技术与方法

利用正交法确定测定意大利蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性最佳反应条件*

唐晓伟[1,2**] 高希武[2] 刁青云[1***]

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 荧光分光光度法检测意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinol 细胞色素 P450 O-脱乙基活性方便快捷、较灵敏,以 7-乙氧基香豆素为底物,通过测定其产物 7-羟基香豆素的荧光变化来确定细胞色素 P450 O-脱乙基的活性。在利用荧光分光光度法检测意大利蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性过程中,反应体系 pH 值、反应时间、反应温度对实验结果影响较大,本实验在确定最佳底物终浓度和辅酶 NADPH 终浓度的前提下用正交法研究了 pH 值、反应时间、反应温度 3 个因素对意大利蜜蜂细胞色素 P450 O-脱乙基活性的影响。极差分析和方差分析表明,3 个因素对实验结果影响大小顺序为:时间 > 温度 > pH 值,并且得到最佳组合条件为:反应时间 20 min、温度 40℃ 及 pH 值 7.8。

关键词 意大利蜜蜂,细胞色素 P450 O-脱乙基活性,正交试验,荧光分光光度法,最佳条件

The optimum conditions for assaying 7-ethoxycoumarin O-deethoxylation of cytochrome P450 from the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spinol) by orthogonal matrix method

TANG Xiao-Wei[1,2**] GAO Xi-Wu[2] DIAO Qing-Yun[1***]

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;
2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The 7-ethoxycoumarin O-deethoxylation (ECOD) activity of cytochrome P450 (CytP450) was determined using fluorescence spectrophotometry with 7-ethoxycoumarin as a substrate. This method was sensitive and convenient. The optimal conditions for assaying the ECOD activity of cytochrome P450 (CytP450) in *Apis mellifera ligustica* Spinol were determined using the orthogonal matrix method. The results show that reaction time was the most important factor determining the ECOD activity of CytP450 in honeybees. The relative importance of time, temperature and pH on the ECOD activity of CytP450 were, in descending order, time > temperature > pH. The optimal conditions were pH of 7.8, reaction temperature of 40℃ and reaction time of 20 minutes.

Key words *Apis mellifera ligustica*, O-deethoxylation, cytochrome P450 monooxygenase, orthogonal experiment, fluorescence spectrophotometry, optimal conditions

多功能氧化酶(MFO)是生物体内脂肪酸、生物碱、激素等内源性化合物以及药物、植物毒素、杀虫药剂等外源性化合物的重要氧化代谢系统(冷欣夫和邱星辉,2001)。细胞色素 P450 酶系

* 资助项目:国家科技支撑计划课题(2006BAD06B04)。

** E-mail: txw7880540@163.com

*** 通讯作者,E-mail: dqyun1@126.com

收稿日期:2010-12-28,接受日期:2011-05-30

(CytP450)是多功能氧化酶系统中的末端氧化酶,位于光滑内质网膜上,具有活化氧分子和与底物结合的双重功能(Stegeman and Livingstone,1998)。

CytP450 能够通过对农药氧化代谢能力的增强引起害虫的抗药性。昆虫体内 CytP450 含量的变化常常作为衡量害虫抗药性的指标之一(Scott,1999)。此外,CytP450 参与对昆虫激素(包括蜕皮激素与保幼激素等)的合成与分解,对植物毒素以及杀虫剂等化合物起解毒或活化作用(Schuler,1996)。因此,CytP450 在许多代谢途径中作为重要酶系而存在。截至目前,常采用以下 4 种模式底物进行 CytP450 活性测定:一是对硝基苯甲醚氧脱甲基活力(PNOD)测定,利用其产物对硝基苯酚(PNP)碱性条件下在 412 nm 有吸收峰的特点,用分光光度计检测(Hansen and Hodgson,1971)或用高效液相色谱法检测(艾国民等,2009)。二是甲基试卤灵氧脱甲基活力(MROD)测定,主要参照 Mayer 等(1977)的方法,以甲氧试卤灵为底物,通过测定其产物试卤灵的荧光变化确定酶的活性。三是 7-乙氧基香豆素脱乙基活力(ECOD)测定,利用荧光分光光度计检测产物 7-羟基香豆素的荧光变化确定酶的活性(Aitio,1978)。四是艾氏剂环氧化活力(AE)测定,利用气相色谱法检测艾氏剂在细胞色素 P450 环氧化作用下生成的狄氏剂的量来测定细胞色素 P450 的活性(Wolff *et al.*,1979)。

