

氨肽酶 N (APN) 与鳞翅目昆虫对 Bt 抗性的关系

苗素丽¹, 张少平², 程红梅³

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 江西农业大学农学院, 南昌 330045;
3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 使用 Bt Cry 毒素防治农业害虫是作物生产上的一个革命性的进步, 受体与 Bt 杀虫蛋白结合能力的改变可能是昆虫对 Bt 产生抗性的主要原因。氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 是一类存在于昆虫中肠内的 Bt 毒素受体蛋白, 通过讨论 APN 与 Bt 毒素的结合作用, 综述了 APN 基因变异与鳞翅目昆虫 Bt 抗性相关的分子机理, 并介绍了 (Bt) Cry 毒素与 APN 相关的作用方式新模型。

关键词: 苏云金芽孢杆菌 (Bt); 氨肽酶 N (APN); 受体; 突变; 抗性

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2008)S1-0012-06

Relationships between Amino peptidase N (APN) and Bt resistance of Lepidoptera

MIAO Su-li¹, ZHANG Shao-ping², CHENG Hong-mei³

(1. College of agriculture and biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094;

2. College of agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045;

3. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The use of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) to control insect pests is a revolutionary progress in crop production. Change in binding ability between Bt insecticidal proteins and its receptors may be the main mechanism of Lepidoptera insect resistance to Bt toxin. Amino peptidase N (APN) is one kind of receptors for *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin in insect midguts. Through discussing its binding capability with Bt toxin, this paper summarizes the molecular biology mechanism of APN gene and Bt resistance of Lepidoptera, and introduces a new model for the mode of CryIAC toxin action.

Key words: *Bacillus thuringiensis* (Bt); amino peptidase N (APN); receptor; mutation; resistance

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种好氧性的革兰氏阳性菌, 在形成芽孢时产生具有杀虫作用的伴孢晶体 (Cry)。Bt 毒素具有对靶标昆虫的高特异性、高毒力以及对环境安全的特性, 这些特性使其在转基因抗虫作物和生物杀虫剂上得到了广泛地应用^[1]。Bt 毒素原来主要用于防治鳞翅目、双翅目和鞘翅目的一些害虫, 近年来又发现它对膜翅目、同翅目和食毛目的某些昆虫及线虫、螨类和原生动物也有杀虫活性^[2]。使用 Bt Cry 毒素防治农业害虫是作物生产上的一个革命性进步。但是, 随着 Bt 毒素用量的增加和转 Bt 基因作物的迅速推广, 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。

由于 Cry 蛋白是一种孔形成细胞毒素 (pore-forming toxins, PFTs), 其杀虫活性主要取决于毒蛋白与特异受体结合后在中肠上皮细胞 BBMVs (brush border membrane vesicles) 上形成离子通道的能力^[3]。目前已基本明确的 Bt 受体有 5 种: 氨肽酶 N (amino peptidase N, APN)^[4-7]; 钙粘蛋白 (cadherin-like protein)^[8]; 碱性磷酸酯酶 (alkaline phosphatase, ALP)^[9]; 肌动蛋白 (actin)^[10] 和糖脂 (glycolipids)^[11]。

APN 是第一个被发现在 Bt 毒素杀虫机制中

收稿日期: 2008-02-25; 修回日期: 2008-04-18

基金项目: 中国 973 计划项目 (2007CB109203) 资助。

作者简介: 苗素丽, 硕士研究生, 主要从事棉铃虫对 Bt 抗性分子机理的研究。通讯作者: 程红梅, 研究员, 博士, 主要从事植物病虫害生物学研究。E-mail: chenghm@caas.net.cn

