

绿盲蝽乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立

李国平¹,周晓静²,封洪强¹,田彩红¹,邱 峰¹

(1. 河南省农业科学院 植物保护研究所,河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 植物保护学院,河南 郑州 450002)

摘要: 为明确绿盲蝽[*Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)]乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定的最佳反应条件,采用正交试验研究了酶浓度、底物浓度、反应时间、反应温度、反应体系 pH 值 5 个因素对绿盲蝽三龄若虫 AChE 活性测定的影响。通过极差分析和方差分析发现,各因素对 AChE 活性测定影响的大小顺序为:反应时间>酶浓度>底物浓度>pH 值>反应温度。绿盲蝽若虫 AChE 活性测定的最适反应条件为:酶浓度 6 头/mL、底物浓度 6 mmol/L、反应时间 5 min、反应温度 35 ℃、pH 值 8.0。

关键词: 绿盲蝽; 乙酰胆碱酯酶; 正交试验; 活性测定; 反应体系

中图分类号: S433.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0088-04

Establishment of Optimal Reaction System for Assaying Acetylcholinesterase Activity of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)

LI Guo-ping¹, ZHOU Xiao-jing², FENG Hong-qiang¹, TIAN Cai-hong¹, QIU Feng¹

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to clarify the optimal conditions for assaying the activity of acetylcholinesterase (AChE) from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür), the concentrations of AChE and substrate, reaction time, temperature and pH of reaction system were determined by orthogonal experiment. L₂₅ (5⁶) orthogonal matrix was adopted, without considering interaction. Through analyzing the data from orthogonal experiment with range analysis and variance analysis, the effects on the activity of AChE were in the order of time>concentration of AChE>concentration of substrate>pH>temperature, and it was found that the optimal conditions for determining AChE activity were as enzyme concentration of 6 larvae/mL, substrate concentration of 6 mmol/L, reaction time of 5 min, reaction temperature of 35 ℃, and pH 8.0.

Key words: *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür); acetylcholinesterase; orthogonal experiment; activity determination; reaction system

绿盲蝽[*Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)]属半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae),是我国棉花上的重要害虫,在棉花各个生长时期均可造成严重危害^[1]。近年来,随着转 *Bt* 基因抗虫棉大面积种植,棉铃虫得到了有效控制,化学农药的施用频率降低,使得原来的次要害虫绿盲蝽上升为棉田主要害虫^[2-6]。目前,对绿盲蝽的防治仍以施用化学杀虫剂为主,特别是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂^[7-8],这 2 类农药的作用机制是通过使昆虫体内的乙酰胆碱酯酶

(AChE)活性部位磷酸化或氨基甲酰化而抑制 AChE 的活性,使乙酰胆碱在突触间的作用时间延长,从而引起突触后膜乙酰胆碱受体的超兴奋,破坏正常的神经冲动传导,引起一系列的中毒症状^[9-11],直至死亡。AChE 敏感度降低是昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的重要机制之一^[12]。有研究报道,豆荚草盲蝽(*Lygus hesperus* Knight)对有机磷杀虫剂产生抗性的主要原因是抗性种群体内 AChE 的敏感度较敏感种群降低了 34 倍^[13]。

收稿日期:2013-08-04

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201103012-7);国家自然科学基金项目(11171199);河南省科技重点攻关项目(122102110058)

作者简介:李国平(1976-),女,河北迁安人,副研究员,博士,主要从事昆虫毒理学研究。E-mail:liguoping1976@163.com

据报道,目前在河北、河南、山东、安徽等省棉区绿盲蝽对马拉硫磷、灭多威等已经产生了低水平的抗性^[14]。为了解绿盲蝽对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性机制,有必要研究其体内靶标酶 AChE 的活性。尽管 AChE 活性的测定方法已很成熟,但研究表明,不同个体甚至相同个体不同组织的同一种酶,其活性测定的最适反应条件不尽一致,通常改变的是最适 pH 值、底物浓度以及反应温度^[15],关于绿盲蝽 AChE 的活性测定方法至今还未见报道。本研究采用正交试验^[16]分析多个变量对绿盲蝽 AChE 活性的影响,以找出最佳的测定条件组合,为今后研究绿盲蝽抗药性机制提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

供试虫源:绿盲蝽于 2007 年采自河南省周口市淮阳县棉田,在室内饲养 60 代以上。养虫室温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $80\% \pm 5\%$,L:D=14:10。

供试试剂:碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCh)为 Fluka 公司产品;5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)为 Roth 公司产品;考马斯亮蓝 G-250 为英国进口分装;其他试剂均为国产分析纯。

