

# 棉铃虫APN基因家族系统进化与功能分析

牛琳琳, ZAW Lin Naing, 张彩虹, 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:** 氨基酶 N (APN) 是锌金属蛋白酶 M1 家族的成员, 鳞翅目昆虫中肠刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 细胞膜上的 APN 不仅在蛋白消化吸收过程中起着重要的作用, 而且是 Bt 的重要受体蛋白。本研究通过 PCR 技术克隆得到 7 条棉铃虫 APN 基因全长序列, *HaAPN1*~7 (Genbank 登录号为 MT002819~MT002825)。经生物信息学分析, *HaAPN1*~7 全长为 2592~3099 bp, 编码 863~1032 个氨基酸, 分子量为 110~115 kDa, 等电点为 4.7~6.4, N 端信号肽为 15~20 aa。系统进化分析结果表明, *HaAPN1*~7 分属于 Class 1~7 类别。RT-qPCR 结果表明, 在敏感棉铃虫 5 龄幼虫中肠中 APN2 的表达量最高, APN7 的表达量最低; Cry1Ac 抗性品系棉铃虫中各类 APN 的表达趋势与敏感品系一致。取食 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 蛋白后棉铃虫中肠 APN 活性显著降低, 取食 Cry1Ac 和 Vip3Aa 蛋白后中肠液和 BBMV 中 APN 活性都显著降低, 而取食 Cry2Ab 蛋白后只有 BBMV 上 APN 活性显著降低; 棉铃虫对 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 产生耐受性后, 中肠液和 BBMV 中 APN 活性也都发生显著变化。因此, 不同类别的棉铃虫 APN 在 Bt 的杀虫机制中可能起到不同的作用, APN 活性变化可能与 Bt 蛋白的降解及抗性演化相关。

**关键词:** 氨基酶 N; 棉铃虫; 系统进化; 功能分析

中图分类号: S433.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2021)01-0091-11

## Phylogenetic Evolution and Function of APN Gene Family in *Helicoverpa armigera*

NIU Linlin, ZAW Lin Naing, ZHANG Caihong, EI Thinzar Soe, LIANG Gemei\*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Aminopeptidase N (APN) is a member of the zinc metalloproteinase M1 family. APNs, located on the cell membrane of brush border membrane vesicles (BBMV) in Lepidoptera insects midgut, not only play an important role in the process of protein digestion and absorption, but also is an important receptor protein for Bt. In this study, seven APN genes with the full sequence of 2592—3099 bp from *Helicoverpa armigera* (*HaAPN1*—7, Genbank acc. No. MT002819—MT002825) were cloned by PCR. Bioinformatics analysis results showed that *HaAPN1*—7 encoded 863—1032 amino acid with a molecular weight of 110—115 kDa and an isoelectric point of 4.7—6.4, and signal peptides of 15—20 aa at the N-terminal. Phylogenetic analysis showed that *HaAPN1*—7 clustered into Class 1—7 families. RT-qPCR results showed that the expression level of APN2 was the highest and that of APN7 was the lowest in midgut of the fifth instar larvae from the susceptible strain. Similar APN expression pattern was also found in Cry1Ac-resistant strain. The APN activity in midgut juice and BBMV both significantly decreased when the larvae were fed Cry1Ac and Vip3Aa protein. But when the larvae were fed Cry2Ab protein, the APN activity was clearly reduced only in midgut BBMV. The APN activity in midgut juice and BBMV also significantly changed after *H. armigera* had tolerance to Cry1Ac, Cry2Ab, or Vip3Aa. It is suggested the different types of *HaAPNs* may play different roles in the insecticidal mechanism of Bt, and the change of APN activity may

收稿日期: 2020-04-16

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

作者简介: 牛琳琳, 硕士研究生, E-mail: 1990283386@qq.com; \*通信作者, 研究员, E-mail: gmliang@ippcaas.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.05.001

be related to Bt degradation and resistance evolution.

**Key words:** aminopeptidase N; *Helicoverpa armigera*; phylogenetic evolution; functional analysis

APNs (氨基酶家族) 属于肽链端解酶, 可使氨基酸从多肽链的 N 末端顺序逐个地游离出来<sup>[1]</sup>, 参与生物体内蛋白翻译水平调控、肽激素水平调控、应激反应以及与健康和疾病相关的细胞反应等过程<sup>[2]</sup>。在昆虫中, 存在于消化道和肠腔中的 APN, 主要功能是与肽链内切酶和羧肽酶共同起作用, 分解来自食物的蛋白<sup>[3]</sup>。研究者根据 APNs 的基因序列系统进化分析结果将鳞翅目昆虫 APNs 分为 8 类, 分别命名为 APN1 到 APN8, 每类分支中通常有多于一种的 APN, 同一物种的不同分支间氨基酸同源率为 23%~40%, 同一分支不同物种间的同源率为 50%~95%<sup>[4,5]</sup>。目前, 有 143 条 APN 的 cDNA 已经从 27 种鳞翅目昆虫中被克隆、分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

昆虫中肠上的受体蛋白与 Bt 结合是 Bt 发挥杀虫作用的关键, 而且受体蛋白的变异与昆虫对 Bt 的抗性密切相关。氨基酶 N 是最早被鉴定出来的 Bt 受体蛋白<sup>[6]</sup>, 烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 APN 通过分离纯化后可与 Bt 蛋白进行体外结合, 是最早被确定的 Cry1Ac 受体<sup>[7]</sup>。2002 年 Gill 等<sup>[8]</sup>采用显微注射法获得了含烟草天蛾 APN 基因的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, APN 在非敏感宿主果蝇中肠和中胚层获得了表达, 这种转基因果蝇对 Cry1Ac 毒素变得很敏感, 该研究首次从虫体水平证实 APN 是 Cry1Ac 的功能性受体。Lin 等<sup>[9]</sup>在 Sf9 昆虫细胞中成功表达家蚕 APN6, 细胞生测结果显示 BmAPN6 参与 Cry1Ac 诱导的细胞形态异常和裂解死亡过程。以往的研究结果表明, 不同 APN 所结合的 Cry 蛋白种类不尽相同, 而且昆虫对 Bt 产生抗性后 APN 基因的表达量变化也有差异, 有的在抗性昆虫中显著降低, 有的却显著升高。Pigott 和 Ellar<sup>[10]</sup>认为, APN 在对 Bt 敏感性不同昆虫中的表达量不同可能与 APNs 在不同种类昆虫中作为 Bt 受体的相对重要性不同相关。因此, 昆虫 APNs 可能在不同 Bt 的杀虫机制及抗性机制中发挥着不同的作用。

