

网络出版时间:2016-10-09 10:08

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.11.024

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161009.1008.048.html>

神经毒素基因 *RjAa17f* 在 *Sf9* 细胞中的 表达及活性分析

孟 姣, 于 欢, 周 斌, 王 敦

(西北农林科技大学 植保资源利用与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】在昆虫草地贪夜蛾细胞(*Sf9*)中表达一种能专一阻断昆虫钠、钾离子通道的神经毒素基因 *RjAa17f*。【方法】运用杆状病毒真核表达系统表达 *RjAa17f* 毒蛋白,并用蛋白质印迹对其进行检测;测定 *RjAa17f* 毒蛋白引起健康棉铃虫中肠膜电位的变化,并对其毒力进行测定。【结果】通过重组杆状病毒质粒的转染和 Western blot 检测验证,神经毒素基因 *RjAa17f* 的重组 Bacmid 已经成功转染到 *Sf9* 细胞中,且在 *Sf9* 中表达出与预测大小一致的 *RjAa17f* 目的蛋白;此毒蛋白作用于棉铃虫中肠 3~12 h 后,中肠膜电位与 CK 相比差异显著,且随着作用时间的延长,棉铃虫中肠膜电位呈逐步升高的趋势,作用 9 h 以后,升高的幅度逐渐降低,趋于平缓。*RjAa17f* 毒蛋白对棉铃虫的 LD₅₀ 为 108.12 μg/g。【结论】在 *Sf9* 细胞内表达出了有活性的 *RjAa17f* 毒蛋白,且该毒蛋白对棉铃虫中肠膜电位有显著改变。

【关键词】 棉铃虫;神经毒素基因 *RjAa17f*; *Sf9*; *RjAa17f* 毒蛋白;杆状病毒真核表达系统

【中图分类号】 Q78

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)11-0166-06

Expression and activity of neurotoxin gene *RjAa17f* in *Sf9* cells

MENG Jiao, YU Huan, ZHOU Bin, WANG Dun

(Ministry Education Key Laboratory of Plant Protection Resources & Pest Management,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to express *Rhopalurus junceus* neurotoxin gene in *Spodoptera frugiperda* cells (*Sf9*) to block insect sodium and potassium ion channels. 【Method】 The toxic protein *RjAa17f* was expressed by baculovirus eukaryotic expression vector system, and western blots was used to identify the toxic protein. The change of midgut membrane potential caused by *RjAa17f* toxic protein crude extract was determined and the toxicity was tested. 【Result】 By Western blot verification, *RjAa17f* target protein expressed in *Sf9* had the same size as predicted. After acting on *Helicoverpa armigera* midgut, the midgut membrane potential increased significantly during 3–12 h compared to CK and the trend decreased after 9 h. LD₅₀ of *RjAa17f* toxin protein crude extract was 108.12 μg/g. 【Conclusion】 *RjAa17f* active protein was expressed in *Sf9*, and it significantly changed midgut potential of *Helicoverpa armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; neurotoxin gene *RjAa17f*; *Sf9*; toxic protein *RjAa17f*; baculovirus eukaryotic expression system

棉铃虫核型多角体病毒早在 1973 年已经在美 国环保局的批准下成为第一个注册登记的杆状病毒

【收稿日期】 2015-05-15

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31170609, 31270691)

【作者简介】 孟 姣(1989—),女,山西太原人,硕士,主要从事微生物资源与利用研究。E-mail: mengjiaomjmj@126.com

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

E-mail: dunwang@foxmail.com; wanghande@nwsuaf.edu.cn

商品杀虫剂。虽然杆状病毒具有高度的专一性、对人畜及动物无害、对环境无污染等优点,但其也有一定的缺点,如杀虫速率相对缓慢、对高龄害虫杀虫力弱等^[1]。因此,利用各种生物毒素对杆状病毒进行基因工程改造已成为主要发展方向。

生物毒素也被称为天然毒素,是由植物、动物、微生物等产生的对其他物种有毒害作用的一类化学

物质^[2-3]。在生物毒素中,有一种蝎毒(Scorpion venom),它主要存在于蝎子尾刺的毒囊中,其主要成分是神经毒素,而神经毒素是引起麻痹甚至死亡的最主要成分^[4-5],并且神经毒素可以选择性地作用于不同的离子通道,被称之为蝎神经毒素。表 1 为几种蝎毒素基因表达产物的杀虫效果。

