *应用昆虫学报*, 49(4): 839–846]
- Wei XQ, Qian K, Zeng XP, Gao XW. 2008. Relationship between carboxylesterase in German cockroach (*Blattella germanica*) from different areas in Beijing and its resistance to organophosphate. *Chinese Journal of Vector Biology & Control*, 19(5): 413–417 (in Chinese) [魏绪强, 钱坤, 曾晓芑, 高希武. 2008. 羧酸酯酶与北京市不同城区德国小蠊对有机磷杀虫剂抗性的关系. *中国媒介生物学及控制杂志*, 19(5): 413–417]
- Wirnt R. 1974. Trypsin, measurements with N-a-ptoluenesulfonyl-l-arginine methyl ester as substrate.//Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis: samples, reagents, assessment of results*, Vol.

2. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 1013–1024
- Wu G. 2009. Effects of plant insect-resistant compounds on the nutritional utilization and enzyme activities of beet army worm, *Spodoptera exigua* (Hübner). Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [吴刚. 2009. 植物抗虫物质对甜菜夜蛾营养效应和酶活性的影响. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Xie N, Jiang XF, Luo LZ, Zhang L. 2012. Effects of Cry1Ac toxin on activities of some enzymes in the larval midgut of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 168–175 (in Chinese) [解娜, 江幸福, 罗礼智, 张蕾. 2012. Cry1Ac杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响. *昆虫学报*, 55(2): 168–175]
- Xu YL, Wang ZY, He KL, Bai SX, Zhang J. 2006. Comparative analysis of detoxification enzyme and midgut proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14(6): 889–893 (in Chinese) [徐艳聆, 王振营, 何康来, 白树雄, 张杰. 2006. 对Bt抗性和敏感亚洲玉米螟解毒酶和中肠蛋白酶的比较. *农业生物技术学报*, 14(6): 889–893]
- Xue L, Lu Y, Zhou ZT, Gao XW, Song DL. 2011. Effect of transgenic Bt plus CpTI cotton on carboxylesterase and acetylcholinesterase of cotton aphid *Aphis gossypii*. *Agricultural Science & Technology*, 12(7): 997–1000
- Xue M, Dong J, Zhang CS. 2002. Effect of feeding Bt cotton and other plants on changes of development and insecticide susceptibilities of lesser armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Plant Protection*, 29(1): 13–18 (in Chinese) [薛明, 董杰, 张成省. 2002. 取食转Bt基因棉等植物对甜菜夜蛾生长发育和药剂敏感性的影响. *植物保护学报*, 29(1): 13–18]
- Yu ZN, Sun M, Liu ZD, Dai JY, Chen YH, Yu L, Luo XX. 1996. The classification of *Bacillus thuringiensis* and their biological active protein genes. *Chinese Journal of Biological Control*, 12(2): 85–89 (in Chinese) [喻子牛, 孙明, 刘子铎, 戴经元, 陈亚华, 喻凌, 罗曦霞. 1996. 苏云金芽孢杆菌的分类及生物活性蛋白基因. *中国生物防治*, 12(2): 85–89]
- Zhang JH, Wang CZ, Qin JD. 2001. Partial purification and characterization of trypsin-like enzyme from *Helicoverpa armigera* larval midgut and its effect on the degradation of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 282–289 (in Chinese) [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]
- Zhang SY, Li DM, Xie BY. 2004. Effects of Bt toxic protein on development and activities of several relative enzymes in *Helicoverpa armigera*. *Entomological Knowledge*, 41(6): 536–540 (in Chinese) [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]
- Zhang Y, Ling GM, Gao Z. 2012. Effects of Vip3Aa and Cry1Ac on enzyme activity in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* larvae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 853–861 (in Chinese) [张彦, 梁革梅, 高珍. 2012. Vip3Aa及Cry1Ac对棉铃虫幼虫多种酶活力的影响. *应用昆虫学报*, 49(4): 853–861]
- Zhao AP, Sun C, Zhan EL, Wu JX, Li YP. 2016. Effects of protease inhibitors on the activities of midgut proteases of larval *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(10): 1069–1078 (in Chinese) [赵爱平, 孙聪, 展恩玲, 仵均祥, 李怡萍. 2016. 蛋白酶抑制剂对梨小食心虫幼虫中肠蛋白酶活性的影响. *昆虫学报*, 59(10): 1069–1078]
- Zounos AK, Allan EJ, Jennifer MA. 1999. Bioactive compound from neem tissue cultures and screening against insects. *Pesticide Science*, 55(4): 497–500

(责任编辑: 王 璇)