

棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶的原核表达及其协同增效作用

项林平¹, 刘小芸¹, 田强强², 刘 强², 吕婷婷¹, 王 敦¹

(1 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】在大肠杆菌中表达棉铃虫单粒包埋型核型多角体病毒(HearNPV)几丁质酶(ChiA), 利用表达产物进行病毒增效作用研究, 以明确杆状病毒 ChiA 对 HearNPV 的协同增效作用。【方法】用 PCR 方法扩增出不含 N 端信号肽编码序列的 ChiA 基因片段, 分别克隆至原核表达载体 pMAL-p2x 和 pET-32a 中, 构建重组表达载体, 并分别在大肠杆菌 TB1 和 BL21(DE3)中进行融合表达, 测定融合蛋白对 HearNPV 的增效作用。【结果】克隆的基因片段经过测序后连接表达载体, 成功构建了重组表达载体 pMAL-p2x-ChiA 和 pET-32a-ChiA。重组载体转化相应菌株并进行诱导表达, 发现 pMAL-p2x-ChiA 在大肠杆菌 TB1 中的表达量占细菌总蛋白的 15.8%, 其中 20.0% 为可溶性表达; pET-32a-ChiA 在 BL21(DE3)中的表达量占细菌总蛋白的 26.8%, 其中 30.2% 为可溶性表达。选用 pET-32a-ChiA 在 BL21(DE3)中的表达产物作为增效蛋白, 当表达的可溶性 HearNPV ChiA 的添加水平为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其能够显著提高病毒毒力, 棉铃虫的死亡率较对照提高 36.6%。【结论】利用大肠杆菌表达的可溶性 HearNPV ChiA, 对 HearNPV 具有明显的增效作用。

【关键词】 棉铃虫核型多角体病毒; 几丁质酶; 原核表达; 增效作用

【中图分类号】 S476⁺.13

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0087-05

Expression of HearNPV chitinase gene in *E. coli* and its enhancement on HearNPV virulence

XIANG Lin-ping¹, LIU Xiao-yun¹, TIAN Qiang-qiang²,
LIU Qiang², LÜ Ting-ting¹, WANG Dun¹

(1 Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was conducted to investigate the virulence enhancement on *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HearNPV) by baculovirus chitinase (ChiA). The HearNPV chitinase gene was cloned and expressed in *E. coli* TB1 and BL21(DE3), respectively. And the bioassay was carried out to evaluate virulence enhancement. 【Method】 The PCR product of the chitinase gene was cloned into the prokaryotic expression vector pMAL-p2x and the pET-32a, and then expressed in *E. coli* strains TB1 and BL21(DE3), respectively. The BL21(DE3) products were used for bioassay. 【Result】 The chitinase (ChiA) was cloned and confirmed by sequencing and then inserted into expression vectors resulting in pMAL-p2x-ChiA and pET-32a-ChiA. The pMAL-p2x-ChiA was expressed with a yield of 15.8% of the total cellular proteins in TB1 while the pET-32a-ChiA was expressed with a higher yield of 26.8% in BL21(DE3). And the soluble products were 20.0% and 30.2% to the fusion proteins expressed in TB1 and

* [收稿日期] 2010-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30872033); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0867)

[作者简介] 项林平(1986—), 男, 河南三门峡人, 在读硕士, 主要从事杆状病毒功能基因组研究。E-mail: xiangleil127@163.com

[通信作者] 王 敦(1973—), 男, 青海西宁人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事昆虫和病毒分子生物学研究。

E-mail: wanghandecn@yahoo.com.cn

BL21(DE3) respectively. The BL21(DE3) product was fed to the third instar larvae of the *H. armigera* for bioassay of virulence enhancement. The bioassay results showed that the mortality was 36.6% higher than the control virus at a combination of 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of soluble ChiA to HearNPV. 【Conclusion】 The virulence of HearNPV could be enhanced by soluble ChiA expressed in *E. coli* significantly.