表 1 不同蝎毒素基因表达产物的杀虫效果

Table 1 Insecticidal efficacy of different scorpion venom gene expression products

蝎毒素基因 Scorpion venom gene	表达系统 Expression system	作用对象 Effect of the object	杀虫效果 Insecticidal effect	参考文献 References
AalT	AcMNPV	2 龄烟芽夜蛾幼虫 2nd instar larvae of <i>Heliothis virescens</i>	LT ₅₀ 缩短了 30% LT ₅₀ shortened by 30%	[6]
	HearNPV	2 龄棉铃虫幼虫 2nd instar larvae of <i>Helicoverpa armigera</i>	LT ₅₀ 缩短了 32% LT ₅₀ shortened by 32%	[7]
I ₅ A	Yeast/ <i>E. coli</i>	家蝇幼虫 Housefly larvae	无活性/无活性 No active/no active	[8]
BmKIT	AcMNPV	3 龄甜菜夜蛾幼虫 3rd instar larvae of <i>Spodoptera exigua</i>	LT ₅₀ 缩短了 13.2% LT ₅₀ shortened by 13.2%	[9]
	SpltNPV	3 龄斜纹夜蛾幼虫 3rd instar larvae of <i>Spodoptera litura</i>	LT ₅₀ 缩短了 28% LT ₅₀ shortened by 28%	[10]
BeIT	<i>Sf9</i> 细胞 Cells	草地贪夜蛾幼虫 <i>Spodoptera frugiperda</i>	无活性 No active	[11]

用于外源基因真核表达的杆状病毒表达系统(Baculovirus expression vector system, BEVS),可以将目的基因整合到杆状病毒基因组后导入昆虫细胞中进行表达,这类表达所得的蛋白具有完善的翻译后修饰及同天然蛋白相同的生理活性^[12],这是细菌表达系统所不具备的^[13]。

本研究所用神经毒素基因(*RjAa17f*)(GenBank 登录号:HM233954)来自古巴黑脚朱蝎(*Rhopalurus junceus*)的毒液,其编码的蛋白质 *RjAa17f* 对节肢动物有特异毒性,该毒素蛋白对小鼠没有毒害现象,而对蟋蟀有明显的致死效应^[14],但其机理并不清楚。本研究利用真核表达系统表达出 *RjAa17f* 毒蛋白,将该毒蛋白作用于棉铃虫中肠,测定棉铃虫中肠膜电位的变化,并对其毒力进行测定,以期为阐明该神经毒素杀虫作用机理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材 料

棉铃虫卵及人工饲料均购于河南济源白云实业有限公司。供体质粒 pFastBac-HTb、大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1,均为西北农林科技大学昆虫研究所保存。昆虫草地夜蛾细胞(*Sf9*)、*E. coli*

DH10Bac(含有苜蓿银纹夜蛾 AcMNPV 人工细菌染色体 Bacmid (bMON14272) 和辅助质粒 pMON7124),均由浙江大学张传溪教授馈赠。含有 HearNPV 基因组(HaBacHZ8)的菌株 *E. coli* BW25113,由中国科学院武汉病毒研究所胡志红研究员馈赠。*RjAa17f* 全基因(GenBank 登录号:HM233954)委托上海冠旭公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 重组转座载体、重组穿梭载体的构建 根据引物设计原则,参照 *RjAa17f* 基因的 cDNA 全序列及供体质粒 pFastBac-HTb,选择的酶切位点分别是 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ(酶切位点下划线斜体标出)。

RjAa17f-F:5'-CGGATCCATGAAGATTTT-GATATTCATC-3'(28 bp);

