技术与方法

飞蝗解毒酶系活力测定方法*

董 玮** 吴海花 张建珍 王泽世 马恩波***

（山西大学应用生物学研究所，太原 030006）

摘 要 飞蝗 *Locusta migratoria* 是重要的农业害虫，代谢抗性是飞蝗主要的农药抗性机制之一。与代谢抗性相关的解毒酶系主要有：非专一性酯酶系（Non-specficesterases，ESTs）、谷胱甘肽 *S*-转移酶系（Glutathione *S*-transferases，GSTs）和细胞色素 P450 单加氧酶系（Cytochrome P450 monooxygenases，P450s），解毒酶系活力的测定是研究飞蝗农药代谢机制的重要途径。本文详细介绍了飞蝗解毒酶系的测定方法，为蝗虫及其他昆虫解毒酶系的测定提供参考。

关键词 飞蝗，解毒酶系，非专一性酯酶，谷胱甘肽 *S*-转移酶，细胞色素 P450 单加氧酶

Techniques for assaying detoxification enzyme activity in *Locusta migratoria*

DONG Wei** WU Hai-Hua ZHANG Jian-Zhen WANG Ze-Shi MA En-Bo***

(Research Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract *Locusta migratoria* (L.) is a major agricultural pest and metabolic resistance is one of the most important mechanisms by which this species develops resistance to insecticides. The detoxification enzymes, which are associated with metabolic resistance, include non-specific esterase (ESTs), glutathione *S*-transferases (GSTs) and cytochrome P450 monooxygenases (P450s). Assaying detoxification enzyme activity is an important way to study pesticide metabolism in *L. migratoria*. This paper describes in detail how to analyze the detoxification enzymes activity in *L. migratoria*, and provides a reference for this in other insects.

Key words *Locusta migratoria*, detoxification enzymes, non-specificesterases, glutathione *S*-transferases, cytochrome P450 monooxygenases

飞蝗 *Locusta migratoria*（L.）是重要的世界性农业害虫，具有极强的迁飞和繁殖能力，广泛分布于世界各地，尤其是中低纬度地区（Scanlan *et al.*，2001）。飞蝗的大规模迁飞和暴发可对农业生产造成毁灭性灾难（陈永林，1991；任炳忠，2013），全世界约有 100 多个国家不同程度地受到蝗灾的威胁（Skaf *et al.*，1990；Wang *et al.*，2014）。目前，控制蝗虫为害的手段主要是采用化学杀虫剂来降低虫口密度（张龙和严毓骅，2000；郝树广等，2002）。化学防治虽然快速、高效，但是由于杀虫剂使用剂量的不断增大，使蝗虫种群长期处于杀虫剂的胁迫下，导致杀虫剂的效能降低，使飞蝗产生了抗药性（Yang *et al.*，2009）。

大量研究表明，代谢抗性是昆虫对杀虫剂产生抗药性的主要机制之一。与代谢抗性相关的解毒酶系主要有：非专一性酯酶系（Non-specificesterases，ESTs）、谷胱甘肽 *S*-转移酶系（Glutathione *S*-transferases，GSTs）和细胞色素 P450 单加氧酶系（Cytochrome P450 monooxygenases，P450s）（Yang *et al.*，2009；

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31201545，31172161）

**第一作者 First author，E-mail：13586974@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：maenbo2003@sxu.edu.cn

收稿日期 Received：2015-07-11，接受日期 Accepted：2015-08-21

Qin *et al.*，2011）。由于化学杀虫剂大部分为亲脂性的，在其进入昆虫体内后，可被解毒酶氧化、还原或水解，降解为亲水性化合物而排出体外，从而发挥解毒作用。在上述解毒酶系中，只要有一种酶系发生变化就可能影响到虫体对杀虫剂的解毒代谢，但是，多数情况下，昆虫的代谢抗性往往是这些酶系共同作用的结果（Qu *et al.*，2003；Yang *et al.*，2009）。目前，已有大量关于解毒酶系参与昆虫抗药性的报道。本文详细介绍了飞蝗解毒酶系的测定方法，为蝗虫及其他昆虫解毒酶系测定及代谢抗性机制研究提供借鉴和参考。