Key words: HearNPV; chitinase; prokaryotic expression; virulence enhancement

几丁质是昆虫中肠围食膜的主要结构成分^[1-3], 而几丁质酶(EC3. 2. 1. 14)具有专化性裂解几丁质的特性。几丁质酶(ChiA)的分类标准较多, 其中按反应初级产物类型及水解切口位置的不同可分为内切 ChiA 和外切 ChiA^[3-5]。昆虫也编码 ChiA, 其中蜕皮液中的 ChiA 可在蜕皮时降解几丁质的旧表皮, 但昆虫的 ChiA 基因(*ChiA*)只在特定组织或特定发育阶段表达, 而在不适当时接触 ChiA 则会影响昆虫的发育^[5-9]。

杆状病毒 ChiA 的分子质量约为 60 ku, 较一般植物 ChiA (25~40 ku) 和细菌 ChiA (20~60 ku) 大, 但这种差别的形成机制目前并不清楚^[8]。研究发现, 杆状病毒的 ChiA 能够提高 Bt 毒素的杀虫效果, 这可能与 ChiA 破坏中肠的围食膜结构有关^[10-15], 但其机理尚不明确。杆状病毒 ChiA 对病毒侵染是否有积极的促进作用、是否能够增强病毒的毒力, 目前还没有相关的研究报道。为了进一步明确杆状病毒 ChiA 在病毒侵染过程中的作用, 探讨其是否能够直接促进病毒的侵染而提高病毒的毒力, 本研究对棉铃虫核型多角体病毒(HearNPV)几丁质酶基因 *ChiA* 进行了可溶性表达, 并将表达产物的粗裂解物以不同水平添加到棉铃虫核型多角体病毒制剂中, 以期探讨 ChiA 在杆状病毒侵染宿主过程中的作用及其对病毒毒力的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, HearNPV 病毒, HearNPV 基因组 DNA, 大肠杆菌 TGI、TB1 和 BL21 (DE3), 表达载体 pMAL-p2x、pET-32a, 均为西北农林科技大学植保学院分子病毒学实验室保存。

1.1.2 试剂 克隆载体 pGEM-Teasy Vector、T4 DNA 连接酶及相应的 Buffer 缓冲液, 均购自 Promega 公司。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、蛋白质分子量标准, 均为 Takara 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, 购自西安先锋生物公司; DNA 回收试剂盒, 购自北

京天根生物公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 参照 HearNPV 基因组全序列(GenBank 登录号: AF271059)中 *ChiA* 基因的全长序列, 删除其中的信号肽序列并在基因上、下游分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 设计引物并由上海生工合成。所设计上、下游引物的序列(下划线部分为酶切位点)为:

ChiAexp-F: 5'-G GGATCC GCT CCA CCC GGC GTT CCC - 3'(*Bam*H I);

ChiAexp-R: 5'-G AAGCTT TTA AAT CAA TCT ACT GTT TGT ACC - 3'(*Hind* III)。

1.2.2 PCR 扩增 以 HearNPV 基因组 DNA 为模板, 用 1.2.1 合成的引物扩增 *ChiA* 基因。PCR 反应体系为 25 μL : 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 2 μL , dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 模板 DNA 0.3 μL , Taq DNA 聚合酶 0.3 μL , 双蒸水 16.9 μL 。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物的纯化按 DNA 回收试剂盒说明书进行。

1.2.3 原核表达载体的构建 将回收的 PCR 产物与 pGEM-Teasy 克隆载体连接构建重组质粒 pGEMT-*ChiA*, 连接产物转化大肠杆菌 TGI, 经测序验证正确后, 扩大培养并提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对重组质粒 pGEMT-*ChiA* 及表达载体 pMAL-p2x、pET-32a 分别进行双酶切, 回收并纯化目的片段 *ChiA*, 分别与线性化载体 pMAL-p2x、pET-32a 连接, 得到重组表达载体 pMAL-p2x-*ChiA* 和 pET-32a-*ChiA*, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定连接正确后分别转化大肠杆菌 TB1 和 BL21(DE3)。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达及粗蛋白液的制备 分别挑取含阳性克隆的表达菌单克隆, 用 37 $^{\circ}\text{C}$ 氨苄抗性 LB 液体培养基过夜培养, 以 1:100 的体积比转接至氨苄抗性 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.5, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 6 h; 6 000 r/min 离心 3 min, 收集诱