试验仪器:玻璃匀浆器(规格 1 mL)购自上海博通经贸有限公司;UV-2450 型紫外分光光度计购自日本岛津公司;5415R 型冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 正交试验设计 针对影响酶促反应的主要因素,酶浓度、底物浓度、反应时间、反应温度和反应体系的酸碱度,分别设 5 个水平,采用 $L_{25}(5^6)$ 正交表,共 25 个处理(表 1)。

表 1 正交试验中的因素及水平

水平	因素				
	酶浓度 (A)/ (头/mL)	底物浓度 (B)/ (mmol/L)	反应时间 (C)/ min	反应温度 (D)/ $^\circ\text{C}$	pH (E)
1	2	1	5	25	6.0
2	4	2	10	30	6.5
3	6	4	15	35	7.0
4	8	6	20	40	7.5
5	10	8	25	45	8.0

注:不同酶浓度以相同缓冲液提取不同头数的绿盲蝽来反映。

1.2.2 酶液制备 将不同头数(表 1)的绿盲蝽三龄若虫在预冷的不同 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(含 0.1% Triton X-100)中冰浴匀浆 1~2 min,

以形成均匀一致的浅绿色为标准,迅速将匀浆液于 4°C 、12 000 g 离心 20 min,上清液即为酶液。

1.2.3 AChE 活性测定 采用 Gorun 等改进的 Ellman 方法^[17-18]测定。取待测酶液 0.1 mL 与 0.1 mL ATCh(底物)混匀,按照正交表 $L_{25}(5^6)$ 所列的 25 个处理组合分别在不同温度水浴中反应一定时间后,加入 3.6 mL DTNB 显色剂(含 40%乙醇)显色并终止反应,在 412 nm 处测定吸收值,酶活性以每毫克蛋白质每分钟水解底物的毫摩尔数来表示 $[\text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]$ 。每处理重复 3 次,每重复进行 3 次测定。

1.2.4 蛋白质含量测定 蛋白质含量测定参考 Bradford^[19]的考马斯亮蓝 G-250 法。取含 10~120 μg 酶蛋白的溶液于试管中,用含 0.1% Triton X-100 的磷酸缓冲液稀释至 0.5 mL,然后加入 2.5 mL 考马斯亮蓝,充分混和,2 min 后于 595 nm 测定吸收值,空白对照加入含 0.1% Triton X-100 的磷酸缓冲液 0.5 mL。每样品重复测定 3 次。

1.3 数据分析

采用 DPS 软件进行极差分析和方差分析,并用 SSR 进行多重比较^[20]。

2 结果与分析

2.1 绿盲蝽 AChE 比活力正交试验结果的极差分析

不同处理组合中绿盲蝽 AChE 比活力的测定结果见表 2。根据极差分析结果,各因素影响的大小顺序为:反应时间>酶浓度>底物浓度>pH 值>反应温度,反应时间的极差值最大,说明该因素对绿盲蝽若虫 AChE 比活力测定的影响最大。从表 2 还可以看出各因素的最优水平,A、B、C、D、E 的最佳水平分别为 3、4、1、3、5。

2.2 绿盲蝽 AChE 比活力正交试验结果的方差分析

正交试验结果的极差分析较为简便、直观,但是因为计算比较粗放,不能给出误差大小的估计,因而进一步对试验结果进行方差分析。经过 F 检验,不同处理组合间绿盲蝽 AChE 的比活力有极显著差异($F=153.467, P=0.0001$),5 个因素对绿盲蝽 AChE 比活力的测定也均有极显著影响($P<0.01$),根据 F 值的大小,其影响大小顺序为反应时间>酶浓度>底物浓度>pH 值>反应温度(表 3),与极差分析得出的结果完全一致。进一步对各因素不同水平的平均值进行差异显著性检验,结果表明,在酶浓度的第 3 水平、底物浓度的第 4 水平、反应时间的第 1 水平、反应温度的第 3 水平、pH

