

二化螟 APN1 的原核表达及其与 Cry2Aa 蛋白的结合特性研究

刘慧^{1,2}, 李博³, 牛林⁴, 邱林⁵, 王永^{1*}

¹湖北工程学院生命科学技术学院/特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验,湖北孝感 432000; ²华中农业大学植物科学技术学院/昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室,湖北武汉 430070; ³广州海关隶属南沙海关,广东广州 511400; ⁴中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室,河南安阳 455000; ⁵湖南农业大学植物保护学院,湖南长沙 410128

摘要:【目的】Bt 杀虫蛋白发挥杀虫活性的重要前提是 Cry 蛋白能够与昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜囊 (BBMVs) 上的受体蛋白结合。在前期获得二化螟氨肽酶 N1 (Aminopeptidase N, APN1) 基因全长序列的基础上,明确二化螟 APN1 多肽片段与 Cry2Aa 的结合能力。【方法】将二化螟 APN1 序列片段在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达,利用蛋白质单向电泳和 ligand blotting 技术分析二化螟 APN1 多肽片段与 Cry2Aa 的结合能力。【结果】重组载体可在表达菌株 BL21 (DE3) 中表达一个约 70 ku 的蛋白,纯化后的多肽条带单一,纯度较好。Ligand blot 分析结果显示,表达的二化螟 APN1 多肽片段可以与活化的 Cry2Aa 杀虫蛋白结合,且结合条带随着重组蛋白上样量的降低而减弱。【结论】APN1 多肽片段可以与 Cry2Aa 结合,为阐明 APN1 基因的功能奠定基础,也为其他 Bt 蛋白的受体蛋白相关研究提供新的借鉴。

关键词: Cry2Aa; 二化螟; APN1; 原核表达; 结合能力

Prokaryotic expression of aminopeptidase N1 from *Chilo suppressalis* and *in vitro* binding analysis with the Cry2Aa toxin

LIU Hui^{1,2}, LI Bo³, NIU Lin⁴, QIU Lin⁵, WANG Yong^{1*}

¹Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000, China; ²Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; ³Guangzhou Customs Attached to Nansha Customs, Guangzhou, Guangdong 511400, China; ⁴Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China; ⁵College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China

Abstract:【Aim】The important premise of insecticidal activity of Bt toxins is that they can bind to specific receptors on the brush marginal capsule (BBMVs) of the epithelial cells in the insect midgut. Based on the full length sequence of the aminopeptidase N (APN) gene of *Chilo suppressalis*, the binding ability of APN1 to Cry2Aa toxin was determined.【Method】APN1 of *C. suppressalis* was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The binding ability of APN1 of *C. suppressalis* to Cry2Aa was analyzed by one dimensional electrophoresis and a ligand blotting assay.【Result】The recombinant vector expressed a 70 ku protein in the BL21 (DE3) strain, which indicated that the prokaryotic expression vector was successfully constructed. SDS-PAGE showed a single protein band, indicating purity. Ligand blot results showed that APN1 recombinant protein could bind to Cry2Aa. The width of the binding band decreased with decreasing recombinant protein sample volume.【Conclusion】APN1 could bind to the Cry2Aa toxin, which lays a foundation for elucidating the function of APN1 gene and provides a new reference for the study of other Bt receptors.

Key words: Cry2Aa; *Chilo suppressalis*; aminopeptidase N1; prokaryotic expression; binding assay

收稿日期 (Received): 2018-09-13 接受日期 (Accepted): 2018-10-26

基金项目: 湖北省教育厅科研项目 (Q20162707)

作者简介: 刘慧, 女。研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: 15271937410@163.com

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wangyong@hbeu.edu.cn

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)属革兰氏阳性菌,在芽孢形成时会产生具有杀虫活性的伴孢晶体蛋白,主要分为 Cry 蛋白和 Cyt 蛋白 2 类(Crickmore *et al.*, 1998),其中 Cry 蛋白是最常见的杀虫蛋白。由于 Bt 杀虫蛋白具有比较好的高效性和专一性,被认为是良好的化学农药替代物,表达 Bt 蛋白的转基因作物和微生物杀虫剂也被广泛应用于害虫防治(Bravo *et al.*, 2011)。由于 20 世纪 90 年代初期棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)大暴发,对我国棉花产业造成严重损失,对棉铃虫具有高效杀虫活性的转基因棉花(主要表达 Cry1Ac)首先在我国广泛种植。转基因作物的种植面积不断扩大,由 1997 年的 170 万 hm^2 增加至 2016 年的 1.85 亿 hm^2 ,其中抗虫转基因作物高达 41% (ISAAA, 2016; Wang *et al.*, 2018)。然而,单一、大面积种植转基因作物增加了棉铃虫等靶标害虫的抗性风险,成为 Cry 蛋白在害虫防治中可持续利用的重大威胁(Hagenbucher *et al.*, 2017; Von Kanel *et al.*, 2016)。因此,明确 Bt 杀虫蛋白的杀虫机制和靶标害虫的抗性机理,对于可持续利用 Bt 蛋白防治害虫具有重要意义。

