

文章编号:1003-4692(2008)05-0413-05

【论著】

羧酸酯酶与北京市不同城区德国小蠊 对有机磷杀虫剂抗性的关系

魏绪强^{1,2}, 钱坤², 曾晓芃², 高希武¹

【摘要】目的 研究羧酸酯酶在不同品系德国小蠊中的活性以及其在有机磷杀虫剂抗性形成中的作用。**方法** 以对有机磷杀虫剂敏感品系(SS)及采自北京市宣武区(XW)、昌平区(CP)、顺义区(SY)和石景山区(SJS)的德国小蠊野外品系为试虫材料,利用生物测定、生化分析及增效剂试验等方法研究羧酸酯酶与德国小蠊对有机磷杀虫剂抗性的关系。**结果** 增效剂 TPP 对马拉硫磷、敌敌畏的增效比在敏感品系中分别为 1.86 和 1.51 倍, TPP 对马拉硫磷的增效比在 XW、CP、SY 和 SJS 品系中分别为 5.79、20.08、15.26 和 4.74 倍; TPP 对敌敌畏的增效比在 XW、CP、SY 和 SJS 品系中分别为 2.00、1.67、2.16 和 4.81 倍。德国小蠊野外品系与敏感品系羧酸酯酶的米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})之间差异有统计学意义,敏感品系羧酸酯酶的 K_m 、 V_{max} 分别为 0.1580 mmol/L 和 58.4225 $\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$; 野外品系(XW、CP、SY 和 SJS)羧酸酯酶的 K_m 、 V_{max} 分别为 0.1279、0.1071、0.1080、0.1095 mmol/L 和 307.2550、338.5755、340.3300、212.4570 $\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$, 2 个品系的羧酸酯酶对马拉硫磷和敌敌畏的抑制作用也不同, 2 种有机磷药剂对敏感品系的抑制中量 I_{50} 分别为 17.64 mmol/L 和 0.91 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 对野外品系(XW、CP、SY 和 SJS)的 I_{50} 分别为 80.48、35.49、83.24、82.29 mmol/L 和 15.35、7.89、11.52、8.60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。**结论** 羧酸酯酶解毒代谢活性的增加是德国小蠊对有机磷杀虫剂产生抗性的机制之一。

【关键词】 德国小蠊; 羧酸酯酶; 有机磷杀虫剂; 抗性机制

中图分类号:R384.9; S482.3⁺3; S481⁺.4

文献标识码:A

Relationship between carboxylesterase in German cockroach (*Blattella germanica*) from different areas in Beijing and its resistance to organophosphate WEI Xu-qiang^{1,2}, QIAN Kun, ZENG Xiao-peng, GAO Xi-wu. 1 Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2 Department of Disinfection and Vector Control, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: ZENG Xiao-peng, E-mail:zengxp@yahoo.cn

[Abstract] Objective To study the role of carboxylesterase in the development of organophosphate resistance and the activity variance of carboxylesterase in different strains of German cockroach (*Blattella germanica*). Methods Relationship between carboxylesterase and organophosphate resistance in German cockroach was studied with bioassay, biochemical analysis and synergistic test. The cockroaches from the susceptible strain(SS) of laboratory and field strains of different areas in Beijing [Xuanwu(XW) district, Changping(CP) district, Shunyi(SY) district and Shijingshan(SJS) district] were used as test insects. Results The synergistic test showed that synergistic ratio of TPP to malathion and dichlorvos were 1.86 and 1.51 fold in susceptible strain, respectively. And in field strains (XW, CP, SY and SJS), they were 5.79, 20.08, 15.26 and 4.74 fold for malathion, respectively and 2.00, 1.67, 2.16 and 4.81 fold for dichlorvos, respectively. There was significant difference between the Michaelis-Menten constants(K_m) and the maximum velocity (V_{max}) of carboxylesterase from two strains of German cockroach. The K_m and V_{max} of carboxylesterase in susceptible strain were 0.1580 mmol/L and 58.4225 $\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$, respectively. And in field strains (XW, CP, SY and SJS), the K_m and V_{max} of carboxylesterase were 0.1279, 0.1071, 0.1080, 0.1095 mmol/L and 307.2550, 338.5755, 340.3300, 212.4570 $\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$, respectively. The inhibition medium concentration (I_{50}) of malathion and dichlorvos to carboxylesterase from SS strain were 17.64 mmol/L and 0.91 $\mu\text{mol}/\text{L}$, respectively. For field strains, the I_{50} of malathion were 80.48, 35.49, 83.24 and 82.29 mmol/L, respectively, and that of dichlorvos were 15.35, 7.89, 11.52 and 8.60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ respectively. The inhibition of malathion and dichlorvos to carboxylesterase from SS strain (I_{50}) were much lower than from field strains strain (XW, CP, SY and SJS). Conclusion The enhancement of detoxification activity was one of resistance mechanism to organophosphate in German cockroach.