导后的菌体,用 10 倍体积的 PBS 重新悬浮洗 3 次;将每 100 mL 培养液收集的菌体,最后重新悬浮于 5 mL 的 PBS 缓冲液中。取上述菌体重悬液,超声波破碎(20 W 功率超声工作 5 s,间隔 5 s;重复 6 次)后 8 000 r/min 离心 3 min,分别收集上清液和沉淀。先测定上清液中的总蛋白浓度,然后将上清液与沉淀分别经 SDS-PAGE 分离,并用 GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad,美国)扫描测定表达的几丁质酶含量,折算表达的几丁质酶蛋白量和可溶性几丁质酶量(上清液)。最后按可溶性几丁质酶的蛋白百分比折算蛋白裂解上清液中的几丁质酶浓度。将上清液(含可溶性几丁质酶产物)直接用于生物测定或-80 ℃保存备用。

1.2.5 融合蛋白的增效作用 取新孵化的棉铃虫 3 龄幼虫,按不同处理分别饲喂 2 mm³ 饲料块,待取食完给药饲料后添加新鲜饲料,逐日观察并统计死亡率。每次处理 30 只幼虫,重复 3 次。4 个试验组饲料块均含 2 μL 的 HearNPV 病毒悬浮液(10⁵ PIB/mL),

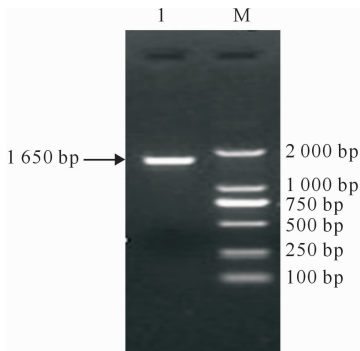


图 1 HearNPV *ChiA* 基因的 PCR 产物
1. *ChiA* 基因的 PCR 产物;M, DNA 标准 DL2000
Fig. 1 PCR amplification of HearNPV *ChiA*
1. PCR product of *ChiA*;M, DNA Marker DL2000

2.2 HearNPV *ChiA* 基因在大肠杆菌中的表达
2.2.1 pMAL-p2x-*ChiA* 在大肠杆菌 TB1 中的表达 SDS-PAGE 电泳结果(图 3)显示,与阴性对照 TB1 相比,转化 pMAL-p2x-*ChiA* 的 TB1 表达了分子质量约 100 ku 的特异性蛋白质。表达的几丁质酶的蛋白量占菌体总蛋白的 15.8%,所表达几丁质酶蛋白的 20.0%为可溶性表达。为了确定表达产物的正确性,用 MBP 单克隆抗体进行 Western blot 杂交,结果在约 100 ku 处有阳性条带,其位置与 SDS-PAGE 特异性条带相符。
2.2.2 pET-32a-*ChiA* 在大肠杆菌 BL21(DE3)中

其中几丁质酶添加水平分别为 0.5,1.0,1.5 和 2.0 μg/mL;同时设 2 个对照:对照 1(CK1)为 HearNPV (10⁵ PIB/mL)水悬浮液;对照 2(CK2)为 HearNPV (10⁵ PIB/mL)+pET-32a 空载体诱导表达物粗裂解液(其 Trx 蛋白含量为 2.0 μg/mL)。

1.3 数据处理
应用 DPS 软件对试验数据进行分析与处理^[16]。

2 结果与分析

2.1 HearNPV *ChiA* 基因的克隆及重组质粒 pMAL-p2x-*ChiA* 和 pET-32a-*ChiA* 的构建
以 HearNPV 基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到长约 1.65 kb 的条带(图 1),PCR 产物经与 pGEM-Teasy 连接、测序无误后,分别构建表达载体 pET-32a-*ChiA* 和 pMAL-p2x-*ChiA*。经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,得到了与预期大小一致的 DNA 片段(图 2),表明表达载体构建成功。