RjAa17f-R:5'-CAAGCTTTTATCCTCTAC-ATTTAATGTTGC-3'(30 bp)。

通过 *Bam*H I 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点,将连在 T 载体的 *RjAa17f* 基因通过酶切、连接、割胶回收、转化等方法克隆进入供体质粒载体 pFastBac-HTb,采用酶切进行鉴定,构建成重组转座载体 *RjAa17f*-HTb。将构建好的 *RjAa17f*-HTb 转化到 DH10Bac 菌株,在包含 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素、100 μg/mL X-

gal、40 $\mu\text{g/mL}$ IPTG 的 LB 琼脂糖平板上进行 DH10Bac 转化株的蓝白斑筛选。挑选 10 个白色的克隆,重新在含有上述抗生素和显色试剂的 LB 琼脂糖平板上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。再次选出白色单克隆,转接至含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、7 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素、10 $\mu\text{g/mL}$ 四环素的液体培养基中,200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,根据 Bac-to-BacTM (Invitrogen, USA) 提取重组质粒,并用 M13 引物 (M13-F: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' 和 M13-R: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 进行 PCR 鉴定,确定获得的重组子为单一的 *RjAa17f*-Bacmid 病毒基因组。

1.2.2 *Sf9* 细胞的培养及重组杆状病毒质粒的转染 *Sf9* 细胞的培养是用 SFX 昆虫培养基 (SIG-MA) 补加 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、1% 的胎牛血清,置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养,约 72 h 细胞即处于对数生长期。

挑选单层贴壁生长状态良好的 *Sf9* 细胞,铺在准备好的 24 孔板,置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数生长期。将制备好的 *RjAa17f*-Bacmid DNA 和转染试剂 (Roche, Switzerland) 及无抗生素的培养基以 1 : 1 : 50, 2 : 1 : 50 混合,静置 45 min。将预先混匀的 DNA 和转染试剂加入已准备好的含有单层贴壁生长状态良好 *Sf9* 的 24 孔板中,摇晃 5~10 s,混匀。27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~7 d,观察转染效果,确定感染正常后收集病毒上清液用于后续感染扩繁含有 *RjAa17f* 的重组病毒。以等量未重组 Bacmid 转染 *Sf9* 细胞获得对照 Bacmid 病毒。

1.2.3 病毒的大量制备 收集转染后的病毒上清液,逐级扩大培养扩增病毒,即取 1 mL 加入单层贴壁生长状态良好的 *Sf9* 细胞中,再加入 1 mL 含血清的 SFX 培养基,温和混匀后于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。6 孔板如此反复,扩增病毒和提高病毒滴度,用于后续感染分析和重组蛋白生产。

1.2.4 蛋白质印迹 (Western blot) 鉴定目的蛋白的表达 用含有 *RjAa17f* 的重组病毒感染 *Sf9* 细胞 120 h 后,将细胞用 PBS (NaCl 137 mmol/L、KCl 2.7 mmol/L、Na₂HPO₄ 8 mmol/L、KH₂PO₄ 1.5 mmol/L, pH 7.4) 清洗 3 次,2 000 r/min 离心 10 min 后收集细胞,然后用沸水煮蛋白样品 10~15 min,通过 SDS-PAGE 进行分离。电泳后凝胶上的目的条带用电转移法印迹到硝酸纤维素滤膜上,转移电压为 9 V 30 min。转移完毕后取出 NC 膜置于封闭液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、150

mmol/L NaCl、0.05% Tween-20) 中,摇床培养 2~3 h。然后加入抗 his 标签鼠抗作为一抗 (Abcam, England) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,过夜,比例为 1 : 2 000,然后 TBST 洗 3 次,每次 5 min;二抗:羊抗鼠 (Abcam, England),比例为 1 : 5 000,摇床培养 1 h,然后 TBST 洗 3 次,每次 5 min。通过化学发光试剂盒 (Thermo Scientific Pierce ECL, USA) 显色,荧光及化学发光成像系统 2950 MI (Clinx Science Instruments, China) 照相。

1.2.5 *RjAa17f* 毒蛋白的制备与中肠电生理测定

(1) *RjAa17f* 毒蛋白的制备 *RjAa17f* 毒蛋白通过杆状病毒表达系统进行表达。用含有基因组 *RjAa17f* 的重组病毒大量感染健康的对数期 *Sf9* 细胞,感染 120 h 后收集感染后的细胞,加 PBS 溶液,500 $g \times 10$ min、4 $^{\circ}\text{C}$ 反复离心,弃上清,加 PBS 溶液混匀、涡旋后进行超声波破碎,强度 30%,破碎 5 s、间隙 5 s,破碎 5 min。离心除去沉淀,上清液即为 *RjAa17f* 毒蛋白粗液。以等量对照 Bacmid 病毒感染的 *Sf9* 细胞为对照,蛋白粗液制备方法相同。制备 *RjAa17f* 毒蛋白粗液和 Bacmid 病毒感染 *Sf9* 细胞蛋白粗液用于后续生物活性测定。