【Key words】 German cockroach (*Blattella germanica*); Carboxylesterase; Organophosphate; Resistance mechanism

作者单位:1 中国农业大学农学与生物技术学院昆虫系(北京 100094); 2 北京市疾病预防控制中心消毒与有害生物防制所(北京 100013)

作者简介:魏绪强(1981-),男,黑龙江省齐齐哈尔人,硕士研究生,主要从事媒介生物学防制研究。

通讯作者:曾晓芃, E-mail: zengxp@yahoo.cn

德国小蠊(*Blattella germanica*)是世界性分布的重要的医学和居室害虫,近 10 余年来在我国已成为重要卫生害虫。目前,对德国小蠊等病媒昆虫的防治手段主要采用化学防治,借助化学杀虫剂杀灭害虫或降低害虫的种群密度^[1]。多种类型杀虫剂的问世,为防治病媒昆虫提供了强有力的手段,对控制病媒昆虫的危害和保障人民的健康起到了关键性作用。但是,由于长期大量不合理使用有机合成杀虫剂,使得病媒昆虫的抗药性问题日渐突出,抗药性已成为制约病媒昆虫化学防治效果的一个主要原因^[2]。从目前对德国小蠊抗药性机制研究的文献来看,德国小蠊抗药性所涉及的机制有行为抗性、药剂穿透作用降低、代谢抗性及杀虫剂的作用位点敏感度降低等几个方面。其中代谢抗性是引起抗性的最重要机制^[3],已证明羧酸酯酶在许多昆虫抗药性中起重要作用^[4,5]。

羧酸酯酶(CarE)在有机磷类抗性中了解最清楚的是马拉硫磷。Matsumura, Brown 在 1961 年首先报道了抗马拉硫磷跗斑库蚊(*Culex tarsalis*)的羧酸酯酶活性高于敏感个体。随后类似的文章相继进行报道,Kojima 等在 1963 年报道了于黑尾叶蝉(*Nephrotettix cincticeps*)中发现马拉硫磷的抗性、Matsumura, Hogedijk 于 1964 年在家蝇(*Musca domestica*)中发现马拉硫磷抗性的存在、1964 和 1965 年 Matsumura, Voss 又相继发表了二点叶蝉(*Tetranychus urticae*)的马拉硫磷抗性、Feroz 于 1971 报道了臭虫(*Cimex lectularis*)的抗性以及唐振华在 1985 年也报道了淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)的马拉硫磷抗性。因此,可以说在大多数昆虫和螨中,马拉硫磷的抗性好像是通过羧酸酯酶解毒代谢机制发展而来的。羧酸酯酶作为昆虫体内重要的解毒酶系,它以水解蛋白和结合蛋白两种方式对杀虫药剂解毒,昆虫体内该酶活性的高低会直接影响其对杀虫药剂的抵抗能力。然而国内对德国小蠊的抗药性缺乏系统的研究,与其他昆虫羧酸酯酶的进展和深度相比,德国小蠊羧酸酯酶的研究还有许多有待解决的问题。为此,以实验室敏感品系以及采自北京市 4 个不同城区德国小蠊野外品系为试虫,利用生物测定、生化分析及其增效试验等方法系统研究羧酸酯酶在不同品系德国小蠊中的活性以及其对 2 种有机磷类杀虫剂马拉硫磷及敌敌畏抗性形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

