# 棉铃虫四个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆 与表达分析

张彩虹 Zaw Lin Naing Ei Thinzar Soe 梁革梅\*

(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:为明确棉铃虫Helicoverpa armigera 丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, serpin)的 种类及其表达特性,利用PCR技术克隆棉铃虫的 serpin基因,使用生物信息学软件预测其结构并进 行系统进化分析,采用实时荧光定量PCR(real time quantitative PCR,RT-qPCR)技术比较 serpin基 因在棉铃虫不同发育阶段和组织中的表达量及取食 Cry1Ac 后其表达量的变化。结果表明,共获得 serpin-a、serpin-b、serpin-c、serpin-e 四个棉铃虫 serpin基因,全长为1119~1254 bp,编码373~418 个 氨基酸,均包含一段具有反应中心环的保守结构域,且与斜纹夜蛾 Spodoptera litura、草地贪夜蛾 S. frugiperda等鳞翅目昆虫 serpin的同源性较高。serpin-a和 serpin-e 在棉铃虫4龄幼虫期的表达量最高 , serpin-b和 serpin-c分别在成虫期和蛹期表达量最高。serpin-a在中肠和围食膜中表达量最高, serpin-b在头、中肠和表皮中表达量最高, serpin-c在头部表达量最高, serpin-e 在中肠和血淋巴中的 表达量显著高于其他组织。棉铃虫取食低浓度 Cry1Ac 后,中肠的 serpin-b和 serpin-e 的表达量显 著增加。推测不同 serpin基因在棉铃虫不同发育时期和组织中可能发挥不同的作用,其中 serpin-b 和 serpin-e 可能参与棉铃虫对 Cry1Ac 的解毒过程。

关键词:棉铃虫;丝氨酸蛋白酶抑制剂;表达量;CrylAc

# Cloning and expression analysis of four serine protease inhibitor genes in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Zhang Caihong Zaw Lin Naing Ei Thinzar Soe Liang Gemei<sup>\*</sup> (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To clarify the species and expression characteristics of serine protease inhibitor (serpin) in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*, *serpin* genes in *H. armigera* were cloned by using PCR method, and their structure and phylogenesis were predicted and analyzed with bioinformatics. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to compare the relative expression level els of *serpin* genes in the different stages and different tissues, and the changes in the expression level of *serpins* in the larvae fed with Cry1Ac were also compared. The results showed that the full-length sequences of four *serpin* genes (*serpin-a*, *serpin-b*, *serpin-c*, *serpin-e*) were 1 119–1 254 bp, encoding 373–418 amino acids. All four *serpin* genes contained reactive center loop domains, with a high homology with those of Lepidoptera, such as *Spodoptera litura* and *S. frugiperda*. The highest expression level els of *serpin-a* and *serpin-e* occurred in the 4th-instar larvae, and the highest expression of *serpin-a* was in midgut

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011-002)

<sup>\*</sup> 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: gmliang@ippcaas.cn 收稿日期: 2021-03-15

and the Malpighian tube. The expression of *serpin-b* was the highest in head, midgut and cuticle. The highest relative expression level of *serpin-c* was in head, and the expression of *serpin-e* in midgut and hemolymph was significantly higher than that in other tissues. The expression levels of *serpin-b* and *serpin-e* in the midgut of *H. armigera* were significantly up-regulated after its larvae were fed with low concentrations of Cry1Ac. The results indicated that different *serpin* genes might play different roles in different developmental stages and tissues in *H. armigera*, and *serpin-b* and *serpin-e* might be involve in the toxicity of Cry1Ac to *H. armigera*.

Key words: Helicoverpa armigera; serine protease inhibitor; expression level; Cry1Ac

丝氨酸蛋白酶(serine protease, SP)是一类重要 的蛋白水解酶家族,能够参与多种生理过程,如消 化、信号转导和防御反应等(Veillard et al., 2016)。 丝氨酸蛋白酶以丝氨酸为活性中心,其催化结构域 由组氨酸、丝氨酸和天冬氨酸3个氨基酸残基组成 (Jiang et al., 2000)。依据酶切位点的不同丝氨酸蛋 白酶主要分为胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等,胰蛋白 酶和胰凝乳蛋白酶是鳞翅目昆虫中最丰富的消化 酶,能够水解食物中的蛋白质,为昆虫提供营养物质 (Srinivasan et al., 2006),同时参与昆虫的多种生理 反应,如蜕皮、发育及几丁质的合成等(Herrero et al., 2005;Broehan et al., 2007)。

丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteases inhibitor, serpin)作为胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等多种蛋 白酶最有效的抑制因子,有3个β折叠(A,B,C)和 7~9个α螺旋,其反应中心环(reactive center loop, RCL) 是 $\beta$ 折叠A与C之间由17个氨基酸组成的暴 露区域,可以与靶标蛋白酶特异性结合形成不可分 裂的酶抑制剂复合物,是决定对目标蛋白酶特异性 和抑制活性的关键结构(Irving et al., 2000)。serpin 广泛分布于动物、植物和微生物中(Rawlings et al., 2004; Law et al., 2006), 在家蚕 Bombyx mori、烟草天 蛾 Manduca sexta、亚洲玉米螟 Ostrinia furnacalis 和 棉铃虫等鳞翅目昆虫中,其功能研究也受到广泛关 注,已证实 serpin 可参与昆虫肠道消化和免疫反应 等生理进程(Choo et al., 2012; Ge et al., 2013)。如 Zou & Jiang(2005)和An & Kanost(2010)研究发现 烟草天蛾 serpin-5 和 serpin-6 通过调节血淋巴中酚 氧化酶的活性来调控其免疫反应;Yuan et al.(2017) 认为棉铃虫的黑化作用是通过 serpin-5 和 serpin-9 基因抑制酚氧化酶的活性进行调控。此外, Prabu et al.(2020)报道称 serpin-3 在亚洲玉米螟 Cry1Ah抗 性品系中肠和血细胞中表达量显著升高,同时抗性 品系亚洲玉米螟酚氧化酶的活性显著高于敏感品 系,而且Cry1Ah毒素会显著增加亚洲玉米螟抗性品 系的免疫反应。

苏云金芽胞杆菌(Bacillus thuringiensis, Bt)产 生的杀虫蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目和膜翅目等 害虫具有特异性的杀虫活性,Cry蛋白是种类最多 的一类 (Schnepf et al., 1998; Cantón et al., 2011; Chakroun et al., 2016), Bt杀虫剂和转Bt抗虫作物已 被广泛用于田间害虫防治(Lu et al., 2012; Carrière et al., 2015)。昆虫取食Bt原毒素后,原毒素的活化 直接影响Bt的杀虫效果,不完全水解或者过度水解 都会降低 Bt 的杀虫活性(Walters et al., 2008; Melo et al., 2016)。已有研究报道证实, 不仅昆虫中肠参 与活化Bt的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等基因的突 变、表达量或活性的改变会引起Bt毒力降低,抗性 产生(Wei et al., 2018; Xiao & Wu, 2019), 而且昆虫 取食Bt后会引起serpin基因表达量的显著变化,如 小菜蛾 Plutella xylostella 取食 Bt 后, serpin-5 和 serpin-7基因表达出现上调, serpin-18的表达则显著下 调(Li et al., 2018);甜菜夜蛾 Spodoptera exigua 经 Vip3Aa处理后,其*serpin*基因表达上调(Bel et al., 2013); 云杉卷叶蛾 Choristoneura fumiferana 和烟草 天蛾取食Cry1Ab后,其serpin基因显著上调(van Munster et al., 2007)。推测 serpin 基因可能通过调 控中肠蛋白酶活性参与Bt的杀虫作用。

转基因Bt抗虫棉自1997年以来在我国广泛种 植,有效控制了棉铃虫的为害。本研究基于前期转 录组数据,利用DGE和RNA-seq法分析拟获得棉铃 虫的serpin基因,克隆得到其全长,并进行基因序列 和结构分析,利用实时荧光定量PCR(real time quantitative PCR,RT-qPCR)分析serpin在棉铃虫不 同发育阶段和组织的表达量,以及经Cry1Ac低剂量 处理后棉铃虫中肠serpin表达量的变化,以期为进 一步揭示serpin基因在棉铃虫对Bt产生抗性过程中 的作用研究奠定理论基础。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试昆虫:96S敏感棉铃虫于1996年采自河南