起作用的毒素受体蛋白,广泛存在于动植物体内,具有水解蛋白质或多肽 N 末端氨基酸的功能^[12]。在昆虫中,APN 主要存在于昆虫的消化道和肠腔中,其主要功能是在消化中切除多肽的末端中性氨基酸残基。同时,作为锌金属肽酶 M1 (zinc metalloproteinases M₁) 家族的一员,它含有锌金属肽酶的主要特征,具有 His³⁵⁷、His³⁶¹、Glu³⁸⁰ 和 Glu³⁵⁸ 等保守位点。其中 His³⁵⁷、His³⁶¹ 和 Glu³⁸⁰ 是锌离子配体,而 Glu³⁵⁸ 与酶的催化作用有关^[13]。另外,在其 N 末端含有一个 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GaNAc) 结构,该结构能被 Cry 毒素识别。而在其 C 末端含有一个具有亲脂性和跨膜特性的糖基化磷脂酰肌醇锚着点 (glycosylphosphatidylinositol anchor, GPI anchor), APN 正是通过 GPI anchor 锚定在昆虫 BBMVs 上。

鳞翅目昆虫是 Bt 毒素的主要靶标昆虫,也是一类重要的农林害虫,目前有关 Bt 抗性方面的研究也主要集中在鳞翅目。因此本文综述了 Bt 杀虫蛋白受体氨肽酶 N 与鳞翅目昆虫对 Bt 抗性的关系,重点探讨其抗性相关的分子机制。

1 氨肽酶 N 是鳞翅目昆虫 Bt 毒素的受体

APN 是第一个被发现在 Bt 毒素杀虫机制中起作用的毒素受体蛋白。通过赖氨酸肽链内切酶消化后的体外结合试验发现,家蚕 APN 与 Cry1Aa 毒素的结合区位于 Asp⁴⁰ 和 Lys³¹³ 之间。利用 E. coli 细胞表达不同长度的重组体 APN,发现 Cry1Aa 毒素结合区主要位于 Ile¹³⁵ 和 Pro¹⁹⁸ 之间^[14]。比较家蚕、烟草天蛾、烟芽夜蛾、印度谷螟和小菜蛾等 11 种不同来源的 APN 家族基因序列,发现存在一个序列高保守但结构易改变的区域。以家蚕 Cry1Aa 结合区的氨基酸序列为对照,发现该区域的 64 个氨基酸残基中,有 27 个氨基酸在家蚕和小菜蛾中是普遍存在的。这些氨基酸残基被认为在与 Cry1Aa 毒素结合中发挥重要的作用,特别是在家蚕和小菜蛾中。这 27 个氨基酸残基中,有大约 22 个氨基酸残基在其他 APN 家族蛋白中是高度保守的。虽然每种昆虫体内都有可能产生几种包含这些保守结构的 APN 家族蛋白,但是 Cry1Aa 并不能与所有昆虫的 APN 结合,

所以在这个保守区内,一个非常微小的变化都可能会影响到 APN 与 Cry1Aa 的结合能力以及昆虫的敏感性^[15]。

昆虫的 APNs 含有一些保守结构,如锌指结合区、催化部位和公认的 Cry1Aa 毒素结合区。在昆虫的进化过程中,APNs 的 Cry1Aa 毒素结合区结构仅发生了细微的变化,而 Bt 的 Cry 毒素却演变出了多个类型,可能就是为了适应这些变化^[15]。通过 GAL4 增强子诱捕 (GAL4 enhancer trap) 技术, Gill 和 Ellar^[16] 将烟草天蛾的 APN 基因转入果蝇中进行活体表达,当 APN 类受体在中肠组织表达时,原来对 Cry1Ac 不敏感的果蝇在 Cry1Ac 毒蛋白 (50 ng/μL) 的作用下全部死亡;当 APN 类受体在中胚层表达时,外皮层在 Cry1Ac 毒蛋白的作用下发生裂解。这充分证明在昆虫体内 APN 是 Bt 杀虫蛋白的重要结合受体。