敏感品系(SS):引自军事医学科学院微生物流行病研究所,由北京市疾病预防控制中心(CDC)养虫室

饲养多代,未接触任何杀虫剂。

野外品系(FS):分别采自宣武区(XW)、昌平区(CP)、石景山区(SJS)及顺义区(SY),由北京市 CDC 养虫室饲养并筛选备用。

1.2 供试药剂及试剂 98.7% 敌敌畏(dichlorvos),由天津农药厂提供;90% 马拉硫磷(malathion),由山东华阳化工有限公司提供。增效剂 TPP (triphenyl phosphate),上海生化制剂一厂生产,分析纯; α -乙酸萘酯(α -naphthol acetate, α -NA),国药集团化学试剂有限公司产品,化学纯;毒扁豆碱(eserine)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),均为美国 Sigma 公司产品;固蓝 B 盐(fast blue B salt)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、考马斯亮蓝,均为 Fluka 公司产品。其他试剂为分析纯。

1.3 试验仪器 微量高速冷却离心机 Microtec 1524R、酶联免疫连续光谱高通量微孔板式酶标仪 SpectraMax Plus³⁸⁴、恒温水浴锅,均为北京吉诺思科贸有限公司产品;半自动点滴仪 AGRONOMICS DIVISION of Burkard Scientific、冷冻工作台、电子天平,均为瑞士梅特勒产品。

1.4 生物测定法 所用药剂均用丙酮稀释成 5 个系列浓度,设丙酮对照,将试虫放置于冷冻工作台上,待其昏迷后,用半自动点滴仪点滴药液于试虫前胸背板上,24 h 后检查死虫数。数据用 POLO 软件处理,求毒力回归线和计算致死中量 LD₅₀。

1.5 增效剂试验 用半自动点滴仪按 10 μ g/只的剂量(TPP 配成丙酮液)点滴于德国小蠊雄性成虫前胸背板上,1 h 后再点滴杀虫剂,24 h 后检查死虫数。数据用 POLO 软件处理,求毒力回归线和计算致死中量 LD₅₀。计算增效比。

1.6 生化测定

1.6.1 酶液制备 取德国小蠊成虫,去掉头部,剪掉双翅(有利于匀浆),在预冷的 pH 值为 6.5 的 0.04 mol/L 磷酸缓冲液中冰浴匀浆。将制得的匀浆液在 4 ℃,10 000 \times g 离心 15 min,取上清液抽滤后作为酶源放入 -80 ℃ 超低温冰箱备用。

1.6.2 羧酸酯酶活性测定 羧酸酯酶活性测定参照 Asperen^[6]、高希武,郑炳宗^[7]方法,略有修改。反应体系 1.6 ml,取待测酶液 0.025 ml 加入 0.9 ml 含有 3×10^{-4} mol/L 底物和毒扁豆碱(底物:毒扁豆碱,1:1)的磷酸缓冲溶液(0.04 mol/L, pH 值为 6.5 的 0.04 mol/L)混匀,在 40 ℃ 水浴中反应 5 min,加入 0.45 ml 的显色剂(1% 固蓝 B 盐:5% SDS, 2:5)显色终止反应,静止 5~10 min 后在 600 nm(α -NA)波长下测吸光度(A)值。对照组加入显色剂后补加 0.025 ml 酶

液。试验重复 3 次。根据得到的 A 值和酶液蛋白含量及 α -NA 标准曲线, 计算羧酸酯酶的比活力。羧酸酯酶的比活力以每毫克蛋白每分钟水解底物的摩尔数来表示, 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})$ 。

1.6.3 羧酸酯酶动力学常数测定 将底物稀释成 5~7 个系列浓度测定在不同浓度下的 A 值。试验重复 3 次。数据用 Enzfitt 软件计算米氏常数 (michaelis constants, K_m) 和最大反应速度 (maximal velocities, V_{\max})。

1.6.4 蛋白含量测定 参照 Bradford^[8] 考马斯亮蓝 G-250 法。用 BSA 测定蛋白质含量标准曲线。取 1 ml 待测酶液 (调整蛋白质含量 20~100 μg), 加 5 ml 考马斯亮蓝 G-250 染色液, 混合均匀后 2 min 至 1 h 内测 A_{595} 值。由标准曲线计算酶液中蛋白质的含量。