蜜蜂是一种具有较高经济效益、生态效益和广泛社会效益的经济动物,由于从事采集活动需要经常暴露在有害外源物质环境中。近年来蜜蜂中毒事件时有发生,因此有必要对蜜蜂体内重要的解毒酶系——细胞色素 P450 酶系进行研究,以便为蜜蜂保护提供指导。在 20 世纪 80 年代,国外对蜜蜂体内包括多功能氧化酶在内的解毒酶有过一些研究(Smirle *et al.*,1984; Yu *et al.*,1984; Smirle and Winston,1987; Kezić *et al.*,1992),采用的测定方法是艾氏剂环氧化酶活力测定法。早在 20 世纪 60 年代就已证明 P450s 具有催化环戊二烯杀虫剂的环氧化作用,艾氏剂变成狄氏剂已经作为 P450 酶系催化的一种模式反应,研究比较广泛和深入,而且经常采用气相色谱法对产物进行检测(Yao *et al.*,1988; 邱立红等,1999)。采用这种方法时,虽然产物狄试剂很稳定,而且样品用量少、灵敏度也较高,但是也有一些缺点。首先,艾氏剂和狄试剂都是剧毒的药品,操作过程中具有一定危害性。另外,利用气相色谱法在对组分直接进行定性分析时,必须用已知物或已知数据与相应的色谱峰进行对比,或与其他方法(如质谱、光谱)联用,才能获得直接肯定的结果,而且操作比较繁琐,不适合大量样品测定。国内对蜜蜂多功能氧化酶的研究还未见报道,与其它昆虫在多功能氧化酶方面研究的进展和深度相比,蜜蜂多功能氧化酶的研究还有许多待解决的问题。本研究采用了方便快捷、较灵敏的 7-乙氧基香豆素脱乙基活力(ECOD)测定法,通过正交试验确定蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性的最佳测定条件,为今后蜜蜂多功能氧化酶的深入了解做必要的基础性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试蜜蜂 意大利蜜蜂幼虫采自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂育种研究室。所有供试幼虫均为 6 龄幼虫。

1.1.2 试剂 苯甲基磺酰氟(PMSF)购自德国 Merrk 公司,含量大于 99%;二硫代苏糖醇(DTT)含量大于 99%、还原型辅酶Ⅱ四钠盐(NADPH)含量大于 99% 均为 Biomol 公司产品;Tris 碱为美国 Promega 公司产品;牛血清白蛋白购(BSA)自北京同正生物公司;考马斯亮蓝 G250、7 - 羟基香豆素(7-Hydroxycoumarin)、7 - 乙氧香豆素(7-Ethoxycoumarin)均为 Sigma 公司产品;甘油、盐酸、氯化钾和氢氧化钠、甘氨酸(Gly)、三氯乙酸(TCA)、乙二胺四乙酸(EDTA)均为分析纯,系北京化学试剂公司产品。

1.1.3 主要仪器 5417R 型高速离心机(德国 Eppendoff 公司产品)、SPH-100B 型恒温振荡器(上海世平实验设备公司产品)、LS55 型荧光分光光度计(英国 Perkin Elmer 公司产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 酶液的制备 参考于彩虹和高希武(2005)的方法:于蜂脾内取标记好 6 龄期封盖幼虫,直接用于实验或者 -80℃ 保存。在 5 头蜜蜂幼虫中加入 2 mL 的 0.1 mol/L,pH 7.5 的磷酸盐缓冲液(含 1 mmol/L EDTA,50 mmol/L PMSF,50

mmol/L DTT 和 10% 甘油) 匀浆,在 4℃,10 800 g 条件下离心 10 min,上清液用两层滤纸过滤,作为细胞色素 P450 原酶液,先用一部分原酶液用于荧光值测定,剩余酶液用于蛋白含量测定。用于蛋白含量测定的酶液贮存于 -20℃冰箱中。