自 1997 年 Bt 棉花在我国种植以来, 棉铃虫的为害得到了有效控制, 但随着种植年限的延长, 棉铃虫对 Cry1Ac 的敏感性逐渐降低, 抗性风险不容忽视<sup>[11]</sup>。Angelucci 等<sup>[12]</sup>通过分析棉铃虫中肠的 cDNA 文库发现了 7 种 APN, 其中有 4 种可以和 Cry1Ac 结合; 我们实验室也对棉铃虫 APN 进行了一系列研究, 包括基因克隆、分离纯化, 并证实 *HaAPN1* 是 Cry1Ac 的受体、在幼虫不同龄期中的表达量不同等<sup>[13-16]</sup>。对 *HaAPNs* 参与杀虫机制、抗性机制中的功能也进行了探讨, 如 *HaAPN4* 可以与 Cry1Ac、Cry2Aa 都结合, 沉默 APN4 基因使棉铃虫对 Cry2Aa 的敏感性降低; 通过抗体封闭试验证实 *HaAPN1* 和 *HaAPN4* 参与 Cry1Ac、Cry2Aa 棉铃虫的杀虫过程<sup>[17-19]</sup>; *HaAPN1* 片段缺失导致棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性<sup>[20]</sup>; *HaAPN1* 的表达量在不同水平的 Cry1Ac 抗性品系棉铃虫中都显著降低, 而 *HaAPN5* 在不同抗性品系中表现不同, 有的升高有的降低<sup>[21]</sup>。但总体来说, 对棉铃虫 APN 家族所有的基因缺乏系统的比较、分析, 因此, 无法全面评价不同 APNs 的作用。本研究我们克隆得到 7 个棉铃虫 APN 基因全长序列后, 对 *HaAPNs* 进行了系统进化分析, 并比较了 *HaAPN1-7* 基因在 Cry1Ac 敏感和抗性棉铃虫中的表达量, 还分析了棉铃虫取食不同种类的 Bt 蛋白后 APN 活性的变化, 以期系统地分析这 7 种 APNs 的功能, 为进一步明确棉铃虫 APNs 在 Bt 杀虫、抗性机制中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

96S 敏感品系棉铃虫 1996 年采集自河南省新乡县棉田, 在实验室用人工饲料饲养至今, 在此期间未接触过任何杀虫剂<sup>[22]</sup>。BtR 品系是由 96S 敏感品系棉铃虫持续饲喂 Cry1Ac 蛋白筛选得到的, 对 Cry1Ac 的抗性倍数超过 1800 倍。96S-Cry2Ab 品系是由 96S 敏感品系棉铃虫持续饲喂 Cry2Ab 蛋白筛选得到的, 对 Cry2Ab 的抗性倍数为 28 倍。96S-Vip3Aa 品系是由 96S 敏感品系棉铃虫持续饲喂 Vip3Aa 蛋白筛选得到的, 对 Vip3Aa 已具有一定耐受性。

各品系棉铃虫均在温度 (26±1) °C, 光周期 16L:8D, 相对湿度 (75±10) % 的条件下饲养。

### 1.2 供试蛋白

Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa 蛋白购自北京美延农业科技有限责任公司。

### 1.3 棉铃虫中肠总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取棉铃虫 5 龄初幼虫 30 头, 于冰上解剖截取中肠, 在 0.7% NaCl 溶液中清洗掉中肠内含物, 用滤纸吸干中肠的水分, 液氮速冻后在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。棉铃虫中肠总 RNA 采用 Trizol 法进行提取<sup>[23]</sup>, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性并用 NanoDrop1000 紫外分光光度计检测其浓度和纯度。

按照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (天根公司) 说明书, 取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 进行反转录。

### 1.4 棉铃虫 APNs 全长基因克隆

分析 GenBank 上传的棉铃虫 APNs 序列信息, 对无 APN 全长的基因 (APN4~7) 先设计中间引物, 然后进行 3' RACE PCR。按照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (Takara 公司) 说明书以 QT (表 1) 引物反转录得到的 3' cDNA 为模板进行 PCR。

设计特异性引物以棉铃虫中肠 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ : cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ TransStart<sup>®</sup> FastPfu Buffer 10  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , TransStart<sup>®</sup> FastPfu DNA Polymerase 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 1 个循环; 变性 95  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 退火 55  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  2 kb/min, 40 个循环; 终延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 1 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离和胶回收纯化后连接到 pEASY-Blunt Simple 克隆载体上, 转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养后挑选阳性单克隆菌斑送至中美泰和有限公司进行测序。测序结果用 NCBI-Blast 进行同源序列检索对比后用 DNAMAN 进行拼接得到全长序列。

表 1 反转录和 PCR 所用引物

Table 1 Primers used for reverse transcription and PCR

引物 Primers	引物序列 Sequences (5'-3')	引物用途 Primers function
APN1FF	ATGGCGAACCGCTGGTACACCTC	全长基因扩增
APN1RR	TTAAGCCATATTAACAACGAGAGTCAC	
APN2FF	ATGCAATTCATCACCATCATACTCTCG	
APN2RR	TTATAACAACATTGCGAGTACTGTCCACGAC	
APN3FF	ATGGCGGCGATAAAACTCTTAG	
APN3RR	TTAGACCACTAAAATAAGGTGCAAAATGGC	
APN4FF	CGTCTGCGTGATGTGGTCTA	3' RACE
APN4F1	ATGGGTGCCAACATGGTGC	中间片段扩增
APN4R (mid)	CGTGAAAGCGACCAGATAG	
APN5F (1~798 bp)	ATGTATTACTGGCACTAC	中间片段扩增
APN5R (1~798 bp)	AGCGGTGGGTGGGCTAAG	
APN5FF	ATGGCTATGAATGTAAACGCCGAT	中间片段扩增
APN5R1	TAGAGCGGTAGCTCCACTTTCAC	
APN5 3' GSP F	GAAATCTGGTTCGGTATTTCG	3' RACE
APN6FF	ATGTCCAAAATACTGCTCGTAGCCTTGAG	中间片段扩增
APN6RR	AACAACGAACAACAAGACAGACATAGC	
APN6 3' GSP F	ATGCTCGGCCATGTTAGGTG	3' RACE
APN7F (1~1200 bp)	ATGAGTGCAATGTTTCGCGCG	中间片段扩增
APN7R (1~1200 bp)	CCTGTGCCGCTCTATTTCTCCT	
APN7 F	GACGCTAAAGACTTGAAAATACAG	
APN7 R	AAGACATCACAATGGGCAGAG	
APN7F (3' 601 bp)	TGATAAAGAGCAAAGACAACCA	
APN7R (3' 601 bp)	TTTTCAGGCGGAACAGT	
QT	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACT CGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	反转录
Q1	GAGGACTCGAGCTCAAGC	3' RACE