1.7 统计处理 所有数据均用 SPSS 软件处理。

2 结果与分析

2.1 生物测定及其增效剂试验

2.1.1 马拉硫磷、敌敌畏对德国小蠊敏感品系及野外品系的毒力测定 利用点滴法分别测定马拉硫磷、敌敌畏对敏感品系及野外品系的毒力。从表 1 可以看出, 北京市不同城区的 4 个野外品系对马拉硫磷、敌敌畏均产生了不同程度的抗药性, 以 CP 和 SJS 2 个野外品系抗性较高, 对马拉硫磷抗性分别达到 19.00 和 15.85 倍; 而对敌敌畏则分别达到 22.87 和 35.66 倍。其他 2 个野外品系对马拉硫磷、敌敌畏抗性均在 10 倍左右, 也应引起注意。

2.1.2 增效剂 TPP 对德国小蠊敏感品系及野外品系的增效作用 由表 1 可以看出, 增效剂 TPP 对马拉硫磷的增效比率普遍高于对敌敌畏增效比率。增效剂

TPP 在敏感品系中对马拉硫磷、敌敌畏均有一定的增效作用; 而在野外品系中对 2 种有机磷药剂则均有明显的增效作用, 在 CP 品系中 TPP 对马拉硫磷的增效作用明显大于 SS 品系, 增效比率高达 20.08 倍, 而该品系对马拉硫磷的抗性也是最高, 达 19.00 倍; 在 SJS 品系中 TPP 对敌敌畏增效比率最高, 为 SS 品系的 4.81 倍, 而该品系对敌敌畏的抗性也是 4 种野外品系中的最高, 抗性倍数为 35.66 倍。增效剂 TPP 是羧酸酯酶的专一性抑制剂, 本实验结果表明增效剂 TPP 对高抗品系有高的增效比率, 这一现象表明 TPP 抑制的羧酸酯酶在抗性高的品系中解毒作用有所加强, 而从另一个方面暗示我们羧酸酯酶与德国小蠊对有机磷类药剂抗性有关。

2.2 生化测定结果

2.2.1 德国小蠊敏感品系及野外品系羧酸酯酶比活力测定 生物测定和增效剂试验结果提示, 德国小蠊羧酸酯酶参与了德国小蠊对有机磷类药剂的抗性。因此, 本实验对德国小蠊羧酸酯酶做了进一步研究。利用生化的方法测定德国小蠊敏感品系及 4 个野外品系羧酸酯酶的活性, 由表 2 可以看出 4 个野外品系的酶活性明显高于敏感品系, 其差异有统计学意义, 而且通过提高显著水平 ($P=0.01$) 做多重比较检验发现敏感品系与野外品系在活性上的差异也均有统计学意义。这一检验结果进一步证明酶的高活性可能影响德国小蠊对有机磷类药剂的抗药性。

2.2.2 德国小蠊敏感品系及野外品系羧酸酯酶的动力学 K_m 是酶的特征性常数, 该值的大小表明酶和底物之间亲和力的高低^[9,10]。德国小蠊不同品系羧酸酯酶对底物水解的 K_m 和 V_{\max} 的值列于表 3 中, 通过数据处理发现, 德国小蠊野外品系的 K_m 均小于敏感