省新乡县棉田,命名为96S。幼虫在室内以自制的 人工饲料饲养,成虫用10%糖水补充营养(梁革梅 等,1999),饲喂期间从未接触过任何Bt蛋白或杀虫 剂。饲养条件为温度(26±1)℃、光周期16L:8D、 相对湿度(75±10)%。

培养基:LB固体培养基:氯化钠 10g、胰蛋白胨 10g、酵母5g、琼脂15g,用去离子水定容至1000 mL, 高压蒸汽灭菌后,置室温冷却至55℃左右加入 100 mg/mL 氨苄/卡那抗生素100 μL、20 μg/mL X-Gal 200 μL和24 mg/mL IPTG 100 μL倒板,封口 膜封闭于4℃储存。

供试Bt蛋白、主要试剂及仪器:Cry1Ac蛋白,北 京绽诺思特生物科技有限公司。RNA提取TRIzol<sup>®</sup> 试剂,美国Invitrogen公司;异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl thiogalactoside, IPTG)、X-gal、FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒,天根生化科技 (北京)有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒, Axygen公司;pEASY-Blunt Simple 克隆载体、 Trans1-T1感受态细胞,全式金(北京)生物技术有限 公司;其他试剂均为国产分析纯。NanoDrop 1000 紫外分光光度计,Thermo Fisher(上海)公司; DHP120型恒温培养箱,上海自动化实验仪器厂; CHB-100型恒温金属浴,博日(杭州)科技有限公 司;Bio-Rad型凝胶成像系统,美国伯乐公司;ABI-7500Fast荧光定量PCR仪,美国ABI公司。

#### 1.2 方法

#### 1.2.1 试虫样品收集

选取大小一致的96S敏感棉铃虫5龄幼虫共 30头,置于冰上解剖并截取中肠,置于0.7% NaCl溶 液中洗去内含物,用滤纸吸干水分,液氮速冻后 于-80℃冰箱保存,用于serpin基因克隆。收集棉铃 虫1龄幼虫50头、2龄幼虫50头、3龄幼虫25头、4龄 幼虫25头、5龄幼虫10头、蛹5头、成虫5头,-80℃ 保存备用。同时,取棉铃虫4龄幼虫30头,解剖头、 表皮、前肠、中肠、后肠、马氏管、围食膜、血淋巴和脂肪 体9种组织,液氮冷冻后保存于-80℃冰箱备用。每种 样品设3次生物学重复,用于serpin基因表达量分析。

将4 μg/g Cry1Ac 原蛋白混合到人工饲料中饲 喂96S敏感棉铃虫4龄幼虫2h后,置于冰上解剖中 肠,液氮冷冻后置于-80℃保存。以正常人工饲料 饲养的棉铃虫作为对照。每个处理30头,3次重复。 1.2.2 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

用 TRIzol® 试剂提取总 RNA,并置于 Nano-

Drop1000紫外分光光度计上检测总RNA浓度,并 用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。按照Fast-King gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒说明书 合成 cDNA第一链,产物置于-20℃保存备用。

### 1.2.3 基因克隆

根据棉铃虫的转录组数据(Wei et al., 2018)分 析得到4个*serpin*基因,利用NCBI-Primer-BLAST 分别设计PCR特异性引物(表1)。以中肠cDNA为 模板,进行PCR反应,25 µL PCR反应体系:cDNA 模板1µL、2×Super Pfx MasterMix 12.5 µL、上下游 引物各1µL、ddH<sub>2</sub>O 9.5 µL。反应条件:98℃预变性 2 min;98℃变性10 s;55℃退火30 s;72℃延伸40 s; 35个循环;72℃再延伸5 min。PCR产物用1.5%琼脂 糖电泳检测,并进行凝胶回收和纯化,将回收产物连接 到 pEASY-Blunt Simple 克隆载体上,转化至 Trans1-T1感受态细胞中,于37℃在含有 IPTG和X-gal的培养 基上培养,挑选阳性克隆,送至中美泰和公司测序。 **1.2.4** 序列分析及系统进化树构建

利用 DNAMAN 软件对 serpin 基因进行序列比 对;并用 ge2000 软件将编码 DNA 序列翻译成氨基 酸; ExPaSy(http://web.expasy.org/compute\_pi)、SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)、NCBI CDD (Conserved Domain Database)和 SWISS MODEL (https://swissmodel.expasy.org/)分 别用于预测 serpin 蛋白分子量和等电点、信号肽、保 守性结构域及三级结构;用 NCBI-Blast(https://blast. ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)在线搜索得到棉铃虫 serpin 同源蛋白,使用 MEGA 5.1 软件邻接法 (neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,Bootstrap 取样值为1000。