### 1.5 棉铃虫 APNs 基因序列分析和系统进化树构建

利用 ExPaSy-PROSITE ([http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi)) 预测 APNs 蛋白的分子量和等电点; 利用 NetNGLyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGLyc/>) 预测 APNs 蛋白的 N-糖基化位点; 利用 NetOGLyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNOLyc/>) 预测 APNs 蛋白的 O-糖基化位点; 利用 GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) 预测 APNs 蛋白的 GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol) 锚定位点; 在 NCBI 上搜索鳞翅目其他昆虫的 APN 氨基酸序列, 利用 Mega 7 软件采用邻接法构建已知鳞翅目昆虫的 APN 系统发育进化树。

### 1.6 不同抗性品系棉铃虫 APNs 表达量差异分析

取各品系 5 龄初棉铃虫幼虫 90 头, 30 头为一个生物学重复, 共 3 次重复。棉铃虫中肠提取、中肠总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成同 1.3。

根据扩增得到的棉铃虫 *APN1~7* 基因全长序列设计实时荧光定量 PCR 引物 (表 2), 内参引物选用核糖体蛋白 S15 基因 (RPS15)。所有引物均进行荧光定量 PCR 验证扩增效率。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 染料法。不同抗性品系 APNs 表达量差异分析利用本步骤中合成的 cDNA, PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 组分为 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10  $\mu$ L, 正向和反向引物各 0.6  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye<sup>^</sup> 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu$ L, PCR 程序按照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (天根公司) 试剂盒说明书进行。

APNs 表达量差异以内参基因 (RPS15) 表达量为标准参照, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法计算 APNs 的表达量差异<sup>[24]</sup>。用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行处理分析, 采用 Tukey 检验进行处理间差异显著性分析。

表 2 荧光定量 PCR 所用引物

Table 2 Primers used in qPCR

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'-3')
RPS15F	CTGAGGTCGATGAAACTCTC
RPS15R	CTCCATGAGTTGCTCATTG
yAPN1F	TGCGTCCATGGGTGTATTGC
yAPN1R	AGCTGGCCTGGTTAAGAGTG
yAPN2F	GAAGTAGACCCGACACCTGC
yAPN2R	CTTCGCCAGACCCTTCTGTT
yAPN3F	TGGACAGAACAGCCAGGACACCC
yAPN3R	GTCGTGAAAGTGATGGGAACAATGTAG
yAPN4F	CGTGCGTTCTAACAGCATCAACAGG
yAPN4R	CAGCATGAGCGGTAGGCAAGTGT
yAPN5F	ACCCAAAACGCACCTATCGT
yAPN5R	CTAGGAAACCAGAAACGAGCG
yAPN6F	CAGCCATACAACGCCAGACAAGC
yAPN6R	GAGTGGGAGCGAAGTCAGAACG
yAPN7F	CTGAACCCATTGAAGAGTACG
yAPN7R	GGGAATCCTGCCGATAAACCT

### 1.7 中肠酶液和 BBMV 中的 APN 活性的测定

将配制好的棉铃虫人工饲料切成边长约为 0.5 cm 的正方体小块, 加到 24 孔昆虫饲养板中。用 25 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 10.5) 将 Bt 蛋白稀释成需要浓度, 按照 0~6.25  $\mu$ g/larva 剂量添加 Bt 蛋白到饲料表面, 待 Bt 蛋白完全渗入饲料后, 将预先饥饿 4 h 后的 5 龄初棉铃虫幼虫接到饲料上。每处理接虫 24 头, 重复 3 次。待棉铃虫将各处理饲料取食殆尽 (8 h), 收集幼虫。

于冰上解剖各处理棉铃虫, 将中肠及内含物取出置于 2 mL 离心管中, 加入预冷的 1 mL 150 mmol/L

NaCl, 微量组织研磨器研磨约 10 s, 4 °C、12000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液于新的离心管中, 再重复离心一次, 上清液即为中肠酶液。棉铃虫中肠 BBMV 提取参照 Wolfersberger 等<sup>[25]</sup>的方法进行。利用 Bradford 法测定中肠酶液和 BBMV 中总蛋白浓度。

参照 Watanabe 等<sup>[26]</sup>和 Takesue 等<sup>[27]</sup>的方法, 以 1 mg/L LpNA 的甲醇储备液作为反应底物, 在 96 孔酶标板中每孔加入 5  $\mu$ L 样品和 195  $\mu$ L 底物溶液, 37 °C 反应 60 min 后, 405 nm 波长下测量吸光值。

APN 活性计算方法:  $U = (\Delta A / \Delta t) \times (V_{\text{总反应体积}} / v_{\text{样品体积}}) \times (1000 / \epsilon) \mu\text{mol}/\text{min}$  (消光系数  $\epsilon = 9.9/\text{mmol}/\text{cm}$ ); APN 特异活性 =  $U/\text{mg protein} = (\Delta A \times 264.0787) / \text{蛋白浓度}$ , APN 活力单位为  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 。

数据分析同 1.6。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫 APNs 基因序列分析

通过 PCR 克隆得到的 7 条棉铃虫 APN 基因全长序列 *HaAPN 1~7*, 已上传至 GenBank, 登录号为 MT002819~MT002825。经 ExPaSy-PROSITE、GPI-SOM 等生物信息学网站分析, *HaAPN 1~7* 全长为 2592~3099 bp, 编码 863~1032 个氨基酸, 分子量为 110~115 kDa, 等电点为 4.7~6.4, N 端信号肽为 15~20 aa。除 *HaAPN7* 以外, *HaAPN1~6* 都有 GAMENWG 和 HEX<sub>2</sub>HX<sub>18</sub>E 基序; *HaAPN1*、*HaAPN2*、*HaAPN3* 的 C 末端都有一段多聚苏氨酸序列; *HaAPN1~7* 蛋白 C 末端都有一个 GPI 锚定位点; *HaAPN1*、*HaAPN2*、*HaAPN3* 的 O-糖基化位点有 16~39 个; 除了 *HaAPN2* 无 N-糖基化位点, 其余 *HaAPNs* 均有 1~8 个 N-糖基化位点。具体序列信息分析见表 3。