表 1 单独使用 2 种杀虫剂及配合使用增效剂对德国小蠊敏感品系和北京市不同地区野外品系的触杀毒力

杀虫剂	品系	试虫只数	单独使用杀虫剂		抗性倍数 [△]	试虫只数	杀虫剂 + TPP		增效比 [▲]
			Slope	LD_{50}^* (95% CI) [#]			Slope	LD_{50}^* (95% CI) [#]	
马拉硫磷	SS	180	2.467 ± 0.555	$0.390(0.293 \sim 0.489)$	1.00	180	2.420 ± 0.464	$0.210(0.161 \sim 0.258)$	1.86
	XW	180	6.769 ± 2.138	$3.629(2.820 \sim 3.955)$	9.31	180	2.215 ± 0.367	$0.627(0.488 \sim 0.793)$	5.79
	CP	180	8.512 ± 2.400	$7.411(6.940 \sim 8.801)$	19.00	180	2.191 ± 0.594	$0.369(0.147 \sim 0.521)$	20.08
	SJS	180	7.180 ± 1.301	$3.131(2.862 \sim 3.359)$	15.85	180	2.706 ± 0.567	$0.660(0.487 \sim 0.813)$	4.74
	SY	180	8.033 ± 2.028	$6.182(5.794 \sim 7.065)$	8.03	180	2.124 ± 0.575	$0.405(0.174 \sim 0.562)$	15.26
敌敌畏	SS	180	5.594 ± 0.963	$0.068(0.060 \sim 0.076)$	1.00	180	2.276 ± 0.764	$0.045(0.023 \sim 0.056)$	1.51
	XW	180	3.564 ± 0.614	$0.723(0.590 \sim 0.852)$	10.63	180	3.081 ± 0.584	$0.361(0.284 \sim 0.434)$	2.00
	CP	180	7.156 ± 1.246	$1.555(1.404 \sim 1.688)$	22.87	180	6.561 ± 1.015	$0.931(0.850 \sim 1.013)$	1.67
	SJS	180	7.040 ± 1.643	$2.425(2.188 \sim 2.625)$	35.66	180	2.498 ± 0.699	$0.504(0.242 \sim 0.653)$	4.81
	SY	180	2.138 ± 0.867	$0.727(0.149 \sim 1.037)$	10.69	180	2.971 ± 0.579	$0.337(0.259 \sim 0.408)$	2.16

注: * 24 h 死亡率; # $\mu\text{g}/\text{只}$; △ 抗性倍数: 抗性品系 LD_{50} /敏感品系 LD_{50} ; ▲ 增效比: 单剂的 LD_{50} /(单剂 + TPP 的 LD_{50})。

表2 德国小蠊敏感品系及野外品系羧酸酯酶的比活力值

品系	比活力 [$\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$]
SS	45.2687 ± 3.9874 ^a
XW	169.4897 ± 5.0218 ^b
CP	179.0673 ± 5.8984 ^b
SJS	118.8103 ± 8.7152 ^c
SY	172.7317 ± 3.2442 ^b

注: 表中的数据为3次重复实验, 每次重复测定3次的 $\bar{x} \pm s$; 不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 敏感品系及北京市不同城区野外品系德国小蠊羧酸酯酶的 K_m 和 V_{max} 值

品系	K_m (mmol/L)	比值	V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot \text{min})$]	比值
SS	0.1580 ± 0.0041 ^a	1.0000	58.4225 ± 0.6357 ^a	1.0000
XW	0.1279 ± 0.0002 ^b	0.8095	307.2550 ± 1.7805 ^c	5.2592
CP	0.1071 ± 0.0003 ^c	0.6778	338.5755 ± 0.7389 ^d	5.7953
SJS	0.1095 ± 0.0007 ^c	0.6930	212.4570 ± 0.8174 ^b	3.6366
SY	0.1080 ± 0.0007 ^c	0.6835	340.3300 ± 0.9772 ^d	5.8253

注: 表中数据为3次重复试验的平均值, 即每次重复测定的 $\bar{x} \pm s$; 不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.01$)。

品系, 通过方差分析和多重比较, 德国小蠊敏感品系的 K_m 值与野外品系差异有统计学意义, 野外品系德国小蠊的羧酸酯酶 V_{max} 亦均高于敏感品系, 且差异有统计学意义。

2.2.3 德国小蠊敏感品系及野外品系羧酸酯酶的离体抑制 测定敌敌畏、马拉硫磷对敏感品系和野外品系德国小蠊羧酸酯酶的抑制中量 I_{50} , 进一步分析比较2个品系酯酶的差异。由表4可以看出, 2种药剂对敏感品系和野外品系抑制作用是不同的, 敏感品系较抗性品系更容易受到抑制, 且差异有统计学意义。2种药剂对酯酶的抑制也存在差异, 敌敌畏对羧酸酯酶抑制能力高于马拉硫磷对羧酸酯酶的抑制能力。