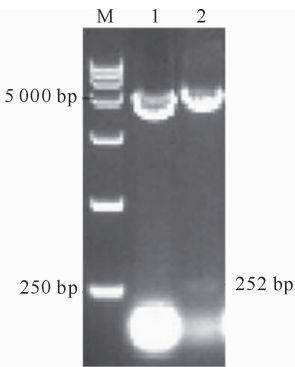
(2) 中肠电生理测定。选取末龄健康棉铃虫,体质量为 60~80 mg/头,30 头为 1 个重复,重复 3 次。每头棉铃虫饥饿过夜后注射 10 μL *RjAa17f* 毒蛋白粗液,以注射 10 μL Bacmid 病毒感染的 *Sf9* 细胞蛋白粗液为空白对照;分别在注射后 3, 6, 9, 12 h 解剖试虫,取出中肠用毛细管吸附,使中肠尾端包裹于毛细管口处,用正负极探针刺入中肠膜,通过 Axoclamp 900A (Axon Instrument, Foster City, CA) 电位仪器测定膜电位。测定数据由连接该仪器的计算机收集,并通过 Origin 9.0 软件进行制图。

1.2.6 *RjAa17f* 毒蛋白的毒力测定 挑选健康的 3 龄棉铃虫进行 *RjAa17f* 毒蛋白毒力测定。将 *RjAa17f* 毒蛋白用 PBS 溶液进行稀释,稀释后质量浓度分别为 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6 和 12 mg/mL。在低温 (4 $^{\circ}\text{C}$) 处理 3 龄棉铃虫 30 min 后,用微量注射器将稀释后的毒蛋白注射到虫体的前胸背板,每头棉铃虫注射 2 μL ,每处理注射 20 头,重复 3 次。以注射生理盐水为对照。处理后将试虫置于 24 $^{\circ}\text{C}$ 的培养室饲养,相对湿度 75%~85%,每隔 2 h 观察并记录棉铃虫死亡数。以注射后 72 h 死亡虫数计算毒力回归方程、致死中量 (LD₅₀)、LD₅₀ 值的 95% 置信限等。

2 结果与分析

2.1 *RjAa17f*-HTb 的酶切鉴定

查询 GenBank 中神经毒素基因 *RjAa17f* 的已知序列,并根据本试验的需要在基因 *RjAa17f* 两端引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点,基因 *RjAa17f* 与供体质粒 pFastBac-HTb 相连后,酶切结果如图 1 所示,在 252 bp 得到 1 条清晰的条带,与预期的结果一致,经过测序与原序列一致。表明神经毒素基



M. DNA标准DL15000 DNA Marker DL15000;
1,2. *RjAa17f*-HTb的酶切产物(*Bam*H I和*Hind* III)
Digested of *RjAa17f*-HTb with *Bam*H I and *Hind* III

图 1 *RjAa17f*-HTb 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of *RjAa17f*-HTb by double enzymes digestion

2.3 重组杆状病毒质粒的转染

将构建好的 *RjAa17f* 重组 Bacmid 转染至贴壁培养的 *Sf9* 细胞,24 h 后开始观察细胞形态的变化。如图 3 所示,转染 24 h 后,细胞直径增加、细胞核增大;转染 24~72 h 后细胞开始出现脱壁现象;

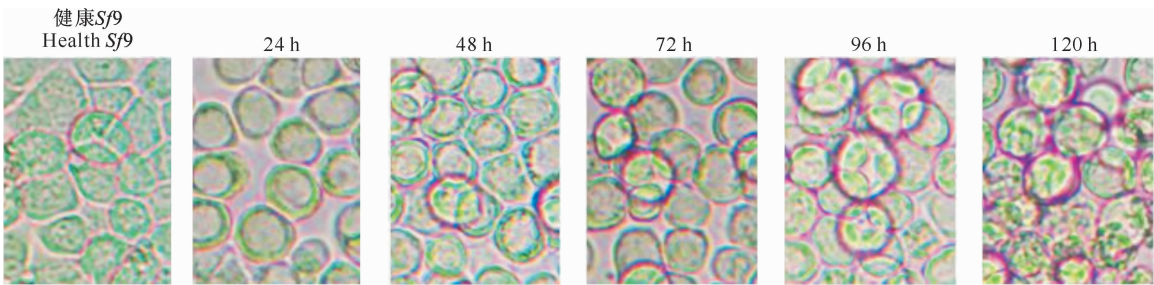


图 3 光学显微镜下 *RjAa17f*-Bacmid 感染后的 *Sf9* 细胞(60×)