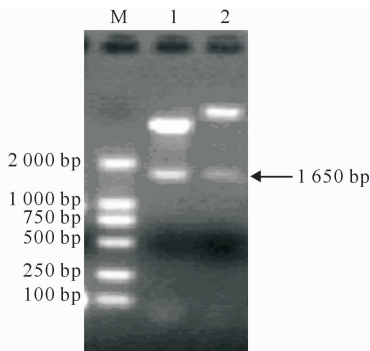


图 2 重组质粒 pET-32a-*ChiA* 和 pMAL-p2x-*ChiA* 的双酶切鉴定
M, DNA 标准;1, pET-32a-*ChiA*;2, pMAL-p2x-*ChiA*
Fig. 2 Digestion analysis of the recombinant plasmids pET-32a-*ChiA* and pMAL-p2x-*ChiA* with double enzymes
M, DNA Marker;1, pET-32a-*ChiA*;2, pMAL-p2x-*ChiA*

的表达 SDS-PAGE 电泳结果(图 4)显示,与阴性对照 BL21(DE3)相比,转化 pET-32a-*ChiA* 的 DE3 表达了分子质量约 80 ku 的特异性蛋白质,与预计表达的蛋白分子质量基本一致。用 6×His 单抗进行 Western blot 杂交分析,结果显示在 80 ku 处有阳性条带,其位置与 SDS-PAGE 特异性条带相符,表明蛋白表达正确。

分析表明,表达的几丁质酶蛋白量占菌体总蛋白的 26.8%,所表达几丁质酶蛋白的 30.2%为可溶性表达。考虑到可溶性蛋白的比例,在后续的生物测定中,选用 pET-32a-*ChiA* 在大肠杆菌

BL21(DE3)中的表达产物作为增效蛋白。

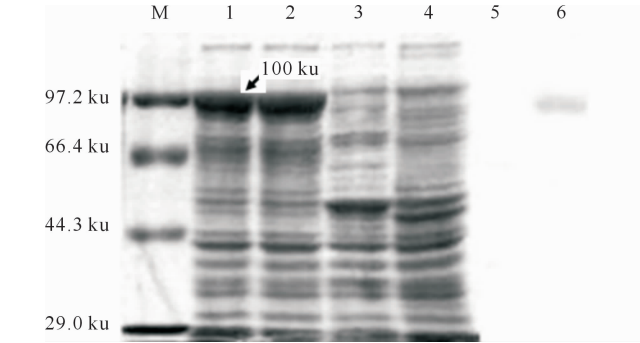


图 3 pMAL-p2x-ChiA 在大肠杆菌 TB1 中的表达
M. 蛋白分子量标准;1,2. 诱导表达的 pMAL-p2x-ChiA;
3. 诱导表达的 pMAL-p2x;4. 诱导表达的 TB1;
5. TB1 的 Western blot 分析;6. pMAL-p2x-ChiA 的 Western blot 分析

Fig. 3 Bacterial expression of pMAL-p2x-ChiA in *E. coli* TB1

M. Protein Marker;1,2. Induced pMAL-p2x-ChiA;
3. Induced pMAL-p2x;4. Induced TB1;5. Western blot for induced TB1;6. Western blot for pMAL-p2x-ChiA

2.3 HearNPV ChiA 蛋白对 HearNPV 的增效作用

由表 1 可知,HearNPV ChiA 蛋白对 HearNPV 有增效作用,在感染病毒的第 5 天,在重组几丁质酶的添加水平为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,即可产生显著的增效作用($P<0.05$),该处理下的试虫校正死亡率(以下简称死亡率)较对照 CK2 高 36.6%;而 CK1 与含有

表 1 HearNPV ChiA 生物增效剂对 HearNPV(10^5 PIB/mL)的增效作用

Table 1 Enhancement of HearNPV ChiA and Cry1AB as enhancer for HearNPV (10^5 PIB/mL)

处理 Treatment	试虫校正死亡率/% Corrected mortality for larvae			
	3 d	4 d	5 d	6 d
HearNPV+2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ChiA	4.0 a	17.1 a	49.4 b	90.8 b
HearNPV+1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ChiA	3.9 a	15.5 a	47.9 b	90.5 b
HearNPV+1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ChiA	4.1 a	15.9 a	45.9 b	90.1 b
HearNPV+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ChiA	3.8 a	15.6 a	35.0 a	80.3 a
CK1(HearNPV)	3.8 a	14.1 a	32.9 a	80.0 a
CK2(HearNPV+Trx 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.9 a	14.4 a	33.6 a	79.1 a
合并标准误 Pooled SE	0.3	0.6	1.1	1.9

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note:The different letters mean significant differences($P<0.05$).