表4 敌敌畏和马拉硫磷对敏感品系及野外品系德国小蠊羧酸酯酶 I_{50} 的比较

品系	敌敌畏		马拉硫磷	
	I_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	比值	I_{50} (mmol/L)	比值
SS	0.91 ± 0.0023 ^a	1.000	17.64 ± 0.3323 ^a	1.000
XW	15.35 ± 0.5247 ^d	16.887	80.48 ± 0.6906 ^c	4.562
CP	7.89 ± 0.1732 ^b	8.679	35.49 ± 0.6940 ^b	2.012
SJS	8.60 ± 0.1544 ^b	9.458	82.29 ± 0.4178 ^c	4.665
SY	11.52 ± 0.6820 ^c	12.673	83.24 ± 1.0759 ^c	4.719

注: 表中数据为3次重复试验的平均值, 即每次重复测定的 $\bar{x} \pm s$; 不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 德国小蠊抗性水平与羧酸酯酶活性、动力学常数及抑制中浓度间接反应抗性水平等因素相关分析 通过对酶活力、动力学常数及抑制中浓度等数据处理分析, 发现这些指标可以很好地在生化水平上反映德国小蠊的抗性水平。因此, 有必要将这些指标与德国小蠊抗性水平的关系做进一步分析, 期望能够确定这些因素与抗性水平是否存在某种确定性或不确定性的关系。通过相关分析发现(表5), 对于马拉硫磷德国小蠊羧酸酯酶比活力、 V_{max} 、 I_{50} 等因素与德国小蠊抗性有很好的正相关, 并且酯酶活性、 V_{max} 与抗性水平相关性显著, 即酶比活力、 V_{max} 和 I_{50} 越大则抗性水平越高; K_m 与德国小蠊抗性亦有很好的负相关性, 且相关性显著, 即 K_m 值越低则抗性水平越高。对于敌敌畏, K_m 与抗性水平呈负相关, 相关性不显著, 但我们可以定性的知道 K_m 值越低则表明抗性水平越高, 这一结果与马拉硫磷一致。

表5 德国小蠊抗性水平与羧酸酯酶比活力、动力学常数及抑制中浓度因素相关分析

药剂	因素	相关系数	抗性水平
马拉硫磷	比活力	Pearson Correlation	0.893*
	Specific activity	Sig. (2-tailed)	0.041
	K_m 值	Spearman's rho	-0.900*
	K_m 值	Sig. (2-tailed)	0.037
	V_{max} 值	Pearson Correlation	0.912*
	V_{max} 值	Sig. (2-tailed)	0.031
Malathion	I_{50}	Pearson Correlation	0.273
	I_{50}	Sig. (2-tailed)	0.657
	比活力	-	-
	Specific activity	-	-
	K_m 值	Pearson Correlation	-0.024
	K_m 值	Sig. (2-tailed)	0.969
Dichlorvos	V_{max} 值	-	-
	I_{50}	-	-

注: “-”不呈线性相关; * 相关系数在0.05水平上差异有统计学意义(双侧检验)。

3 讨论

本研究通过生物测定、增效剂试验和生化分析的方法系统地研究了德国小蠊对有机磷类药剂(以马拉硫磷和敌敌畏为代表)的抗药性机制。生物测定结果表明北京市不同城区的4个野外品系对马拉硫磷、敌敌畏均产生了不同程度的抗药性, CP和SJS品系对马拉硫磷抗性分别达到19.00和15.85倍; 而对敌敌畏则分别高达22.87和35.66倍。在增效剂试验中, 增效剂