#### **1.2.5** RT-qPCR

基于 *serpin* 基因序列,用Beacon Designer 8设计 RT-qPCR 特异性引物,内参基因为核糖体蛋白 S15 基因 *RPS15* (GenBank 登录号:XM\_021326200.1), 合成并进行引物扩增效率检测(表1)。以不同龄期、 不同组织及不同处理的 cDNA 为模板,利用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪扩增。反应体系为20  $\mu$ L:cD-NA 模板 1  $\mu$ L, 2×SuperReal PreMix Plus 10  $\mu$ L, 正反 向引物各 0.6  $\mu$ L, 50×ROX Reference Dye<sup>A</sup> 0.4  $\mu$ L, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu$ L。反应条件参照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒说明书进行: 95℃预变性 15 min;95℃变性 10 s;60℃退火/延伸 32 s;40个循环,采用2<sup>-ΔΔet</sup>法分析 *serpin* 基因的相对 表达量(Livak & Schmittgen,2001)。

引物 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	引物用途 Application
Serpin-a-F	ATGTTTAAAGTAGTGGCAGTGG	基因克隆
Serpin-a-R	TTATTTCTTAGGGTCTCTG	Clone
Serpin-b-F	ATGCAGTTCATAGTGTTTTTAGTGAG	
Serpin-b-R	TCAGTACAGAGATGGCGT	
Serpin-c-F	ATGGTCGAGATCACAATGAGGGTC	
Serpin-c-R	TCAATATACAGTAGGTTTAG	
Serpin-e-F	ATGGATTCCAAGGCTCTTTC	
Serpin-e-R	TCAGCCGCGATAGACGCCCATG	
Serpin-a-qPCR-F	CTTCTCGCCTATACATCA	
Serpin-a-qPCR-R	CGTCTTCAGGTAGTAAGT	
Serpin-b-qPCR-F	CCAAGCCAGAGTAATAGAAT	
Serpin-b-qPCR-R	CGAGGAATGAAGCAATCT	
Serpin-c-qPCR-F	ATCGTCATACTGCCATAC	实时荧光定量
Serpin-c-qPCR-R	TCATCTTGTAGCCTCTTG	RT-aPCR
Serpin-e-qPCR-F	CCATTCCACATTACCGTAA	ki-qi cik
Serpin-e-qPCR-R	GTCACTGCTATCACCATAC	
RPS15-F	CTGAGGTCGATGAAACTCTC	
RPS15-R	CTCCATGAGTTGCTCATTG	

表1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

#### 1.3 数据分析

利用 SPSS Statistics 21 软件对试验数据进行方 差分析,不同龄期、不同组织间表达量的比较采用单 因素方差分析(ANOVA),并用 Tukey 法进行差异显 著性检验; Cry1Ac 毒素处理前后的表达量比较用 *t* 检验进行分析。

# 2 结果与分析

#### 2.1 Serpin基因克隆和生物信息学分析

本研究共获得了棉铃虫4个 serpins 基因,分别 命名为 serpin-a、serpin-b、serpin-c、serpin-e (Gen-Bank 登录号为MT066041~MT066044),其开放阅读 框全长分别为1239、1254、1203和1119bp,分别 编码413、418、401和373个氨基酸,预测分子量为 45~57 kD,等电点为4~7(表2)。除 serpin-e蛋白外, 其余 serpin蛋白 N端均包含16~21个氨基酸组成的 信号肽序列。预测得到的4种 serpin蛋白三维结构 存在较大差异,但均具有保守的 RCL结构域(图1)。

#### 2.2 Serpin 进化树分析

序列比对结果显示棉铃虫与其他鳞翅目昆虫 serpin氨基酸序列一致性高达80%以上,4个serpins 分属于不同亚支,其中serpin-a和serpin-e聚为一支, serpin-b与serpin-c进化为同一亚支(图2)。棉铃虫 serpin-a与草地贪夜蛾、粉纹夜蛾*Trichoplusia ni* serpin的亲缘关系较近;serpin-b与斜纹夜蛾、粉纹夜蛾 和草地贪夜蛾 serpin的亲缘关系最近;serpin-c与家 蚕、二化螟 serpin的亲缘关系较近;serpin-e与斜纹 夜蛾,草地贪夜蛾 serpin亲缘关系较近。