1 材料准备与溶液配制

1.1 昆虫

飞蝗 *L. migratoria*（L.）虫卵购自山西太原晋源区蝗虫养殖公司，置于人工培养箱中孵化，温度为（28±1）℃，湿度为 50%，光周期为 14L∶10D，若虫孵出后，将其移至纱网制成的养虫笼中，用新鲜小麦苗饲喂，长至 3 龄后添加麦麸。

1.2 试剂

α-乙酸萘酯（α-naphthyl acetate，α-NA）、α-萘酚（α-naphthol）、固蓝 B 盐（Fast blue B salt）、7-乙氧香豆素（7-ethocycoumarin，7-EC）、4-甲基伞形酮（4-methylumbelliferone）、氧化型谷胱甘肽（Oxidizedglutathione，GSSG）、谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductase，GR）购自美国 Sigma 化学药品公司（St. Louis，MO）；牛血清白蛋白（Bovine serum albumin，BSA）购自美国伯乐公司（Hercules，CA）；1-氯-2，4-二硝基苯（1-chloro-2，4-dinitrobenzene，CDNB）、还原型谷胱甘肽（Reduced glutathione，GSH）订购于上海生工生物工程有限公司；三氯乙酸（Trichloroacetic acid，TCA）和 NADPH 分别购自天津科密欧化学试剂有限公司和绿生源生物科技公司。

1.3 溶液配制

1.3.1 非专一性酯酶活性测定所需溶液

1）pH 7.5 磷酸缓冲液（0.1 mol/L）：称取 $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 30.18 g、KH_2PO_4 2.16 g、蒸馏水定容至 1 000 mL；

2）α-NA 母液（30 mmol/L）：称取 55.9 mg α-NA 溶于 10 mL 丙酮，冷藏保存；

3）α-NA 工作液（0.3 mmol/L）：1 mL 母液加磷酸缓冲液稀释，定容至 1 000 mL；

4）5% SDS 溶液：称取 5 g SDS，蒸馏水定容至 100 mL，室温保存；

5）显色剂：称取 30 mg 固蓝 B 溶于 10 mL 5%的 SDS 溶液，现用现配，避光；

6）α-萘酚母液（2 μg/μL）：称取 α-萘酚 10 mg 溶于 5 mL 丙酮；

7）α-萘酚工作液（0.02 μg/μL）：100 μL 母液加磷酸缓冲液稀释，定容至 10 mL；

8）磷酸缓冲液与 1%丙酮的混合溶液：500 μL 丙酮加磷酸缓冲液定容到 50 mL。

1.3.2 谷胱甘肽 *S*-转移酶活性测定所需溶液

1）GSH（10.35 mmol/L）：称取 31.8 mg GSH 溶于 10 mL 蒸馏水，现用现配；

2）CDNB（20 mmol/L）：称取 40.52 mg CDNB 溶于 10 mL 丙酮，分装冷藏避光保存。

1.3.3 细胞色素 P450 活性测定所需溶液

1）7-ECOD（50 mmol/L）：称取 19.02 mg 7-ECOD 溶于 2.0 mL 丙酮，避光保存；

2）β-NADPH（62.5 mmol/L）：称取 5.2 mg 溶于 100 μL 蒸馏水中；

3）氧化型谷胱甘肽（100 mmol/L）：称取 61.26 mg 溶于 1.0 mL 蒸馏水中；

4）乙腈（50%）：3.0 mL 乙腈加入 3.0 mL 0.05 mol/L TRIZMA-base（pH 10）（Tris-HCl）；

5）底物-NADPH 混合液：50 μL 50 mmol/L 的 7-ECOD，100 μL 62.5 mM β-NADPH，4.85 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.6），室温混合（现用现配）；

6）伞形酮母液（1.0 μg/μL）：称取 5 mg 溶于 5 mL 丙酮；

7）伞形酮工作液（0.4 ng/μL）：100 μL 伞形酮（1.0 μg/μL）加入 4.9 mL 磷酸缓冲液稀释，混匀后从中取出 100 μL 伞形酮（0.02 μg/μL）加入 4.9 mL 磷酸缓冲液。

