



抑制剂和激活剂对梨星毛虫中肠蛋白酶活性的影响

董艳璐¹,张战利²,吴江波³,陈 玮¹,袁向群¹,李怡萍¹

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院,农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室,陕西杨凌 712100;

2. 陕西省植物保护工作站,西安 710003;3. 宜川县农业技术推广服务中心,陕西宜川 716200)

摘 要 旨在研究不同抑制剂和激活剂对梨星毛虫 *Illiberis pruni* 中肠蛋白酶活性的影响。利用生化技术分别测定梨星毛虫幼虫不同龄期的4种中肠蛋白酶(总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)活性,进而在最适龄期(4龄幼虫)测定蛋白酶激活剂(EDTA, MgCl₂, EGTA, CaCl₂)和抑制剂(PMSF, TPCK, STI, TLCK, IAA, DTT)对梨星毛虫中肠蛋白酶活性的影响。结果表明:梨星毛虫幼虫中肠总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶均在4龄具有最高酶活性。所有试剂均对总蛋白酶有激活作用;5 mmol/L CaCl₂对强碱性胰蛋白酶抑制作用最高;对弱碱性胰蛋白酶有抑制作用的仅有5 mmol/L DTT;对胰凝乳蛋白酶抑制效果最佳的为10 mmol/L EGTA。所筛选的对梨星毛虫主要中肠蛋白酶具有抑制作用的抑制剂,对以昆虫中肠蛋白酶为靶标的绿色害虫防控技术的开发具有参考价值。

关键词 梨星毛虫;中肠;蛋白酶;活性;抑制剂

中图分类号 Q966

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)09-1235-07

梨星毛虫 *Illiberis pruni* 属鳞翅目,斑蛾科,又名梨叶斑蛾、饺子虫、囊粘虫等。梨星毛虫在中国广泛分布,各果品产区发生普遍,常见的危害严重地区有陕西、山东、河北等地。除危害梨树外,苹果、桃、李、杏等果树也是其主要寄主^[1]。该虫是典型的食叶害虫,以幼虫成群取食果树叶片,也可钻蛀果树的嫩芽、花蕾、果实危害。为害叶片时,其吐丝将虫体包裹进叶片内,形似饺子,被取食叶片变黄、焦枯,发生严重时会导致园中果树叶片大面积脱落,从而使果树光合作用减弱,降低果树的树势,影响果树产量^[2-3]。

在昆虫中,营养物质的消化吸收主要在中肠进行,中肠有多种消化酶,包括丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶^[4-5]等,其中,丝氨酸蛋白酶家族是大多数昆虫消化作用的关键参与者,属重要的蛋白水解酶^[6-7]。对鳞翅目害虫中肠蛋白酶的研究主要集中在胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶上,二者是最重要的丝氨酸蛋白酶^[8]。蛋白酶抑制剂在一些动物、植物和微生物中参与昆虫的相互作用,常用于研究昆虫蛋白酶

活性。抑制作用取决于抑制剂的类型、浓度、抑制剂与酶的比例等^[9]。植物中的丝氨酸蛋白酶抑制剂在抑制昆虫蛋白酶方面起主要作用,并已用于防治害虫^[10]。Broadway等^[11]发现马铃薯蛋白酶抑制剂PI-2(马铃薯抑制剂II)在低浓度时可抑制甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫肠道中的大部分胰蛋白酶活性。Mcmanus等^[12]发现50 mg/L的STI对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫胰蛋白酶活性的抑制率高达88%。然而,迄今为止,关于梨星毛虫中肠蛋白酶的研究鲜有报道。

目前对于梨星毛虫的防治主要是化学防治,化学农药的使用带来了“3R”等问题,因此,寻找一种新的绿色防控技术迫在眉睫。本研究测定梨星毛虫幼虫不同龄期中肠总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性,在最适龄期(4龄)下,测定不同激活剂和抑制剂对梨星毛虫中肠蛋白酶活性的影响。研究结果为以昆虫中肠蛋白酶为靶标的新型农药的研发和转基因抗虫作物的研究提供理论依据。

收稿日期:2022-06-17 **修回日期:**2022-07-26

基金项目:国家自然科学基金(31871971,32172409);陕西省科技重大专项(2020ZDZX03-03-02)。

第一作者:董艳璐,女,硕士研究生,从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:1127585238@qq.com

通信作者:李怡萍,女,博士,教授,从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:liyiping@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