Bt 蛋白发挥杀虫活性的重要前提是 Cry 蛋白能够与昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜囊 (brush border membrane vesicle, BBMV) 上的受体蛋白结合 (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017)。目前已报道的 Cry 杀虫蛋白受体主要包括钙黏蛋白 (cadherin, CAD)、氨肽酶 (aminopeptidase N, APN) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) (Pardo-Lopez *et al.*, 2013; Soberon *et al.*, 2009)。此外,研究发现, V-ATP 合成酶亚基 A/B、ABC 转运蛋白 (ABCC2、ABCC3、ABCG1、ABCA2) 和钠溶质转运体可与 Cry 蛋白结合,可能是潜在的 Cry 受体蛋白 (Chen *et al.*, 2010; Contreras *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2017b)。其中, APN 作为 Cry 蛋白的受体功能已在烟草天蛾 *Manduca sexta* L.、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Fabricius)、小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 等鳞翅目昆虫中得到鉴定 (Contreras *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2017a)。

当前已报道的 Cry 基因超过 500 种,根据其结构特点和杀虫活性大致被分为 67 类 (Crickmore *et al.*, 2014)。由于不同类别的 Bt 杀虫蛋白存在杀虫特异性,不同杀虫蛋白对同一靶标害虫的杀虫效果不尽相同,同一昆虫体内也可能存在不同的受体蛋白 (Frankenhuyzen, 2009)。二化螟 *Chilo suppressalis*

(Walker) 是水稻上的重要害虫之一 (Du *et al.*, 2013)。由于水稻品种更新、气候变化、水稻耕作技术发展以及二化螟抗药性产生等因素的影响,二化螟在我国的危害程度持续上升 (陈波等, 2012)。目前, Cry2A 类蛋白的受体鉴定和作用机制相关报道较少,因此,本文在前期获得二化螟 APN1 基因的基础上,分析其与 Cry2Aa 蛋白的结合能力,为二化螟 APN 蛋白的受体功能研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

二化螟为本实验室内以人工饲料 (不含 Bt 蛋白) 连续饲养多代的敏感种群,未接触任何杀虫剂。待幼虫生长至 4 龄,将其放置冰上切取中肠,去除内含物,用预冷的 0.7% NaCl 溶液冲洗并用吸水纸将其吸干,立即放入液氮中冷冻,收集的中肠样品放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 主要试剂

表达载体 pET-28a-(+)、克隆感受态细胞 Trans I-T1 Phage Resistant 为实验室前期保存。反转录 cDNA 合成试剂盒和限制性内切酶 (EcoRI 和 NotI) (Fermentas 公司), RNA 提取试剂和 DNA 聚合酶 (PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase) (Takara 公司), T 载体 peasy-blunt 和感受态细胞 Trans BL21 (DE3) (全式金公司), 质粒提试剂盒和 X-gal [天根生化科技 (北京) 有限公司], DNA T4 连接酶 (Promega 公司)、Cry2Aa 活化蛋白 (美国一龙公司 Envirologix Inc.)。菌体破碎时使用的溶菌酶, PMSF, DNaseI, 蛋白纯化时使用的填料 (康为世纪生物科技有限公司); PTG, 硫酸卡那霉素胰蛋白胨, 酵母提取物, 氯化钠 (武汉鼎国生物技术有限公司)。PCR 引物合成和 DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。蛋白纯化所用的 inclusion binding buffer、inclusion elution buffer 为自己配制,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 二化螟中肠 RNA 的提取及 cDNA 模板的合成

取 10 头二化螟 4 龄幼虫的中肠,放入无 RNAase 的 1.5 mL 离心管中,加入 1000 μL 的 Trizol reagent 充分匀浆,用 Takara 公司的 RNAiso Plus 试剂盒进行总 RNA 的提取,将提取的 RNA 按照 Thermo Scientific cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA。