Fig. 3 Light microscopy observation of *Sf9* cells infected with *RjAa17f*-Bacmid(60×)

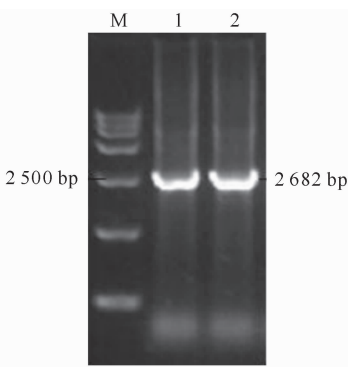
2.4 蛋白质印迹(Western blot)检测毒素蛋白 *RjAa17f* 的表达

收集 *RjAa17f*-Bacmid 转染后 120 h 的 *Sf9* 细胞进行蛋白检测。神经毒素基因 *RjAa17f* 表达的毒蛋白再加上 6×His 标签的蛋白大小为 16.2 ku 左右。由图 4 可知,*RjAa17f* 毒蛋白感染细胞可明

因 *RjAa17f* 已成功与 pFastBac-HTb 载体相连。

2.2 转化到 DH10Bac 菌株的 PCR 鉴定

查询 Bac-to-Bac 表达系统可知,含有神经毒素基因 *RjAa17f* 的重组质粒片段大小为 2 430 bp,加上插入的目的基因片段,即为 2 682 bp,经过几轮划线纯化后,通过 M13-F/M13-R 的鉴定,筛选出纯转座子。由图 2 可知,*RjAa17f*-Bacmid 的 PCR 与预期的结果一致,说明得到含有神经毒素基因 *RjAa17f* 的重组 Bacmid。



M. DNA标准DL15000 DNA Marker DL15000;
1,2. *RjAa17f*-Bacmid的PCR鉴定
RjAa17f-Bacmid by PCR identification

图 2 *RjAa17f* 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 2 *RjAa17f*-Bacmid transposition by PCR identification

转染 72 h 后,被感染的细胞数量明显增多,大部分细胞开始呈现脱壁现象并上浮。这说明神经毒素基因 *RjAa17f* 的重组 Bacmid 已经成功转染到 *Sf9* 细胞中。

显看到与预测条带大小一致的阳性条带,说明神经毒素基因 *RjAa17f* 已经在 *Sf9* 细胞中成功表达。

2.5 *RjAa17f* 毒蛋白对棉铃虫中肠膜电位的作用

以注射后时间为 *x* 轴、棉铃虫中肠膜电位为 *y* 轴,通过 Origin9.0 软件进行作图,结果见图 5。由图 5 可知,CK 试虫的电位在-50~-60 mV,注射

RjAa17f 毒蛋白后,棉铃虫中肠膜电位呈现逐步升高的趋势,随着时间的变化,升高的幅度逐渐降低,最后趋于平缓。

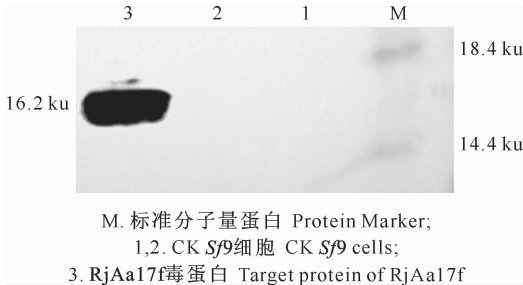


图 4 蛋白质印迹检测毒素蛋白 RjAa17f 的表达
Fig. 4 RjAa17f toxin protein expression by western blot in Sf9 cells