表 2 $L_{25}(5^6)$ 正交试验结果及极差分析

试验编号	因素					AChE 比活力/ [mmol/(min·mg)]
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.257 7±0.016 2
2	1	2	2	2	2	0.154 0±0.002 3
3	1	3	3	3	3	0.157 3±0.000 9
4	1	4	4	4	4	0.226 6±0.002 3
5	1	5	5	5	5	0.188 9±0.001 4
6	2	1	2	3	4	0.175 3±0.003 5
7	2	2	3	4	5	0.128 2±0.001 6
8	2	3	4	5	1	0.067 9±0.000 8
9	2	4	5	1	2	0.065 0±0.000 2
10	2	5	1	2	3	0.418 4±0.015 3
11	3	1	3	5	2	0.178 2±0.001 8
12	3	2	4	1	3	0.157 0±0.001 9
13	3	3	5	2	4	0.149 7±0.001 9
14	3	4	1	3	5	1.003 6±0.011 3
15	3	5	2	4	1	0.352 5±0.001 9
16	4	1	4	2	5	0.101 7±0.001 1
17	4	2	5	3	1	0.067 9±0.001 5
18	4	3	1	4	2	0.309 7±0.005 4
19	4	4	2	5	3	0.261 4±0.002 5
20	4	5	3	1	4	0.218 7±0.004 1
21	5	1	5	4	3	0.092 5±0.001 0
22	5	2	1	5	4	0.484 8±0.002 7
23	5	3	2	1	5	0.261 7±0.009 4
24	5	4	3	2	1	0.147 0±0.001 2
25	5	5	4	3	2	0.139 8±0.001 6
K_1	2.953 34	2.416 05	7.422 79	2.880 26	2.679 12	
K_2	2.564 20	2.975 82	3.614 62	2.912 70	2.540 37	
K_3	5.523 14	2.838 94	2.488 36	4.632 00	3.259 86	
K_4	2.878 32	5.110 90	2.078 90	3.328 33	3.765 05	
K_5	3.377 49	3.954 79	1.691 83	3.543 19	5.052 09	
k_1	0.196 89	0.161 07	0.494 85	0.192 02	0.178 61	
k_2	0.170 95	0.198 39	0.240 97	0.194 18	0.169 36	
k_3	0.368 21	0.189 26	0.165 89	0.308 80	0.217 32	
k_4	0.191 89	0.340 73	0.138 59	0.221 89	0.251 00	
k_5	0.225 17	0.263 65	0.112 79	0.236 21	0.336 81	
极大值	0.368 21	0.340 73	0.494 85	0.308 80	0.336 81	
极小值	0.170 95	0.161 07	0.112 79	0.192 02	0.169 36	
R	0.197 26	0.179 66	0.382 06	0.116 78	0.167 45	
调整后 R	0.176 44	0.160 69	0.341 73	0.104 45	0.149 77	
因素影响顺序	2	3	1	5	4	
最佳水平	3	4	1	3	5	

注: K_i 代表各因素 i 水平下比活力值的总和, k_i 代表 K_i 的平均值, R 表示极差。

表 3 正交试验结果方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
A	0.377 40	4	0.094 35	2 970.018**
B	0.312 00	4	0.078 00	2 455.525**
C	1.447 00	4	0.361 76	11 387.950**
D	0.135 60	4	0.033 89	1 066.868**
E	0.274 90	4	0.068 72	2 163.329**
误差	0.001 52	54	0.000 03	
总和	2.683 41	74		

注: ** 代表影响达极显著水平 ($P < 0.01$)。

值的第 5 水平所测定的绿盲蝽 AChE 比活力最大, 均极显著高于同因素其他水平下的测定结果(表 4)。

综合极差分析和方差分析结果, 5 个因素对测定绿盲蝽若虫 AChE 的比活力均有影响, 因此在测定时应加以控制。选择各因素的最优水平, 可以得到测定绿盲蝽三龄若虫 AChE 活性的最佳反应条件组合: 酶浓度为 6 头/mL, 底物浓度为 6 mmol/L, 反应时间为 5 min, 反应温度为 35 ℃, pH 值为 8.0。

表 4 正交试验 5 个影响因素各水平的多重比较(SSR 检验)

水平	AChE 比活力/[mmol/(min·mg)]				
	A	B	C	D	E
1	0.196 89cC	0.161 07eE	0.494 85aA	0.192 02dD	0.178 61dD
2	0.170 95dD	0.198 39cC	0.240 97bB	0.194 18dD	0.169 36eE
3	0.368 21aA	0.189 26dD	0.165 89cC	0.308 80aA	0.217 32cC
4	0.191 89cC	0.340 73aA	0.138 59dD	0.221 89cC	0.251 00bB
5	0.225 17bB	0.263 65bB	0.112 79eE	0.236 21bB	0.336 81aA