2 APN 变异与鳞翅目昆虫抗性关系

由于 Bt 毒素在发挥毒性杀死昆虫的过程中,需要经溶解、活化、穿过围食膜、受体结合、形成聚体等中间过程,并最终形成离子孔道,因此昆虫有可能通过多种方式对 Bt 毒素产生抗性。Heckel 等^[17] 从理论上预测昆虫有 10 种潜在的抗性机制,如昆虫中肠受体位点浓度及亲和力下降、中肠蛋白酶活化作用降低或降解毒素活性上升等。但是到目前为止,所有与 Bt 抗性相关的报道中主要有以下两种方式导致了昆虫对 Bt 毒素的抗性。一种是昆虫中肠蛋白酶发生改变,这包括昆虫中肠蛋白酶对原毒素的活化活性降低和对毒素的降解作用上升^[18,19]。另外一种是毒素的中肠结合受体发生改变,这其中包括受体发生变异而导致的亲和力下降和中肠中的受体位点浓度降低,这是报道最多的也是最重要的抗性产生方式。APN 作为昆虫中肠 BBMVs 上的重要 Cry 毒素受体,其变异会导致昆虫对 Cry 毒素敏感性下降甚至产生抗性。

2.1 APN 表达量与抗性的关系

Herreno 等^[20] 以甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 为对象,利用抑制消减杂交法 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建了甜菜夜蛾老

熟幼虫中肠的 cDNA文库,筛选出了受 BtCry1Ca 毒素增强或抑制的基因,结果得到了两种不同类型的 APNs(APN2和 APN4)。利用相同的方法对比 Cry1Ca敏感型和 Cry1Ca抗性(对 Cry1Ca的抗性倍数 > 75)的甜菜夜蛾 mRNA 序列,发现仅 APN1存在差异。Northern blot分析发现 APN1在抗性昆虫中不表达,而其他 3种 APNs(APN2、APN3、APN4)在敏感和抗性昆虫中的表达量相同,说明 APN1的不表达与甜菜夜蛾对 Cry1Ca的抗性相关^[20]。

根据斜纹夜蛾 S1APN 的 cDNA, Rajagopal 等^[21]构建了 dsRNA,并将其注入 5龄幼虫的血淋巴中,用来干扰 APN 基因的 RNA 转录,48 h 后测得处理组幼虫的 APN 表达比对照组减少了 80%,而 LC₅₀提高了 70%。利用 dsRNA 干扰 S1APN 基因在杆状病毒表达载体 Sf21 细胞中的表达,研究 S1APN 的表达量与毒素结合量之间的关系,也取得了相似的结果。随着 S1APN 表达量的降低,同时也降低了这些幼虫对 Cry1C 毒素的敏感性。随着昆虫的蜕皮和发育,基因沉默保留了下来,但在其下一代中降低了影响^[21]。证明了昆虫中肠的 APN 是 Bt 杀虫蛋白的受体,而且还说明其表达量与抗性相关。

2.2 APN 单个氨基酸突变与抗性的关系

昆虫对化学杀虫剂的抗性,包括拟除虫菊酯类、DDT 狄氏剂和有机磷类等,主要是由这些杀虫剂靶标位点的点突变而产生的,而且抗性基因在全世界得到了广泛地传播^[22]。因此,由单个氨基酸突变引起的毒素对 APN 受体结合的改变,对 Cry 毒素抗性的发展具有重要的作用。

Zhu 等^[23]通过构建印度谷螟 cDNA 文库的方法,克隆、测序了 APN 基因。发现抗性品系有 4 个核苷酸突变,其中 2 个导致了氨基酸的变化,推测抗性品系中 Asp¹⁸⁵ Glu¹⁸⁵ 的突变位于 Cry1Aa 毒素结合部位,从而影响毒素结合位点与毒素的亲合力,导致印度谷螟的抗性。另一位点为脂肪族的 Ile⁷⁶³ 突变为含有羟基的 Thr⁷⁶³,由于该 Thr 残基提供了一个潜在的新磷酸化位点,并与一个保守的 Cys 残基相邻,假如此 Cys 参与了二硫键的形成,那么这个点突变将会破坏 APN 蛋白的三级结构,因此该突变位点也可能与昆虫对 Cry1Aa 毒素的抗性相关。