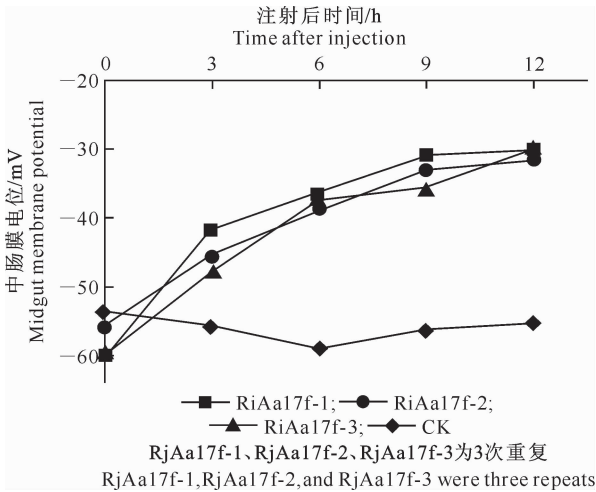


图 5 RjAa17f 毒蛋白对棉铃虫中肠膜电位的作用
Fig. 5 The effect of RjAa17f toxic protein crude extracts on midgut membrane potential

2. 6 RjAa17f 毒蛋白的毒力测定

RjAa17f 毒蛋白对棉铃虫的毒力回归方程为 $Y=1.93+1.52X$, 相关系数 $r=0.98$, LD_{50} 为 108. 12 $\mu\text{g/g}$, 95% 水平的置信区间为 75. 68 ~ 161. 34 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论与结论

编码整合有神经毒素基因的杆状病毒可以提高杆状病毒对鳞翅目害虫的杀虫速度,例如鳞类毒素 TxP-1^[15]、蜘蛛毒素 Av-Tox2^[16]、东亚钳蝎毒素 BmKIT^[9]等,这些重组病毒加快了昆虫的死亡,减少了昆虫取食量,引起昆虫肌肉麻痹,但对其作用机理的研究甚少。为进一步明确神经毒素对鳞翅目幼虫的致毒机理,本研究通过真核表达系统在 Sf9 细胞中成功表达了 RjAa17f 毒蛋白,通过组织电极测

定发现 RjAa17f 毒蛋白作用于棉铃虫后,棉铃虫中肠膜电位显著升高,而注射对照蛋白液的棉铃虫中肠膜电位则没有发生变化。这说明 RjAa17f 毒蛋白能直接作用于鳞翅目幼虫的中肠,导致其膜电位的升高,使得中肠跨膜电位差缩小,从而影响离子的运输,对中肠产生一定的麻痹作用。由于中肠是昆虫消化吸收营养的主要部位,这解释了神经毒素基因重组的杆状病毒能够有效减少试虫取食量并提高杀虫速度的原因。当然,神经毒素的作用靶标远不止中肠,要完全了解神经毒素对昆虫的全部作用途径与机理还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 孟紫强. 环境毒理学 [M]. 北京:中国环境科学出版社,2000: 312-313,321-323.
Meng Z Q. Environmental toxicology [M]. Beijing:China Environmental Science Press,2000:312-313,321-323.

[3] 陈冀胜. 生物毒素研究与应用展望 [J]. 中国工程科学,2003,5 (2):16-19.
Chen J S. A prospect on research and application of natural toxins [J]. Engineering Science,2003,5(2):16-19.

[4] 沈立荣,张传溪,程家安. 抗昆虫蝎毒素及其转基因技术的研究与应用进展 [J]. 昆虫知识,2001,38(5):321-325.
Shen L R, Zhang C X, Cheng J A. Research and application on anti-insect scorpion toxin and its transgenic technology [J]. Entomological Knowledge,2001,38(5):321-325.

[5] 王春光,戚正武. 蝎长链神经毒素研究进展 [J]. 生命科学研究,2001,5(2):95-101.
Wang C G, Qi Z W. Advances in the study of long-chain scorpion neurotoxins [J]. Life Science Research,2001,5(2):95-101.

[6] McCutchen B F, Choudary P V, Crenshaw R, et al. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control [J]. Nature Biotechnology,1991,9(9):848-852.

[7] Chen X W, Sun X L, Hu Z H, et al. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single: nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide [J]. Journal of Invertebrate Pathology,2000,76(2):140-146.

[8] Pang S Z, Oberhaus S M, Rasmussen J L, et al. Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plants [J]. Gene,1992,116(2):165-172.