表2	棉铃虫	serpin	序列和	结构特征
----	-----	--------	-----	------

基因名	开放阅读框 Open reading frame/	预测分子量 Molecular weight/	等电点	信号肽 Signal peptide/	RCL区域 Reactive center loop domain/
Gene name	bp	kD	Isoelectric point	(aa)	(aa)
serpin-a	1 239	56.06	4.98	1-17	360-388
serpin-b	1 254	56.56	4.99	1-16	370-392
serpin-c	1 203	50.53	6.06	1-21	350-375
serpin-e	1 119	46.27	5.20	No	322-352

Table 2 Sequences and structural characteristics of serpins in Helicoverpa armigera

#### 2.3 Serpin 的时空发育动态

4个 serpins 基因在棉铃虫各个发育阶段都有表达,且差异显著。其中, serpin-a 在4龄幼虫期中表达量最高, 在其他发育时期的表达量差异不显著(图 3-A)。 serpin-b 在幼虫4龄后表达量显著增加, 到成

虫期达到最高(图3-B)。serpin-c在蛹期表达量最高,其次是5龄幼虫期和成虫期(图3-C)。serpin-e在4龄幼虫期中表达量最高,其次是3龄幼虫期,其余发育历期表达量之间差异不显著(图3-D)。



白色区域为使用CDD 预测的潜在的 RCL 保守结构域。 The white regions indicate the potential RCL domains predicted through CDD. 图1 预测得到的4个棉铃虫 serpin 蛋白三维结构

Fig. 1 The predicted 3D structures of four serpins in Helicoverpa armigera

#### 2.4 Serpin 的组织分布

4个 serpins 在棉铃虫各组织中都有表达,其中, serpin-a 在中肠和围食膜中的表达量显著高于其他 组织(图4-A); serpin-b 在头、马氏管及表皮中的表 达量较高(图4-B); serpin-c 在头中的表达量显著高 于其他组织,其次是血淋巴(图4-C); serpin-e 在血 淋巴中的表达量最高,其次是中肠(图4-D)。

#### 2.5 Cry1Ac诱导的 serpin 表达量变化

用4 μg/g Cry1Ac 处理棉铃虫4龄幼虫2h后,除 serpin-a 表达量略有下降外,其他3个 serpins 基因表达量都有所升高。与对照相比,低剂量 Cry1Ac 处理2h后, serpin-b和 serpin-e的表达量都显著上调(图5)。

## 3 讨论

Serpin具有一个位于多肽链C端的反应中心环 RCL,存在能被靶蛋白酶识别的氨基酸残基P1,与 P1羧基端相连的氨基酸残基为P1',P1~P1'之间的 肽键被水解后发挥作用(Irving et al.,2000)。本研 究用 SWISS-MODEL 模拟出 serpin 蛋白三维结构 后,对预测的保守结构域进行定位,可以直观看出 RCL 位于 serpin 的暴露区域。BLAST 结果显示棉 铃虫 serpin 与其他鳞翅目昆虫 serpin 的同源性高达 80%以上,与草地贪夜蛾、家蚕、粉纹夜蛾 serpin 亲 缘关系较近。据此,推测棉铃虫的 serpin 基因可能 与已报道的家蚕、烟草天蛾等鳞翅目昆虫 serpin 的 功能类似,即在消化、免疫反应等方面起着重要作用 (李国胜等,2013;Li et al.,2018)。

系统进化树结果还显示,棉铃虫4个 serpins 基 因进化差异较大, serpin-a和 serpin-e进化为一个亚 支,serpin-b和serpin-c进化为另一个亚支。4个serpins在棉铃虫各个发育阶段都有表达,但serpin-a和 serpin-e在4龄幼虫期的表达量最高, serpin-b在成 虫中表达量最高,serpin-c在蛹期的表达量最高。而 且,serpin在棉铃虫不同组织中的表达量也存在显 著差异,serpin-a在中肠和围食膜中的表达量显著高 于其他组织,serpin-b在头、马氏管及表皮中的表达 量较高,serpin-c在头中的表达量最高,serpin-e在血 淋巴中表达量最高。这种现象在其他昆虫中也有报 道,如Zhao et al.(2012)研究发现家蚕 serpin-15 在蛹 期高表达;家蚕 serpin-6 在5 龄幼虫头中表达水平先 升后降,分析其可能与家蚕蜕皮变态相关,而且serpin-6在表皮中转录水平高,可能参与了表皮黑化反 应(王彦云等,2013)。朱笑婷等(2017)对棉铃虫3个

