

昆虫中肠 Bt 毒素受体氨肽酶 N 的研究进展

李赛男 (肇庆学院生物学系, 广东肇庆 526061)

摘要 氨肽酶 N (APN) 是昆虫中肠中主要的 Bt 毒素受体, 它与 Cry 毒素特异结合后, 毒素插入细胞膜, 在膜上形成孔洞, 细胞裂解, 最终导致昆虫死亡。APN 的变异导致昆虫对 Bt 敏感性下降甚至产生抗性。就 APN 的结构特征、分类、APN 与 Cry 毒素的相互作用机制以及 APN 与昆虫 Bt 抗性的关系作一综述。

关键词 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白; 氨肽酶 N; 受体; 抗性

中图分类号 S482.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02523-03

Research Progress in the Insect Midgut Aminopeptidase N

Li Sai-nan (Biology Department, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061)

Abstract Aminopeptidase N is a major kind of receptors for Bt toxins in the midgut of insects. Cry toxins bind to APN on the midgut epithelium and a portion of the toxin inserts into the membrane forming a pore. The integrity of midgut epithelial cells is destroyed and the insect dies. The mutation of APN results in insects resistance to Bt toxins. With the development of the studies on APN, it is possible to find out some more efficient resistance management strategies. The research progress in the aminopeptidase N receptors on the midgut epithelial membrane of susceptible insects for *Bacillus thuringiensis* toxins was reviewed.

Key words *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein; Aminopeptidase N; Receptor; Resistance

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是世界上目前应用最广泛、最成功的微生物杀虫剂, 也是公认的无公害生物农药。Bt 是一种革兰氏阳性芽孢杆菌, 它可以在形成芽孢的同时产生包含 δ -内毒素即杀虫晶体蛋白 (Insecticidal crystal proteins, ICPs) 的伴孢晶体, 其中许多亚种的伴孢晶体可以杀灭对农业和人类健康造成巨大危害的鳞翅目 (Lepidoptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、双翅目 (Diptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、同翅目 (Homoptera) 和直翅目 (Orthoptera) 的许多害虫, 同时对螨类、线虫等显示杀虫活性^[1]。Bt 伴孢晶体被敏感品系昆虫摄食后, 在昆虫中肠内被溶解为无活性的前毒素, 经中肠蛋白酶水解, 变成有活性的毒素, 有活性的毒素穿过围食膜, 与位于中肠上皮细胞刷状缘膜泡 (Brush border membrane vesicles, BBMV) 上的受体结合, 然后毒素分子或是以单聚体或是以形成寡聚体的形式进入细胞膜内, 在细胞膜上产生小孔, 形成渗漏通道, 最终导致膜的胶样渗透溶解 (Colloid osmotic lyses), 细胞因胶样渗透平衡的破坏而死亡^[2-3]。同时离子梯度的破坏也扰乱了中肠细胞内正常的跨膜电势和酸碱平衡, 影响了养分的吸收, 从而导致虫体死亡。

每种 Bt 毒素都有其特异的杀虫谱, 杀虫谱与昆虫中肠 BBMV 上的特异性受体相关联的。Bt 毒素必须与受体结合才能产生杀虫活性, 因此, 特异性受体的存在是决定 Bt 毒素杀虫特异性的最重要的因素之一。到目前为止, 已发现的 Bt 毒素受体可分为 4 类。一类是钙粘蛋白超家族的成员。最早在昆虫中肠中发现的 2 个类钙粘蛋白 (Cadherin-like protein), 分别是 BT-R₁ 和 BT-R₁₇₅。BT-R₁ 首先是在烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 的中肠中发现的, 它能与 Cry1Ab 特异结合, 大小为 210 kDa^[4]。把表达了 BT-R₁ 的脊椎动物 COS 7 细胞暴露在 Cry1Ab 中时, 细胞产生一些明显的形态学上的变化, 并肿胀破裂^[5]。BT-R₁₇₅ 是一个在家蚕 (*Bombyx mori*) 的 BBMV 上发现的类钙粘蛋白, 大小为 175 kDa, 能与 Cry1Aa 特异结合。在 Sf9 细胞中表达 BT-R₁₇₅, 当细胞暴露在 Cry1Aa 中时,