1.4 APN1 基因片段的克隆

1.4.1 引物设计 根据 GenBank 中二化螟 APN1

(JQ747494.1)的序列,在 Cry2Aa 蛋白结合区设计引物;APN1 正向引物 5'-AGGAATTCATGGACGGGATTGCCAAATC-3',反向引物 5'-AGGCGGCCGCTTTCATCAATCAAAGCGATCATTGTTG-3',为了便于将目的基因克隆到表达载体上,在正向、反向引物中分别设计了 EcoRI、NotI 酶切位点(用下划线表示)。

1.4.2 PCR 产物的克隆和鉴定 以合成的 cDNA 第一链为模板,按照说明书配制 Prime STAR Max 的 PCR 体系,1%琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。将回收的目的片段连接到克隆载体 peasy-blunt 中,然后转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑挑选,挑取白色单菌落,培养后进行菌液 PCR 鉴定,将鉴定的阳性克隆进行测序鉴定。

1.5 APN1 基因原核表达载体的构建及鉴定

1.5.1 质粒提取 对测序正确的单菌落菌液,1:100 加入 10 mL 带 kana 抗性的 LB 液体培养基过夜培养,采用 TIANprep Mini Plasmid Kit 进行质粒提取。

1.5.2 重组表达载体的构建 将重组的质粒 peasy-blunt/APN1 和原核表达载体 pET-30a-(+) 经 EcoRI 和 NotI 双酶切后,分别切胶回收 1600、5000 bp 左右的片段。在 T4 连接酶的作用下,将 APN1 片段与原核表达载体 pET-30a-(+) 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。接着转化大肠杆菌 DH5 α ,过夜培养,然后进行菌液 PCR 的鉴定及重组质粒的测序鉴定。

1.6 APN1 多肽片段诱导表达并纯化

1.6.1 APN1 多肽片段诱导表达 提取经鉴定正确的质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,涂平板,过夜培养。挑取单菌落进行 PCR 验证,取阳性结果对应的菌液 100 μL 加入到 10 mL Kana+LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 4 h,再转入 1 L Kana+LB 液体培养基中, $D_{600\text{nm}}$ 值达到 0.5~0.8 时,加 IPTG 至终浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养 6 h,12000 g 离心 1 min,弃上清,所得沉淀为总蛋白,用于 SDS-PAGE 电泳及纯化。

1.6.2 APN1 多肽片段纯化 将 IPTG 诱导后的蛋白加入 LE buffer(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 ,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea,pH8.0)溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 18000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清至 His-tag 亲和层析柱,wash buffer(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 ,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole,8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea,pH8.0)冲洗柱子。elution buffer(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 ,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,500 $\text{mmol} \cdot$

L^{-1} Imidazole,8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea,pH8.0)洗脱目的蛋白。收集的纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测。

1.7 ligand blotting 分析

将提取纯化的 APN1 片段进行 SDS-PAGE 分析,用 Bio-Rad 标准半干法转膜装置将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 PBST 稀释的 5%脱脂奶粉封闭 2 h,与活化的 Cry2Aa 杀虫蛋白(0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)孵育 2 h;PBST 洗膜 10 min,重复 3 次;与 Cry2Aa 的抗体(1:3500)孵育 2 h;PBST 洗膜 10 min,重复 3 次;辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3500)孵育 2 h;ECL 化学发光显色,记录图片。

2 结果与分析

2.1 APN1 在大肠杆菌表达纯化结果

结合 GenBank 已收录的 APN1 的全长,经过表达载体构建将目的基因构建到 pET-30a-(+) 表达载体上,转化 BL21(DE3)感受态细胞以后,用终浓度 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导蛋白表达并纯化。如图 1 所示,在体外获得了二化螟 APN1 蛋白,诱导表达和纯化得到的蛋白大小一致,约 70 Ku,与预测的蛋白大小相一致。纯化后的多肽条带单一,纯度较好,可以用于蛋白杂交实验。

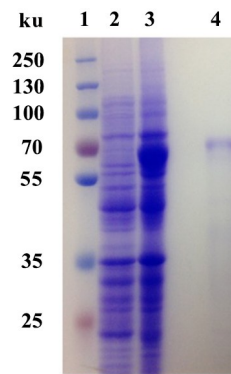


图1 二化螟 APN1 的原核表达和纯化

Fig.1 Prokaryotic expression and purification of *C. suppressalis* APN1

1:Marker; 2:未添加 IPTG 诱导的总蛋白;3:IPTG 诱导的总蛋白;4: Ni^{2+} 柱纯化的蛋白。

1: Marker; 2: No IPTG-induced total protein; 3: IPTG-induced total protein; 4: Purified protein by Ni^{2+} column.