苏建亚等^[24,25]通过对比抗性与敏感棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼虫中肠 APN1 的 cDNA 的开放阅读框,发现抗性品系的开放阅读框中,有 57 个核酸发生变化,共导致了 15 个氨基酸的改变,其中 2 个突变 (Gln¹³⁷ Glu, Val¹⁷³ Thr) 位于 Cry1A 毒素结合区域,推测 APN1 的这两个点突变可能与棉铃虫对转 Bt 基因棉产生抗性有关。通过对 Bt 棉抗性和敏感棉铃虫幼虫中肠氨肽酶 N 的克隆和测序,鉴定了氨肽酶 N 基因家族的 1 个成员 Haapn2,其 cDNA 序列具有 3 209 个核苷酸,含有 3 096 bp 的开放阅读框,编码产生 1 032 个氨基酸的蛋白质。

2.3 功能序列缺失与抗性的关系

受体的缺失有可能是产生抗性的重要原因^[26~28],这一推测已经在类钙粘蛋白作用机制中得到了证实。Xu 等^[29]通过 3' RACE 及 PCR 技术克隆了敏感及抗性棉铃虫(抗性品系对 Cry1Ac 的抗性倍数 > 800)中肠类钙粘蛋白受体全长基因,发现棉铃虫抗性品系 (GYBT) 中的类钙粘蛋白受体基因由于第 1 258 位提前产生的一个终止密码子 TAA,使表达出的类钙粘蛋白受体存在较大缺失。遗传连锁分析表明类钙粘蛋白受体基因缺失与抗性紧密连锁。

Zhang 等以室内饲养多年的抗性和敏感棉铃虫为材料(抗性品系对 Cry1Ac 的抗性倍数为 2 971 倍^[30]),构建了敏感和抗性棉铃虫的 cDNA-AFLP 体系,从 2 000 个 cDNA 条带基因中,筛选到 202 个差异基因,其中有 37 个与已知功能的基因同源。对已筛选出差异的 APN1 片段经重新设计引物、RT-PCR 及基因测序比对,进一步克隆、原核蛋白表达及与 Cry1Ac 的毒素结合试验,证明敏感品系 APN1 C-末端 90 个氨基酸残基可以和 Cry1Ac 毒素结合,而缺失了 22 个氨基酸的抗性品系不能结合,这也说明棉铃虫 APN1 是 Cry1Ac 的受体,同时 APN1 的缺失突变是棉铃虫对 Bt 产生抗性的重要原因(待发表)。

3 Cry1Ac 毒素作用方式新模型——APN 在信号转导中的作用

鳞翅目昆虫的上皮细胞上有一类脂质卵筏 (lipidraft),而该脂质卵筏能容纳不同类型的蛋白质,如糖基化磷脂肌醇锚定蛋白、十六烷基酰基化

和双酰基化膜转移蛋白,也是 Bt 杀虫蛋白氨肽酶类受体的特异性存在位点,从而在 Bt 杀虫蛋白氨肽酶类受体介导的成孔过程中具有重要的作用。由于 Cry 蛋白作用方式的关键一步就是毒素与中肠膜上蛋白受体的结合,在鳞翅目中,能与 Cry1A 毒素结合的不只一种蛋白,所以,APN 类受体蛋白可能存在作为结合受体以外的功能。

Santos 等^[31]研究表明 APN 在昆虫体内除了降解蛋白和作为毒素受体外,还在信号转导中发挥重要作用。Jurat-Fuentes 和 Adang^[32]根据对烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 的幼虫研究,提出一个 Cry1Ac 毒素作用方式新模型 (图 1)。该模型认为,进入昆虫体内的 Cry1Ac 毒素晶体首先活化为毒素单体,再结合到 HevCaLP (烟芽夜蛾钙粘蛋白)。这种结合激活了由磷酸酯酶所调节的细胞内信号途径,使部分毒素会与肌动蛋白和细胞内