细胞产生明显的形态学上的变化, 并且产生细胞膨胀。细胞膜的通透性变化表明 BT-R₁₇₅ 在细胞中的表达导致 Cry1Aa 插入细胞膜, 从而破坏了细胞的渗透平衡^[6]。另一类 Bt 毒素受体为氨肽酶 N (Aminopeptidase N, APN)。APN 是一类特异的从蛋白质或多肽的氨末端剪切中性氨基酸的肽链外切酶, 这类酶广泛分布于植物与动物体内。在昆虫中, APN 在中肠中分布最为丰富, 是一类消化食物蛋白的酶。另 2 类 Bt 毒素受体分别为复合糖类^[7] 和糖脂类^[8]。在这几大类 Bt 毒素受体中, APN 约占整个昆虫 BBMV 蛋白的 2%^[9], 是昆虫中肠中主要的 Bt 毒素受体。笔者对昆虫中肠 Bt 毒素受体 APN 作一综述。

1 APN 的基本结构特征

APN 是锌金属肽酶 M₁ (Zinc metallopeptidases M₁) 家族的成员, 它含有 Hs³⁵⁷、Hs³⁶¹、Gu³⁸⁰ 和 Gu³⁵⁸ 保守位点, 其中 Hs³⁵⁷、Hs³⁶¹ 和 Gu³⁸⁰ 是锌离子配体, Gu³⁵⁸ 与酶的催化作用有关。在 APN 的裂解区域含有 Tyr、Arg、Hs 和 Gu/Asp 保守位点, 在 APN 的 N 末端的一个特异的阴离子结合部位上有一个 Gu 保守位点^[10]。

在 APN 的 N 末端含有一个 N 乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine, GalNAc) 结构, 该结构能被 Cry 毒素识别, 因此, 在实验中加入具竞争效应的 GalNAc 能阻抑 Cry1Ac 与 APN 的结合^[11]。另外, N 末端还有一个大约 20 个氨基酸的信号肽, 整个 APN 序列中含有多处 N 糖基化位点 (N-glycosylation site)。

APN 在其序列的 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)。在昆虫中, APN 通过 GPI-anchor 锚定在昆虫 BBMV 上, 并能被磷酸酰肌醇特异性的磷脂酶 C (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) 从膜上切下^[12-13], 被切下的 APN 分子量变小, 这是由于 GPI-anchor 被切掉的缘故。