表 3 棉铃虫 APN1~7 生物信息学分析  
Table 3 Bioinformatics analysis of *HaAPN1~7*

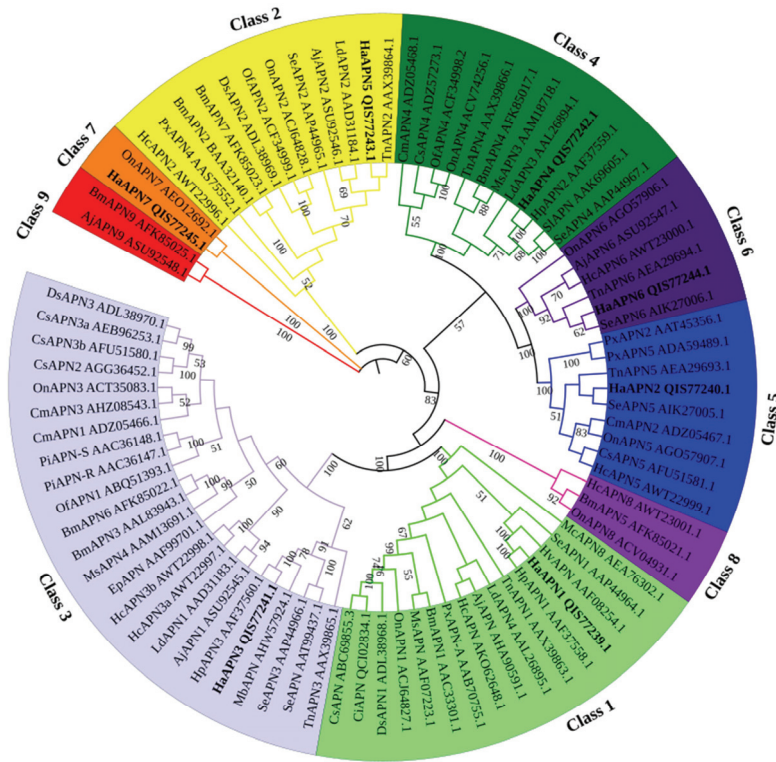
基因	CDS (bp)	氨基酸 (aa)	分子量 (kDa)	等电点	信号肽 (aa)	GAMENWG 基序	HEX <sub>2</sub> HX <sub>18</sub> E 基序	C 端 polythreonine 序列	GPI 锚定 位点	O-糖基化 位点	N-糖基化 位点
<i>APN1</i>	3042	1012	113.04	5.78	1~20	√	√	√	GSA	39	1
<i>APN2</i>	3099	1032	114.77	4.73	1~17	√	√	√	SSA	31	无
<i>APN3</i>	3045	1014	114.24	5.3	1~18	√	√	√	DGA	16	4
<i>APN4</i>	2856	951	108.25	5.45	1~20	√	√	×	NGA	无	8
<i>APN5</i>	2826	941	106.26	5.18	1~15	√	√	×	SGA	无	1
<i>APN6</i>	2886	961	109.49	5.45	1~19	√	√	×	ASA	无	6
<i>APN7</i>	2592	863	100.98	6.38	1~20	×	×	×	DGA	无	6

### 2.2 棉铃虫 APNs 系统发育分析

从 NCBI 下载了 22 种鳞翅目昆虫 APN 氨基酸序列共 86 条(包括本研究所克隆的 7 条 *HaAPNs* 序列), 利用 Clustal W 进行多序列比对, 采用 Neighbor-Joining 构建鳞翅目 APN 系统发育进化树(bootstrap=1000), 结果显示鳞翅目在进化上分为 9 个分支, 其中棉铃虫 *APN1~7* 基因分别在其中的 7 个分支 Class 1~7 上。Class 1 中包括 16 个物种; Class 2 中包括 11 个物种; Class 3 共有 17 个物种, Class 3 在进化关系上与 Class 1 的亲缘关系最近, 但与 Class 1 相比 O-糖基化位点更少; Class 4 与 Class 2 一样 C 末端无苏氨酸富集区, 此类别包含 11 个物种; Class 5 中包含 8 个物种, Class 6 中包含 6 个物种; Class 7~9 中仅包含 2~3 个物种。从棉铃虫 APN 进化上的亲缘关系上来看, 棉铃虫 *APN1* 与澳洲棉铃虫 *Helicoverpa punctigera*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 *APN1* 亲缘关系较近; 棉铃虫 *APN2* 与甜菜夜蛾 *APN5*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* *APN5* 亲缘关系较近; 棉铃虫 *APN3* 与澳洲棉铃虫 *APN3* 亲缘关系最近; 棉铃虫 *APN4* 与澳洲棉铃虫 *APN2* 亲缘关系最近; 棉铃虫 *APN5* 与粉纹夜蛾 *APN2* 亲缘关系最近; 棉铃虫 *APN6* 与甜菜夜蛾 *APN6* 亲缘关系最近; 棉铃虫 *APN7* 与欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* *APN7* 亲缘关系最近(图 1)。

### 2.3 Cry1Ac 敏感和抗性品系棉铃虫中 *HaAPN1~7* 表达量

在 96S 敏感棉铃虫中 *HaAPNs* 表达量差异显著 ( $F_{6,21} = 343$ ,  $P < 0.0001$ ), 表达量由高到低依次为



注：APN 基因均用物种名缩写+GeneBank 登录号的形式表示。物种名缩写为：Aj.: 蓖麻夜蛾；Bm.: 家蚕；Ci.: 甘蔗二点螟；Cm.: 稻纵卷叶螟；Cs.: 二化螟；Ds.: 小蔗螟；Ep.: 芋潜褐卷蛾；Ha.: 棉铃虫；Hc.: 美国白蛾；Hp.: 澳洲棉铃虫；Hv.: 烟芽夜蛾；Ld.: 舞毒蛾；Mb.: 甘蓝夜蛾；Mc.: 蓓带夜蛾；Ms.: 烟草天蛾；Of.: 亚洲玉米螟；On.: 欧洲玉米螟；Pi.: 印度谷螟；Px.: 小菜蛾；Se.: 甜菜夜蛾；Sl.: 斜纹夜蛾；Tn.: 粉纹夜蛾。