梨星毛虫幼虫预试验由张战利和吴江波提供,正式试验幼虫采自西北农林科技大学南校区海棠树。采集的幼虫直接用于试验测定,以30只幼虫为样品,每个样品重复3次。

1.2 主要试剂

牛血清白蛋白(BSA)由美国 Equitech-Bio 公司提供。甲基磺酰-L-苯丙氨酸氯甲酮(Tosyl-phenylalanine chloromethyl-ketone, TPCK)、氨苯磺胺偶氮酪蛋白(Azocasein)、 α -p-甲苯磺酰基-L-精氨酸甲酯(Tert-amyl methyl ether, TAME)、大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor, STI)、N-苯甲酰基-L-酪氨酸乙酯(Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE)、苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、Na-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺(Na-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide, BAPNA)、甲基磺酰-L-赖氨酸氯甲酮(N-tosyl-L-lysyl chloromethyl-ketone, TLCK)均由美国 Sigma Aldrich 公司提供。乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、乙二醇二乙醚二氨四乙酸[oxyethylenenitrilo]tetraacetic acid, EGTA]由美国英杰公司提供。

1.3 方法

1.3.1 中肠酶液的制备 取2~5龄梨星毛虫幼虫,用预冷的0.15 mol/L NaCl溶液冲洗虫体,并在冰上快速解剖,收集其中肠。将收集样品用生物组织研磨机在4℃匀浆,随后在4℃、12 000 r/min条件下离心20 min,收集上清液作为中肠蛋白酶粗提物。

1.3.2 中肠酶液蛋白浓度的测定 参照Bradford^[13]方法,选取BSA(牛血清白蛋白)作为标准蛋白,使用BCA(Bicinchoninic acid)蛋白定量试剂盒测定提取物中蛋白质的浓度。利用酶标仪测得吸光度,为保证样品的吸光度值在特定范围内(标准曲线的1/2~2/3),将提取的中肠酶液稀释至相同浓度,随后检测蛋白酶活性。

1.3.3 不同龄期幼虫中肠蛋白酶活性的测定 参照赵爱平等^[14]的方法进行测定,每个处理设定3组重复。

总蛋白酶活性测定:以20 mg/mL的偶氮酪蛋白作为反应底物,用0.15 mol/L的NaCl溶液

进行配制。先后分别在1.5 mL的离心管中加入10 μ L的中肠酶液、90 μ L的0.1 mol/L反应缓冲液 Tris-HCl 和100 μ L的偶氮酪蛋白溶液。随后将混合液置于37℃恒温水浴中孵育2 h,而后加入150 μ L预冷的20%(质量与体积比)三氯乙酸终止酶促反应。将最终反应液在4℃条件下12 000 r/min离心15 min。收集上清液200 μ L并加入到96孔板中,立即使用酶标仪在415 nm处测量吸光度。

强碱性胰蛋白酶活性测定:以20 mg/mL的BAPNA作为反应底物,用二甲基亚砜进行底物溶液的配制。向96孔板中先分别加入90 μ L 0.1 mol/L KH_2PO_4 /NaOH缓冲液,再各加入10 μ L中肠酶液,最后加入100 μ L 20 mg/mL BAPNA底物。37℃下反应20 min,在405 nm处测定吸光值。

弱碱性胰蛋白酶活性测定:以2 mmol/L的TAME作为反应底物,用0.15 mol/L的NaCl溶液进行配制。反应体系同上,使用酶标仪在247 nm处测定吸光值。

胰凝乳蛋白酶活性测定:以1 mmol/L的BTEE作为反应底物,用10%(体积比)的甲醇0.15 mol/L NaCl溶液配制。反应过程同上,在256 nm处测定吸光值。

1.3.4 抑制剂及激活剂对中肠蛋白酶活性的影响 激活剂种类及浓度分别为:5 mmol/L MgCl_2 、10 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L EDTA、10 mmol/L EDTA、5 mmol/L EGTA、10 mmol/L EGTA。抑制剂种类及浓度分别为5 mmol/L DTT、10 mmol/L DTT、5 mmol/L PMSF、10 mmol/L PMSF、2 mmol/L TPCK、4 mmol/L TPCK、1 mmol/L TLCK、2 mmol/L TLCK、5 μ g/mL STI、10 μ g/mL STI、5 mmol/L IAA、10 mmol/L IAA。ddH₂O作为对照,每组处理重复3次。总反应体系包括100 μ L反应底物、10 μ L抑制剂、10 μ L中肠酶溶液、80 μ L反应缓冲液,随后在30℃孵育15 min,用酶标仪在不同波长下测定吸光值。其中,特异性底物、缓冲液和波长均参照“1.3.3”中的方法。