2 APN 的分类

自从在 *Manduca sexta* 中发现的第 1 个 APN 分子被确认为 Gy 毒素受体蛋白以来, 已经在其他的鳞翅目昆虫中肠中

基金项目 广东省肇庆市科技项目 (203301)。

作者简介 李赛男 (1979-), 女, 湖南邵阳人, 在读硕士, 助教, 从事杀虫微生物的研究。

收稿日期 2006-12-28

发现了多种 APN 分子,并且 APN 已作为 B 毒素受体被大量研究。迄今为止,已经有近 10 种昆虫的 50 多种 APN 基因被克隆并在 GenBank 中登记。其中有 18 个同工型 APN 的 cDNA 从 8 种鳞翅目昆虫中克隆到,这 8 种鳞翅目昆虫分别是: *Bombyx mori*, 烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*), 小菜蛾 (*Plutella xylostella*), 澳洲棉铃虫 (*Helicoverpa punctigera*), *Manduca sexta*, 舞毒蛾 (*Lymantria dispar*), 印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 和苹果浅褐卷蛾 (*Epiphyas postvittana*)。Otean 等^[14]对来自昆虫中肠的 APN 的同工酶序列进行系统分析,发现鳞翅目昆虫的 APN 可分为 4 大类。*Bombyx mori* 和 *Plutella xylostella* 同时具备 4 大类的 APN。当然昆虫中的 APN 可能不止这 4 类,还有很多 APN 同工酶没有被克隆,新的 APN 仍有待于发现。Nakarishi 等^[15]运用 Clustal X 软件建立了鳞翅目中肠 APN 的系统分析树(图 1),并认为: BmAPN1、MsAPN1、Hv170 kDa APN、HpAPN1 和 PxAPNA 属第 1 类; PxAPN1、BmAPN2、Ld APN2 和 MsAPN2 为第 2 类; H APN1、HpAPN3、Hv120 kDa APN、PxAPN3、BmAPN3、EpAPN 和 LdAPN1 为第 3 类;第 4 类包括 PxAPN4、Hv110 kDa APN、HpAPN2 和 BmAPN4。同一类 APN 分子之间具有较高的同源性 (> 50%)。例如, *Heliothis virescens* 的 110 kDa APN 与 *Helicoverpa punctigera* 的 APN2 具有 89% 的同源性,但以上 2 种 APN 与其亲缘关系相近的大多数同类 APN 只具有 27% 的同源性^[16],因此,第 4 类 APNs 还可细分为 2 类或更多类。*Heliothis virescens* 的 3 种 APN 之间的同源性也不是很高,但是它们具有共同的保守结构及锌金属肽酶 M 家族的特征,因此 APN 基因在 *Heliothis virescens* 中至少发生了 2 次复制,这一现象也存在于另外一些鳞翅目昆虫中^[17]。

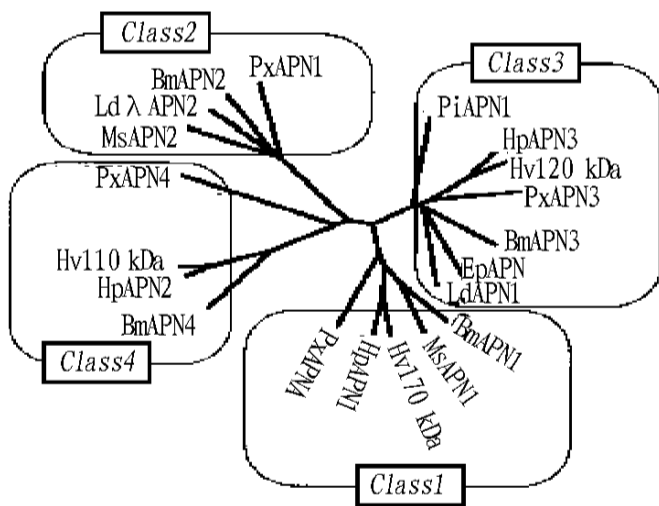


图 1 用 Clustal X 建立的鳞翅目中肠 APN 的系统分析树

APN 序列来自 GenBank,其来源和序号如下: BmAPN1 (AF084257)、BmAPN2 (AB011497)、BmAPN3 (AF352574) 和 BmAPN4 (AB013400) 来自 *Bombyx mori*; MsAPN1 (X89081) 和 MsAPN2 (X97877) 来自 *Manduca sexta*; Hv170 kDa (AF173552)、Hv120 kDa (U85096) 和 Hv110 kDa (AF378666) 来自 *Heliothis virescens*; PxAPN1 (X97878)、PxAPNA (AF020389)、PxAPN3 (AF109692) 和 PxAPN4 (AJ222699) 来自 *Plutella xylostella*; LdAPN1 (AF126442) 和 Ld APN2 (AF126443) 来自 *Lymantria dispar*; HpAPN1 (AF217248)、HpAPN2 (AF217249) 和 HpAPN3 (AF217250) 来自 *Helicoverpa punctigera*; EpAPN (AF276241) 来自 *Epiphyas postvittana*; H APN1 (AF034483) 来自 *Plodia interpunctella*。