1.4 主要仪器

FA1104 型上皿电子天平（上海精科天平仪

器厂）；隔水式电热恒温培养箱（湖北省黄石市医疗器械厂）；DY89-II 型电动玻璃匀浆机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；3K-15 型高速冷冻离心机（德国 Sigma 公司）；HWS24 型电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；SpectraMAX 190 型酶标仪（美国 Molecular Device 公司）；SpectraMAX M5 型酶标仪（美国 Molecular Device 公司）。

2　测定方法

2.1　酶液的制备

将虫体加入预冷的玻璃匀浆器中，按 1∶10（w/v）的比例加入 0.1 mol/L、pH 7.5 预冷的磷酸缓冲液，将匀浆杯置于冰水混合物中，用玻璃电动匀浆机 500 r/min 匀浆 1 min。P450 所需酶液用塑料匀浆杵匀浆 30 s，加入 pH 7.6 的磷酸缓冲液。匀浆液于 10 000 g 4℃离心 15 min，取上清液转移到新的离心管中，作为酶液冰浴备用。

2.2　非专一性酯酶活力的测定

酯酶比活力测定方法参照 van Asperen（1962）及 Zhu 和 He 等（2000）的方法。在 96 孔酶标板中加入 15 μL 适当稀释的酶液，然后加入 135 μL 0.3 mmol/L 的 α-NA 溶液，混合后放入恒温箱于 37℃温育 30 min，取出后加入 50 μL 显色剂终止反应，室温放置 15 min，将样品放入 SpectraMAX 190 型酶标仪，测定 OD 值，对照加 15 μL 磷酸缓冲液代替酶液。测定 600 nm 处 OD 值，实验设 3 次重复，记录 OD 值。

2.3　谷胱甘肽 *S*-转移酶活力的测定

谷胱甘肽 *S*-转移酶活力测定方法参照 Zhu 等（2000）的方法加以修改，在酶标板中加入 10 μL 适当稀释的酶液，将 20 mmol/L GSH 和 10.35 mmol/L CDNB 按照 188∶2 体积比混合（现配），用多道移液器加入 190 μL 混合液，放入 SpectraMAX 190 型酶标仪，用时间动力学程序测定样品，在 340 nm 处每隔 10 s 计数，记录 1 min 内的反应速度 $\Delta OD_{340\ min}$，对照组以 10 μL 缓冲液代替酶液。CDNB 的摩尔消光系数为 9.6 $mmol \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$。

2.4　细胞色素 P450（7-乙氧香豆素 O-脱乙基酶 ECOD）活力的测定

参照 Aitio（1978）及 Greenlee 和 Poland（1978）方法，并加以修改。在酶标板中加入 20 μL 酶液，将 80 μL 底物-NADPH 混合液加入酶液中，使反应体系中 7-EC 和 β-NADPH 的终浓度分别为 0.4 和 1.0 mmol/L；将反应溶液混匀，于 30℃ 240 r/min 的摇床中孵育 30 min；加入 10 μL 氧化型谷胱甘肽和 10 μL 谷胱甘肽还原酶（1.0 U）于每一孔中，室温孵育 10 min；加入 120 μL 50%乙腈终止反应；对照组以 20 μL 磷酸缓冲液代替酶液。用 SpectraMAX M5 型荧光酶标仪测定 7-羟基香豆素在 465 nm 处的荧光变化，激发波长 λex=390 nm（狭缝 slit=10 nm）。

2.5　蛋白含量的测定

蛋白含量根据 Smith 等（1985）的方法，用牛血清白蛋白作为标准，用酶标仪在 560 nm 处读取 OD 值。

3　酶活力计算方法

3.1　非专一性酯酶比活力计算

非专一性酯酶比活力的计算采用产物标准曲线法，将吸光值转换为 mmol 萘酚/min·mg pro.。产物标准曲线用 α-萘酚作标准测定，配制成 8 个不同浓度的 α-萘酚溶液，按照表 1 依次加试剂，将不同体积的 0.02 μg/μL α-萘酚加入到 15 μL 0.1 mol/L、pH 7.5 磷酸缓冲液中用 1%的丙酮磷酸缓冲液补足体积至 150 μL，再加入 50 μL 显色剂，每管总体积为 200 μL， α-萘酚在体系中的终浓度为 0.28~3.64 μg。