1.3.5 数据分析 基于方差的正态性和同质性假设,对对照组和处理组之间的统计差异进行方差分析,然后用LSD和Tukey's检验其5%的显著性。对所有试验数据均采用SPSS Statistics

26.0 和 Origin 8.5 进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同龄期梨星毛虫幼虫中肠蛋白酶活性

4 种中肠蛋白酶活性在梨星毛虫幼虫不同龄期间差异显著,且均在 4 龄具有最高酶活性(图 1)。由图 1-A 可知,梨星毛虫幼虫中肠总蛋白酶在 4 龄具有最高活性,其次是 5 龄,且 2 龄幼虫总蛋白酶活性显著低于 4 龄。强碱性胰蛋白酶在梨星毛虫幼虫不同龄期间,其活性整体呈先上升后

降低的趋势,在 4 龄时具有最高值,且显著高于 2 龄酶活性(图 1-B)。弱碱性胰蛋白酶也在 4 龄具有最高酶活性,其次是 3 龄,2 龄酶活性最低(图 1-C)。胰凝乳蛋白酶活性整体高于其余 3 种蛋白酶,在 2.1~2.4 OD/(min·mg) 范围内波动,变化趋势和弱碱性胰蛋白酶相同,酶活性在 4 龄最大(图 1-D)。可见,梨星毛虫 4 龄幼虫中肠总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶具有最高活性,2 龄幼虫的活性最低。

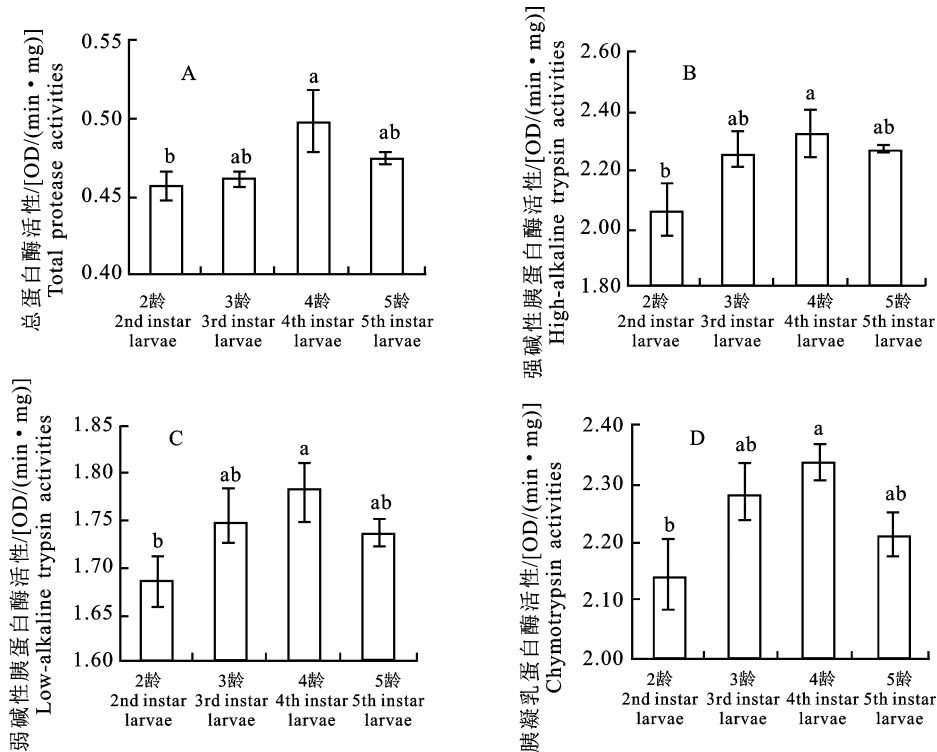


图 1 不同龄期梨星毛虫幼虫中肠蛋白酶活性

Fig. 1 Activities of midgut protease in *Illiberis pruni* larvae different larvae ages