注:同列数据后不同小写字母和大写字母分别表示差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

3 结论与讨论

本研究首次应用正交试验确定了绿盲蝽 AChE 反应的最适条件,为今后研究绿盲蝽 AChE 奠定了基础。酶浓度对酶活性测定的影响比较复杂,当其达到一定水平,继续增加酶浓度,酶活性也不再增加^[21]。在本试验中,当绿盲蝽 AChE 浓度增大到 8 头/mL 和 10 头/mL 时,反应速度反而有所下降,这可能是由于酶浓度过大时,酶分子过量,游离酶分子的存在对中间产物(或活化络合物)转变为最终产物有一定的影响而造成的。有研究表明,过量的底物会抑制 AChE 活性,因此需要确定合适的底物浓度^[22],本研究中绿盲蝽 AChE 的最适底物浓度为 6 mmol/L,低于或高于该浓度,AChE 活性有所下降。大多数物种的 AChE 最适 pH 值都是 8.0 左右,如果 pH 值高于 8.0,显色剂 DTNB 会发生自发水解,使测定值偏大^[12],本试验中,绿盲蝽 AChE 的最适 pH 值为 8.0。温度在整个反应体系中也是非常重要的,这是因为温度升高不但能加快酶反应速度,而且还会引起酶蛋白变性,因此最适温度是二者的平衡点,但不同的酶或不同来源的同一种酶,其反应的最适温度可能不同,本研究中绿盲蝽 AChE 的最适反应温度为 35℃。酶反应动力学表明:反应时间与酶活性在一定范围内呈线性关系,当酶解产物达到一定浓度后,会对酶产生反馈抑制作用,因而反应会随着时间延长越来越慢^[22],在本研究设定的反应时间范围内,最短时间(5 min)测到了最大的比活力,随着时间延长,所测比活力下降,因此将最佳反应时间定为 5 min。通过正交试验,得到测定绿盲蝽三龄若虫 AChE 活性的最佳反应条件组合:酶浓度为 6 头/mL,底物浓度为 6 mmol/L,反应时间为 5 min,反应温度为 35℃,pH 值为 8.0。

参考文献:

- [1] 曹赤阳,万长寿.棉盲蝽的防治[M].上海:上海科学技术出版社,1983:1-60.
- [2] Wu K M, Lu Y H, Feng H Q, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin containing cotton[J]. Science, 2008, 321: 1676-1678.
- [3] Lu Y H, Wu K M, Jiang Y Y, et al. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China[J]. Science, 2010, 328: 1151-1154.
- [4] Li G P, Feng H Q, McNeil J N, et al. Impacts of transgenic

- Bt cotton on a non-target pest, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (Hemiptera: Miridae), in northern China [J]. Crop protection, 2011, 30(12): 1573-1578.
- [5] 张留江. 棉田绿盲蝽的药效筛选及防治对策[J]. 天津农业科学, 2007, 13(4): 58-59.
- [6] 刘宝生, 白义川, 张增海, 等. 棉田绿盲蝽的发生规律与防治技术[J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 53-54.
- [7] 李国平, 封洪强, 杨士敏, 等. 杀虫剂对黑苜蓿盲蝽(Hemiptera: Miridae)的毒力测定方法及 9 种杀虫剂的室内毒力测定[J]. 植物保护, 2009, 35(1): 132-135.
- [8] 李国平, 封洪强, 梁双双, 等. 四种杀虫剂亚致死剂量对黑盲蝽发育和繁殖的影响[J]. 昆虫学报, 2008, 51(12): 1260-1264.
- [9] Corbett J R, Wright K, Baillie A C. The biochemical mode of action of pesticides[M]. New York: Academic Press, 1984: 99-140.
- [10] Fournier D, Mutero A. Mini review: Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. Comparative Biochemistry Physiology, 1994, 108(1): 19-31.
- [11] Gunning R V, Moores G D, Devonshire A L. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 62: 147-151.
- [12] 唐振华. 昆虫抗药性及其治理[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [13] Zhu K Y, Brindley W A. Acetylcholinesterase and its reduced sensitivity to inhibition by paraoxon in organophosphate-resistant *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1990, 36(1): 22-28.
- [14] 谭瑶, 张帅, 高希武. 两种盲蝽的抗药性监测[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(2): 348-358.
- [15] Thompson H M. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates[J]. Ecotoxicology, 1999, 8(5): 369-384.
- [16] 李松岗. 实用生物统计[M]. 北京: 北京大学出版社, 2002: 304-315.
- [17] Gorun V, Proinov L, Baltescu V. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterase in crude enzymatic preparations[J]. Analytical Biochemistry, 1978, 86(1): 324-326.
- [18] 高希武. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍[J]. 昆虫知识, 1987, 24(4): 245-246.
- [19] 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(2): 248-254.
- [20] 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, 2007.
- [21] 汤方, 杨梅江, 高希武, 等. 黑翅土白蚁乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立及药剂敏感度比较[J]. 昆虫学报, 2008, 51(7): 714-719.
- [22] Fairbrother A, Marden B, Bennett J, et al. Methods used in determination of cholinesterase activity[M]//Minneau P. Chemicals in agriculture, Vol 2. Cholinesterase-inhibiting insecticides. Amsterdam: The Elsevier Science Publishers, 1999: 35-72.