Note: The species name and GeneBank accession number are shown for each APN sequences. Species names abbreviations are as follows. Aj.: *Achaea janata*; Bm.: *Bombyx mori*; Ci.: *Chilo infuscatellus*; Cm.: *Cnaphalocrocis medinalis*; Cs.: *Chilo suppressalis*; Ds.: *Diatraea saccharalis*; Ep.: *Epiphyas postvittana*; Ha.: *Helicoverpa armigera*; Hc.: *Hyphantria cunea*; Hp.: *Helicoverpa punctigera*; Hv.: *Heliothis virescens*; Ld.: *Lymantria dispar*; Mb.: *Mamestra brassicae*; Mc.: *Mamestra configurata*; Ms.: *Manduca sexta*; Of.: *Ostrinia furnacalis*; On.: *Ostrinia nubilalis*; Pi.: *Plodia interpunctella*; Px.: *Plutella xylostella*; Se.: *Spodoptera exigua*; Sl.: *Spodoptera littoralis*; Tn.: *Trichoplusia ni*

图 1 鳞翅目昆虫 APNs 进化树

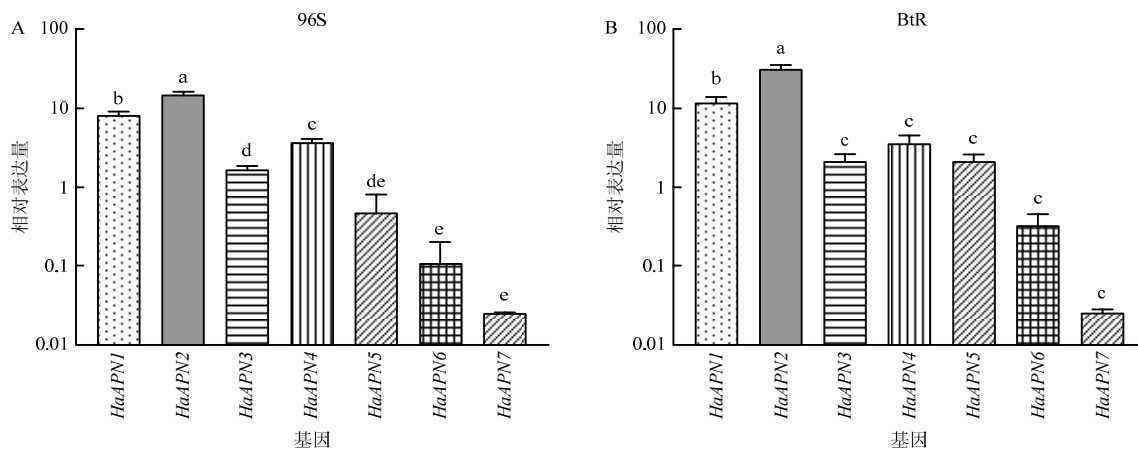
Fig. 1 Phylogenetic tree of Lepidoptera insects APNs

*HaAPN2*, *HaAPN1*, *HaAPN4*, *HaAPN3*, *HaAPN5*, *HaAPN6*, *HaAPN7*, 其中 *HaAPN2* 的表达量比 *HaAPN1* 高约 1 倍且达到显著水平 ( $P=0.002$ )；*HaAPN4* 的表达量显著低于 *HaAPN1* ( $P<0.0001$ )，*HaAPN3* 的表达量显著低于 *HaAPN4* ( $P=0.001$ )；*HaAPN5* 与 *HaAPN3* 表达量差异不显著 ( $P=0.38$ )；*HaAPN5*~7 表达量差异不显著 ( $P>0.57$ ) (图 2A)。

在 BtR 抗性棉铃虫中 *HaAPNs* 表达量差异显著 ( $F_{6,21}=184, P<0.0001$ )，表达量由高到低依次为 *HaAPN2*、*HaAPN1*、*HaAPN4*、*HaAPN3*、*HaAPN5*、*HaAPN6* 和 *HaAPN7*，其中 *HaAPN2* 的表达量比 *HaAPN1* 高约 2 倍且达到显著水平 ( $P<0.0001$ )；*HaAPN3*~6 表达量均显著低于 *HaAPN1* ( $P<0.0001$ )；*HaAPN3*~7 表达量无显著差异 ( $P>0.07$ ) (图 2B)。

2.4 敏感品系棉铃虫取食不同 Bt 蛋白后中肠 APN 活性的变化

取食 Cry1Ac 蛋白后，96S 棉铃虫中肠 APN 活性变化明显 (中肠酶液:  $F_{6,14}=7.33, P=0.001$ ; BBMVs:  $F_{6,14}=457, P<0.0001$ )，与取食正常饲料的棉铃虫相比，2 ng/larva ( $P=0.0009$ )、50 ng/larva ( $P=0.018$ ) 和 0.25 μg/larva ( $P=0.003$ ) 剂量处理的棉铃虫中肠酶液中 APN 活性显著下降；所有不同 Cry1Ac 剂量处理的棉铃虫中肠 BBMVs 中 APN 活性与对照相比显著下降 ( $P<0.0001$ )。取食 Cry2Ab 蛋白后 ( $F_{6,14}=2.11, P=0.117$ )，中肠酶液中 APN 活性无显著变化 ( $P>0.18$ )；但与对照相比，所有剂量处理中肠 BBMVs 中 APN 活性都显著降低 ( $F_{5,12}=181, P<0.0001$ ; 1.25 μg/larva:  $P=0.029$ ; 其余剂量:  $P<0.0001$ )。取食



注: 纵轴中基因相对表达倍数进行了以 10 为底对数处理。图上不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著。

Note: The relative expression of gene on the vertical axis was logarithmized to 10. Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

图 2 Cry1Ac 敏感 (A) 和抗性 (B) 品系棉铃虫中 *HaAPN1*~7 表达量

Fig. 2 Expression level of *HaAPN1*—7 in Cry1Ac-susceptible (A) and -resistant (B) strain

Vip3Aa 蛋白后, 与对照相比, 各个处理中肠酶液中 APN 活性显著降低 ( $F_{5,12}=144$ ,  $P<0.0001$ ; 所有剂量:  $P<0.0001$ ); 除了 10 ng/larva 剂量处理外, 中肠 BBMV 中 APN 活性也都显著降低 ( $F_{5,12}=117$ ,  $P<0.0001$ ; 10 ng/larva:  $P=0.965$ ; 其余剂量:  $P<0.0001$ ) (图 3)。