3 结论与讨论

本研究采用不同的表达载体,均获得了 ChiA 高水平的可溶性表达,其中表达载体为 pET-32a-ChiA 时,可溶性蛋白含量可达目的蛋白的 30.2%。生物测定结果表明,原核表达获得的 ChiA 蛋白能够明显增强 HearNPV 的毒力,在重组几丁质酶的添加水平为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,试虫的死亡率较对照高 47.0%。说明杆状病毒的 ChiA 能够显著增强 He-

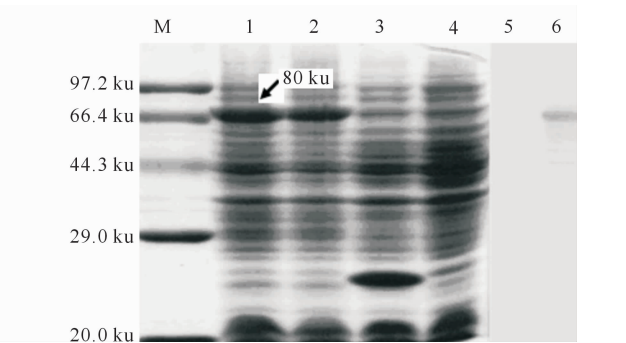


图 4 pET-32a-ChiA 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达
M. 蛋白分子量标准;1,2. 诱导表达的 pET-32a-ChiA;
3. 诱导表达的 pET-32a;4. 诱导表达的 BL21(DE3);5. BL21(DE3)的 Western blot 分析;6. pET-32a-ChiA 的 Western blot 分析

Fig. 4 Bacterial expression of pET-32a-ChiA in *E. coli* BL21(DE3)

M. Protein Marker;1,2. Induced pET-32a-ChiA;
3. Induced pET-32a;4. Induced BL21(DE3);5. Western blot for induced BL21(DE3);6. Western blot for pET-32a-ChiA

Trx 标签蛋白的 CK2 处理的试虫死亡率差异不显著,说明标签蛋白没有任何增效作用。在几丁质酶的添加水平为 2.0 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,感染病毒试虫第 5 天的死亡率分别较 CK2 高 47.0%和 42.6%。持续到病毒感染的第 6 天,添加几丁质酶处理的死亡率仍然较对照 CK2 高 14.4%以上。

arNPV 的毒力,其可能在病毒侵染宿主昆虫的过程中发挥着重要作用。

昆虫体壁、围食膜对环境及外界生物的危害起物理和化学屏障作用,而且其主要成分为几丁质,所以几丁质代谢是选择性害虫治理策略的极好靶标^[7,17]。虽然已有研究指出,ChiA 为杆状病毒复制的非必需基因^[5-9],但其在杆状病毒感染宿主昆虫,导致虫体液化和水平传播的过程中发挥着重要作用^[17-19]。目前,尚不明确 ChiA 在病毒侵染宿主过

程中的作用机理,但推测其作用很可能与宿主有关,在侵染过程中 ChiA 能够降解宿主昆虫的以几丁质为主要成分的中肠围食膜,如果这种推测合理,则人为添加 ChiA 就有可能会增加病毒侵染的效率,从而提高病毒毒力。本研究结果证明,表达的重组 ChiA 能够明显增强病毒的侵染,提高病毒毒力,这种增效作用很可能与病毒侵染宿主昆虫过程中 ChiA 降解昆虫中肠围食膜的几丁质成分有关,与前人的推测一致^[17-19]。因此,杆状病毒的 *ChiA* 基因不仅是一个与宿主昆虫虫体液化和病毒水平传播有关的基因,而且还是一个与病毒侵染宿主相关,能够增加病毒侵染效率、并增强病毒毒力的重要功能基因。