2.2 Cry2Aa 蛋白与 APN1 多肽片段的结合分析

将纯化后的 APN1 进行 SDS-PAGE 电泳后,采用 ligand blotting 技术,检验 APN1 片段和 Cry2Aa 的结合能力,结果如图 2 所示,表达的二化螟 APN1 多肽片段可以与活化的 Cry2Aa 杀虫蛋白结合,且结合条带随着重组蛋白上样量的降低而减弱。

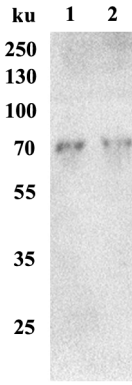


图 2 二化螟 APN1 蛋白与 Cry2Aa 蛋白的结合

Fig.2 The binding of APN1 protein to Cry2Aa protein in

C. suppressalis

1: 10 μ L 二化螟 APN1 蛋白; 2: 5 μ L 二化螟 APN1 蛋白。

1: 10 μ L of *C. suppressalis* APN1 protein;

2: 5 μ L of *C. suppressalis* APN1 protein.

3 讨论

有关 Cry 蛋白的作用机制,普遍认为 Cry 蛋白被靶标昆虫取食后,在昆虫中肠碱性环境条件下溶解,原蛋白在中肠酶的作用下水解为活化的杀虫蛋白,活化的杀虫蛋白与昆虫中肠上皮细胞 BBMVs 上的特异性受体相结合后,经过复杂的相互作用插入到昆虫细胞膜的脂筏中,导致细胞内外离子通透性和渗透压改变,引起细胞裂解和幼虫死亡 (Adang *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2017b)。

Cry 蛋白发挥作用的前提是其能够与昆虫体内的特异性蛋白受体相结合,这也是 Bt 蛋白发挥作用非常关键的一步 (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017)。目前已报道可以与 Cry 蛋白结合的蛋白中,其中一些已确认为 Cry 蛋白的受体蛋白,一部分可能是潜在的受体蛋白。1995 年发现昆虫 APN 为 Cry 蛋白的结合蛋白,现已在超过 20 多种鳞翅目昆虫中得到证实 (Qiu *et al.*, 2017a)。APN1 作为 Cry1 类蛋白受体已经在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Hübner)、烟草天蛾、棉铃虫和二化螟中得到证实 (Flores-Escobar *et al.*, 2013; Tiewisiri & Wang, 2011; Wei *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2009)。Wang *et al.* (2017b) 发现 RNAi 敲除 APN1 基因能降低二化螟对 Cry1Ac 的敏感性。但由于不同类型的杀虫蛋白可能存在不同的受体蛋白, Cry2A 与 Cry1A 类杀虫蛋白具有不同的作用机制 (Wei *et al.*, 2015)。

蛋白质结合是 Bt 蛋白发挥杀虫活性的前提,但结合并不意味着就是蛋白受体。谷实夜蛾中 APN1 是 Cry1Ac 的受体蛋白,但不是 Cry2Ab 的受体 (Wei

et al., 2016)。Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白能够与南方小花蝽 *Orius similis* Zheng 成虫体内的热激蛋白 70 相结合,但实验确认为非特异性结合 (Wang *et al.*, 2018)。肌动蛋白 actin 作为 Cry1Ac 蛋白的结合蛋白在烟草天蛾和棉铃虫蛋白质组中得到鉴定,在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (L.) 中也可作为 Cry4Ba 的结合蛋白 (Bayerreddy *et al.*, 2009)。肌动蛋白与 Cry 蛋白的结合有可能破坏细胞骨架的正常功能 (Chen *et al.*, 2010; McNall & Adang, 2003), 但肌动蛋白是否为 Cry 的受体蛋白至今还未明确。Qiu *et al.* (2017a) 利用 RNAi 敲除 2 个氨基肽酶 *N* 基因 (APN1 和 APN2) 导致二化螟对 Bt 水稻品系 TT51 (Cry1Ab 和 Cry1Ac 融合基因) 和 TIC-19 (Cry1Ca 基因) 的敏感性降低,但对 T2A-1 品系 (Cry2Aa 基因) 的敏感性无显著变化。本研究发现, Cry2Aa 杀虫蛋白可以与原核表达的二化螟中肠 APN1 多肽片段结合,其与 Cry2Aa 之间的互作关系仍需进一步研究。

