

中华稻蝗两地理种群乙酰胆碱酯酶生化特性研究

杨美玲, 吴海花, 郭亚平, 马恩波

(山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要:采用生物测定方法,对采自山西省临猗县和江苏省徐州市郊中华稻蝗五龄若虫的乙酰胆碱酯酶(AChE)特性进行了比较研究,同时测定了2种群五龄若虫对马拉硫磷的敏感性。用对氧磷、氧化毒死蜱和甲基内吸磷3种有机磷抑制剂对2种群中华稻蝗五龄若虫AChE的体外抑制进行的研究表明,该2种群AChE对对氧磷、氧化毒死蜱、甲基内吸磷的敏感性没有显著差异,临猗种群比徐州种群分别高1.24、1.13和0.82倍;乙酰胆碱酯酶动力学研究结果表明,临猗种群的动力学参数米氏常数(K_m 值)和最大反应速度(V_{max} 值)均较徐州种群为高;用乙酰硫代胆碱(ATC)做底物测定AChE活性,2种群AChE活性无显著差异,临猗种群是徐州种群的1.24倍。而2种群生物测定结果表明,临猗种群和徐州种群五龄若虫对马拉硫磷的敏感度有差异,徐州种群五龄若虫的LD₅₀值(13.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 虫质量)是临猗种群(4.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 虫质量)的2.8倍。据此推测,中华稻蝗徐州种群马拉硫磷敏感性下降与AChE无相关性,可能存在其他影响因素。

关键词:中华稻蝗;乙酰胆碱酯酶(AChE);马拉硫磷敏感性;酶动力学;体外抑制

中图分类号:S481.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)03-0572-04

Biochemical Characterizations of Acetylcholinesterases of *Oxya chinensis* in Two Field Populations

YANG Mei-ling, WU Hai-hua, GUO Ya-ping, MA En-bo

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Acetylcholinesterases (AChE) were characterized and compared in the fifth-instar nymphs of *Oxya chinensis* from two field populations, collected from Linyi of Shanxi Province and Xuzhou of Jiangsu Province, China. Malathion susceptibility was compared between the two populations by bioassay. Inhibition studies of AChE using three inhibitors, including paraoxon, chlorpyrifos-oxon, demeton-S-methyl, indicated that the *Oxya chinensis* of Linyi population showed 1.24, 1.13 and 0.82-fold higher susceptibility than that of Xuzhou population respectively, but there were not significant difference between AChE susceptibilities of the two populations. Kinetic studies showed that the Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximal velocity (V_{max}) of AChE from Linyi population were higher than those from Xuzhou population, and the AChE activity in *Oxya chinensis* of Linyi population were 1.24-fold higher than that of Xuzhou population using acetylthiocholine iodide (ATC) as a substrate, but the difference was not significant. Bioassay results indicated that there existed significant difference in malathion susceptibility between the two populations, and LD₅₀ of the Xuzhou population (13.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ body weight) was 2.8-fold higher than that of the Linyi population (4.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ body weight). Therefore, we speculated that AChE might not be correlated to reduced malathion susceptibility of Xuzhou population and there might be some other influence factors.

Keywords: *Oxya chinensis*; acetylcholinesterases (AChE); malathion susceptibility; enzyme kinetics; acetylcholinesterases inhibition

中华稻蝗(*Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acridoidea))属昆虫纲,直翅目,蝗总科,斑腿蝗科,稻蝗属,是一种重要的农业害虫。该种蝗虫在中国分布广泛,除新疆、西藏等少数省区外,全国大多数地区均有分布^[1],主要取食禾本科植物,尤喜食水稻、谷物,对