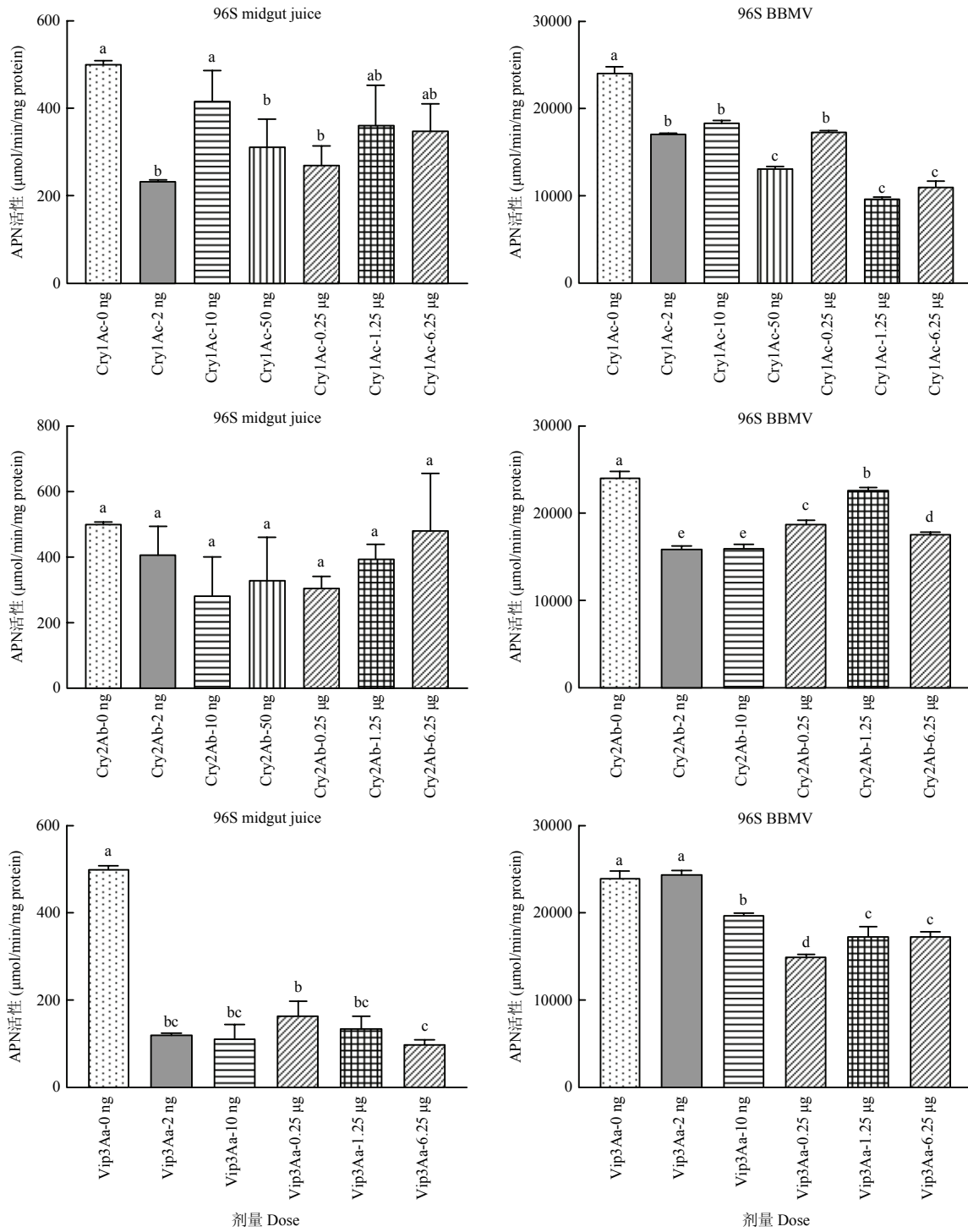
### 2.5 不同 Bt 抗性品系棉铃虫中肠 APN 活性的比较

与 96S 敏感品系棉铃虫相比, 各 Bt 抗性品系棉铃虫中肠 APN 活性显著降低 (中肠酶液:  $F_{3,8}=32.9$ ,  $P<0.0001$ ; BBMV:  $F_{3,8}=21.3$ ,  $P=0.0004$ ), 其中 BtR 品系 ( $P=0.0004$ ) 和 96S-Vip3Aa 品系 ( $P=0.004$ ) 棉铃虫中肠酶液中 APN 活性显著降低, 96S-Cry2Ab 品系与 96S 无显著差异 ( $P=0.564$ ); 而在 BBMV 中, 与 96S 棉铃虫相比, 96S-Vip3Aa 品系 ( $P=0.0004$ ) APN 活性显著降低, 96S-Cry2Ab 品系 ( $P=0.056$ ) 和 BtR 品系与敏感品系差异不显著 ( $P=0.841$ ) (图 4)。

## 3 讨论

鳞翅目昆虫中肠 APNs 的分子量从 100 到 180 kDa 不等, 具有多个保守区域, 从蛋白的 N 端到 C 端依次为信号肽、蛋白前体区、GAMENWG 基序、HEX<sub>2</sub>HX<sub>18</sub>E 锌指结构基序、苏氨酸富集区、糖基磷脂酰肌醇 (Glycosyl-phosphalidylinositol, GPI) 锚定信号位点<sup>[28]</sup>。本研究克隆得到的 *HaAPN1*~7 都具有这些 APN 家族的共同特征。*HaAPN1*~7 中, 只有 *APN7* 没有保守的 GAMENWG 基序和 HEX<sub>2</sub>HX<sub>18</sub>E 锌指结构基序, 证明 *APN7* 不是一个有活性的氨肽酶 N 基因<sup>[12]</sup>。棉铃虫 *APN4*~7 基因 C 末端没有苏氨酸富集区, 此区域也是 APN 的 O-糖基化位点; 具有苏氨酸富集区的 *APN1*~3 含有的 O-糖基化位点的个数也不相同, *HaAPN1* 和 *HaAPN2* 分别有 39 和 31 个 O-糖基化位点, *HaAPN3* 有 16 个 (表 3)。相比于 O-糖基化位点, 每个棉铃虫的 APN 基因只有少数几个 N-糖基化位点, 其中 *HaAPN2* 无 N-糖基化位点。APN 的糖基化位点通常被认为可能是 Cry1Ac 的结合区域<sup>[10,12]</sup>, 不同 APN 糖基化位点的差异可能是 APNs 与不同 Bt 蛋白结合存在差异的主要原因。例如, Cry1Ca 蛋白与烟草天蛾 106 kDa 的 APN 结合、但不能和 115 kDa 大小的 APN 结合<sup>[29]</sup>; 欧洲玉米螟中 APN1 结合 Cry1Ab 和 Cry1Fa, APN3a、APN8 只结合 Cry1Fa, APN2、APN3b, 与 Cry1Ab 和 Cry1Fa 都不结合<sup>[30]</sup>; 棉铃虫 *APN1*~4 均可以和 Cry1Ac 结合<sup>[12]</sup>, 其中 APN1 除了能与 Cry1Ac 结合外还能与 Cry1Aa 和 Cry1Ab 结合, APN2 则只能与 Cry1Ac 结合<sup>[20,21,31]</sup>。因此, 我们推测棉铃虫 *APN1*~6 与不同的 Bt 可能存在不同的结合谱。