的磷酸酯酶发生相互作用。结合 HevCaLP 后,毒素单体被加工,形成四元寡聚体,再与 GPI- 锚定的蛋白 (HvALP, APN) 结合。由于这些蛋白集中在脂筏上,毒素的结合会导致脂筏聚合,所以毒素在脂筏上聚集很可能有双重作用,既诱导毒素插入形成小孔,又活化细胞内信号途径。由于调节这些信号流的磷酸酯酶与调节信号通过钙粘蛋白的磷酸酯酶一般属于同一类型,所以这两个细胞内信号将会激活细胞凋亡反应,以及由毒素小孔形成引起的渗透压冲击,从而导致细胞死亡。根据这个模型,钙粘蛋白 (HevCaLP) 和 GPI- 锚定的蛋白 (APN 和 HvALP) 对毒性的发挥起着重要的作用,毒素结合到钙粘蛋白或通过 GPI- 锚定的蛋白聚合到脂筏上,都会引起细胞内信号流的变化,从而导致细胞凋亡^[32]。

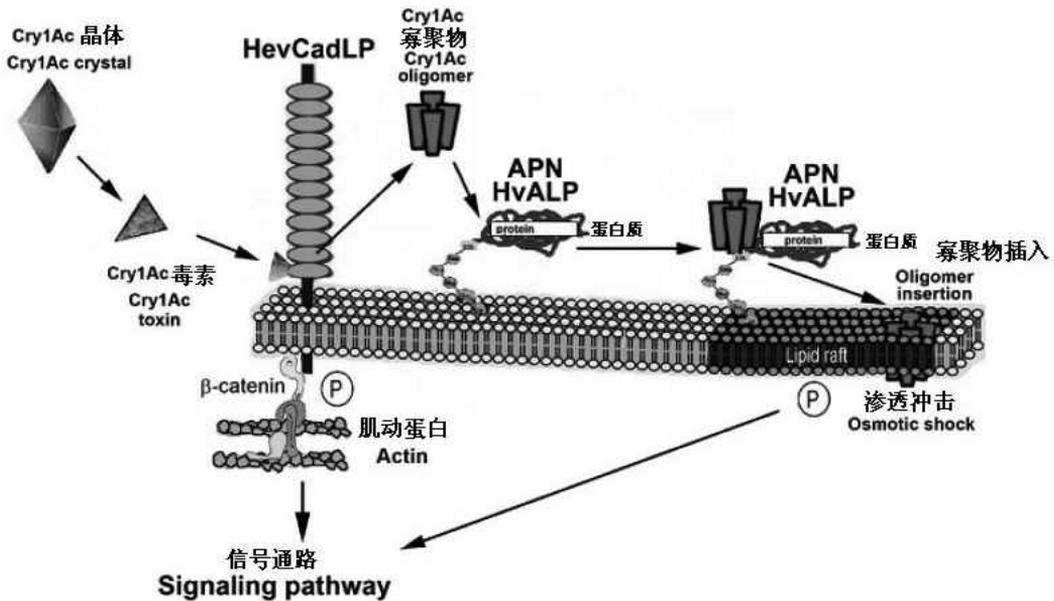


图 1 烟芽夜蛾幼虫 Cry1Ac 毒素作用方式新模型^[32]

Fig 1 New model of action way for Cry1Ac toxin on *Heliothis virescens* larvae^[32].

Valaitis^[33]也发现用 Bt PFTs 毒素喂养舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫,可以引发舞毒蛾中肠上皮细胞上 GPI- 锚定的 APN 的大量脱落,而 APN 的脱落量与毒素的剂量和作用时间成正相关。但是该现象可以被环腺苷酸 (cyclic AMP) 和有丝分裂原激活蛋白激酶 (MEK) 抑制剂所抑制,所以 MEK/ERK 途径中的信号转导与脱落过程的调节有关。另外,由于该途径活化了磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-3LC),所以其他 GPI 锚定的蛋白