TPP 在敏感品系中对马拉硫磷、敌敌畏均有一定的增效作用;而在野外品系中对 2 种有机磷药剂则均有明显的增效作用,在 CP 品系中 TPP 对马拉硫磷的增效作用明显大于 SS 品系,增效比率高达 20.08 倍,而该品系对马拉硫磷的抗性也最高,达 19.00 倍;在 SJS 品系中 TPP 对敌敌畏增效比率最高,为 SS 品系的 4.81 倍,而该品系对敌敌畏的抗性也是 4 种野外品系中最高,抗性倍数为 35.66 倍。由于增效剂 TPP 是羧酸酯酶的专一性抑制剂,说明羧酸酯酶参与了德国小蠊对有机磷类药剂的代谢作用。而增效剂 TPP 对高抗品系有高的增效作用,这一结论进一步证实羧酸酯酶的解毒代谢对抗性的形成具有重要意义,即羧酸酯酶的解毒代谢参与了德国小蠊对有机磷类药剂的抗药性形成。

生物测定和增效剂试验结果提示,德国小蠊羧酸酯酶参与了德国小蠊对有机磷类药剂的抗性。利用生化的方法进一步测定德国小蠊敏感品系及 4 个野外品系羧酸酯酶的活性。野外品系的酶比活力明显高于敏感品系,结果进一步证明酯酶的高活性可能影响德国小蠊对有机磷类药剂的抗药性。

K_m 是酶的特征性常数,该值的大小表明酶和底物之间亲和力的高低。羧酸酯酶的动力学研究表明,不同品系的羧酸酯酶对 α -NA 这一共同底物表现出不同的亲和性(K_m 值不同),德国小蠊野外品系的 K_m 值均小于敏感品系,由 K_m 所表示的酶特性可知,野外品系酯酶与底物的亲和力远远高于敏感品系,也就是说当外源有毒化合物进入虫体时,抗性品系的酯酶能够很好地与之结合,将其转化成低毒或者无毒的物质,进而减缓或者代谢掉有毒的化合物,从而避免中毒。而 V_{max} 从另一个侧面反映抗性品系德国小蠊的羧酸酯酶对 α -NA 的活性高于敏感品系。羧酸酯酶体外抑制试验表明,2 种有机磷类药剂对敏感和野外品系抑制作用是不同的,敏感品系较抗性品系更容易受到抑制。通过一系列系统的试验,可以得出这样的结论:羧

酸酯酶解毒代谢活性的提高是德国小蠊对有机磷类药剂产生抗药性的机制之一。

虽然酶动力学试验的结果初步证实了抗性品系和敏感品系羧酸酯酶存在质的差别,但是还不能确定抗性品系羧酸酯酶发生了何种变化,这些都有待于通过同工酶电泳以及分子生物学的方法做进一步的研究。需要指出的是昆虫对杀虫剂的抗药性是多方面因素综合作用的结果,本研究仅从生化水平上讨论羧酸酯酶是否参与了抗药性的形成,对于更深层次的研究有待于做进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 曹敏,孙锦程,运秦来,等. 舰艇德国小蠊对氯菊酯抗性的研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2003, 9(2):29~31.
- [2] 钱俊德. 近 20 年来我国实验昆虫学的发展[J]. 昆虫学报, 2000, 43(3):318~326.
- [3] 张大羽,程家安. 德国小蠊的抗药性水平和主要机制[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8(3):236~239.
- [4] Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular resistance in arthropods [M]// Roush RT, Tabashnik BE. Eds. Pesticide resistance in arthropods. New York: Chapman & Hall Press, 1990:58~96.
- [5] Brattsten LB. Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides[M]// Green MB, Lebaron HM, Moberg WK. Eds. Managing Resistance to Agrochemicals. Washington, DC: American Chemical Society, 1990:42~60.
- [6] Asperen VK. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method[J]. J Insect Physiol, 1962, 8:401~416.
- [7] 高希武,郑炳宗. 几种农药对蚜虫羧酸酯酶的抑制和拟除虫菊酯的增效[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(4):89~94.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72:248~254.
- [9] Shi MA, Zhong YJ, Wu J. Studies on the kinetic of acetylcholinesterase in the resistant and susceptible strains of housefly (*Musca domestica*) [J]. Entom Sinica, 2001, 8(1):30~38.
- [10] Shi MA, Zhong YA, Wu J. Kinetic analysis of acetylcholinesterase in a Propoxur-resistant strain of housefly (*Musca domestica*) from Shanghai China[J]. Pest Biochem Physio, 2002, 72(2):72~82.

[收稿日期:2008-04-28]