2.2 不同激活剂和抑制剂对中肠蛋白酶活性的影响

测定蛋白酶抑制剂和激活剂对梨星毛虫 4 龄幼虫中肠蛋白酶活性的影响,结果表明:总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性差异较大,且激活剂一般对蛋白酶产生促进作用,而抑制剂则对蛋白酶产生抑制作用,但当浓度发生变化或作用对象不同时,激活剂可能起到抑制作用,抑制剂也可能起到激活作用。

与对照组相比,各处理组对总蛋白酶活性均起到激活作用(图 2-A)。激活作用较好的处理组分别是 10 mmol/L EGTA、2 mmol/L TPCK、5 mmol/L DTT。且除处理组 DTT 与 TPCK 外,

其他试剂均为高浓度的激活作用大于低浓度,其中 EGTA 处理组中,不同浓度的激活效果差异最大。

强碱性胰蛋白酶测定结果表明,对其产生抑制作用的试剂由强到弱依次为 5 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L EGTA、10 mmol/L PMSF、5 mmol/L PMSF、10 mmol/L EGTA(图 2-B)。其余试剂均对强碱性胰蛋白酶产生激活作用,激活作用最强的为 5 mmol/L DTT 和 10 mmol/L DTT。研究中还发现, CaCl_2 在高浓度时表现激活作用,低浓度时则表现抑制作用,与之相反的是 IAA,在低浓度表现激活作用,在高浓度则与对照组差异不大。

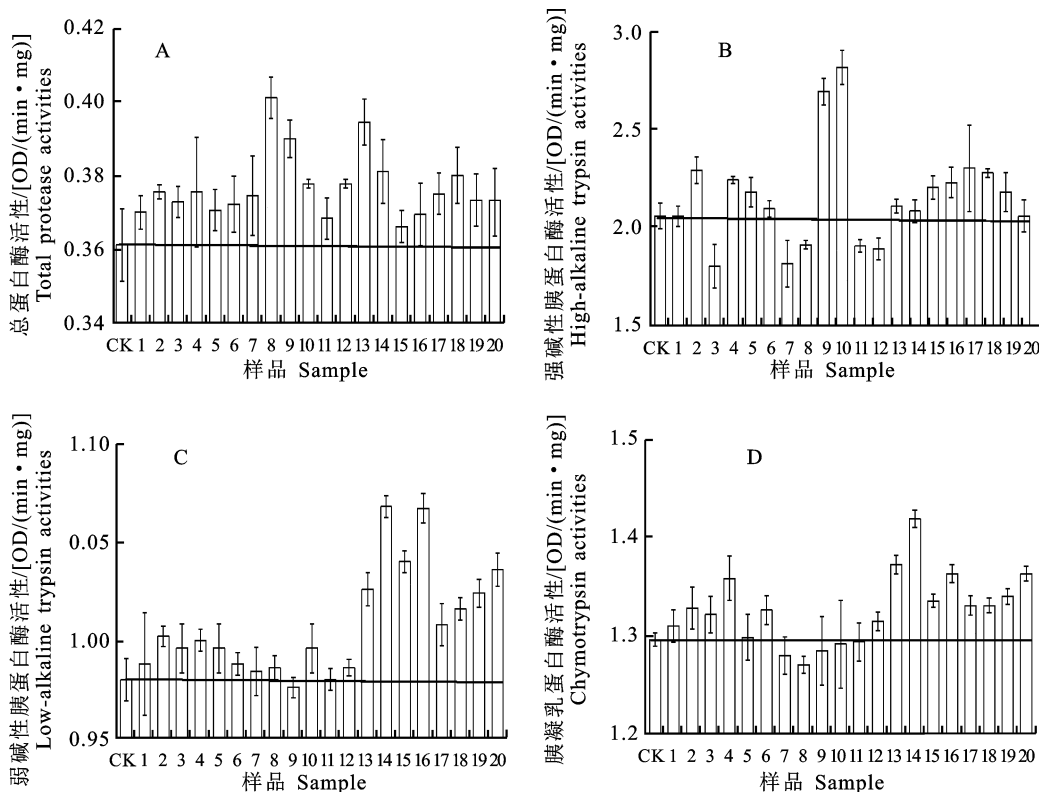
除 5 mmol/L DTT 外,其余所有试剂均对弱碱性胰蛋白酶产生激活作用(图 2-C)。激活作用

较好的依次为 4 mmol/L TPCK、2 mmol/L TLCK、1 mmol/L TLCK、10 mmol/L IAA、2 mmol/L TPCK。5 mmol/L EGTA、5 mmol/L DTT 和 5 mmol/L PMSF 处理组与对照组激活作用差异不显著。其次,除 EGTA 的两个处理组外,其余处理组都随着浓度的增大,弱碱性胰蛋白酶活性增大,即浓度越大激活作用越强。