【参考文献】

- [1] Brand C R. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1978, 32: 12-14.
- [2] 刘艳荷,方继朝,郭慧芳. 昆虫杆状病毒几丁质酶及其应用研究进展 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(4): 430-436.
- Liu Y H, Fang J C, Guo H F. Baculovirus chitinase: Advances in research and application [J]. Acta Entomologica Sinica, 2008, 51(4): 430-436. (in Chinese)
- [3] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. Virology, 1994, 202: 586-605.
- [4] 彭辉银,李 星,张双民,等. 中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆 [J]. 中国病毒学, 1998, 13(2): 139-143.
- Peng H Y, Li X, Zhang S M, et al. Localization and cloning of the chitinase gene of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus [J]. Virologica Sinica, 1998, 13(2): 139-143. (in Chinese)
- [5] Hawtin R E, Arnold K, Ayres M D, et al. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome [J]. Virology, 1995, 212: 673-685.
- [6] 洪靖君,段家龙,彭辉银. 昆虫杆状病毒若干基因的研究进展 [J]. 中国病毒学, 2002, 17(3): 270-275.
- Hong J J, Duan J L, Peng H Y. Baculovirus progress of a number of genes [J]. Virologica Sinica, 2002, 17(3): 270-275. (in Chinese)
- [7] Kramer K J, Corpuz L, Choi H. Sequence of a cDNA and expression of the genes encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 23: 691-701.
- [8] 张传溪,林欣大,吴 峻. 棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因及杆状病毒几丁质酶基因的分子进化 [J]. 昆虫学报, 2000, 43(3): 233-241.
- Zhang C X, Lin X D, Wu J. Chitinase gene of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and the phylogenetic tree of the baculovirus chitinase genes [J]. Acta Entomologica Sinica, 2000, 43(3): 233-241. (in Chinese)
- [9] Hawtin R E, Zarkowska T, Arnold K, et al. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infected insects is dependent on the integrity of virus encoded chitinase and cathepsin genes [J]. Virology, 1997, 238: 243-253.
- [10] Wang F, Zhang C X, Kumar V S, et al. Influences of chitinase gene deletion from BmNPV on the cell lysis and host liquefaction [J]. Archives of Virology, 2005, 150(5): 981-990.
- [11] Rao R, Fiandra L, Giordana B, et al. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(11): 1205-1213.
- [12] Daimon T, Katsuma S, Kang W, et al. Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2006, 345(2): 825-833.
- [13] Katsuma S, Shimada T, Kobayashi M. Characterization of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus gene homologous to the mammalian FGF gene family [J]. Virus Genes, 2004, 29(2): 211-217.
- [14] Ding X, Gopala K B, Johnson L B, et al. Insect resistance of transgenic tobacco expression an insect chitinase gene [J]. Transgenic Research, 1998, 7: 77-84.
- [15] 王 芳,顾奇伟,武家才,等. HaSNPV 几丁质酶基因在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达及其产物对 Bt 杀虫剂的增效作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 792-797.
- Wang F, Gu Q W, Wu J C, et al. Expression of HaSNPV chitinase gene in *E. coli* and insect cells and synergism of expressed products with Bt in killing insects [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 20(6): 792-797. (in Chinese)
- [16] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1-407.
- Tang Q Y, Feng M G. DPS data processing system for practical statistics [M]. Beijing: Science Press, 2002: 1-407. (in Chinese)
- [17] 彭 宇,王荫长. 昆虫几丁质酶作为生防措施促进因子的应用前景 [J]. 世界农药, 2002, 24(1): 27-30.
- Peng Y, Wang Y C. Prospects of insect chitinase as an improvement factor in biocontrol control [J]. World of Pesticides, 2002, 24(1): 27-30. (in Chinese)
- [18] 金利容,刘凯于,胡秋婷. 与宿主昆虫液化相关的杆状病毒基因及其蛋白 [J]. 微生物学杂志, 2005, 25(6): 76-80.
- Jin L R, Liu K Y, Hu Q T. Baculovirus genes and their proteins related to the liquefaction of the host insect [J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(6): 76-80. (in Chinese)
- [19] Williams G V, Rohel D Z, Kuzio J. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion and deletion mutants [J]. Journal of General Virology, 1989, 70: 187-202.