也会从中肠上皮细胞脱落,包括碱性磷酸酶。

4 结论与展望

昆虫对杀虫剂抗性的产生是一种进化现象,其产生的主要原因是特定基因的等位基因频率随着时间的变化而变化。由 Bt 产生的 Cry1A 家族的杀虫毒素广泛地应用在农业害虫防治中,给昆虫种群施加了一种强大的选择压,特别是在仓库、

田间和温室长期施用后,已经至少有3种鳞翅目害虫印度谷螟^[34],小菜蛾^[35,36]和粉纹夜蛾^[37]。对Bt产生了明显抗性。随着表达Bt毒素的转基因玉米和棉花的大范围种植,田间害虫产生抗性的几率也在不断增大。为了预测、防止或延迟其他尚未对Bt产生抗性的靶标昆虫对其产生抗性,必须深入了解哪些基因正面临着Bt的选择压力,以及它们在抗性中起到什么作用。因此,除了生化和生理技术,遗传的研究方法是研究田间抗性的一个必要的补充^[38]。

昆虫对Bt毒素抗性研究很早就引起了科研工作者的重视。1994年Estada等^[39]在实验室中筛选得到对CryIAb产生抗性的银纹夜蛾品系,但是该品系对于CryIA并没有产生抗性,不同的是离体结合实验表明,二者共用一个高亲和力位点,因此毒素与受体的离体结合并不能完全反应毒素对昆虫的毒性,也不能反应昆虫对毒素的抗性^[39]。所以,可以应用活体内蛋白互作的方法,如酵母双杂交(yeast two hybrid)、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)等技术,研究Bt杀虫蛋白与受体蛋白的关系。

在对CryIac有1000倍抗性的小菜蛾的研究中发现其CryIac与APN受体的结合并没有发生变化,因此与受体的结合下降或受体缺失虽然会导致昆虫对毒素的抗性,但并非所有抗性都由毒素与APN类受体的结合力下降所致^[40]。Bt抗性产生的原因是多方面的,Bt毒素受体的变化不是抗性产生的唯一原因,而且APN也不是唯一的受体,但是APN与抗性有着重要的关系,所以对APN的系统研究有助于全面了解昆虫抗性产生的机制,从而为制定出更合理的抗性治理对策提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Betz F S, Hammond B G, Fuchs R L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000, 32: 156 - 173.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 775 - 806.
- [3] Li J, Carroll J, Ellar D J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution [J]. *Nature*, 1991, 353: 815 - 821.
- [4] Knight P J K, Crickmore N, Ellar D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is an aminopeptidase N [J]. *Mol Microbiol*, 1994, 11: 429 - 436.
- [5] Gill S S, Cowles E A, Francis V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryAc toxin binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens* [J]. *Biol Chem*, 1995, 270: 27277 - 27282.
- [6] Lee M K, You T, Young B, et al. Aminopeptidase-N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIac toxin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2845 - 2849.
- [7] Gamer K J, Hiremath S, Lehtonen A K, et al. Cloning and complete sequence characterization of two Gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIac toxin [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29: 527 - 535.
- [8] Vadlamudi R K, Weber E, Ji T H, et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 5490 - 5494.
- [9] Itoh M, Kanamori Y, Takao M, et al. Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29 (2): 121 - 129.
- [10] McNeil R J, Adang M J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* CryIac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33: 999 - 1010.
- [11] Griffiths J S, Haskam S M, Yang T L, et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin [J]. *Science*, 2005, 307: 922 - 925.
- [12] Taylor A. Aminopeptidases: structure and function [J]. *FASEB J*, 1993, 7 (2): 290 - 298.
- [13] Cristófoletti P T, Terra W R. The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1479: 185 - 195.
- [14] Yaoi K, Nakanishi K, Kadotani T, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N [J]. *FEBS Lett*, 1999, 463: 221 - 224.
- [15] Nakanishi K, Yaoi K, Shimada N, et al. *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin binds to a highly conserved region of an aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1432: 57 - 63.
- [16] Gill M, Ellar D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIac [J]. *Insect Mol Biol*, 2002, 11: 619 - 625.
- [17] Heckel D G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects [J]. *Biocontrol Sci Technol*, 1994, 4: 405 - 417.
- [18] Oppert B, Kramer K J, Johnson D, et al. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) protoxin [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996, 26 (6): 571 - 583.