对于胰凝乳蛋白酶活性的测定发现,仅 EGTA 与 DTT 的两个处理组对胰凝乳蛋白酶具有抑制作用,其中高浓度的 10 mmol/L EGTA 抑制效果最显著,DTT 则是低浓度处理组的抑制效

果较好(图 2-D)。激活作用效果较好的依次为,4 mmol/L TPCK、2 mmol/L TPCK、2 mmol/L TLCK、10 mmol/L IAA、10 mmol/L CaCl_2 。其中 TPCK 处理组具有较高的激活作用。

经过筛选发现,所有试剂对总蛋白酶均表现激活作用, CaCl_2 、PMSF、EGTA 对强碱性胰蛋白酶均有抑制作用,其中效果最佳的为 5 mmol/L CaCl_2 ,在弱碱性胰蛋白酶活性研究中发现,仅有 5 mmol/L DTT 具有抑制作用,EGTA 和 DTT 对胰凝乳蛋白酶均有抑制效果,抑制活性最高的为 10 mmol/L EGTA。



CK. ddH₂O; 1. 5 mmol/L MgCl_2 ; 2. 10 mmol/L MgCl_2 ; 3. 5 mmol/L CaCl_2 ; 4. 10 mmol/L CaCl_2 ; 5. 5 mmol/L EDTA; 6. 10 mmol/L EDTA; 7. 5 mmol/L EGTA; 8. 10 mmol/L EGTA; 9. 5 mmol/L DTT; 10. 10 mmol/L DTT; 11. 5 mmol/L PMSF; 12. 10 mmol/L PMSF; 13. 2 mmol/L TPCK; 14. 4 mmol/L TPCK; 15. 1 mmol/L TLCK; 16. 2 mmol/L TLCK; 17. 5 $\mu\text{g/mL}$ STI; 18. 10 $\mu\text{g/mL}$ STI; 19. 5 mmol/L IAA; 20. 10 mmol/L IAA

图 2 不同浓度激活剂和抑制剂处理后梨星毛虫幼虫中肠蛋白酶活性

Fig. 2 Activities of midgut protease of *Illiberis pruni* larvae under different protease activator and inhibitors

3 讨论

由于昆虫在不同发育阶段的生理代谢具有差异性,进而表现为中肠蛋白酶活性也具有一定差异^[15]。樊艳平等^[16]测定了不同龄期的绿豆象 *Callosobruchus chinensis* 幼虫中肠各种蛋白酶的活性,发现随龄期的升高,酶活性越大。曾纪岚等^[17]的研究表明:4 种中肠蛋白酶(总蛋白酶、强

碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶)活性随甜菜夜蛾幼虫龄期的升高而降低,这与樊艳平等^[16]的报道不同。本研究结果表明,梨星毛虫幼虫在 4 龄时中肠蛋白酶活性最高,2 龄最低,与曾纪岚等^[17]的研究结果一致。梨星毛虫幼虫在 4 龄生长发育较为旺盛,具有较强的取食能力,进而消化酶活性较高,因此 4 龄中肠蛋白酶活性均高于其他龄期。5 龄幼虫准备进入化蛹阶段,