1.2.2　蛋白质含量测定　采用 Bradford(1976) 的考马斯亮蓝染色法。

1.2.3　细胞色素 P450 的 O-脱乙基活性测定　参考 Hung 和 Sun(1989) 的方法,以 7-乙氧基香豆素为底物,利用荧光分光光度计检测细胞色素 P450 对 7-乙氧基香豆素的脱乙基活性,通过测定其产物 7-羟基香豆素的荧光变化来确定酶的活性。通过反复试验设计出适合蜜蜂的最佳反应体系: 1 mL 反应体系中含 0.1 mol/L 的 Tris-HC1, 7-乙氧基香豆素,NADPH,原酶液。在加完反应体系后开始计时,在适合温度下,220 转恒温振荡器内反应一定时间后,加三氯乙酸(TCA)(15%) 终止反应,10 800 g 条件下离心 1 min。移液枪缓慢吸取 1 000 μL 上清液,注入比色皿,加入 450 μL 甘氨酸-氢氧化钠(Gly-NaOH)(pH 10.5),使荧光值达到最稳定,擦镜纸擦净比色皿,用荧光分光光度计于 34℃条件下检测荧光值。测定条件:

激发波长入(excitation wavelength) -368 nm

狭缝(excitation slit) -5 nm

发射波长入(emission wavelength) -456 nm

狭缝(emission slit) -5 nm

根据产物 7-羟基香豆素的标准曲线和测定样品的荧光值得到产物生成量,根据反应时间、产物 7-羟基香豆素(7-H) 的生成量和蛋白含量计算细胞色素 P450 比活力。

$$\text{酶的比活力}(\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgPro}^{-1}) = \frac{\text{产物 7-羟基香豆素生成量}(\text{pmol})}{\text{蛋白含量}(\text{mg})\cdot\text{反应时间}(\text{min})}$$

1.2.4　正交试验设计　在酶促反应中反应温度、体系 pH 值、反应时间等因素会对结果产生较大影响,本实验设定温度、pH 值、时间 3 个因素,每个因素设 4 个水平(表 1),采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表(李松岗,2002)。

2　结果与分析

2.1　底物终浓度和辅酶 NADPH 终浓度的确定

NADPH 为酶促反应提供还原力,它和底物一样不应给酶促反应带来供应不充分的限制,但是过高浓度会抑制酶促反应,对测定结果产生影响。所以本实验首先确定了底物终浓度和辅酶 NADPH 终浓度,使反应在底物和辅酶供应充分并对测定结果不产生影响的条件下进行。

表 1　正交试验中的影响因素和水平

Table 1　Experimental factors and levels for orthogonal project

水平 Level	pH (A)	反应时间 Reaction time(min) (B)	温度 Temperature (℃) (C)
1	7.0	5	25
2	7.5	10	30
3	7.8	15	35
4	8.0	20	40

注: 1,2,3,4 分别表示各因素的 4 个水平,A, B, C 分别表示 pH,反应时间,温度。

Numbers 1, 2, 3, and 4 represent 4 levels of factors, letters A, B, C represent factors of pH, reaction time, temperature.

将底物和辅酶设置 7 个浓度梯度: 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 μmol/L,一个处理包含 7 个反应体系,7 个反应体系分别对应 0.02 μmol/L 到 0.14 μmol/L 的不同浓度底物和辅酶,每个体系中加入的底物和辅酶浓度相同,反应体系中加入的其它试剂和酶液均相同。处理做 3 个重复,每个重复测定 3 次。

结果如图 1 所示,随着底物和辅酶的浓度逐渐增大,对应的细胞色素 P450 O-脱乙基酶比活力逐渐增大,直到浓度达到 0.1 μm/L 时比活力达到最大值,之后随着浓度的继续增大,比活力值缓慢降低,酶活性受到抑制。所以在蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基酶活性测定所建立的反应体系中,最适的底物和辅酶浓度为 0.1 μm/L。

