

# 棉铃虫乙酰胆碱酯酶(AChE)的体躯 分布及部分纯化\*

高希武 周序国 王荣京 郑炳宗

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

**摘要** 该文研究了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 乙酰胆碱酯酶(AChE)的体躯分布及部分纯化技术。在幼虫和成虫体内均以头部 AChE 活性最高; AChE 在成虫和幼虫头、胸、腹部的活性分布分别为 78.2%、3.9%、17.9%和 90.3%、6.5%和 3.2%。通过用 Sepharose 4B 和 Sephadex G200 纯化后, AChE 的最高纯化倍数为 3.66 和 17.74 倍。样品和洗脱液中含有 Triton X-100 时, 纯化倍数明显高于无 Triton X-100 的处理组。

**关键词** 乙酰胆碱酯酶, 棉铃虫, 抗药性

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是一种世界性害虫, 目前仍以化学防治为主。有机磷和氨基甲酸酯是用于防治棉铃虫的两类最重要的杀虫药剂。通过对中文科技期刊(1985~1997年)、CAB(1992~1996年)和 AGRICOLA(1984~1996年)三个数据库光盘检索表明, 有关棉铃虫抗药性的文章分别为 42、97 和 52 篇, 占有关棉铃虫文献总量的 8%、11%和 23%。对 AGRICOLA 数据库分析表明, 1984~1996 年的 52 篇棉铃虫抗药性的文章中, 1992~1996 年占了 48 篇, 说明棉铃虫抗药性的问题近年来受到了人们的重视。据报道, 我国棉铃虫已经对有机氯、有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫药剂产生了不同程度的抗性<sup>[1~3]</sup>, 但是关于有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药剂的重要靶标酶——棉铃虫 AChE 的系统研究还未见报道。本文就棉铃虫 AChE 体躯分布以及部分纯化方法进行了研究, 报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试虫

棉铃虫采自山东省, 在室内用人工饲料饲养 3~4 代后用于试验。饲养的温度为 (26 ± 1) °C, 相对湿度为 70%~80%, 光照 L/D 为 16 h/8 h。6 龄幼虫或老熟幼虫和 7 日龄成虫用于 AChE 活性测定, 混合日龄成虫用于 AChE 的纯化。

### 1.2 试剂

碘化硫代乙酰胆碱(ATCh)为 Fluka 公司产品; 5, 5'-二硫双硝基苯甲酸

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39570487)

1997-11-25 收稿, 1998-04-23 收修改稿

(DTNB) 为 Roth 公司产品; 毒扁豆碱和 Sepharose 4B 为 Sigma 公司的产品; Sephadex G-200为 Aldrich 公司产品。

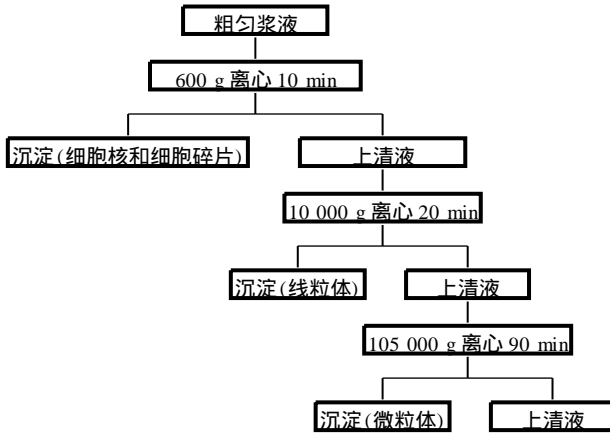


图 1 AChE 差速离心分离图

Fig. 1 Separation of acetylcholinesterase by method of differential centrifugation

### 1.3 AChE 纯化方法

1.3.1 AChE 活性测定: 采用 Gorun 等改进的 Ellman 等方法<sup>[4]</sup>, 用 Shimadzu UV-120-02 型分光光度计测定光密度值 (OD 值)。依据胸足着生的位置分别将幼虫和成虫分为头、胸、腹 3 段用于 AChE 活性体躯分布研究。