取食量有所下降,导致其生理代谢活动减弱,中肠蛋白酶活性降低。以上结果说明梨星毛虫幼虫中肠蛋白酶活性的变化与其生长发育密切相关。

不同蛋白酶抑制剂对昆虫中肠蛋白酶抑制作用差异显著。有研究表明^[18],不同抑制剂对稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 幼虫蛋白酶活性的抑制作用不同,PMSF、TLCK、E-64、Pepstatin A、Leupeptin 抑制总蛋白酶活性;PMSF 显著降低胰凝乳蛋白酶活性;EDTA、PMSF、TPCK、TLCK、E-64 显著降低胰蛋白酶活性。在研究不同蛋白酶抑制剂对小菜蛾 *Plutella xylostella* 中肠蛋白酶活性影响时发现^[19],CaCl₂、EDTA 和 EGTA 仅抑制胰蛋白酶;PMSF、TLCK、TPCK、STI 和 PMSF 抑制总蛋白酶、强碱性胰蛋白酶、弱碱性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶;TLCK 抑制总蛋白酶和强碱性胰蛋白酶,而 TPCK 只激活强碱性胰蛋白酶的活性;STI 对所有的蛋白酶都有抑制作用。本研究中大部分试剂对梨星毛虫 4 龄幼虫中肠蛋白酶起激活作用,仅少部分试剂具有抑制作用。所有试剂对总蛋白酶均表现为激活作用,对强碱性胰蛋白酶抑制作用最高的为 5 mmol/L CaCl₂,仅有 5 mmol/L DTT 对弱碱性胰蛋白酶有抑制作用,对胰凝乳蛋白酶抑制效果最佳的为 10 mmol/L EGTA。本研究与前人结果差异原因可能是梨星毛虫的中肠蛋白酶对抑制剂具有选择性,即某种抑制剂对其他昆虫具有抑制作用,但对梨星毛虫却具有激活作用。另外,也可能与昆虫对抑制剂的敏感程度有关。有研究者^[20-21]发现,只有斜纹夜蛾的 1 龄幼虫在饲喂含有大豆胰蛋白酶抑制剂的饲料时生长速度降低,但整体发育仅延迟大约 1 d,同样,在对马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的研究中也发现,仅有 1 龄、2 龄幼虫对水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂敏感。

同种抑制剂在不同浓度抑制作用差异较大。对美洲条螟 *Diatraea saccharalis* 的研究表明,随着抑制剂 ApTI 浓度的增加,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性均呈下降趋势^[22]。本研究发现,在总蛋白酶中,除处理组 DTT 与 TPCK 外,其他试剂均为高浓度的激活作用大于低浓度;在强碱性胰蛋白酶中,CaCl₂ 在高浓度时表现激活作用,低浓度时则表现抑制作用,与之相反的是试剂 IAA 在低浓度表现激活作用,在高浓度则与对照组差异不大。其差异原因可能在于不同昆虫间具有物种

差异性,且不同抑制剂处理组的抑制活性本身差异较大,不同浓度作用于昆虫中肠蛋白酶时就会产生不同的作用效果。本研究结果显示:低浓度的 CaCl₂ 对强碱性胰蛋白酶有较强的抑制作用,高浓度 CaCl₂ 则起激活作用。可能与不同浓度下钙离子与目标蛋白酶活性位点的结合情况不同有关。

由于昆虫在进化过程中形成了不同的取食习性,因此,发挥主要功能的中肠蛋白酶也具有差异。例如,鞘翅目和半翅目倾向于利用半胱氨酸蛋白酶,而膜翅目、双翅目、鳞翅目和直翅目倾向于利用丝氨酸蛋白酶^[23]。本研究结果表明,强碱性胰蛋白酶的活性在梨星毛虫幼虫各龄期整体偏高,说明梨星毛虫主要倾向于利用强碱性胰蛋白酶进行消化吸收。

4 结 论

本研究测定出梨星毛虫幼虫 4 龄的中肠蛋白酶具有最高酶活性,在此龄期进行抑制剂筛选发现,不同浓度及种类试剂对 4 种中肠蛋白酶活性影响差异显著,所有试剂对总蛋白酶均表现为激活作用,5 mmol/L CaCl₂ 对强碱性胰蛋白酶抑制作用最高,仅 5 mmol/L DTT 对弱碱性胰蛋白酶有抑制作用,对胰凝乳蛋白酶抑制效果最佳的为 10 mmol/L EGTA。本试验为后续抑制剂对梨星毛虫的体内活性作用的研究提供了参考依据,便于明确抑制剂对梨星毛虫生长发育的影响,为以中肠蛋白酶为靶标,研发含抑制剂的生物源药剂或转基因作物的绿色防控提供参考。

参考文献 Reference:

- [1] 张翌楠,龙建平,雷金繁. 苹果树昆虫群落空间结构的研究[J]. 西北农业学报,2002,11(1):53-56.
ZHANG Y N, LONG J P, LEI J F. Research on the spatial structure of insect community in the apple tree[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2002, 11(1): 53-56.
- [2] 刘厚荣. 梨星毛虫生活史、习性的观察与防治[J]. 甘肃农业科技,1986(7):11-13.
LIU H R. Observation and control of life history and habit of *Illiberis pruni* Dyar[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 1986(7): 11-13.
- [3] 李少平. 梨星毛虫的发生与防治[J]. 西北园艺,2013(2): 52.
LI SH P. The occurrence and control of *Illiberis pruni* Dyar[J]. *Northwest Horticulture*, 2013(2): 52.
- [4] 王琛柱,钦俊德. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定