3 APN 与 Gry 毒素的相互作用机制

不同受体与不同 Gry 毒素间有着特异性和专一性的相互作用。在 *Manduca sexta* 中, Gry1C 只与 106 kDa APN 结合而

不与 115 kDa APN 结合,而 Gry1Ac 与 115 kDa APN 结合不与 106 kDa APN 结合^[9]。从四斑按蚊 (*Anopheles quadri maculatus*) BBMV 上分离出来的 100 kDa APN 能特异性地与 Gry11Ba 紧密结合,而与 Gry2Aa、Gry4Ba 和 Gry1Aa 均不结合^[18]。一种 Gry 毒素可能存在多种结合蛋白,多种 Gry 毒素可能共同识别一种受体蛋白, Gry 毒素与受体蛋白的结合表现出多样性和复杂性的特征。在 *Heliothis virescens* 中, Gry1Aa 和 Gry1Ab 均能与 170 kDa APN 结合,而 Gry1Ac 却能结合 120 kDa、110 kDa 和 170 kDa APN^[15]。

Gry 毒素与受体的特异结合是决定 Gry 毒素杀虫特异性的关键因素之一。APN 上具有与 Gry 毒素相结合的特异位点。在 *Bombyx mori* 中, BmAPN1 上与 Gry1Aa 毒素结合的毒素结合区域位于 Ile135 和 Pro198 之间,为一个包含 63 个氨基酸残基的序列^[19]。在 *Plutella xylostella* 的 APN3 上也发现了相同的与 Gry1Aa 毒素特异结合的毒素结合区域^[20]。虽然鳞翅目昆虫 4 大类 APN 同工酶都具有一个共同的与 Gry1Aa 和 Gry1Ab 毒素结合的毒素结合区域,但是 Gry1Aa 和 Gry1Ab 只和各自特异的 APN 同工酶结合。在 APN 同工酶上的毒素结合区域有许多保守的氨基酸残基,不同的 Gry 毒素识别不同的保守序列。但能产生交叉抗性的 Gry1Ac 和 Gry1Fa 能识别相同的保守序列并能与 APN 上相同的毒素结合区域结合,这可能是它们的功能结构域具有相同序列的缘故^[22]。一般 1 个 APN 分子上只有 1 个 Gry 毒素结合位点,因此 1 个 APN 分子只与 1 个 Gry 毒素分子结合,但在 *Manduca sexta* 的 115 kDa APN 上有 2 个 Gry1Ac 结合位点,它能同时与 2 个 Gry1Ac 毒素分子结合。除了 APN 上具有与 Gry 毒素相结合的特异位点外, Gry 毒素上也具有特异的与 APN 相结合的区域。

X 射线晶体衍射技术的运用已经成功解决了 Gry3A 与 Gry1Aa 毒素的三维结构。这 2 种蛋白具有相似的结构特点并且都由 3 个功能结构域 (Domain) 组成: Domain 由 7 个反向平行的 α -螺旋组成,其中第 5 个螺旋被其他 6 个螺旋围绕; Domain 由 3 个反向平行的 α -折叠连接而成一个典型的“Greek key”拓扑结构,并形成 3 个暴露于表面的 loop 结构; Domain 由 2 个反向平行的 α -折叠相互缠绕形成 1 个 α -夹心结构。

利用 Gry 毒素位点专一性突变研究发现, Gry 毒素的 3 大功能结构域在与 APN 的结合及孔洞的形成过程中分别起到了不同作用。Domain 介导了 Gry 毒素与 APN 结合后对昆虫中肠上皮细胞膜的插入以及随后的孔洞的形成过程; Domain 直接与 APN 进行不可逆结合; Domain 除了与 APN 进行可逆结合外还参与了孔洞的形成过程,决定了 Gry 毒素与受体结合的特异性,并且 Domain 与 APN 的结合还可以保护毒素免于被进一步降解。Dean 等^[23]认为 Gry 毒素与 APN 的作用机制可能为:首先, Domain 与 APN 上的 Gry 毒素结合位点迅速产生可逆结合,这种结合可被 GalNAc 阻抑,然后 Domain 就与 APN 进行不可逆结合, Domain 表面的一些 loops 参与了结合。随后, Domain 和 Domain 就插入昆虫的中肠上皮细胞膜,形成孔洞,其中 Domain 的 17 结构参与了孔洞的形成。