2.2　细胞色素 P450 的 O-脱乙基活性

按照正交表设计的 16 个处理组合进行测定,每个处理 3 个重复,每个重复测定 3 次,数据用 SPSS 数据处理软件进行分析,实验结果见表 2。

2.3　正交试验结果极差分析

表 3 对正交试验数据进行了极差分析,根据极差大小,从分析结果可以看出 3 个因素对细胞色素 P450 O-脱乙基活性影响的主次顺序为: 反应时间 > 温度 > pH,各因素的优水平分别为: 反应时间 4,20 min; 温度 4,40℃; pH 3,7.8,3 个因素的最

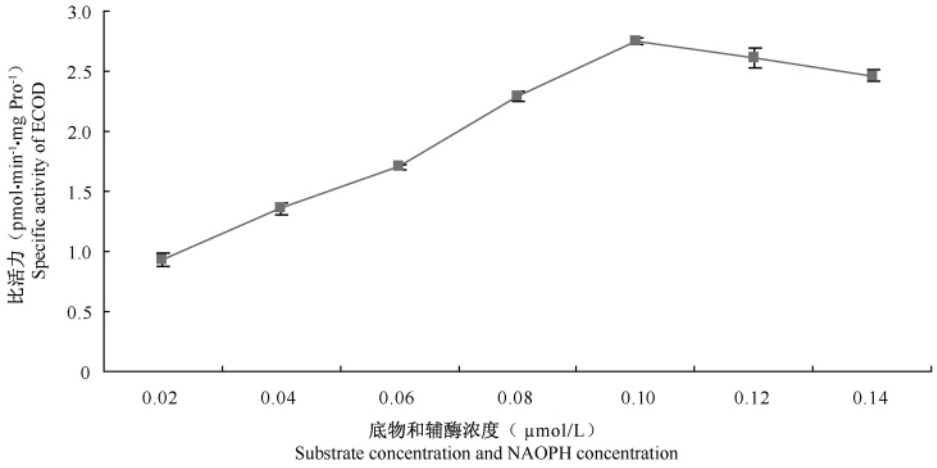

图 1 底物和辅酶浓度对酶比活力的影响

Fig. 1 The effect of substrate concentration and NADPH concentration on the activity of O-deethylation of cytochrome P450

表 2 蜜蜂幼虫 O-脱乙基活性不同处理组合比活力值

Table 2 Application of $L_{16}(4^5)$ orthogonal matrix in detecting the activity of O-deethylation of cytochrome P450 in Italian honeybee larva

编号 Number	处理组合 Combination of treatment	比活力 Specific activity of ECOD (pmol·min⁻¹·mg Pro⁻¹)
1	$A_1B_1C_1$	0.4809 ± 0.0762
2	$A_1B_2C_2$	1.1828 ± 0.1757
3	$A_1B_3C_3$	1.6399 ± 0.1754
4	$A_1B_4C_4$	3.3385 ± 0.1583
5	$A_2B_1C_2$	1.6112 ± 0.3547
6	$A_2B_2C_1$	1.1309 ± 0.0673
7	$A_2B_3C_4$	2.4341 ± 0.2176
8	$A_2B_4C_3$	2.8237 ± 0.1284
9	$A_3B_1C_3$	1.0414 ± 0.1106
10	$A_3B_2C_4$	2.5580 ± 0.0903
11	$A_3B_3C_1$	1.8547 ± 0.1048
12	$A_3B_4C_2$	3.4993 ± 0.2379
13	$A_4B_1C_4$	1.4085 ± 0.2441
14	$A_4B_2C_3$	1.6111 ± 0.1790
15	$A_4B_3C_2$	1.7019 ± 0.1462
16	$A_4B_4C_1$	1.6851 ± 0.0012

注：每个处理重复 3 次，每个重复测定 3 次，表中数据为平均值 ± 标准误。

Every row of run number represents one experimental replicate, every run was replicated three times and every replicate was measured three times. Values are mean ± SE.