Pigott and Ellar<sup>[10]</sup>进行系统发育分析后将鳞翅目序列划分为 5 个类群, 随着基因组测序技术的发展, 越来越多昆虫的 APN 同工酶序列被克隆出来, 鳞翅目 APNs 又进一步被细致地分为 8 个类群<sup>[4]</sup>, 在此基础上 Hughes<sup>[5]</sup>基于鳞翅目 APNs 的保守衍生基序, 去掉 Class7 分支后加上双翅目 APNs, 然后重新分析了鳞



注：纵轴中基因相对表达倍数进行了以 10 为底的对数处理。图上不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著。

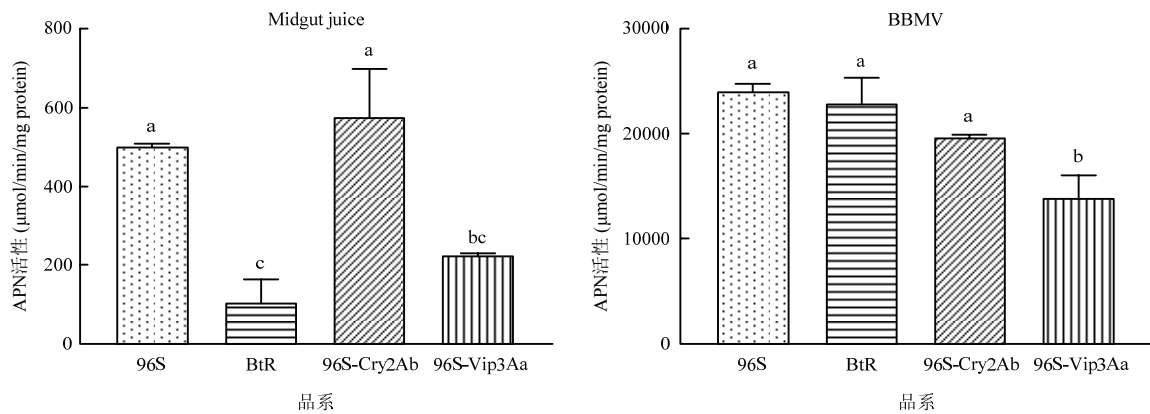
Note: The relative expression of gene on the vertical axis was logarithmized to 10. Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

图 3 取食不同 Bt 蛋白后敏感品系棉铃虫中肠 APN 活性

Fig. 3 APN activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* susceptible larvae after fed different Bt proteins

翅目 APNs 的系统发育情况<sup>[5]</sup>。本研究整合目前在 NCBI 上的鳞翅目 APNs 全长序列，除去无信号肽和 GPI 锚定位点的 PSA (puromycin-sensitive amino) 类 APN<sup>[4]</sup>，进行系统发育分析将其分为 9 个类群，Class 1~9。目前，不同类群 APN 均有作为 Bt 受体的报道，其中 Class 1~4 类群 APNs 与 Cry 蛋白的相互作用研究较为广泛，Class 1 中烟草天蛾 APN1<sup>[32]</sup>、小菜蛾 PxAPN-A<sup>[33]</sup>、棉铃虫 APN1<sup>[20,31]</sup>、粉纹夜蛾 APN1<sup>[34]</sup>已报道为





注: 纵轴中基因相对表达倍数进行了以 10 为底对数处理。图上不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著。

Note: The relative expression of gene on the vertical axis was logarithmized to 10. Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

图 4 不同 Bt 抗性品系棉铃虫中肠 APN 活性的差异

Fig. 4 Differences of APN activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* from different Bt resistant strains

Cry1Ac 的受体; Class 2 中烟草天蛾 APN2 可以与 Cry1Ab5 结合<sup>[7]</sup>; Class 3 中家蚕和小菜蛾 APN3<sup>[35]</sup>、棉铃虫 APN3<sup>[3]</sup>、烟芽夜蛾 120 kDa APN<sup>[37]</sup>、舞毒蛾 APN1<sup>[38]</sup>可作为 Cry1A 的结合蛋白也有相关报道; Class 4 中家蚕和小菜蛾的 APN4 可以与 Cry1Aa、Cry1Ab 结合<sup>[35]</sup>。Class 5~9 类群作为 Cry 蛋白的受体报道还很少。

为了明确 APN 在 Bt 杀虫或抗性机制中的作用, 人们常用 RNAi 技术干扰 APN 的表达来明确其功能, 如通过降低棉铃虫、美国白蛾、甜菜夜蛾、二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 等的 APN 基因表达量, 证实了 APN 是 Cry 类蛋白的受体<sup>[39-42]</sup>。APN 突变或表达量的改变与棉铃虫<sup>[20]</sup>、甜菜夜蛾<sup>[43]</sup>、粉纹夜蛾<sup>[34]</sup>等对 Cry1 类蛋白的抗性相关。我们的研究结果显示棉铃虫中肠 APN1~7 的表达量存在显著差异, 其中 APN2 的表达量最高, APN7 的表达量最低; 而且 Cry1Ac 抗性品系棉铃虫中各类 APN 的表达趋势与敏感品系一致。我们推测, *HaAPN1*~7 可能在分解蛋白、作为结合受体等方面有不同的重要性。

Chougule 等<sup>[44]</sup>曾报道, 取食不同的饲料会造成棉铃虫 APNs 表达量的差异; Cry1Ab 抗性品系小蔗螟 APN 蛋白酶活性和表达量较敏感品系都显著降低, 敏感幼虫 APN 被 RNAi 后, APN 活性降低、对 Cry1Ab 敏感性降低<sup>[45]</sup>。我们的研究结果显示敏感品系棉铃虫取食 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 蛋白后中肠 APN 活性显著降低, 其中取食 Cry1Ac 和 Vip3Aa 蛋白后中肠酶液中 APN 活性显著降低, 取食 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 蛋白后中肠 BBMVs 上 APN 活性都显著降低(图 3)。棉铃虫对 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 产生耐受性后, 中肠酶液和 BBMVs 中 APN 活性也发生了显著变化, 而且与 96S 棉铃虫相比, BtR 品系和 96S-Vip3Aa 品系棉铃虫中肠酶液中 APN 活性显著降低, 96S-Vip3Aa 品系棉铃虫 BBMVs 中 APN 活性显著降低(图 4)。说明棉铃虫取食不同的 Bt 或对不同 Bt 有耐受性后, 在中肠酶液中和 BBMVs 上 APN 的活性变化不同。由此, 我们推测棉铃虫 APN 活性的变化与 Bt 蛋白的降解及抗性演化相关, 但具体的功能有待以后进一步验证。