农业生产造成很大危害^[2]。

有机磷(Organophosphate, OP)杀虫剂是害虫防治中最常用的一类农药,它主要通过抑制其靶标物乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的活性而使昆虫中毒死亡。这类杀虫剂一贯用于各种害虫的防治,由于长期使用,造成很大一部分害虫产生了抗性,使害虫防治过程中杀虫剂用量增大,防治效果降低。Fournier 等对果蝇的研究发现, AChE 在中枢神经系统的含量和对杀虫剂的敏感性之间有很强的相关性^[3]。朱坤炎等对麦二叉蚜(*Schizaphis graminum*)的一

收稿日期:2004-08-18

基金项目:国家自然科学基金(30170612);山西省科技攻关项目(041005)

作者简介:杨美玲(1977—),女,硕士研究生,主要从事抗药性生理生化研究。

联系人:马恩波 E-mail:maenbo2003@xssu.edu.cn

个有机磷敏感种群 OSS 和 3 个抗性种群——有机磷高抗性种群(OR-2)、有机磷中等抗性种群(OR-1)及有机磷边缘抗性种群(OR-0)的 AChE 的活性和敏感性进行酶动力学比较表明,AChE 活性的增加是麦二叉蚜产生有机磷抗性的一个重要机制^[4]。

本文以中华稻蝗为研究对象,从生化水平对其有机磷杀虫剂敏感性差异机理进行初步研究,以期为农业生产中合理使用农药、提高防效提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本试验所研究的中华稻蝗五龄若虫均于 2003 年 7 月采自山西临猗县和江苏徐州市郊,标本于-80℃保存。

1.2 主要试剂

99.5%的马拉硫磷(malathion (O,O-dimethyl-S-1,2-di(carboethoxy)ethyl phosphorodithioate, 99.5% pure))订购于美国 Chem Service 公司。乙酰硫代胆碱(ATC),5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB),对氧磷(paraoxon),BCA(Bicinchoninic acid solution)订购于美国 Sigma 化学试剂公司。氧化毒死蜱(chlorpyrifos-oxon 97% pure)和甲基内吸磷 (demeton-S-methyl 95% pure)分别订购于美国 DowElanco 和 Chem Service 公司。

1.3 生物测定

采用注射法测定临猗种群和徐州种群五龄若虫对马拉硫磷的敏感性。用丙酮将马拉硫磷原药稀释成 6 个适当的浓度,挑选活泼健康、大小均匀的五龄若虫,用微量注射器取 4 μL 稀释好的农药注射于虫体的第三腹节右侧,每个浓度注射 16~24 头,雌雄各半,每组注射 3 个重复,注射等量丙酮作为对照。室温正常饲养 24 h 后观察死亡情况,轻触虫体不动为死亡。记录各个浓度的试虫数和死亡数,用 Origin 6.0 软件包进行回归分析,求出各种群对马拉硫磷的 LD₅₀ 值。

1.4 乙酰胆碱酯酶的提取

取-80℃冻存的五龄若虫中华稻蝗,用解剖刀切取头部,加 0.5 mL 0.1 mol·L⁻¹ pH7.5、含 0.3% Triton X-100 的磷酸缓冲液,用玻璃电动匀浆机(DY89-II,宁波新芝生物科技股份有限公司)500 r·min⁻¹ 匀浆 1 min,匀浆液于 4℃ 15 000 g 离心 30 min 后,将上清液转移到一个新的 0.5 mL 离心管中,将离心管置于冰上,酶液备用。

1.5 乙酰胆碱酯酶活性的测定

取 20 μL AChE 酶液置于 96 孔平底酶标板的孔

中,每个样品设 3 个重复,用 AChE 提取缓冲液作为对照。用 12 道移液器取终浓度为 0.72 mmol·L⁻¹ 的 ATC-DTNB 混合液 180 μL 加入含酶液的酶标板孔中,立即在酶标仪(美国 Molecular Devices, Spectra MAX 190 型)405 nm 读数,以 1.36×10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹ 摩尔消光系数计算酶活性^[5]。