[9] Fan X J, Zheng B, Fu Y J, et al. Baculovirus-mediated expression of a Chinese scorpion neurotoxin improves insecticidal effi-

cacy [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(12): 1855-1860.

[10] Tang X X, Sun X L, Pu G Q, et al. Expression of a neurotoxin gene improves the insecticidal activity of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) [J]. Virus Research, 2011, 159(1): 51-56.

[11] Carbonell L F, Hodge M R, Tomalski M D, et al. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors [J]. Gene, 1988, 73(2): 409-418.

[12] 杨 林, 李国清, 黄葆英, 等. GST 融合蛋白在杆状病毒系统中表达的可溶性研究 [J]. 中国病毒学, 2000, 15(2): 143-148. Yang L, Li G Q, Huang B Y, et al. Solubilization analysis of GST fusion protein expressed in baculovirus system [J]. Virologica Sinica, 2000, 15(2): 143-148.

[13] 孙国勋, 丁 翠, 蔡秀玉. 杆状病毒的结构蛋白及其功能 [J]. 昆虫学报, 2001, 44(3): 366-372.

Sun G X, Ding C, Cai X Y. Structural proteins of baculovirus and their functions [J]. Acta Entomologica Sinica, 2001, 44(3): 366-372.

[14] Garcia-Gomez B I, Coronas F I, Restano-Cassulini R, et al. Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* [J]. Toxicon, 2011, 58(1): 18-27.

[15] Burden J P, Hails R S, Windass J W, et al. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the Ithc mite toxin TxP-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni* [J]. Invertebrate Pathology, 2000, 75(3): 226-236.

[16] Jung M P, Choi J Y, Tao X Y, et al. Insecticidal activity of recombinant baculovirus expressing both spider toxin isolated from *Araneus ventricosus* and *Bacillus thuringiensis* crystal protein fused to a viral polyhedron [J]. Entomological Research, 2012, 42(6): 339-346.

(上接第 165 页)

[12] Julio C E A, Jairo A G D. Practical aspects in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in exotic fruits [J]. Food Chemistry, 2015, 182: 14-22.

[13] 岑江杰, 上官小来, 徐永哲, 等. 杀菌剂烯酰吗啉的毒性研究 [J]. 浙江化工, 2004, 35(5): 8-9, 16. Cen J J, Shanguan X L, Xu Y Z, et al. Toxicity research of fungicides dimethomorph [J]. Journal of Zhejiang Chemical Industry, 2004, 35(5): 8-9, 16.

[14] Jorge R, Nair O, Jesussimal G, et al. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons [J]. Environmental Research, 2015, 140: 37-44.

[15] Paola A, Giulia M, Marco M, et al. Photo transformation pathways of the fungicide dimethomorph ((E,Z) 4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3, 4-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl] morpholine), relevant to sunlit surface waters [J]. Science of the Total Environment, 2014, 501: 351-360.

[16] Qu C K, Qi S H, Yang D, et al. Risk assessment and influence factors of organochlorine pesticides (OCPs) in agricultural soils of the hill region: a case study from Ningde, southeast China [J]. Journal of Geochemical Exploration, 2015, 149: 43-51.

[17] Liu C, Lu D H, Wang Y C, et al. Residue and risk assessment of pyridaben in cabbage [J]. Food Chemistry, 2014, 149: 233-236.

[18] 宿飞飞, 陈伊里, 石 瑛, 等. 不同纬度环境对马铃薯淀粉含量及淀粉品质的影响 [J]. 作物杂志, 2009, 1(4): 27-31. Su F F, Chen Y L, Shi Y, et al. Environmental effects of different latitudes on the potato starch content and starch quality [J]. Crops, 2009, 1(4): 27-31.

[19] 中国营养学会. 中国居民膳食指南 [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2008. Chinese Nutrition Society. Chinese dietary guidelines [M]. Lasa: Tibet People's Publishing House, 2008.

[20] 中华人民共和国农业部. GB 2763—2014 食品中农药残留最大限量 [S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2014: 166-167. Ministry of Agriculture in People's Republic of China. GB 2763—2014 Maximum levels of pesticide residues in food [S]. Beijing: Ministry of Agriculture in People's Republic of China, 2014: 166-167.