- [J]. 昆虫学报, 1996, 39(1): 7-13.
- WANG CH ZH, QIN J D. Identification of major protease activities in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1996, 39(1): 7-13.
- [5] AJAMHASSANI M, ZIBAEE A, SENDI J, *et al.* Proteolytic activity in the midgut of the crimson speckled moth *Utethesia pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae) [J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2012, 52(3): 368-373.
- [6] 叶倩, 马勋, 薄新文, 等. 扩展莫尼茨绿虫丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin* 部分片段克隆及不同体节 mRNA 转录水平分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24(8): 16-22.
- YE Q, MA X, BO X W, *et al.* Cloning of partial *serpin* gene and its mRNA transcription analysis in different segments of *Moniezia expansa* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(8): 16-22.
- [7] GOMAN M J, ANDREEVA O V, PASKEWITZ S M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30(1): 35-46.
- [8] 史艳霞, 张永军, 窦宝峰, 等. Bt 抗性和敏感棉铃虫幼虫中肠类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶基因克隆及半定量测定 [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 630-633.
- SHI Y X, ZHANG Y J, DOU B F, *et al.* Cloning and relative quantitative determination of trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme genes in larval midgut of Bt susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2009, 15(5): 630-633.
- [9] SINGH S, SINGH A, KUMAR S, *et al.* Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management [J]. *Insect Science*, 2020, 27(2): 186-201.
- [10] 罗娟, 王秀敏, 韩烈保, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*CpTI*) 的克隆及其植物表达载体的构建 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 16-19.
- LUO J, WANG X M, HAN L B, *et al.* Cloning of cowpea trypsin proteinase inhibitor gene and construction of its plant expression vector [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(3): 16-19.
- [11] BROADWAY R M, DUFFEY S S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea*, and *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1986, 32(10): 827-833.
- [12] MCMANUS M T, BURGESS E P J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1995, 41(9): 731-738.
- [13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [14] 赵爱平, 孙聪, 展恩玲, 等. 蛋白酶抑制剂对梨小食心虫幼虫中肠蛋白酶活性的影响 [J]. 昆虫学报, 2016, 59(10): 1069-1078.
- ZHAO A P, SUN C, ZHAN E L, *et al.* Effects of protease inhibitors on the activities of midgut proteases of larval *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(10): 1069-1078.
- [15] 李云寿, 罗万春, 赵喜欢. 不同寄主植物对小菜蛾羧酸酯酶活性的影响 [J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(2): 147-151.
- LI Y SH, LUO W CH, ZHAO X H. Effects of food plants on the activity of carboxylesterase of the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Journal of Shangdong Agricultural University*, 1996, 27(2): 147-151.
- [16] 樊艳平, 成小芳, 王宏民, 等. 蛋白酶抑制剂对绿豆象幼虫中肠蛋白酶活性的影响 [J]. 应用生态学报, 2018, 29(5): 1660-1666.
- FAN Y P, CHENG X F, WANG H M, *et al.* Effects of protease inhibitors on the activities of midgut proteases in *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus) larvae [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(5): 1660-1666.
- [17] 曾纪岚, 孔祥东, 董梓慧, 等. 5 种寄主植物对甜菜夜蛾幼虫中肠蛋白酶活性的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(1): 42-49.
- ZENG J L, KONG Y D, DONG Z H, *et al.* Effects of five different host plants on the midgut protease activities of the larva in *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41(1): 42-49.
- [18] YANG Y J, XU H X, WU Z H, *et al.* Effects of inhibitors on the protease profiles and degradation of activated Cry toxins in larval midgut juices of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(8): 2195-2203.
- [19] ZHAO A P, LI Y, LENG C M, *et al.* Inhibitory effect of protease inhibitors on larval midgut protease activities and the performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1963.
- [20] MCMANUS M T, BURGESS E P J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1995, 41(9): 731-738.
- [21] MICHAUD D, BEMIER V N, OVEMEY S, *et al.* Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(9): 1041-1048.
- [22] DA SILVA D S, DE OLIVEIRA C F, PARRA J R, *et al.* Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 61: 1-7.
- [23] CHENG Z Y, XUE Q Z. The structure and regulation of plant proteinase inhibitor genes and their strategy in pest control [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2003, 30(8): 790-796.