1.6 乙酰胆碱酯酶动力学常数 K_m 、 V_{max} 的测定

将 75 mmol·L⁻¹ 的 ATC 底物分别用 0.1 mol·L⁻¹、pH 7.5 的磷酸缓冲液以 2 倍梯度稀释为 12 个浓度。取 50 μL 各个浓度的底物加入 96 孔平底酶标板孔中;在加入底物的孔中再加入 50 μL 0.01 mol·L⁻¹ DTNB 溶液;用 12 道移液器在以上孔中加入 50 μL 适当稀释的 AChE 溶液,混匀 30 s 后立即在酶标仪 405 nm 处读数。按 Hanes-plot 的方法计算 K_m 、 V_{max} 值^[6]。

1.7 乙酰胆碱酯酶体外抑制

用对氧磷、氧化毒死蜱和甲基内吸磷 3 种有机磷抑制剂进行 AChE 体外抑制。根据不同抑制剂对 AChE 的抑制情况,将抑制剂以 2 倍梯度稀释为 8 个不同的浓度,使抑制剂对 AChE 活性的抑制在 10%~90%之间。取 10 μL 不同浓度的抑制剂加入 96 孔平底酶标板孔中,以 10 μL 0.1 mol·L⁻¹、pH 7.5 的磷酸缓冲液作为对照。用 12 道移液器取 10 μL 适当稀释的 AChE 酶液加入上述含抑制剂和空白的孔中。立即混匀,室温(约 24℃)抑制 2 min 后,立即在反应液中加入 180 μL 终浓度为 0.72 mmol·L⁻¹ 的 ATC-DTNB 混合液,立即在酶标仪 405 nm 处读数,记录原始数据。以抑制剂终浓度×2 min 为 X 轴,AChE 残留活性百分比的对数值为 Y 轴作直线回归,该直线斜率的相反数即为该抑制剂抑制的 K_i 值^[7]。

2 结果

2.1 中华稻蝗临猗种群和徐州种群对马拉硫磷的敏感性

临猗种群和徐州种群中华稻蝗五龄若虫对马拉硫磷的 LD₅₀ 值分别为:4.64 和 13.00 μg·g⁻¹ 虫重,而且这 2 种群对马拉硫磷的 LD₅₀ 值在 95%置信区间内没有重叠。结果表明,临猗种群和徐州种群若虫对马拉硫磷的敏感度有差异,与临猗种群相比,徐州种群若虫对马拉硫磷的敏感性下降了 2.8 倍,见表 1。

2.2 中华稻蝗临猗种群和徐州种群乙酰胆碱酯酶活性比较

从表 2 可以看出,临猗种群和徐州种群 AChE 活性没有明显差异,临猗种群 AChE 活性是徐州种群的

表 1 临猗、徐州 2 种群中华稻蝗五龄若虫对马拉硫磷敏感性的比较

Table 1 Comparisons on malathion susceptibility of the fifth-instar nymphs of *Oxya chinensis* (Thunberg) collected from Linyi and Xuzhou populations

种群	<i>n</i>	χ^2	<i>P</i>	LD ₅₀ (95% CI) /μg · g ⁻¹ 虫重	LD ₅₀ 比值
徐州	390	4.14	0.99	13.00(10.11-16.41)	2.8
临猗	487	8.09	0.95	4.64 (4.05-5.41)	—

注: *n* 为每个种群生物测定的供试虫数。*P*≥0.05 表明用几率分析的观察值和期望值回归直线之间有显著高的拟合度。

表 2 临猗、徐州 2 种群中华稻蝗五口若虫乙酰胆碱酯酶活性 (mmol · min⁻¹ · mg⁻¹ protein) 比较

Table 2 Comparisons on AChE activities (mmol · min⁻¹ · mg⁻¹ protein) of the fifth-instar nymphs of *Oxya chinensis* (Thunberg) collected from Linyi and Xuzhou populations