serpins 基因进行组织表达分析,发现 serpin-6 在头中表达水平最高, serpin-5 在表皮中表达水平最高, serpin-10 在中肠中表达水平最高。因此,推测不同

serpin 基因在昆虫不同发育时期和不同组织中表达量的不同可能与其功能特异性有关,不同 serpin 基因在昆虫生长发育过程中发挥着不同功能。



Ha:棉铃虫; SI:斜纹夜蛾; Sf:草地贪夜蛾; Px:柑橘凤蝶; Vt:特美红蛱蝶; Ms:烟草天蛾; Bma: 野桑蚕; Bm:家蚕; Cs: 二化螟; Of:亚洲玉米螟; Gm:大蜡螟; Tn:粉纹夜蛾; Pr:菜粉蝶。Ha: Helicoverpa armigera; SI: Spodoptera litura; Sf: S. frugiperda; Px: Papilio xuthus; Vt: Vanessa tameamea; Ms: Manduca sexta; Bma: Bombyx mandarina; Bm: B. mori; Cs: Chilo suppressalis; Of: Ostrinia furnacalis; Gm: Galleria mellonella; Tn: Trichoplusia ni; Pr: Pieris rapae.

#### 图2 基于 serpin 氨基酸序列采用邻接法构建棉铃虫和其他鳞翅目昆虫的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of serpin from *Helicoverpa armigera* and other Lepidoptera insects based on the amino acid sequences by using neighbor-joining method

已有报道证实,昆虫取食Bt后会引起其serpin 基因表达量的显著变化,如小菜蛾取食Bt后,serpin-5和serpin-7基因表达上调,serpin-18则显著下 调(Li et al.,2018);Vip3Aa处理甜菜夜蛾后,serpin 基因上调表达(Bel et al.,2013);云杉卷叶蛾和烟草 天蛾取食Cry1Ab后,其serpin基因上调表达(van Munster et al.,2007)。本试验也证实,棉铃虫取食 Cry1Ac后中肠中serpin-b和serpin-e的表达量都显 著上调。由于昆虫中肠的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 与Bt杀虫活性直接相关,相关基因的突变、表达量 或活性的改变会引起Bt毒力降低,抗性产生(Wei et al.,2018;Xiao & Wu,2019),serpin又是胰蛋白酶、 胰凝乳蛋白酶最有效的抑制因子,因此推测serpin 基因可能通过调控中肠蛋白酶活性,从而参与Bt的 杀虫过程,其调控机理有待进一步研究。 研究表明 serpin 在昆虫抵抗病菌侵染等反应过 程中起着重要作用,如白僵菌 Beauveria、家蚕核型 多角体病毒 Bombyx mori nucleopolyhedrovirus 和藤 黄微球菌 Micrococcus luteus 等病原微生物侵染不 同时间会引起家蚕 serpin-15 表达量不同程度的上 调或下调(刘栋然,2015);黑胸败血芽胞杆菌 Bacillus bombyseptieus 诱导家蚕的 serpin上调表达,引起 家蚕的免疫应答反应(黄璐琳,2010);棉铃虫被注射 杆状病毒后, serpin-5 和 serpin-9 基因上调表达,通 过抑制酚氧化酶的活性来调控棉铃虫的黑化反应 (Yuan et al.,2017)。Bel et al.(2013)利用微矩阵分 析认为昆虫中上调表达的 serpin 基因与病原体防 御、蛋白质运输和代谢相关的基因同源,此类基因可 能参与昆虫免疫反应,病菌的防御等,下调表达的 serpin 基因与编码蛋白,代谢相关基因同源,推测可

5期

Cry1Ac处理棉铃虫后 serpin-b和 serpin-e 的表达量

都显著上调,因此,推测 serpin-b和 serpin-e 基因可能参与棉铃虫的抗病菌反应,也有待进一步验证。



A: serpin-a; B: serpin-b; C: serpin-c; D: serpin-e。1~5:1-5龄幼虫; P:蛹; M: 蛾子。 A: serpin-a; B: serpin-b; C: serpin-c; D: serpin-e.1~5:1st-5th instar larvae; P: pupa; M: moth. **图3** Serpin基因在棉铃虫不同发育时期的表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *serpin* genes during different developmental stages of *Helicoverpa armigera* 图中数据为平均数±标准误。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 lowercase letters indicate significant difference at P<0.05 level by Tukey test.