表 3 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果极差分析表

Table 3 The method of range analysis

	O-脱乙基活性比活力 Specific Activity of ECOD (pmol·min⁻¹·mg Pro⁻¹)		
	A	B	C
K1	6.6535	4.4293	5.1513
K2	7.8862	6.4823	7.8823
K3	8.9535	7.6420	7.1271
K4	6.4067	11.3461	9.7391
k1	1.6634	1.1073	1.2878
k2	1.9716	1.6206	1.9706
k3	2.2384	1.9105	1.7818
k4	1.6017	2.8365	2.4348
极差 *R* 值	0.5750	1.7292	0.6828
主次顺序	B > C > A		
最佳水平	A_3	B4	C4
最佳组合	$A_3B_4C_4$		

注：K_i 代表各因素 i 水平下比活力值的和；k_i 代表 K_i 的平均值。

K_i is the sum of the specific activity ECOD of the i level of different factors, and k_i represents the average of K_i.

优水平组合即为最佳反应条件。

2.4 正交试验结果方差分析

虽然极差分析法简单明了，但这种方法不能区分因素各水平间对应的试验结果的差异究竟是

由于因素水平不同引起的,还是由于试验误差引起的,无法估计试验误差的大小,不能提出一个标准来判断所考察因素作用是否显著。为了弥补极差分析的缺陷,对试验结果进行方差分析。

表 4　$L_{16}(4^5)$ 正交试验结果方差分析表

Table 4　Analysis of the results from orthogonal projects with ANVOA

变异来源 Source of Variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean of square	*F*
A	1.0430	3	0.3477	3.4222
B	6.2188	3	2.1063	20.731**
C	2.7037	3	0.9013	8.8711*
合并误差 Consolidated error	0.6098	6	0.1016	

注: 将正交表中空列两项合并到误差项中,表中合并误差即为两项的合并值　"* "和"**"分别表示差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。

Two blank rows were consolidated into the error item. "* " and "**" represent significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively.

从表 4 的方差分析结果可以看出,3 个因素中 B 时间和 C 温度对细胞色素 P450 乙氧基香豆素 O-脱乙基酶(ECOD)比活力都有显著影响,其中时间有极显著影响,pH 的影响不显著。方差分析结果表明反应时间为蜜蜂细胞色素 P450 乙氧基香豆素 O-脱乙基酶(ECOD)比活力测定中的最重要影响因素,其次分别为反应温度和反应体系 pH。

3　讨论

气相色谱法、高效液相色谱法和分光光度法在测定细胞色素 P450 活性的研究中均被采用过,虽然色谱法具有样品用量少、分辨率高等特点(刘小宁等,2004),但是处理较繁琐,相对色谱法,本研究采用的荧光分光光度法更方便、快捷,而且较灵敏。

正交法经常被用来寻求最优水平,魏绪强等(2008)利用正交试验法建立了德国小蠊羧酸酯酶的最佳反应体系,张莹等(2005)也利用正交试验法确定了测定意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶反应的最佳条件。

在测定酶促反应速度的过程中,酶必将处于温度、pH、辅助因子等最适条件下,测量其底物向产物的转化(王镜岩等,2004)。在测定细胞色素 P450 酶活性过程中,反应温度、反应时间和 pH、底物浓度等反应条件均是重要的影响因素。刘小宁等(2004)在利用毛细管气相色谱法检测棉铃虫的细胞色素 P450 O-脱甲基活性的研究中得出结论:反应体系的 pH 值、反应温度和反应时间对酶反应都有较大影响,最适 pH 值为 7.8,最适温度为 30℃,反应时间 10min。任秀华(2010)采用高效液相色谱法对大鼠肝细胞色素 P4503A 活性测定条件优化进行了研究,发现酶浓度、底物浓度、反应时间和温度对细胞色素 P4503A 活性均有影响。因此在对蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性进行研究前有必要明确最佳测定条件。

前期试验确定 6 龄(刚封盖)蜜蜂幼虫酶比活力最高,而且材料较容易获得,因此选取 6 龄幼虫作为试验材料。为确保试验结果具有更大可比性,所有 6 龄意蜂幼虫均为标记后同一天取得。为保留酶的最大活性,材料运输过程均为低温,并保存于超低温冰箱备用,细胞色素 P450 的测定操作也应在较低温度条件下进行,有研究表明在 0~4℃条件下比在室温下操作酶活性显著升高(金念祖等,1996)。