	临猗	徐州	比值 (临猗/徐州)
AChE 比活性	7.95±0.94a	6.43±0.43a	1.24

注:结果为 4 个重复的平均值±标准差(*n*=4)。标记相同字母的平均值之间没有显著差别(*P* > 0.05, *t* 检验)。

1.24 倍。

2.3 中华稻蝗临猗种群和徐州种群乙酰胆碱酯酶动力学比较

表 3 表示以 ATC 做底物, 临猗种群和徐州种群 AChE 的动力学常数。2 种群 AChE 对底物 ATC 的 *K_m* 值和 *V_{max}* 值均无显著差异, 临猗种群的 AChE 水解乙酰胆碱的 *K_m* 值和 *V_{max}* 值分别是徐州种群的 1.30 和 1.05 倍。

2.4 中华稻蝗临猗种群和徐州种群乙酰胆碱酯酶对不同抑制剂的敏感性

选用对氧磷、氧化毒死蜱及甲基内吸磷 3 种有机磷化合物对临猗种群和徐州种群 AChE 进行体外抑制分析, 抑制双分子常数 *K_i* 值越大, 说明 AChE 对抑制剂的敏感性越高, 据此可知, 临猗种群 AChE 对对氧磷、氧化毒死蜱及甲基内吸磷的敏感性比徐州种群分别高 1.24、1.13 和 0.82 倍, 临猗种群和徐州种群 AChE 对 3 种有机磷化合物敏感性无显著差异, 见表 4, 图 1。

表 3 临猗、徐州两种群中华稻蝗乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱的动力学常数比较

Table 3 Comparisons on kinetic parameters of AChE in hydrolyzing acetylthiocholine (ATC) between Linyi and Xuzhou populations of *Oxya chinensis* (Thunberg)

底物	<i>K_m</i> /μmol · L ⁻¹			<i>V_{max}</i> /μmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ protein		
	临猗	徐州	比值(临猗/徐州)	临猗	徐州	比值(临猗/徐州)
乙酰胆碱	25.45±4.34a	19.54±3.89a	1.30	9.99±1.02a	9.49±0.89a	1.05

注:结果表示为 4 个重复的平均值±标准差(*n*=4)。标记相同字母的平均值表示临猗种群的乙酰胆碱酯酶水解底物的米氏常数和最大反应速度与徐州种群相比均没有显著差别(*P* > 0.05, *t* 检验)。

3 讨论

在我国,小菜蛾(*Plutella xylostella*)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål)、白背飞虱(*Sogatella furcifera* Horvath)、棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等农业害虫已经对马拉硫磷等有机磷农药产生了很高的抗性,并且马拉硫磷与其他有机磷农药之间存在交互抗性^[8-12]。马拉硫磷作为一种高效低毒的杀虫剂,近年来随着其在某些地区中华稻蝗防治中用量的加大,马拉硫磷已经对这些种群形成了选择压力。临猗种群采自山西临猗县黄河边的荒滩上,这里的土壤沙化严重,植被以香蒲和小莎草为主,该地的蝗虫治理以监测防治为主较少使用化学药剂。而徐州种群采自水库边的玉米田及附近草丛中,多年以来这里一直是重点化学防治区,有机磷作为一种有效的杀虫剂而被广泛使用。本文生物测定结果表明,临猗种群五口若虫对马拉硫磷的敏感性比徐州种群高 2.8 倍,这可能是由于中华稻蝗不同种群对马拉硫磷选择压力的不同而造成其敏感度的差异。