## 参 考 文 献

- [1] Sanz Y. Aminopeptidases[M]//Polaina J, MacCabe A P, eds. Industrial Enzymes. Springer, 2007, 243-260.
- [2] Luan Y P, Xu W F. The structure and main functions of aminopeptidase N[J]. Current Medicinal Chemistry, 2007, 14(6): 639-647.
- [3] Wang G R, Liang G M, Wu K M, et al. Gene cloning and sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. European Journal of Entomology, 2005, 102: 13-19.
- [4] Crava C M, Bel Y, Lee S F, et al. Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and *Bombyx mori* (L.): Sequences, mapping and expression[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40: 506-515.
- [5] Hughes A L. Evolutionary diversification of aminopeptidase N in Lepidoptera by conserved clade-specific amino acid residues[J]. Molecular

- Phylogenetics and Evolution, 2014, 76: 127-133.
- [6] Denolf P, Hendrickx K, Van D J, *et al.* Cloning and characterization of *Manduca Sexta* and *Plutella Xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 248: 748-761.
- [7] Knight P J K, Crickmore N, Ellar D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin in the brush-border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11(3): 429-436.
- [8] Gill M, Ellar D J. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1[J]. Insect Molecular Biology, 2002, 11(6): 619-625.
- [9] Lin P, Cheng T C, Feng T S, *et al.* Interaction of *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like protein with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(11): 1809-1822.
- [10] Pigott C R, Ellar D J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71(2): 255-281.
- [11] Zhang D D, Xiao Y T, Chen W B, *et al.* Field monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Cry1Ac insecticidal protein resistance in China (2005-2017)[J]. Pest Management Science, 2019, 75: 753-759.
- [12] Angelucci C, Barrett-wilt G A, Hunt D F, *et al.* Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(7): 685-696.
- [13] 王桂荣, 梁革梅, 吴孔明, 等. 棉铃虫中肠氨基肽酶 N 基因的克隆及序列分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1293-1300.
- [14] 梁革梅, 徐广, 王桂荣, 等. 棉铃虫中肠 Bt 毒素受体蛋白(APN)的分离与纯化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(1): 102-107.
- [15] 常洪雷, 梁革梅, 王桂荣, 等. 棉铃虫中肠 Cry1A 受体蛋白氨基肽酶 N1 在 Tn 细胞系的表达[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1667-1672.
- [16] 张涛, 魏纪珍, 张丽丽, 等. Bt 抗性和敏感棉铃虫钙粘蛋白及氨基肽酶 N1 表达量的比较[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 69-74.
- [17] Liu C, Gao Y, Ning C, *et al.* Antisera-mediated in vivo reduction of Cry1Ac toxicity in *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56: 718-724.
- [18] Zhao M, Yuan X D, Wei J Z, *et al.* Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46555.
- [19] 王冰洁, 袁向东, 赵曼, 等. 棉铃虫中肠钙粘蛋白、氨基肽酶 N 及碱性磷酸酯酶的抗血清对 Cry1Ac 和 Cry2Ab 毒力的影响[J]. 昆虫学报, 2016, 59(9): 977-984.
- [20] Zhang S P, Cheng H M, Gao Y L, *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.
- [21] Wei J Z, Yang S, Lin C, *et al.* Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera*[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1653.
- [22] 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, 35(2): 16-18.
- [23] Simms D, Cizdziel P E, Chomczynski P. TRIZOL™: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA[J]. Focus, 1993, 15(4): 99-102.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Wolfersberger M G, Luethy P, Mauerer A, *et al.* Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1987, 86: 301-308.
- [26] Watanabe Y, Shimamori Y, Ozaki M, *et al.* Purification of a membrane-bound neutral endopeptidase from rat kidney and its activation by polyamines[J]. Journal of Biochemistry, 1984, 95(6): 1725-1732.
- [27] Takesue Y, Yokota K, Nishi Y, *et al.* Solubilization of trehalase from rabbit renal and intestinal brush-border membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C[J]. FEBS Letters, 1986, 201(1): 5-8.
- [28] Adang M J. Insect aminopeptidase N[M]//Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition). London Academic: Press, 2004, 296-299.
- [29] Luo K, Lu Y J, Adang M J. A 106-kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 26: 783-791.
- [30] Crava C M, Bel Y, Jakubowska A K, *et al.* Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: Activity characterization and differential binding

- to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43: 924-935.
- [31] Rajagopal R, Agrawal N, Selvapandian A, *et al.* Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 370(3): 971-978.
- [32] Flores-Escobar B, Rodríguez-Magadan H, Bravo A, *et al.*, Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 15: 4543-4550.
- [33] Chang W X Z, Gahan L J, Tabashnik B E, *et al.* A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera[J]. *Insect Molecular Biology*, 1999, 8: 171-177.
- [34] Tiewsirir K, Wang P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(34): 14037-14042.
- [35] Nakanishia K, Yaoi K, Nagino Y, *et al.* Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*-their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin[J]. *FEBS Letters*, 2002, 519: 215-220.
- [36] Valaitis A P. Localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding molecules in gypsy moth larval gut sections using fluorescence microscopy[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 108: 69-75.
- [37] Gill S S, Cowles E A, Francis V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*[J]. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 27277-27282.
- [38] Garner K J, Hiremath S, Lehtoma K, *et al.* Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(6): 527-535.
- [39] Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh G R, *et al.* Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 7312-7319.
- [40] Zhang Y J, Zhao D, Yan X P, *et al.* Identification and characterization of *Hyphantria cunea* aminopeptidase N as a binding protein of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab35 toxin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(12): 2575.
- [41] Qiu L, Cui S, Liu L, *et al.* Aminopeptidase N1 is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45007.
- [42] Wang L Y, Gu S H, Nangong Z Y, *et al.* Aminopeptidase N5 (APN5) as a putative functional receptor of Cry1Ac toxin in the larvae of *Athetis lepigone*[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(4): 455-459.
- [43] Herrero S, Gechev T, Bakker P L, *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6(1): 96.
- [44] Chougule N P, Giri A P, Sainani M N, *et al.* Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(4): 355-367.
- [45] Yang Y, Zhu Y C, Ottea J, *et al.* Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40: 592-603.

(责任编辑: 张莹)