1.3.2 AChE 差速离心分离: 取棉铃虫成虫或幼虫的头, 按 50 个头/10mL 缓冲液 (pH7.5, 0.1mol/L 在需要时加入 0.5% 的 Triton X-100) 在液氮中匀浆。将匀浆液按图 1 进行差速离心。

1.3.3 凝胶柱层析: 将 Sephadex G200 在蒸馏水中溶胀 72 h 后抽气装柱, 柱长 40 cm, 直径为 1.6 cm。在 5 恒温箱中用洗脱液洗 2 个柱体积后备用。

Sepharose 4B 柱直径为 1 cm, 柱长为 20 cm, 将 Sepharose 4B 商品抽气后直接装柱。在 5 恒温箱中用洗脱液洗 2 个柱体积后备用。

Sephadex G200 和 Sepharose 4B 柱上样量分别为 2 mL 和 4 mL, 5 用 0.5 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液 (pH7.5, 0.1 mol/L, 洗脱液分两种含或不含 0.5% Triton X-100) 进行洗脱, 洗脱速度为 1 mL/15 min, 用 BS-160A 型部分收集器收集洗脱液。洗脱一定时间后 (Sephadex G-200 柱为 12 h, Sepharose 4B 为 6 h) 分别测定各洗脱管的酶活性和蛋白质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫 AChE 的体躯分布

表 1 显示出棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 主要集中在头部。成虫和幼虫头部 AChE 活性分别占总活性的 78.2% 和 90.3%。棉铃虫成虫头部的比活力明显高于幼虫, 成虫约为幼虫的 7 倍。

表 1 棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性体躯分布\*

Table 1 Body distribution of acetylcholinesterase activity in cotton boll worm

体段 Body segment	成虫 Adult		幼虫 Larva	
	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution
头 Head	1278.66 ± 8.82	78.2	174.46 ± 2.64	90.3
胸 Thorax	63.27 ± 0.72	3.9	12.49 ± 0.31	6.5
腹 Abdomen	292.58 ± 13.07	17.9	6.22 ± 0.39	3.2

\* mOD/ (min · mg)

## 2.2 棉铃虫 AChE 的亚细胞分布

表 2 和表 3 分别显示出棉铃虫成虫和老熟幼虫 AChE 的亚细胞分布。成虫和幼虫头部 AChE 的活性主要集中在线粒体层, 其次为微粒体层、细胞核及细胞碎片和上清液层。说明棉铃虫头部 AChE 主要以膜结合的形式存在。用非离子型表面活性剂 Triton X-100 处理后, 成虫、幼虫头部 AChE 的活性相对集中在微粒体层, 而在其它亚细胞层次中的分布趋于均一。成虫和幼虫上清液层比活力, Triton X-100 处理组比无 Triton X-100 分别提高 4.1 和 3.3 倍, 分布百分率分别提高 10.4 和 3.1 倍。

表 2 棉铃虫成虫头部 AChE 亚细胞分布 \*

Table 2 Subcellular distribution of acetylcholinesterase from head of cotton boll worm adult

亚细胞层 Subcellular fraction	不含 Triton X-100 Without Triton X-100		含 Triton X-100 With Triton X-100	
	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution
细胞核及细胞碎片 Cell nucleus and cell debris	0.596 ±0.020	13.48 ±0.19	0.447 ±0.003	25.43 ±0.01
线粒体 Mitochondrion	2.257 ±0.213	25.04 ±2.45	0.313 ±0.009	17.80 ±0.29
微粒体 Microsome	1.484 ±0.036	33.56 ±2.03	0.652 ±0.001	37.09 ±0.23
上清液 Supernatant	0.085 ±0.003	1.92 ±0.03	0.346 ±0.005	19.68 ±0.10

\* OD/ (min ·mg)

表 3 棉铃虫幼虫 AChE 的亚细胞分布 \*

Table 3 Subcellular distribution of acetylcholinesterase from head of cotton boll worm larva

亚细胞层 Subcellular fraction	不含 Triton X-100 Without Triton X-100		含 Triton X-100 With Triton X-100	
	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution	比活力 Specific activity	分布 (%) Distribution
细胞核及细胞碎片 Cell nucleus and cell debris	0.133 ±0.001	17.23 ±0.08	0.480 ±0.00	55.36 ±1.54
线粒体 Mitochondrion	0.454 ±0.012	58.81 ±1.26	0.097 ±0.010	11.19 ±0.60
微粒体 Microsome	0.153 ±0.011	19.82 ±1.29	0.183 ±0.030	21.11 ±2.94
上清液 Supernatant	0.032 ±0.00	4.15 ±0.01	0.107 ±0.003	12.34 ±1.59