本研究首次采用正交法对蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性测定最佳条件进行研究,为以后对蜜蜂各个虫态和龄期该酶的测定奠定了基础。温度通过增加底物分子的热能影响酶促反应速率,但酶组成分子的热能增加也会导致酶蛋白变性速率增加,进而降低反应速率,因此酶促反应都有自己的最适反应温度。每种酶也都有它的最适 pH 值,最适 pH 值的轻微偏差会导致反应速率的降低,pH 值有较大偏差会导致酶的变性。另外在酶测定过程中要获得足够多的产物,从而准确、灵敏的得出实验结果需要一定的时间限制。最后,测定的比活力是对酶的活性的度量,应该不受到底物供应不充分的限制(王镜岩等,2004),因此本研究首先确定了反应的最佳底物终浓度,同时确定了为反应提供还原力的辅酶 NADPH 终浓度。通过本试验也可以看出正交试验设计确实是能安排多因素试验、寻求最优水平组合的一种高效率试验设计方法,为科学实验工作提供了很多便利。

参考文献(References)

艾国民,王庆敏,邹东云,高希武,李富根,2009. 高效液相色谱法测定家蝇磁暴色素 P450 O-脱甲基活性. 分析化学,37(8):1157—1160.

Aitio A, 1978. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, 85(2): 488—491.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1/2): 248—254.

Hansen LG, Hodgson E, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes. *Biochem. Pharm.*, 20(7): 1569—1578.

Hung CF, Sun CN, 1989. Microsomal monooxygenases in diamondback moth larvae resitant to fenvalerate and piperonyl butoxide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33(2): 168—175.

金念祖,陈景衡,赵人,茅力,1996. 大鼠肝细胞色素 P450 含量测定的影响因素. 中华预防医学杂志,30:(5) 301—302.

Kezić N, Lucić D, Sulimanović D, 1992. Induction of mixed function oxidase activity in honey bee as a bioassay for detection of environmental xenobiotics. *Apidologie*, 23(3): 217—223.

冷欣夫, 邱星辉,2001. 细胞色素 P450 酶系的结构功能与应用前景. 北京:科学出版社. 51—55.

刘小宁,史雪岩,梁沛,高希武,2004. 应用毛细管气相色谱法检测棉铃虫细胞色素 P450 O 一脱甲基活性. 昆虫知识,41(3):232—235.

李松岗,2002. 实用生物统计. 北京:北京大学出版. 304—315.

Mayer RT, Jermyn JW, Burke MD, Prough RA, 1977. Methoxyresorufin as a substrate for the fluorometric assay of insect microsomal O-dealkylases. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7(4): 349—354.

邱立红,张文吉,李晓薇,1999. 棉铃虫微粒体多功能氧化酶系组分含量及酶活性在不同生长发育阶段的变化规律研究. 农药学学报,1(1):45—50.

任秀华,曹磊斯,陆勤,薛柯雯,裘军,李高,2010. 大鼠肝细胞色素 P4503A 活性测定及其孵育条件的优化. 中国医院药学杂志,30(10): 809—812.

Schuler M, 1996. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.*, 112(4): 1411—1419.

Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29(9): 757—777.

Smirle MJ, Winston ML, 1987. Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 80(1): 5—8.

Smirle MJ, Winston ML, Woodward KL, 1984. Development of a sensitive bioassay for evaluating sublethal pesticide effects on the honey bee(Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 77(1): 63—67.

Stegeman JJ, Livingstone DR, 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121(1/3): 11—15.

王镜岩,张新跃,文重,2004. 生物化学. 北京:科学出版社. 85—100.

魏绪强,钱坤,曾晓凡,高希武,2008. 利用正交试验法建立德国小蠊羧酸酯酶的最佳反应体系. 中国媒介生物学及控制,19(4):294—297.

Wolff T, Deml E, Wander H, 1979. Aldrin epoxidation, a highly sensitive indicator specific for cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase activities. *Drug Metab. Dispos.*, 7(5): 301—305.

Yao MC, Hung CF, Sun CN, 1988. Fenvalerate resistance and aldrin epoxidation in larvae of the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 30(3): 272—278.

于彩虹,高希武,2005. 棉铃虫细胞色素 P450 CO 差光谱的测定. 昆虫学报, 48(2):301—304.

Yu SJ, Robinson FA, Nation JL, 1984. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22(3): 360—368.