AChE 主要作用是催化昆虫中枢神经系统胆碱能突触中的神经传导物乙酰胆碱(ATC)的水解,是有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的主要作用靶标。本文选取了 2 个不同防治背景的中华稻蝗种群进行 AChE 生化特性的研究。AChE 活性和动力学比较结果表明,2 种群 AChE 活性无显著差异, 临猗种群 AChE 活性仅是徐州种群的 1.24 倍, 并且两种群的 *K_m* 值和 *V_{max}* 值也无显著差异; 有机磷对 AChE 的体外抑制发现,临猗种群的 AChE 对对氧磷、氧化毒死蜱及甲基内吸磷的敏感性与徐州种群相比没有显著差异。2 种群的 AChE 生化特性研究结果与生物测定结果不相符, 也就是说两种群的生测结果差异在 AChE 的活性和有机磷敏感性上均没有表现出来。因此推测中华稻蝗徐州种群马拉硫磷敏感性下降与 AChE 无相关性,可能存在其它的影响因素。另外,通过 AChE 对不同有机磷抑制剂的体外抑制反应,还可以建立不同种群乙酰胆碱酯酶对不同有机磷抑制剂

表 4 3 种有机磷抑制剂对中华稻蝗两种群乙酰胆碱酯酶抑制的双分子常数 K_i 比较($M^{-1} \cdot min^{-1}$)
Table 4 Comparisons on bimolecular rate constant (K_i) ($M^{-1} \cdot min^{-1}$) of three OP inhibitors from Linyi and Xuzhou populations of *Oxya chinensis* (Thunberg)

种群	对氧磷	比值(临猗/徐州)	氧化毒死蜱	比值(临猗/徐州)	甲基内吸磷	比值(临猗/徐州)
临猗	$(1.26 \pm 0.27) \times 10^4 a$	1.24	$(1.26 \pm 0.11) \times 10^2 a$	1.13	$(4.91 \pm 0.72) \times 10^6 a$	0.82
徐州	$(1.02 \pm 0.17) \times 10^4 a$		$(1.12 \pm 0.24) \times 10^2 a$		$(6.00 \pm 1.37) \times 10^6 a$	

注: 结果表示为 4 个重复的平均值±标准差($n=4$)。同一列标记相同字母的平均值之间没有显著差别($P > 0.05$, t 检验)。

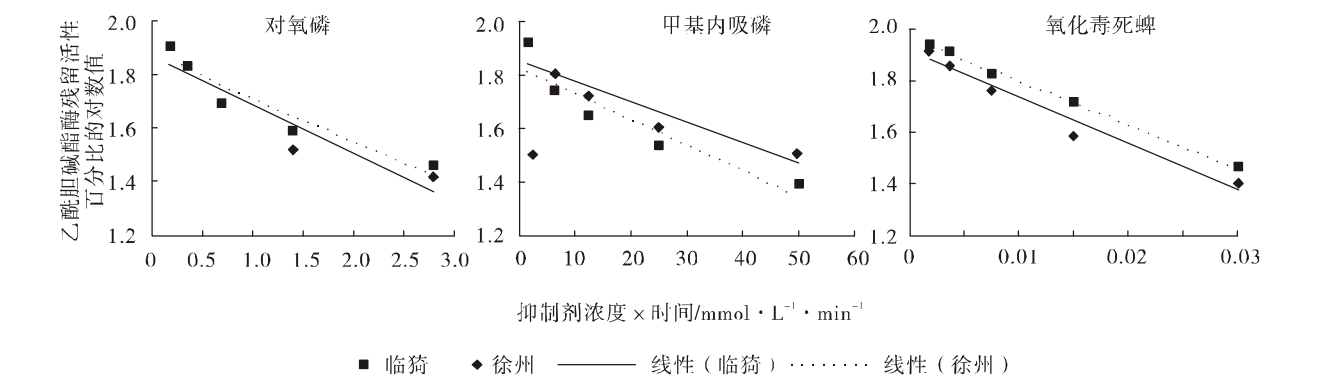


图 1 3 种有机磷抑制剂对中华稻蝗临猗种群和徐州种群的乙酰胆碱酯酶在室温约 24℃ 和 pH 7.5 条件下的抑制动力学 (每个作图点为 4 次测定值的平均数)

Figure 1 Inhibition kinetics of AChE purified from the Linyi and Xuzhou populations of *Oxya chinensis* (Thunberg) by three organophosphate inhibitors at room temperature (about 24℃) and pH 7.5. Each point represents the mean of four determinations ($n=4$)