\* OD/ (min ·mg)

## 2.3 棉铃虫 AChE 的部分纯化

表 4 显示出棉铃虫 AChE 经 Sephadex G200 和 Sepharose 4B 部分纯化后的结果。用 Sephadex G200 纯化后酶活性峰的最大比活力为 2.323 OD / (mg ·min) (无 Triton X-100) 和 5.731 OD / (mg ·min) (含 Triton X-100), 纯化倍数分别为 8.07 和 17.74 倍。而 Sepharose 4B 纯化时酶活性峰最大比活力仅为 0.529 OD / (mg ·min) (无 Triton X-100) 和 1.181 OD / (mg ·min) (含 Triton X-100), 纯化倍数分别为 1.84 和 3.66 倍。上

述结果表明当纯化体系中含有 Triton X-100 时纯化倍数较大, 这可能与 Triton X-100 使聚合的 AChE 解聚有关。

Sephadex G200 的纯化效果明显优于 Sepharose 4B, 相差 4~5 倍。图 2 和图 3 显示出 Sephadex G200 和 Sepharose 4B 纯化棉铃虫成虫 AChE 的洗脱图谱。从图 3 可以看出 Sepharose 4B 洗脱图谱中仅有一个明显的 AChE 活性峰, 而蛋白质峰有两个。在 Sephadex G200 洗脱图谱 (图 2) 中, 洗脱体系中含有 Triton X-100 时, 有两个 AChE 活性峰, 一个在洗脱管数第 12 位, 峰比较高, 另一个小的峰出现在洗脱管数第 25 位。Sephadex G200 纯化效果优于 Sepharose 4B 可能与选择的柱长有关, Sephadex G200 柱柱长为 40 cm, Sepharose 4B 柱柱长为 20 cm。

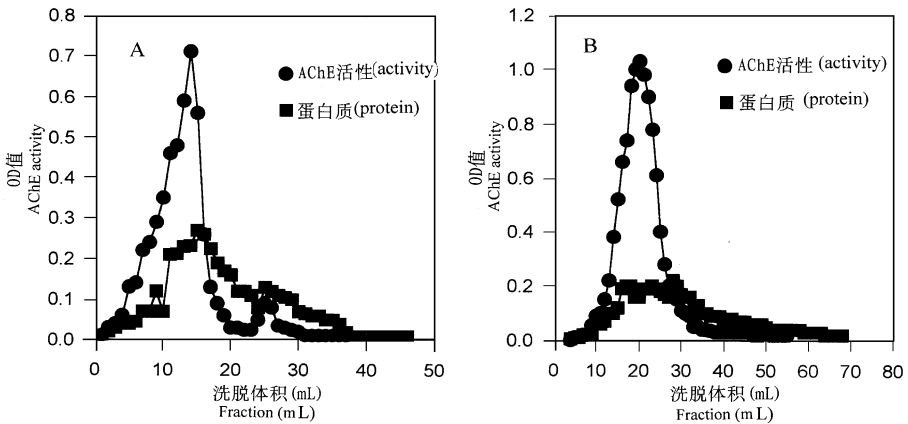


图 2 Sephadex G200 纯化棉铃虫成虫 AChE 的洗脱图谱

洗脱速度为 1 mL/15 min, 图 2A 洗脱液中不含有 Triton X-100; 图 2B 洗脱液中含有 Triton X-100

Fig. 2 Elution profile of acetylcholinesterase from head of cotton bollworm adult by Sephadex G200 chromatography