Gry 毒素与 APN 结合后,毒素与毒素单体之间的相互作

用是毒素产生毒力的必要一步。毒素呈聚合体状态起作用,有研究者已经在人工细胞膜上发现了Gy1Ac 的四聚体状态,但Gy 毒素并不能在体外自发形成寡聚体形式,这说明Gy 毒素寡聚体的形成发生在与受体结合之后,在插入膜之前,但是Gy 毒素寡聚体的形成过程仍不清楚。

4 APN 与昆虫Bt 抗性的关系

随着Bt 的大量长期使用,一些昆虫已对Bt 杀虫剂和转Bt 植物产生高度的抗性。从理论上讲,昆虫对Bt 产生抗性的机制可能发生在Bt 毒素蛋白发挥作用的每一个环节,如:毒素的溶解、毒蛋白的水解加工过程、毒素与受体的结合、孔洞的形成以及中肠细胞的修复作用等^[24]。但与Bt 毒素结合的昆虫中肠BBMV 上的毒素特异性受体的改变可能是昆虫对Bt 产生抗性的主要机理。APN 作为昆虫中肠BBMV 上的主要Gy 毒素受体,其变异会导致昆虫对Gy 毒素敏感性下降甚至产生抗性。苏建亚等^[25]通过比对对Bt 棉抗性和敏感棉铃虫(*Hlicoverpa 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 个点突变,共导致了15 个氨基酸的改变,其中2 个突变(谷氨酰胺137 谷氨酸、缬氨酸173 苏氨酸)位于Gy1A 毒素结合区域,推测APN1 的突变可能与棉铃虫对转Bt 基因棉产生抗性有关。*Hodja interpunctella* 的Bt 敏感株和Bt 抗性株的中肠BBMV 上的APN 的序列只有2 个氨基酸残基的差异,可能正是这个差异导致了Bt 抗性株的APN 对Gy 毒素的结合紧密度降低甚至不能结合,从而产生抗性^[26]。Herrero 等^[27]研究发现从甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*) BBMV 上分离得到的APN1 在抗性昆虫中不表达,推测可能正是由于APN1 的不表达导致 *Spodoptera exigua* 对Gy1Ca 产生抗性。

5 结语

到目前为止,对功能性Bt 毒素受体的认识还不是很清楚,大量的APN 尚未被发现,同时,APN 与Gy 毒素的相互作用机制还没有完全研究清楚。因此,未来的研究将会继续发现新的APN 以及探究APN 与Gy 毒素间的相互作用机制,找出APN 的变异与昆虫Bt 抗性之间的关系以及APN 在昆虫Bt 抗性发展中的意义,从分子水平上明确昆虫对Bt 产生抗性的机理,找出新的有效的抗性治理策略。

