

酯酶同功酶在分析亚洲玉米螟抗药性中的应用

尚 稚 珍

许 文 娜

(南开大学元素有机化学研究所,天津) (北京农业大学土化系)

提 要

以聚丙烯酰胺凝胶电泳法对室内选育的亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* (Guenée)) 抗杀灭菊酯和抗呋喃丹品系的酯酶同功酶进行分析,并与感性品系比较,差异十分明显,为鉴别害虫抗药性的遗传变异提供了有价值的依据,并从方法学的几个侧面进行探讨,为广泛研究害虫抗药性机理做一些基础工作。

关键词 亚洲玉米螟,酯酶同功酶,抗药性,杀灭菊酯,呋喃丹

同功酶是具有相同或相似的催化功能而分子结构不同的一类酶,也是染色体上同一基因位点上不同的等位基因或不同基因编码的。用电泳技术研究同功酶日益普及,根据酶带的变化已作为鉴定物种、研究分类与进化,遗传与变异的重要指标^[1,2]。水解酶类,在昆虫中包括羧酸酯酶、磷酸酯酶、胆碱酯酶和其它酯酶及其同功酶。这些酯酶广泛参与杀虫剂的代谢,使杀虫剂酯键断裂水解,从而降低杀虫剂的毒力并且与抗药性密切相关。近年来,用酯酶同功酶作为种内抗性与感性品系的鉴定特征已在蚊虫及家蝇中有报道^[3-5],有人用欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) 为材料研究农业害虫的同功酶,采用淀粉凝胶电泳测定酶蛋白,分析两个对外激素有不同反应的品系间的遗传相似性^[4]。而利用亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* (Guenée)) 的酯酶同功酶研究其抗药性问题尚未见报道。我们以室内多年选育成功的抗性品系(抗杀灭菊酯及抗呋喃丹)与敏感品系为试材,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法比较亚洲玉米螟酯酶同功酶酶谱区带的变异,并以此变异做为获得抗药性的指标。

材 料 和 方 法

一、试验材料

由山东农业大学植保系提供。敏感种群采自黑龙江海林县三道河地区,无用药历史。两抗性品系由该种群经杀灭菊酯和呋喃丹等药剂累代四年选育而成,至30代时,抗杀灭菊酯品系已达40.3倍抗性,抗呋喃丹品系达30.2倍,以这两个抗性品系及敏感品系作为实验材料。

二、方法

1. 酶源的制备 取10头五龄幼虫与2ml pH 7.0、0.1mol/L的磷酸缓冲液及一定量的蔗糖溶液及苯基硫脲在玻璃匀浆器中匀浆后,以低温高速离心机在4℃,900g离心10分钟,取出上清液,再以10000g离心10分钟,取上清作为酶源,置于冰箱备用。

2. 参照莽克强(1975)电泳法^[6],用聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳,高pH不连续系统。分离胶浓度为6%,交联度2.5%,电极缓冲液为pH 8.7的Tris-甘氨酸缓冲液,0.1%溴酚蓝为前沿指示剂。每试样各取30 μ l酶源,用DY-III型稳压稳流电泳仪于8℃冰箱中电泳,电流为每胶板30mA,溴酚蓝移至前沿时,停止电泳。

3. 电泳胶染色 以 α -醋酸萘酯和 β -醋酸萘酯为底物,固蓝RR'盐为显色剂将电泳胶染色10分钟,然后以7%冰醋酸脱色,固定,最后以无离子水保存。

4. 酯酶酶谱的扫描 用岛津双波长CS-

900 型薄层扫描仪分析染色后的同功酶酶谱, 样品波长为 500nm, 参比波长为 700nm。

实验结果

一、抗性品系 (RF、RP) 与感性品系 (S) 酯酶同功酶的比较

由图 1 可清晰地分辨出, 感性品系 (S) 共有 12 条同功酶区带 (自负极向正极编号为 E₁、

E₂……E₁₂), 抗呋喃丹品系 (RF) 有 15 条区带 (E₁、E₂……E₁₅), 抗杀灭菊酯品系 (RP) 有 17 条区带 (E₁、E₂……E₁₇)。RF 区带中的 E₁、E₉ 及 E₁₀, RP 区带中的 E₁、E₃、E₇、E₁₀、E₁₁、E₁₃ 及 E₁₅ 与 S 品系有区别, S 品系的 E₁ 区别于 RF 和 RP 品系。从图 2 的扫描结果也能看出其差别。