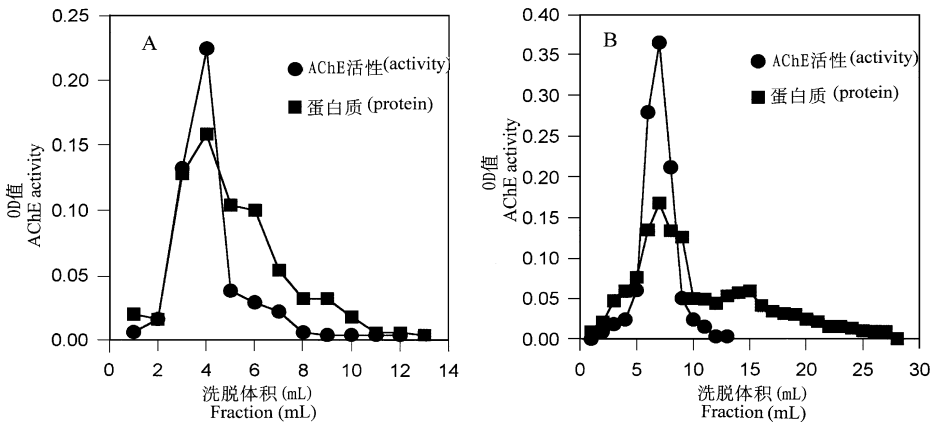


图 3 Sepharose 4B 纯化棉铃虫成虫 AChE 的洗脱图谱

洗脱速度为 1 mL/15 min, 图 3A 洗脱液中不含有 Triton X-100; 图 3B 洗脱液中含有 Triton X-100

Fig. 3 Elution profile of acetylcholinesterase from head of cotton bollworm adult by Sepharose 4B chromatography

表 4 棉铃虫成虫头部 AChE 的部分纯化结果<sup>\*</sup>

Table 4 Partial purification of acetylcholinesterase from head of cotton boll worm adult

纯化方法 Method of purification	Sephacrose 4B		Sephadex G200	
	无 Triton Without Triton	含 Triton With Triton	无 Triton Without Triton	含 Triton With Triton
粗匀浆比活力 Specific activity in crude homogenate	288	323	288	323
纯化后比活力 Specific activity of purified enzyme	529	1181	2323	5731
纯化倍数 Purified ratio	1.84	3.66	7.76	17.74
纯化后米氏常数 Km of purified enzyme	0.91 ±0.09	1.54 ±0.09	0.51 ±0.07	1.44 ±0.20
V max	485 ±11	641 ±13	244 ±10	614 ±23

\* AChE 的比活力单位为 mOD/(min·mg);  $K_m$  值单位为 mmol/L

### 3 讨论

AChE 主要分布于动物的神经系统和脊椎动物的红血球及肌肉中。在双翅目昆虫中, 大部分酶活性集中在头部, 约占总活性的 65%~90%, 其余集中在胸部<sup>[5]</sup>。Xu 和 Bull<sup>[6]</sup> 的试验表明骚扰角蝇头部 AChE 占 85%, 胸部占 12%, 而腹部仅占 3%。棉铃虫成虫和幼虫 AChE 的分布与双翅目昆虫类似, 头部活性分别占 78.2% 和 90.3%。而在棉铃象甲 *Anthonomus grandis* 中, 55% 的活性在腹部, 胸部仅占 5%, 头部占 40%<sup>[7]</sup>。关于大蜡螟 *Galleria mellonella* AChE 分布研究表明, 3 日龄成虫头部 AChE 活性为 2.16 mol/h, 在脂肪体和血淋巴中没有检测到 AChE 的活性, 可是胸部肌肉的 AChE 活性确高达 1.35 mol/h; 在幼虫中, 以中枢神经系统活性为最高, 脂肪体中活性非常低, 血淋巴中也没有检测到活性; 在未成熟的卵和未受精成熟卵以及卵巢中没有检测到 AChE 活性, 但是, 在受精卵和睾丸中却发现了 AChE 活性, 睾丸中 AChE 的比活力值与末龄幼虫头部相近<sup>[8]</sup>。