Effects of Inhibitors and Activators on Protease Activity in the Midgut of *Illiberis pruni*

DONG Yanlu¹, ZHANG Zhanli², WU Jiangbo³, CHEN Wei¹,
YUAN Xiangqun¹ and LI Yiping¹

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling Shannxi 712100, China; 2. Shaanxi Provincial Plant Protection Station, Xi'an 710003, China; 3. Yichuan County Agricultural Technology Extension and Service Center, Yichuan Shannxi 716200, China)

Abstract This paper aims to investigate the effects of different inhibitors and activators on the midgut protease activity of the *Illiberis pruni*. Determination of the activities of four midgut proteases (total protease, high-alkaline trypsin, low-alkaline trypsin and chymotrypsin) in different instar larvae of *Illiberis pruni* by biochemical techniques, and then the effects of protease activators (EDTA, MgCl₂, EGTA, MgCl₂) and inhibitors (PMSF, TPCK, STI, TLCK, IAA, DTT) on the midgut protease activity of *Illiberis pruni* were determined at the optimum age (4th instar larvae). The results showed that total protease, high-alkaline trypsin, low-alkaline trypsin and chymotrypsin have the highest enzymatic activities at the 4th instar. Under the optimum conditions, all reagents have activating effects on total protease; 5 mmol/L CaCl₂ have the highest inhibitory effect on high-alkaline trypsin; only 5 mmol/L DTT have inhibitory effect on low-alkaline trypsin; 10 mmol/L EGTA have the best inhibitory effect on chymotrypsin. The screened inhibitor has inhibitory effect on the main midgut proteases of *Illiberis pruni*, which has reference value for the development of green pest control technology targeting insect midgut proteases.

Key words *Illiberis pruni*; Midgut; Proteases; Active; Inhibitors

Received 2022-06-17

Returned 2022-07-26

Foundation item National Natural Science Foundation of China (No. 31871971, No. 32172409); Key Science and Technology Project of Shaanxi Province (No. 2020ZDZX03-03-02).

First author DONG Yanlu, female, master student. Research area: agricultural entomology and pest control. E-mail: 1127585238@qq.com

Corresponding author LI Yiping, female, Ph. D, professor. Research area: agricultural entomology and pest control. E-mail: liyiping@nwsuaf.edu.cn

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)



《西北农业学报》微信公众平台栏目介绍

溯本探源:发布本刊及他刊论文背后的故事,深层次解读论文的研究背景和研究过程。亦可发布就农业科研或生产上的疑难问题,透过表象探寻本源的过程,以便更好地服务读者和作者。

院士之声:发布农业和生物学领域的院士关于行业发展、存在问题、未来的研究方向等方面的讲话,为青年科研人员提供选题思路和线索,发挥传帮带的作用。

科学普及:发布农学、林学、植(森)保、园艺、土壤化学、畜牧、兽医等方面的科普性文章,力求生动趣味,浅显易懂,服务大众,服务社会。

(大师风采)学者风采:发布涉农领域专家学者的治学轶事或教书育人的事迹。

区域特色:发布西北五省(区)乃至国内其他地区及国外各具特色动植物资源、农业生态环境、耕作技术、农产品及加工、涉农风土人情等方面的知识。

丝路农业:发表“一带一路”沿线国家农业合作的前景、成功范例、存在问题及解决相关问题的技术方案等方面的文章,助力“一带一路”农业合作迈向更大范围、更高水平、更高层次。

名作点评:对国内和国外涉农顶级期刊发表的最新科研论文进行解读和点评,为年轻科研人员提供借鉴,促进学术繁荣和学术交流。

农史荟萃:刊登农史知识及农业考古信息,拓展读者的知识面。

创新思维:发布有关生物科学和农业科学研究上的新观点、新思路、学术商榷、假说等文章,只求逻辑自洽,不求完整的试验验证。

采编撷语:发布科技期刊从业者在论文编校及出版发行工作中的感悟、发现及对编辑实务的探索性文章。

本刊微信公众平台愿做农业科研工作者与广大手机用户之间交流与联系的纽带,旨在实现科研工作者用大众化的语言讲述专业故事的构想。恳请各位专家学人惠赐佳作,稿件一经审核通过,不收取任何费用,并按有关规定支付稿酬。来稿请投西北农业学报官方网站 <http://xbnyxb.alljournals.cn/ch/index.aspx> 或 1330659401@qq.com,并注明微信公众平台稿件。