二、羧酸酯酶同功酶酶谱的鉴别 采用羧酸酯酶专一性抑制剂 TPP (磷酸三苯酯) 处理

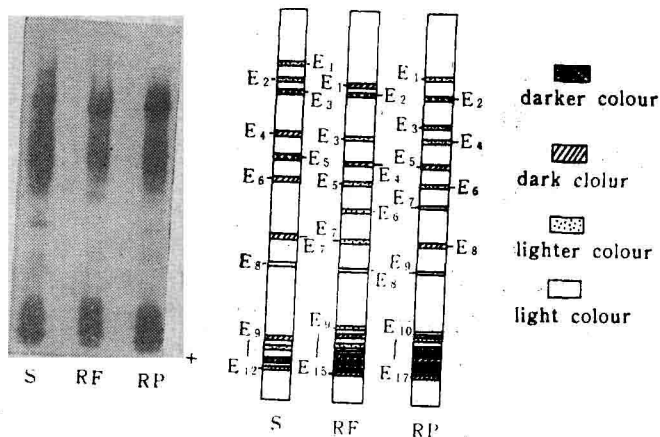


图 1 三品系酯酶同功酶酶谱
Fig. 1 zymograms of esterase isozymes of the three strains

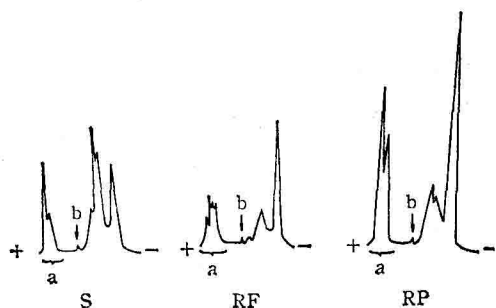


图 2 三品系酯酶同功酶酶谱扫描图
Fig. 2 The scanning pattern of the Fig. 1. zymograms

a: inhibited by TPP. b: inhibited by eserine.

电泳后的胶板, 然后再染色, 消失的区带即为羧酸酯酶 (图 2 中 a 及图 3)。可见这些羧酸酯酶酶谱分布在靠近正极的部位, 且三品系间羧酸酯酶同功酶区带的数目及电泳位置亦存在差别, S 品系有 4 条羧酸酯酶区带, RF 品系有 7 条。RP 品系有 8 条。

三、胆碱酯酶同功酶的鉴定 用专一性抑

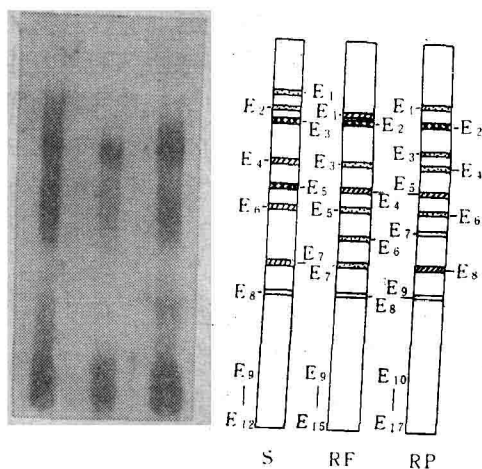


图 3 TPP 处理后的酯酶同功酶酶谱
(示羧酸酯酶被抑制)
Fig. 3 Zymograms of esterase isozymes treated with TPP
(Showing inhibited carboxylesterases)
(See the notes above)

制剂毒扁豆碱处理电泳胶板后再染色, S 品系

的 E₇、RF 品系的 E₇ 及 RP 品系的 E₆ 均消失 (图 2 中 b 部分及图 4), 此为胆碱酯酶, 在三品系间无明显的差别。

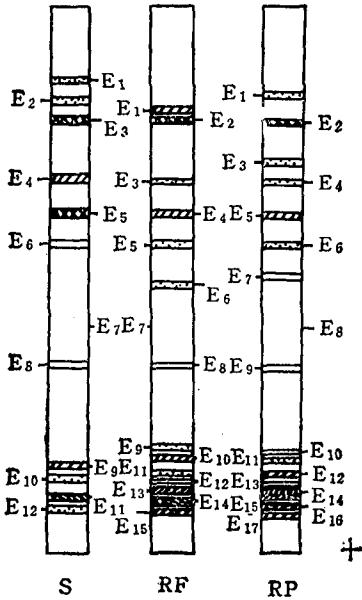


图 4 毒扁豆碱处理后的酯酶同功酶酶谱 (示胆碱酯酶被抑制)

Fig. 4 Zymograms of esterase isozymes treated with eserine (Showing inhibited cholinesterase) (See the notes above)

讨 论

1. 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析亚洲玉米螟酯酶同功酶, 敏感性品系与二抗性品系间表现出明显的差别, 这说明亚洲玉米螟具有预适应的抗性基因, 经杀虫剂的选择作用使这些基因得以表达, 经变异、遗传形成了高抗水平的抗性品系, 同功酶酶谱差别有重复性和相对稳定性, 由品系间酶带的变化可以推断出基因位点和等位基因的异同, 可以作为鉴别抗药性的