差速离心的结果显示, 棉铃虫 AChE 主要以膜结合蛋白形式存在, 其活性主要集中在膜层。用 Triton X-100 处理后, 棉铃虫 AChE 的活性相对集中在微粒体层, 上清液层 AChE 活性分布显著提高。Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂, 它可以先与蛋白质的疏水区形成分子团, 再与膜脂结合形成共胶束 (Comicelle)<sup>[9]</sup> 使 Triton X-100 与膜的亲和性提高<sup>[10]</sup>, 使 AChE 从膜上置换下来。此外, Triton X-100 对 AChE 的多聚体具有解聚作用。Zhu 等<sup>[11]</sup> 对豆荚草盲蝻 AChE 研究表明, Triton X-100 处理后, AChE 活性 90% 分布在 10 000 g 离心 20 min 后的上清液中, 而无 Triton X-100 时上清液中 AChE 活性仅占 52%。在本研究中, 棉铃虫成虫和幼虫匀浆液 10 000 g 离心 20 min 后, 上清液 AChE 活性有 Triton X-100 时分别 45% 和 47%, 而无 Triton X-100 时仅为 28% 和 21%。在其它一些昆虫中也得到了类似的结果<sup>[12]</sup>。

AChE 纯化是对 AChE 性质进行详细研究的基础。粗匀浆液中除 AChE 外, 还混有其它的蛋白质, 尤其是水解酶类对反应的结果可能会有影响。在反应中这些杂蛋白可能会降解 AChE 的抑制剂或作为结合蛋白使抑制剂有效浓度降低<sup>[13~15]</sup>。为了避免上述情

况的发生,需要对昆虫的 AChE 进行纯化。常用的纯化方法包括离心、盐析、凝胶过滤、离子交换层析和亲和层析等。目前,亲和层析对 AChE 的纯化效果较好, Gnagey 等<sup>[16]</sup>, Bonning 等<sup>[17]</sup>, Zhu 和 Brindley<sup>[18]</sup>以及 Xu 和 Bull<sup>[6]</sup>利用亲和层析技术对黑尾果蝇、尖音库蚊、豆荚草盲蝽和西方角蝇 AChE 的纯化效果分别达 4 000、350、600 和 273 倍。本研究对棉铃虫 AChE 的部分纯化使用的是离心和凝胶过滤方法。Sephadex G200 是一种葡聚糖凝胶,干胶粒的颗粒直径为 40~120 $\mu\text{m}$ ,对球蛋白最适分段分离范围在  $5 \times 10^3 \sim 8 \times 10^5\text{D}$  之间, Sepharose 4B 是一种琼脂糖凝胶,颗粒直径 40~190 $\mu\text{m}$ ,对球蛋白最适分段分离范围  $10^4 \sim 2 \times 10^7\text{D}$ 。许多研究表明昆虫的 AChE 以球状的 G 型蛋白为主<sup>[19]</sup>,沉降系统在 5~7s 之间,对家蝇的研究表明,相当于分子量  $8 \times 10^4\text{D}$  的球状催化亚基单体<sup>[20]</sup>。尽管昆虫 AChE 在分离过程可能会以多种聚集体的形式存在,也超不出上述分子筛的工作范围。本试验中,首先用 G25 柱脱去样本中的色素,然后过 Sephadex G200 或 Sepharose 4B 柱,从分离的效果来看 Sephadex G200 柱好于 Sepharose 4B 柱。可能与 Sephadex G200 柱 (1.6 cm  $\times$  40 cm) 比 Sepharose 4B 柱 (1.0cm  $\times$  20cm) 长有关,尤其在用 Triton X-100 处理后,棉铃虫 AChE 解聚,出现一些分子量相对较低的 AChE 分子型。这些分子型对于粒径较大的 Sepharose 4B 来讲,无法分离或分离不完全。因此,在用了 Triton X-100 后, Sepharose 4B 柱的最高纯化倍数也只有 3.7 倍,而 Sephadex G200 柱可达 17.7 倍。本试验虽然仅用了上述两类分子筛,尤其是 Sepharose 4B 对棉铃虫 AChE 的纯化效果不明显,但与已有的研究相比,分离效果还是比较一致的。Brestkin 等<sup>[21]</sup>使用凝胶层析的方法对麦二叉蚜进行了部分纯化,在 Triton X-100 存在的条件下,纯化了 3 倍。Zhu 等<sup>[11]</sup>用 Sephadex G200 柱 (含 Triton X-100) 将豆荚草盲蝽 AChE 仅纯化了 6.4 倍。