将溶液混匀，室温放置 15 min，用酶标仪在 600 nm 处测定 OD 值。每组设 3 个重复，取平均值，用线性回归建立 α-萘酚含量（μg）对吸光度（OD 值）的标准曲线。同样建另一个 α-萘酚含量为 0.028~0.896 μg 的标准曲线。将实验测得的 OD 值代入相应范围的线性方程，计算出 α-萘酚含量记为 C（μg），将 C 带入下列公式计算出酯酶的比活力。

表 1 不同浓度 α-萘酚的配制

Table 1 Operation process of dilute concentration of α-naphthol

	浓度 Concentration							
	1	2	3	4	5	6	7	8
α-乙酸萘酯体积 α-NA volume (μL)	0	10	30	50	70	90	110	130
磷酸缓冲液体积 PBS volume (μL)	15	15	15	15	15	15	15	15
1%丙酮磷酸缓冲液体积 PBS+ 1% acetone volume (μL)	135	125	105	85	65	45	25	5
总体积 Total volume (μL)	150	150	150	150	150	150	150	150

$$EST = \frac{C}{T \times P \times v} = \frac{15.415 \times C}{P} \text{nmol / min / mg}$$

公式中 T: 反应时间；P：蛋白含量；v：参与反应的酶液体积。

3.2 谷胱甘肽 *S*-转移酶活力计算

谷胱甘肽 *S*-转移酶活力的计算采用消光系数法，CDNB 的摩尔消光系数为 9.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$，将实验所测 $\Delta\text{OD}_{340\ \text{min}}$ 代入下列公式计算谷胱甘肽 *S*-转移酶的比活力。

$$GST = \frac{\Delta OD \times V}{\dfrac{T_{\min} \times p\mu\text{g/mL} \times v\text{mL}}{\dfrac{9.6}{\dfrac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \text{cm}} \times \dfrac{2}{3}\text{cm}}} = \frac{\Delta OD \times V}{6.4 \times T \times P \times v} \text{nmol / min / mg}$$

公式中 T：反应时间；P：蛋白含量；v：参与反应的酶液体积；V：酶促反应总体积；$\Delta OD_{340\ \text{min}}$：吸光度变化值。

3.3 细胞色素 P450（7-乙氧香豆素 *O*-脱乙基酶 ECOD）活力的测定

7-ECOD 比活力的计算采用产物标准曲线法，配制成 8 个不同浓度的溶液，用 7-羟基香豆素作标准来测定，将不同体积 0.4 ng/μL 7-羟基香豆素与 pH 7.6 的磷酸缓冲液按照表 2 混合。

每孔加入 100 μL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.6），120 μL 溶于 0.05 mol/L TRIZMA-base（pH 10）的 50%（vol/vol）乙腈，总体积 240 μL，用 SpectraMAX M5 型荧光酶标仪测定 465 nm 处的荧光变化，激发波长 λex=390 nm 狭缝 slit=10 nm，每组设 3 个重复，取平均值，用线性回归建立 7-羟基香豆素含量（ng）对吸光度（OD 值）的标准曲线。将实验测得的 OD 值代入线性方程，计算出 7-羟基香豆素含量记为 C（ng），将 C 带入下列公式计算出 7-ECOD 的比活力。

$$ECOD = \frac{C}{T \times P \times v} = \frac{10.282 \times C}{P} \text{pmol / min / mg}$$

公式中 T：反应时间；P：蛋白含量；v：参与反应的酶液体积。

4 注意事项

在进行酶活力测定时，需要注意如下事项：

1）制备酶液时，在匀浆离心后取上清液需注意去除液体表面漂浮的脂肪体，可将移液器吸

表 2 不同浓度 7-EC 的配制

Table 2 Operation process of dilute concentration of 7-EC

	浓度 Concentration							
	1	2	3	4	5	6	7	8
7-羟基香豆素体积 7-EC volume (μL)	0	2	4	6	8	10	12	14
磷酸缓冲液体积 PBS volume (μL)	20	18	16	14	12	10	8	6
总体积 Total volume (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20