参考文献

- [1] 袁志明,蔡全信,ANDRUP L,等.苏云金芽孢杆菌肠毒素基因的PCR 检测[J].微生物学报,2001,41(2):149-153.
- [2] KNOWLES B H,ELLAR D J. Collid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* -endotoxins with different insect specific[J]. *Bochim Biophys Acta*,1987,924(3):509-518.
- [3] DROBNEVSKI F A,ELLAR D J. Investigation of the membrane lesion induced in vitro by two mosquitoicidal -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Curr Microbiol*,1988,16(4):195-199.
- [4] VADLAMUDI R K,WEBER E, I I, et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*[J]. *J Biol Chem*,1995,270:5490-5494.
- [5] DORSCH J A, CANDAS M, GRUKO N B, et al. Gy1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BF R(1) in *Manduca sexta* involving a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002,32:1025-1036.
- [6] NAGAMATSU Y, KOKET, SASAKI K, et al. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Gy1Aa toxin[J]. *FEBS Letters*,1999,460:385-390.
- [7] VALATIIS A P, JENKINS J L, LEE M K, et al. Isolation and partial characterization of gypsy moth BIR-270, an arioncrush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Gy1A toxins with high affinity[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2001,46:186-200.
- [8] GRIFHTIS J S, HASLAM S M, YANG T, et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin[J]. *Science*, 2005,307:922-925.
- [9] HARA H, AISUMI S, YAOI K, et al. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Gy1Aa toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae[J]. *FEBS Letters*, 2003,538:29-34.
- [10] CRISTOFOLETTI 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.
- [11] JENKINS J L, LEE M K, SANGADALAS, et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Gy1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity[J]. *FEBS Letters*, 1999,462:373-376.
- [12] GAREZYNSKI S F, CRIMM J W, ADANG M J. Identification of putative insect brush border membrane binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* -endotoxin by protein blot analysis[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1991,57(10):2816-2820.
- [13] TOMITA T, OBARA H, TAKESUE Y, et al. Purification of glycosylphosphatidylinositol anchoring aminopeptidase N from the plasma membrane of larval midgut epithelial cells of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *International Journal of Biochemistry*, 1994,26:977-986.
- [14] OLTEAN DI, PULLIKUTHA K, LEE H K, et al. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Gy1A toxin receptor A from *Helicthis virescens* and cloning of the corresponding cDNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999,65(11):4760-4766.
- [15] NAKANISHI K, YAOI K, NAGINO Y, et al. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Hutella xylostella*-their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Gy1A toxin[J]. *FEBS Letters*, 2002,519:215-220.
- [16] EMMERLING M, CHANDLER D, SANDEMAN M. Molecular cloning of three cDNAs encoding aminopeptidases from the midgut of *Hlicoverpa punctigera*, the Australian native budworm[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001,31(9):899-907.
- [17] CHANG W X, GAHAN L J, TABASHNIK B E. A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera [J]. *Insect Molecular Biology*, 1999,8(2):171-177.
- [18] ABDULLAH M A, VALATIIS A P, DEAN D H. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Gy11Ba toxin binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadri maculatus*[J]. *BMC Biochemistry*, 2006,7:16.
- [19] YAOI K, NAKANISHI K, KADOTANI T, et al. *Bacillus thuringiensis* Gy1Aa toxin binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N[J]. *FEBS Letters*, 1999,463(3):221-224.
- [20] NAKANISHI K, YAOI K, SHIMADA N, et al. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Gy1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999,1432(1):57-63.
- [21] GOMEZ I, OLTEAN DI, GILL S, et al. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Gy1A toxin interaction using phage display[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(31):28906-28912.
- [22] BANKS D J, JURAT-FUENIYES J L, DEAN D H, et al. *Bacillus thuringiensis* Gy1Ac and Gy1Fa -endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Hlicthis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001,31:909-918.
- [23] DEAN D H, RAJAMOZHAN F, LEE M K, et al. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview[J]. *Gene*, 1996,179:111-117.
- [24] 王桂荣,梁革梅,吴孔明,等.棉铃虫中肠氨肽酶N 基因的克隆与序列分析[J]. *中国农业科学*, 2003,36(11):1293-1300.
- [25] 苏建亚,周晓梅,沈晋良.抗Bt 棉棉铃虫幼虫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] ZHU Y C, KRAMER K J, OPPERT B, et al. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Hodja interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000,30:215-224.
- [27] HERREROS, GECHEV T, BAKKER P L, et al. *Bacillus thuringiensis* Gy1Ca resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes[J]. *BMC Genomics*, 2005,6:96.