特征和指标。此法简单易行, 适用于其他螟蛾科害虫抗药性的研究, 经比较, 以 6% 凝胶浓度最为适宜, 既有较高的分辨率, 又具有一定的机械强度, 利于操作和保存。用固蓝 RR' 盐染色, 其效果比用固蓝 B 盐好, 后者染色背景较深, 不易脱色。染色液可先经过滤或离心, 去掉未溶解的固蓝 RR' 盐的颗粒。底物溶液以现用现配较好。染色以 10 分钟为宜, 时间过短不能使酶带充分着色, 时间过长则使凝胶背景加深, 影响分辨率。

2. 羧酸酯酶同功酶区带数目 RP 品系比 S 品系多, 电泳位置也不同, 这种变化可能与 RP 品系的抗药性有关, 将杀灭菊酯水解为酸、醇进一步代谢解毒。RF 品系羧酸酯酶同功酶数目也多于 S 品系, 亦可能与其抗性有关系。

3. 胆碱酯酶的同功酶中, 抗性品系与感性品系无明显差别。

采用电泳法与特定的显色剂以及抑制剂配合, 使酯酶得到分离和着色, 从而获得抗性种群间遗传变异的基本资料, 对于研究鳞翅目其它种类的害虫的抗药性有参考价值, 在农业害虫抗药性研究中具有实际意义。

承蒙山东农业大学植保系蔡立义先生、王开运老师指导并提供亚洲玉米螟试材, 本所龙韞先先生协助电泳酯酶酶谱扫描, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 彭统序. 昆虫知识, 1986; 23(4): 179
- 2 Georghiou G P. *J Econ Entomol*, 1978; 71(2): 201
- 3 李晶等. 昆虫学报, 1988; 31(2): 140
- 4 唐振华等. 昆虫学报, 1985; 28(2): 135
- 5 Wagner R P. *Ann Rev Entomol*, 1974; 19: 117
- 6 莽克强等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975

[本文于 1989 年 2 月 21 日收到]

APPLICATION OF ELECTROPHORETIC ESTERASE ISOZYME PATTERNS IN THE IDENTIFICATION OF INSECTICIDE-RESISTANT OF ASIAN CORN BORER

Shang Zhizhen (Shang Chihchen)

(Institute of element organic chemistry Nankai university, Tianjin)

Xu Wenna

(Department of soil-chemistry, Beijing agricultural university)

ABSTRACT

Polyacrylamide gel electrophoresis was used to determine esterase isozymes of three strains of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee). Two strains were insecticide-resistant and one was susceptible. It is suggested that there were distinct differences in the zymograms of the esterase isozymes among the three strains, especially carboxylesterase. The number of carboxylesterase bands of both resistant strains was more than that of the susceptible one, but there was no difference in their cholinesterase. The zymograms were taken as a criterion to differentiate the resistant strain from the susceptible one. The method is suitable for studying resistance of some other agricultural insects and some aspects of methodology were discussed. **Key words** *Ostrinia furnacalis* (Guenee), esterase isozyme, electrophoresis, resistant

(上接第156页)

以上结果表明,质粒 pKT230 通过三亲交配被转移至小肠结肠炎耶氏菌中。此外,在所检测的小肠结肠炎耶氏菌转移接合子中未发现 pRK2013 质粒的存在(材料未发表)。

在 pRK2013 的帮助下,质粒 pKT230 以大约 10^{-6} 的频率被诱动转移至大肠结肠炎耶氏菌中(见表 2)。

pKT230 是具有广泛寄主范围的质粒运载体。它已被证明能够在诱动质粒的帮助下转移进多种革兰氏阴性菌属中,并带有可以克隆外源基因的限制性酶切位点^[9]。本工作将这一转移系统运用到小肠结肠炎耶氏菌中,得到满意的结果,说明这是以小肠结肠炎耶氏菌为受体进行基因转移一种有效的遗传途径。

有文献报道 pRK2013 在诱动转移的同时,自己也以一定的频率进入受体细胞^[10]。本实验在二十多个小肠结肠炎转移接合子中,只检测到 pKT230 质粒,而未发现 pRK2013 的转入,这一点与文献报道不同。

质粒 pKT230 可以在含有毒力质粒的小肠结肠炎耶氏菌接合子中稳定地复制,无丢失现象。说明 pKT230 与毒力质粒互容。

承蒙包幼迪教授惠赠小肠结肠炎耶氏菌菌株,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Swaminathan B *et al.* *J Appl Bacteriol*, 1982; 52: 151
- 2 Zink D L *et al.* *Nature*, 1980; 283: 224
- 3 Laroche Y *et al.* *Plasmid*, 1984; 12: 67
- 4 Bakour R *et al.* *Plasmid*, 1983; 10: 279
- 5 Bagdasarian M *et al.* *Gene*, 1981; 16: 237
- 6 Figurski D H, Helinski D R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 1648
- 7 Higuchi K, Smith J L. *J Bacteriol*, 1961; 81: 605
- 8 Kado C I, Liu S T. *J Bacteriol*, 1981; 145: 1365
- 9 Gemski P *et al.* *Infect Immun*, 1980; 27: 682
- 10 Ditta G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 7347

[本文于1988年12月21日收到]