A: *serpin-a*; B: *serpin-b*; C: *serpin-c*; D: *serpin-e*。H: 头; FG: 前肠; MG: 中肠; HG: 后肠; MT: 马氏管; PM: 围食膜; FB: 脂肪体; HE: 血淋巴; C: 表皮。A: *serpin-a*; B: *serpin-b*; C: *serpin-c*; D: *serpin-e*. H: Head; FG: foregut; MG: midgut; HG: hindgut; MT: malpighian tube; PM: peritrophic membrane; FB: fat body; HE: hemolymph; C: cuticle.

#### 图4 Serpin 基因在棉铃虫不同组织中的表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *serpin* genes in *Helicoverpa armigera* during different stages 图中数据为平均数±标准误。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 lowercase letters indicate significant difference at P<0.05 level by Tukey test.



A: serpin-a; B: serpin-b; C: serpin-c; D: serpin-e.

#### 图5 Cry1Ac处理对棉铃虫中肠 serpin 基因表达量的影响

Fig. 5 The effect of Cry1Ac on relative expression levels of serpins in Helicoverpa armigera

图中数据为平均数±标准误。\*表示经*t*检验法检验在*P*<0.05水平差异显著。ns表示无显著差异。 Data are mean±SE. \* indicates significant difference at *P*<0.05 level by *t* test. ns indicates no significant difference.

#### 参考文献 (References)

- An CJ, Kanost MR. 2010. Manduca sexta serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40(9): 683–689
- Bel Y, Agata KJ, Costa J, Herrero S, Escriche B, Luis JFJ. 2013. Comprehensive analysis of gene expression profiles of the beet armyworm *Spodoptera exigua* larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin. PLoS ONE, 8(12): e81927
- Brochan G, Zimoch L, Wessels A, Ertas B, Merzendorfer H. 2007. A chymotrypsin-like serine protease interacts with the chitin synthase from the midgut of the tobacco hornworm. Journal of Experimental Biology, 210(Pt20): 3636–3643
- Cantón PE, Zanicthe Reyes EZ, Ruiz de Escudero I, Bravo A, Soberón M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. Peptides, 32(3): 595–600
- Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE. 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. Nature Biotechnology, 33: 161–168
- Chakroun M, Ferrando NB, Bel Y, Escriche B, Ferré J. 2016. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(2): 329– 350
- Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Qiu Y, Wan H, Sohn MR, Sohn HD, Jin BR. 2012. Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. PLoS ONE, 7(2): e32269
- Ge ZY, Wan PJ, Cheng XF, Zhang Y, Li GQ, Han ZJ, Bell jb. 2013. Cloning and characterization of serpin-like genes from the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Genome, 56(6): 359–366
- Herrero S, Combes E, van Oers MM, Vlak JM, de Maagd RA, Beekwilder J. 2005. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35(10): 1073–1082
- Huang LL. 2010. A genome-wide analysis of the silkworm host responses to *Bacillus bombyseptieus* (Bb) and other pathogens. Ph. D thesis. Chongqing: Xinan University (in Chinese) [黄璐琳.

2010. 病原微生物黑胸败血芽孢杆菌(Bacillus bombyseptieus)等 诱导家蚕(Bombyx mori)全基因组寄主应答研究.博士学位论文.重庆:西南大学]

- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. 2000. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. Genome Research, 10(12): 1845–1864
- Jiang HB, Michael R Kanost. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30(2): 95–105
- Law RHP, Zhang QW, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, et al. 2006. An overview of the serpin superfamily. Genome Biology, 7(5): 216
- Li GS, Wang YY, Wang MH, Xu KZ, Chen YH, Shen WD, Xu JX. 2013. Preparation of polyclonal antibody and tissues expression analysis of *Bombyx mori* serine protease inhibitor 5. Science of Sericulture, 39(2): 261–265 (in Chinese) [李国胜, 王彦云, 王明 慧, 徐开遵, 陈玉华, 沈卫德, 许雅香. 2013. 家蚕丝氨酸蛋白酶 抑制剂 5 的多克隆抗体制备及组织表达分析. 蚕业科学, 39(2): 261–265]
- Li SZ, Xu XX, Shakeel M, Xu J, Zheng ZH, Zheng JL, Yu XQ, Zhao Q, Jin FL. 2018. *Bacillus thuringiensis* suppresses the humoral immune system to overcome defense mechanism of *Plutella xylostella*. Frontiers in Physiology, 9: 1478
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY. 1999. An improvement in the technique of artificial raring cotton bollworm. Plant Protection, 25(2):15-17 (in Chinese) [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 1999. 人工饲养棉铃虫技 术的改进. 植物保护, 25(2): 15-17]
- Liu DR. 2015. Functional study and analysis of Bmserpin-15 in domestic silkworm, *Bombyx mori*. Master thesis. Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese) [刘栋然. 2015. 家蚕 Bmserpin-15 的 功能初探与分析. 硕学位论文. 合肥: 安徽农业大学]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 25(4): 402–408
- Lu Yh, Wu Km, Jiang YY, Guo YY, Desneux N. 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. Nature, 487: 362–365

- Melo AL, Soccol VT, Soccol CR. 2016. Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Critical Reviews in Biotechnology, 36(2): 317–326
- Prabu S, Jing DP, Shabbir MZ, Yuan WN, Wang ZY, He KL. 2020. Contribution of phenoloxidase activation mechanism to Bt insecticidal protein resistance in Asian corn borer. International Journal of Biological Macromolecules, 153: 88–99
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochemical Journal, 378(3): 705–716
- 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 and Molecular Biology Reviews, 62(3): 775–806
- Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS. 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, 11(1): 132–154
- van Munster M, Préfontaine G, Meunier L, Elias M, Mazza A, Brousseau R, Masson L. 2007. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. Insect Molecular Biology, 16(1): 25–35
- Veillard F, Troxler L, Reichhart JM. 2016. Drosophila melanogaster clip-domain serine proteases: structure, function and regulation. Biochimie, 122: 255–269
- Walters FS, Stacy CM, Lee MK, Palekar N, Chen JS. 2008. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae. Applied and Environmental Microbiology, 74(2): 367–374
- Wang YY, He JM, Li GS, Wang MH, Shen WD, Xu YX. 2013. An analysis on specific expression of *Bombyx mori* serine protease inhibi-

tor gene *Bmserpin-6*. Science of Sericulture, 39(2): 257-260 (in Chinese) [王彦云,何渐鸣,李国胜,王明慧,沈卫德,许雅香. 2013. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *Bmserpin-6* 的特异性表达分析. 蚕业科学, 39(2): 257-260]

- Wei JZ, Yang S, Chen L, Liu XG, Du MF, An SH, Liang GM. 2018. Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera*. Frontiers in Physiology, 9: 1653
- Xiao YT, Wu KM. 2019. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 374(1767): 20180316
- Yuan CF, Xing LS, Wang ML, Wang X, Yin M, Wang Q, Hu ZH, Zou Z. 2017. Inhibition of melanization by serpin-5 and serpin-9 promotes baculovirus infection in cotton bollworm *Helicoverpa armi*gera. PLoS Pathogens, 13(9): e1006645
- Zhao P, Dong ZM, Duan J, Wang GH, Wang LY, Li YS, Xiang ZH, Xia QY. 2012. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. PLoS ONE, 7(2): e31168
- Zhu XT, Liu JJ, Sun JJ, Li JG. 2017. Cloning and expression analysis of serine protease inhibitor encoding genes from *Helicoverpa armigera*. Genomics and Applied Biology, 36(4): 207–215 (in Chinese) [朱笑婷, 刘娟娟, 孙姣姣, 李继刚. 2017. 棉铃虫丝氨酸蛋 白酶抑制剂基因的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学, 36(4): 207–215]
- Zou Z, Jiang HB. 2005. Manduca sexta serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8: cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. Journal of Biological Chemistry, 280(14): 14341–13348

(责任编辑:王 璇)