张 莹,黄 建,高希武,2005. 正交试验法确定测定意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶反应的最佳条件. 昆虫学报,48:(4) 627—632.

应用基础

刺吸电位技术应用中的几个问题*

汤清波 张大山 姬 琨 丁识伯 闫凤鸣**

(河南农业大学化学生态研究所 郑州 450002)

摘 要 近年来,刺吸电位技术(electrical penetration graph,EPG)在我国得到越来越广泛的应用,但在应用过程中还存在一些问题或误区,在一定程度上影响了EPG的应用效果。本文根据多年实际应用经验,讨论了EPG应用中可能遇到的和容易出现的一些问题及解决办法,包括EPG技术的适用范围、昆虫和植物的处理办法、仪器的调试、EPG波形的生物学意义阐释、指标的选择、数据统计分析、人工饲料上的EPG记录等。

关键词 适用范围,材料选择,仪器调试,波形,人工饲料

Some key points in applications of electrical penetration graph technique

TANG Qing-Bo ZHANG Da-Shan JI Kun DING Shi-Bo YAN Feng-Ming**

(Institute of Chemical Ecology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract The electrical penetration graph (EPG) has been extensively used in research on plant-insect interactions, virus transmission mechanisms and plant resistance mechanisms. However, some misunderstandings in the application of EPG have resulted in mistakes in experimental design or misinterpretation of results. This paper provides solutions to some particular problems in EPG applications, including EPG application fields, how to deal with plant and insect materials, equipment manipulations, interpretations of EPG waveforms and their biological correlations, selection of variables, statistics, as well as EPG recordings on artificial diets.

Key words application scopes, selection of materials, adjusting of equipments, biological correlation of waveforms, artificial diet

目前,刺吸电位技术(electrical penetration graph,EPG)已经成为研究植食性刺吸式昆虫取食行为及其传毒机理、植物抗性机理等的重要手段(Woodford *et al.*, 1990; Nisbet *et al.*, 1992; Rahbe*et al.*, 2000; Mauck *et al.*, 2010),在国内外的昆虫学研究中得到了广泛应用。国内已经举办了几次EPG培训班和研讨会,目前很多单位利用EPG开展了许多工作。但作者在审稿和阅读一些国内发表的EPG相关论文中发现,EPG应用中存在着多个误区甚至错误,这在一定程度上影响了EPG应用的效果和对研究结果的阐释;也有不少研究生经常来信或来电询问EPG应用的一些细节。本文根据长期从事EPG研究的经验和教训,就实验中需要注意的一些问题和技巧进行分析和讨论,以期为从事此项研究的科研工作者和研究生提供参考和借鉴。由于我国多数学者使用的是直流电刺吸电位仪(DC-EPG),所以本文着重讨论DC-EPG的应用问题。

1 EPG技术的适用范围

从理论上来说,EPG既可以用于研究昆虫与植物的关系,也可以用于研究吸血昆虫(或蜱螨)与动物(或人)的关系,但由于应用上的一些技术原因,到目前为止,EPG还是仅应用于刺吸式口器

* 资助项目:国家自然科学基金(30571219)、国家转基因新品种培育重大专项(2009ZX08012-007B)。

** 通讯作者,E-mail: fmyan@henau.edu.cn

收稿日期:2010-12-13,接受日期:2011-03-05

昆虫(同翅目、半翅目)、锉吸式口器昆虫(蓟马)、植食性螨类等与植物关系方面的研究。由于刺吸式昆虫独特的取食特点,使得直接观察其取食行为非常困难。对于咀嚼式昆虫,可以通过观察植物的受损来判断昆虫的取食程度、取食量,以及昆虫对于植物种类、部位的喜好程度;但刺吸式昆虫的取食情况就很难通过常规观察来了解。而 EPG 技术可以将刺吸式口器昆虫的取食过程通过电位的形式记录下来(Tjallingii,1988),在刺吸式昆虫与植物的关系研究上具有独特的优势。目前,EPG 主要应用于以下 3 个方面:

第一,EPG 技术可以用来进行刺吸式口器昆虫在植物上取食行为的研究。有很多技术可以用来研究这些昆虫的取食行为,如生态学方法中的昆虫在寄主植物上的繁殖速率、昆虫在寄主植物上的分布,或者利用直接观察的方法、蜜露钟法来研究昆虫在寄主植物上的取食等。虽然这些生态学和生物学方法对昆虫行为的干扰较少,能够获得相关昆虫取食的宏观信息,但这些方法不能得到昆虫口针在寄主植物中刺吸的相关信息。用 EPG 技术来研究昆虫的取食行为,可以准确得知昆虫口针的刺探位置、是否吸食汁液、吸食时间长短、植物对昆虫的抗性因素的存在部位等信息(Walker and Janssen,2000)。

第二,EPG 可以进行植物对刺吸式昆虫抗性机制的研究和植物的诱导防御反应机理的研究(Eenink *et al.*, 1984; Will *et al.*,2009; Yin *et al.*, 2010)。EPG 波形及发生顺序、持续时间等,可以在一定程度上反映昆虫对植物各个组织的喜好程度,同时可以说明植物在组织水平上是否存在对昆虫的抗性或诱食因子,因此,利用 EPG 可以对抗性或诱食因子进行准确定位。

第三,EPG 在刺吸式昆虫传播植物病毒机理的研究中可以发挥重要作用。研究表明,植物病毒可以修饰媒介昆虫的取食行为和寄主植物的营养状况,而 EPG 的一些特征波形(或其亚波)能够反映出昆虫是否带毒、植物染毒程度等(Martin *et al.*, 1997)。

因此,DC-EPG 技术在研究昆虫在寄主植物上的取食行为、植物的抗性机制、昆虫的传毒机理等方面成为一种重要的工具。

2 植物与昆虫的选择

2.1 植物材料及实验叶片的选择

EPG 实验所用植物,生长情况应严格保持一致,这样才能尽可能减少因为实验材料引起的误差。植物不同部位对于昆虫的取食行为也有很大的影响(Tjallingii and Mayoral, 1992),待测植株上放置昆虫的叶片位置应是昆虫喜食叶片的所在位置。刺吸式昆虫一般在叶背的叶脉附近取食,所以应将昆虫放在叶背叶脉周围。人工直接放置在叶背的昆虫容易滑落,在屏蔽笼中也不好操作,因此可以用斜放的塑胶板或聚酯板固定叶片,使其叶背向上,用封口膜固定在板上,以防叶片翻转或移动导致昆虫脱离叶面或者金线接触叶面进而干扰记录。同时,这样也可以使昆虫更容易获得充足的光源,方便昆虫觅食。

2.2 实验昆虫的固定和预处理

EPG 实验所用昆虫的标准应该严格保持一致,不同龄期和性别的昆虫的取食行为可能有较大的差异。最好将昆虫的龄期差异控制在 24 h 之内。通常情况下,EPG 试虫最好选择成虫,这是因为如果以幼虫作为测试昆虫,实验记录过程中的幼虫脱皮会导致金线脱落,从而影响实验成功率。如有特殊情况必须使用幼虫进行实验,则应该在幼虫蜕皮后最短的时间内进行实验。下面详细介绍昆虫的固定和连接中应当注意的问题。

2.2.1 昆虫的固定一般采取负压法、冷冻法或 CO_2 麻醉法 由于昆虫的活动性,需要将昆虫麻醉或者固定后再进行金丝电极连接。昆虫的固定一般采取负压法、冷冻法或 CO_2 麻醉法。可采用真空泵或负压等制作固定昆虫的装置,简单的也可以利用水流产生的负压。昆虫的麻醉可采用干冰麻醉法和冷冻法。这类方法的难点在于时间的掌握,不同昆虫对于低温的承受能力有差异。例如,烟粉虱在冷冻室中经过 20 ~ 30 s 即不能活动,取出置于操作台上即可进行电极的连接。由于蚜虫的活动性较弱,一般连接过程可以直接在叶片上进行。褐飞虱不宜采用冷冻法,因为经过冷冻的褐飞虱,恢复活动后,取食能力较差,对实验结果影响较大。

2.2.2 昆虫与金丝的连接 昆虫电极上的金丝会在一定程度上影响昆虫的活动,有时也可能影