头伸入液体表面以下吸取溶液，也可采取抽滤方法去除脂肪体；

2）提取细胞色素 P450 时，可以采用高速离心机分离粗酶液，取上清液测定，也可采用超速离心机分离出微粒体，取沉淀进行测定；

3）酶液在测定前，须保持冰浴条件，避免长时间室温放置失去活性；

4）制备好的酶液如果当日不进行酶活测定，则应分装到离心管里，置于 – 80℃冻存，每次测定，取出一管，尽量避免反复冻融而使酶液失去活性；

5）当测定多个样品时，加底物时须用多道移液器，这样可以确保酶液和底物开始发生反应的时间一致，从而减少误差；

6）测定谷胱甘肽 *S*-转移酶时，如样品量过大，应分次测定，以避免加样时间过长致使底物之间相互反应；

7）计算谷胱甘肽 *S*-转移酶比活力时，需注意减去对照组 OD 的变化值；

8）用消光系数法计算谷胱甘肽 *S*-转移酶时，需注意消光系数 9.6 $mmol \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$ 适用于液面高度为 1 cm 的反应体系，在本文中，由于液面高度为 2/3 cm，因此计算时需乘以 2/3。在实际操作中，应根据具体反应体系液面高度，对消光系数进行换算。本文所述各项解毒酶测定方法，也适用于其他昆虫，测定时可根据具体情况稀释酶液，用分光光度计测定时，则需根据比色皿大小相应改变反应体系。

5　讨论

昆虫在外源有毒物质的选择压力下，可以通过增加体内代谢解毒酶活力，增强自身解毒能力，加快对外源物质的代谢解毒过程。因此，解毒酶系的活力测定是研究昆虫对杀虫剂代谢机制的重要方法。

非专一性酯酶系（ESTs）是一种常见的水解酶，普遍存在于昆虫体内，能够催化酯键水解，在杀虫剂代谢过程中起着重要作用（He *et al.*，2004）。非专一性酯酶对底物的催化作用一般发生在酶蛋白的特定部位，其作用方式是通过水解酯类化合物的酯键来达到解毒的目的。非专一性酯酶活性测定常用的底物主要有 α-乙酸萘酯（α-NA）、β-乙酸萘酯（β-NA）和 α-丁酸萘酯（α-NB），本文以 α-乙酸萘酯为底物详细介绍了酯酶比活力的测定和计算方法。其他两种底物测定均可参照本方法，当以 β-乙酸萘酯（β-NA）为底物时，则需测定 560 nm 处 OD 值。

谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）的反应原理是通过催化各类亲电子基团与还原型谷胱甘肽进行亲核加成，将外源有毒物质代谢分解并排出体外（Motorama and Dauterman，1980；唐振华和毕强，2003；Qin *et al.*，2012）。因此，GSTs 进行酶促反应时，需要依赖于还原型谷胱甘肽 GSH，而 GSH 与底物 CDNB 混合时也会发生反应，实验中应尽量减少这两种底物之间的反应。测定时，混合溶液应遵循现用现配原则，配好的溶液应避免长时间存放，同时注意选择合适的 pH 值，测定需在室温条件下进行，计算酶活力时应减去对照组 OD 的变化值。

细胞色素 P450 是生物体内一种重要的末端氧化酶（Omura *et al.*，1993；Werck and Feyereisen，2000），主要存在于微粒体中，由于细胞色素 P450 酶是一种膜结合蛋白，难以分离提取，且在体外不稳定，容易失活，长期以来，昆虫细胞色素 P450 的测定难度较大。脱乙基反应是细胞色素 P450 酶的重要催化反应之一。细胞色素 P450 以乙氧香豆素为底物，进行脱乙基反应会生成荧光产物 7-羟基香豆素（伞形酮）。在本文中，我们利用 7-羟基香豆素能产生荧光的特性，用 7-羟基香豆素检测这一产物的生成量，从而计算细胞色素 P450 7-乙氧香豆素-O-脱乙基酶的活性。这一方法灵敏可靠，同样适用于其他昆虫细胞色素 P450 的酶活力测定。

综上所述，本文根据实际工作经验提供了飞蝗酯酶、谷胱甘肽 *S*-转移酶和细胞色素 P450 单加氧酶的测定方法，旨在为相关研究提供借鉴与参考。

参考文献（References）

Aitio A, 1978. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Analytical Biochemistry*, 85 (2): 488–491.