## 参 考 文 献

- 1 高希武, 郑炳宗, 林 彬. 棉铃虫抗药性的毒理学和生物化学. 生命科学进展. 中国科协第二届青年学术年会执行委员会编, 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 365~372
- 2 慕立义, 王开运. 我国北方棉铃虫抗药性现状. 农药, 1988, 27: 5~6
- 3 谭建国, 谭福杰, 尤子平. 棉铃虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性监测和抗性选择. 南京农业大学学报 (增刊), 1987, 36~41
- 4 Gorun V, Proinov I, Baltescu V *et al.* Modified Ellman procedure for assay of cholinesterase in crude enzymatic preparations. *Anal. Biochem.*, 1978, 86: 324~326
- 5 Melanson S W, Yun C H, Pezzementi M L. Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, 81C: 87~96
- 6 Xu G, Bull D L. Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: Muscidae): distribution and purification. *J. Econ. Entomol.*, 1994, 87: 20~26
- 7 Bull D L, Lindquist D A. Cholinesterase in bollweevils *Anthonomus grandis*: . Distribution and some properties of the crude enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, 25: 639~649
- 8 Habibulla M, Newburgh R W. Studies of acetylcholinesterase of the central nervous system of *Galleria mellonella*. *Insect Biochem.*, 1973, 3: 231~242
- 9 Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, New York: Wiley, 1979

- 10 Wallach D F H, Winzler R J. Evolving Strategies and Tactics in Membrane Research, New York: Springer, 1974
- 11 Zhu K Y, Brindley W A, Hsiao T H. Isolation and partial purification of acetylcholinesterase from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). J. Econ. Entomol., 1991, 84: 790 ~ 794
- 12 Siegfried B D, Scott J G. Properties and inhibition of acetylcholinesterase in resistant and susceptible German cockroaches (*Blattella germanica* L.). Pestic. Biochem. & Physiol., 1990, 38: 122 ~ 129
- 13 Heymann E. Carboxylesterase and amidases. In: Jakoby W B ed. Enzyme Basis of Detoxication. New York: Academic Press, 1980, 291 ~ 323
- 14 Devonshire A L, Moores G D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae*). Pestic. Biochem. & Physiol., 1982, 18: 235 ~ 246
- 15 Motoyama N, Kao L R, Lin P T *et al.* Dual role of esterases in insecticide resistance in the green rice leafhopper. Pestic. Biochem. & Physiol., 1984, 21: 139 ~ 147
- 16 Gnagey A, Forte M, Rosenberry T L. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. J. Biol. Chem., 1987, 262: 13 290 ~ 13 298
- 17 Bonning B C, Malcolm C A, Hemingway J. Purification and characterization of acetylcholinesterase from *Culex pipiens* Say. Pestic. Sci., 1988, 24: 278 ~ 280
- 18 Zhu K Y, Brindley W A. Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). J. Econ. Entomol., 1992, 84: 790 ~ 794
- 19 Toutant J P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog. Neurobiol., 1989, 32: 423 ~ 446
- 20 Steele R W, Smallman B N. Acetylcholinesterase from the housefly head: affinity purification and subunit composition. Biochem. Biophys. Acta, 1976, 445: 158 ~ 168
- 21 Brestkin A P, Maizel E B, Moraler S N *et al.* Cholinesterases of aphids: isolation, partial purification and some properties of cholinesterases from spring grain aphid *Schizaphis graminum* (Rond). Insect Biochem., 1985, 15: 309 ~ 314

## DISTRIBUTION AND PURIFICATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN COTTON BOLL WORM (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Gao Xiwu      Zhou Xuguo      Wang Rongjing      Zheng Bingzong

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** Body distribution and partial purification of acetylcholinesterase (AChE) were investigated in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). The head, thorax and abdomen possessed 78.2%, 17.9% and 3.9% of total AChE activities in the 7<sup>th</sup>-day adult, while in the sixth instar larva, the percentages were 90.3%, 6.5% and 3.2% respectively. Eighteen times of the purified factors in AChE activities were obtained by Sephadex G200, but only four times by Sepharose 4B in column chromatography. The purified factors of AChE were higher with Triton X-100 than without Triton X-100 in eluant.

**Key words** acetylcholinesterase, *Helicoverpa armigera*, insecticide resistance