参考文献

- 陈波, 范兵, 陈科海, 张静, 2012. 基于水稻主要病虫害的发生趋势论种质资源在水稻抗性育种中的应用. *现代农业科技* (3): 234-236.
- ADANG M J, CRICKMORE N, JURAT-FUENTES J L, 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology*, 47: 39-87.
- BAYYAREDDY K, ANDACHT T M, ABDULLAH M A, ADANG M J, 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4): 279-286.
- BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, SOBERON M, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423-431.
- CHEN L Z, LIANG G M, ZHANG J, WU K M, GUO Y Y, RECTOR B G, 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73(2): 61-73.
- CONTRERAS E, SCHOPPEMEIER M, REAL M D, RAUSELL C, 2013. Sodium solute symporter and cadherin proteins act as *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxin functional receptors in *Tribolium castaneum*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25): 18013-18021.

- CRICKMORE N, ZEIGLER D R, FEITELSON J, SCHNEPF E, VAN RIE J, LERECLUS D, BAUM J H D D, 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 807–813.
- DU X, WANG Y, CHEN L, PENG C, MA W, LEI C I, 2013. Effects of high-quality aromatic rice varieties on the fitness of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) in central China. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(7): 1208–1214.
- FLORES-ESCOBAR B, RODRÍGUEZ-MAGADAN H, BRAVO A, SOBERÓN M, GÓMEZ I, 2013. Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15): 4543–4550.
- FRANKENHUYZEN K, 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1): 1–16.
- HAGENBUCHER S, EISENRING M, MEISSELE M, ROMEIS J, 2017. Interaction of transgenic and natural insect resistance mechanisms against *Spodoptera littoralis* in cotton. *Pest Management Science*, 73(8): 1670–1678.
- ISAAA, 2016. *Global status of commercialized biotech/GM Crops*; 2016. Ithaca, NY: ISAAA.
- JURAT-FUENTES J L, CRICKMORE N, 2017. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. *Journal of Invertebrate Pathology*, 142: 5–10.
- LUO K, TABASHNIK B E, ADANG M J, 1997. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3): 1024–1027.
- MCNALL R J, ADANG M J, 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10): 999–1010.
- PARDO-LOPEZ L, SOBERON M, BRAVO A, 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1): 3–22.
- QIU L, FAN J, ZHANG B, LIU L, WANG X, LEI C, LIN Y, MA W, 2017a. RNA interference knockdown of aminopeptidase N genes decrease the susceptibility of *Chilo suppressalis* larvae to Cry1Ab/Cry1Ac and Cry1Ca-expressing transgenic rice. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145: 9–12.
- QIU L, WANG P, ZHANG B, LIU L, WANG X, LEI C, LIN Y, MA W, 2017b. Proteomic analysis of Cry1Ac and Cry2Aa binding proteins in brush border membrane vesicles of the *Chilo suppressalis* midgut. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1165–1169.
- SOBERON M, GILL S S, BRAVO A, 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8): 1337–1349.
- TIEWSIRI K, WANG P, 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 14037–14042.
- VON KANEL M B, GORE J, CATCHOT A, COOK D, MUSSER F, CAPRIO M, 2016. Influence of dDual-Bt protein corn on bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), survivorship on bollgard II cotton. *Journal of Economic Entomology*, 109(2): 860–864.
- WANG L Y, GU S H, NANGONG Z Y, SONG P, WANG Q Y, 2017a. Aminopeptidase N5 (APN5) as a putative functional receptor of Cry1Ac toxin in the larvae of *Aethis lepigone*. *Current Microbiology*, 74(4): 455–459.
- WANG X Y, DU L X, LIU C X, GONG L, HAN L Z, PENG Y F, 2017b. RNAi in the striped stem borer, *Chilo suppressalis*, establishes a functional role for aminopeptidase N in Cry1Ab intoxication. *Journal of Invertebrate Pathology*, 143: 1–10.
- WANG Y, LI D, ZHOU H, LIU H, NIU L, WANG L, MA W, 2018. Evaluation of Cry1Ac and Cry2Aa toxin binding to two important beneficial cotton field insects, *Harmonia axyridis* and *Orius similis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66: 8698–8702.
- WEI J, GUO Y, LIANG G, WU K, ZHANG J, TABASHNIK B E, LI X, 2015. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Scientific Reports*, 5: 7714.
- WEI J, ZHANG M, LIANG G, WU K, GUO Y, NI X, LI X, 2016. APN1 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Scientific Reports*, 6: 19179.
- ZHANG S, CHENG H, GAO Y, WANG G, LIANG G, WU K, 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(7): 421–429.