的敏感性谱,为乙酰胆碱酯酶不敏感性机制研究提供基础。

酯酶 (EST) 是一种主要的结合并代谢有机磷杀虫剂的酶,酯酶活性的提高在昆虫对有机磷杀虫剂抗性的积累中起着很大的作用。同酯酶一样,作为动物体内的一种重要解毒酶,谷胱甘肽-S-转移酶的活性提高也是害虫抗药性的一个重要机制。临猗种群和徐州种群酯酶和谷硫转移酶的活性分析表明,徐州种群酯酶和谷硫转移酶的活性分别是临猗种群的 2.31 和 1.54 倍,而且徐州种群的酯酶和谷硫转移酶的活性与临猗种群相比均有显著差异。我们推测徐州种群中酯酶和谷硫转移酶活性的提高与其对马拉硫磷的敏感性降低有关。

不同的昆虫在产生抗性过程中的生化机制是不尽相同的,研究表明,一种昆虫对一种农药的抗性也可能包括多种不同的机制。Conyers 等研究发现,锯谷盗 (*Orgzaephilus surinamensis*) 对马拉硫磷和杀螟硫磷的抗性是由于酯酶水平的提高而引起的,谷硫转移酶和细胞色素 P₄₅₀ 单加氧酶的活性水平没有提高,也没有出现 AChE 的不敏感^[13]。本文通过比较 2 个中华稻蝗自然种群对马拉硫磷的敏感性差异,并从生化水平探讨其有机磷杀虫剂敏感性差异机理,从而为我国重要农业害虫中华稻蝗的综合研究提供基础资料,并有助于对我国中华稻蝗的可持续控制。

参考文献:

[1] 郑哲民.蝗虫分类学[M].西安:陕西师范大学出版社,1993.
[2] 陈永林.蝗灾的特点、原因和生态学治理[J].生物学通报,2000,35(7): 1-5.
[3] Fournier D, Bride J M, Hoffman F, et al. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide[J]. *J Biol Chem*,1992, 267: 14270-14274.
[4] Zhu K Y, Gao J R. Increased activity associated with reduced sensitivity of acetylcholinesterase in organophosphate-resistant greenbug,Schizaphis graminum (Homoptera: Aphididae)[J]. *Pestic Sci*,1999, 55: 11-17.
[5] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961,7: 88-95.
[6] Henderson P J F. Statistic analysis of enzyme kinetic data[A].in:R Eisen-thal, M.J. Danson (Eds.), *Enzyme Assays: A Practical Approach*[C]. New York: Oxford University Press, 1992. 227-316.
[7] Zhu K Y,Clark J M.Comparison of kinetic properties of acetyl-cholinesterase from the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say)[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1995, 51: 57-67.
[8] 刘泽文,王荫长,韩召军,等.两种稻飞虱对杀虫剂的敏感性比较[J]. 南京农业大学学报,2003,26(2): 29-32.
[9] 刘泽文,韩召军,张玲春.褐飞虱抗甲胺磷品系的交互抗性和抗性生化机制[J]. 昆虫学报,2002,45(4): 447-452.
[10] 孙鲁娟,高希武,郑炳宗.棉蚜抗氧化乐果品系及敏感品系羧酸酯酶性质的比较[J]. 昆虫学报,2002,45(6): 724-727.
[11] 刘泽文,韩召军.褐飞虱对马拉硫磷的抗性遗传和交互抗性研究 [J]. 华东昆虫学报,2003b,12(1): 19-23.
[12] 聂秋林,梁 沛,高希武,等.杀虫药剂混用对棉铃虫乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的联合抑制作用研究[J].农药学学报,2002,4(3):43-49.
[13] Mouches C, Magnin M, Berge J B, et al. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant Culex mosquitoes and their presence in other insects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2113-2116.