Chen YL, 1991. Locust and calamity caused by locust. *Bulletin of Biology*, 11: 9–12. [陈永林, 1991. 蝗虫和蝗灾. 生物学通报, 11: 9–12.]

Greenlee WF, Poland A, 1978. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 205 (3): 596–605.

Hao SG, Qin QL, Wang ZJ, 2002. Management strategies and control techniques for locust and grasshopper plagues around the world: status and perspectives. *Acta Entomologica Sinica*, 45(4): 531–537. [郝树广, 秦启联, 王正军, 2002. 国际蝗虫灾害的防治策略和技术: 现状与展望. 昆虫学报, 45(4): 531–537.]

He YP, Ma EB, Zhu KY, 2004. Characterizations of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pestic. Biol. Chem. Physiol.*, 78(2): 103–113.

Motorama N, Dauterman WC,1980. Glutathion *S*-transferases: their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.*, (2): 49–69.

Omura T, Ishimura Y, Fjiik Y, 1993. Cytochrome P450. Tokyo: VCH, Kodansha. 223–227.

Qin GH, Jia M, Liu T, Zhang XY, Xuan T, Guo YP, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2012. Heterologous expression and characterization of a sigma glutathione *S*-transferase involved in carbaryl detoxification from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *J. Insect Physiol*., 58(2): 220–227.

Qin GH, Jia M, Liu T, Zhang XY, Xuan T, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, Zhang JZ, 2011. Identification and characterization of ten glutathione *S*-transferase genes from oriental migratory locust, *Locust migratoria manilensis* (Meyen). *Pest Manage Sci.*, 67: 697–704.

Qu MJ, Han ZJ, Xu XJ, Yue LN, 2003. Triazophos resistance mechanisms in the rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 77(3): 99–105.

Ren BZ, 2013. History and controlling strategy of locust plague in China. *Journal of Jilin Agricultural University*, 35(2): 5. [任炳忠, 2013. 中国的蝗灾及防控对策. 吉林农业大学学报, 35(2): 5.]

Scanlan JC, Grant WE, Hunter DM, Milner RJ, 2001. Habitat and environmental factors influencing the control of migratory locusts (*Locusta migratoria*) with an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*). *Ecological Modelling*,136(2): 223–236.

Skaf R, Popov G B, Roffey J, 1990. The desert locust-an international challenge. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B*, 328(1251): 525–538.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Provenzano FH, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1): 76–85.

Tang ZH, Bi Q, 2003. Molecular Behavior of Insecticide Action. Shanghai: Fareast Publications. 125–128.[唐振华, 毕强, 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海: 上海远东出版社. 125–128.]

van Asperen K, 1962. A study of house fly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8: 401–416.

Wang XH, Fang XD, Yang PC, 2014. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nat. Commun.*, 5(5): 1–9.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R, 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6):3003.1–3003.9.

Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu XJ, Guo YP and Ma EB, 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71(1): 3–15.

Zhang L, Yan YH, 2000. Some considerations on sustainable control over plague of locusts in China. *Acta Entomologica Sinica*, 43(supplement): 180–185. [张龙, 严毓骅, 2000. 持续治理飞蝗灾害的新对策. 昆虫学报, 43 (增刊): 180–185.]

Zhu KY, Gao JR, Starkey SK, 2000. Organophosphate resistance mediated by alterations of acetyl cholinesterase in a resistant clone of the green bug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 68(3): 138–147.

Zhu KY, He FQ, 2000. Elevated esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the green bug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 67(3): 155–167.