- [19] Forcada C, Alcazer E, Gaters M D, et al. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. *Arch Insect Biochem. Physiol.*, 1996, 31: 257 - 272.
- [20] Herrero S, Gechev T, Bakker P L, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIcA-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 96.
- [21] Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, et al. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor [J]. *Biol Chem.*, 2002, 277: 46849 - 46851.
- [22] French-Constant R H, Daborn P J, Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance [J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20: 163 - 170.
- [23] Zhu Y C, Kramer K J, Oppert B, et al. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *P. interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. *Insect Biochem. Mol Biol.*, 2000, 30: 215 - 224.
- [24] 苏建亚,周晓梅,张天翼. 抗转 B 基因棉铃虫幼虫中肠氨肽酶 N 基因的克隆与序列特征 [J]. *棉花学报*, 2004, 16 (1): 13 - 20
- [25] 苏建亚,周晓梅,沈晋良. 抗 Bt 棉铃虫幼虫 Bt 受体氨肽酶 N (APN2) 基因克隆 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24 (10): 59 - 62
- [26] Van Rie J, McGaughey W H, Johnson D E, et al. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. *Science*, 1990, 247 (4938): 72 - 74.
- [27] Ferre J, Real M D, Van Rie J, et al. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 (12): 5119 - 5123.
- [28] Tabashnik B E, McGaughey W H. Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indian meal moth (*Lepidoptera: Pyralidae*) to *Bacillus thuringiensis* [J]. *J. Econom. Entomol.*, 1994, 87 (4): 834 - 841.
- [29] Xu X J, Yu L Y, Wu Y D. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to CryIcA δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* [J]. *Appl Environ. Microbiol.*, 2005, 71 (2): 948 - 954.
- [30] Luo S, Wu K, Yan T, et al. Cross-resistance studies of CryIcA-resistant strains of *Helicoverpa armigera* (*Lepidoptera: Noctuidae*) to Cry2Ab [J]. *Econ. Entomol.*, 2007, 100: 909 - 915.
- [31] Santos A N, Langner J, Hemmann M, et al. Aminopeptidase N/Cd13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes [J]. *Cell Immunol.*, 2000, 201: 22 - 32.
- [32] Jurat-Fuentes J L, Adang M J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae [J]. *J. Invert Pathol.*, 2006, 92: 166 - 171.
- [33] Valaitis A P. *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from *Gypsy moth* midgut epithelial cells [J/OL]. *Insect Biochem. Mol Biol.*, doi: 10.1016/j.ibmb.2008.03.003.
- [34] McGaughey W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. *Science*, 1985, 229: 193 - 195.
- [35] Tabashnik B E, Cusing N L, Finson N, et al. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) [J]. *J. Econ. Entomol.*, 1990, 83: 1671 - 1676.
- [36] Shelton A M, Robertson J L, Tang J D, et al. Resistance of diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) subspecies in the field [J]. *J. Econ. Entomol.*, 1993, 86: 697 - 705.
- [37] Janmaat A F, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni* [J]. *Proc. Biol. Sci.*, 2003, 270: 2263 - 2270.
- [38] Heckel D G, Gahan L J, Baxter S W, et al. The diversity of Bt resistance genes in species of *Lepidoptera* [J]. *J. Invert Pathol.*, 2007, 95: 192 - 197.
- [39] Estada U, Ferre J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (*Lepidoptera: Noctuidae*), and selection for resistance to one of the crystal proteins [J]. *Appl Environ. Microbiol.*, 1994, 60 (10): 3840 - 3846.
- [40] Ke Luo B E T, Adang M J. Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIcA toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*) [J]. *Appl Environ. Microbiol.*, 1997, 63 (3): 1024 - 1027.