

甲酸乙酯及甲酸对离体玉米象乙酰胆碱酯酶及酯酶活性的影响^{*}

徐 丽 贺艳萍 陈思思 谢令德^{**}

(武汉工业学院食品学院, 武汉 430023)

Effect of ethyl formate and formic acid to esterase and AChE of *Sitophilus zeamais* in vitro. XU Li, HE Yan-Ping, CHEN Si-Si, XIE Ling-De^{**} (Institute of Food Science and Engineering of Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract The inhibition of ethyl formate and formic acid to esterase and AChE of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) in vitro was studied. The results showed that ethyl formate can not inhibit esterase and AChE of *S. zeamais* in vitro, and the I_{50} of formic acid to esterase and AChE was much higher than the LC_{50} of the ethyl formate to *S. zeamais*. It revealed that the inhibition of formic acid was not the major mechanism of ethyl formate killing *S. zeamais*.

Key words ethyl formate, formic acid, esterase, AChE, *Sitophilus zeamais*

摘 要 研究甲酸乙酯和甲酸对离体玉米象 *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) 酯酶和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制作用, 结果表明甲酸乙酯对离体的玉米象酯酶和 AChE 没有抑制作用, 并且甲酸对玉米象酯酶和 AChE 的抑制中浓度远远高于甲酸乙酯对玉米象的致死中浓度, 说明甲酸对玉米象这两种酶的抑制作用不是甲酸乙酯杀虫的主要机理。

关键词 甲酸乙酯, 甲酸, 酯酶, 乙酰胆碱酯酶, 玉米象

甲酸乙酯是一种很有潜力的熏蒸剂, 具有很好的速效性, 在空仓中 24 h 时就能达到较理想的熏蒸效果; 甲酸乙酯还是一种环境友好型熏蒸剂, 许多谷物、干果、蔬菜以及动物性产品牛奶、奶酪等都能产生甲酸乙酯。一般情况, 在水中甲酸乙酯的水解反应较慢, 而在粮食中, 尤其是在温暖而潮湿的粮食中反应较快^[1], 所以甲酸乙酯在粮食中的残留期较短。甲酸乙酯进入昆虫体内水解为甲酸和乙醇, 乙醇为无毒物质, 甲酸能够抑制昆虫的细胞色素 c 氧化酶的活性, 导致昆虫死亡^[2]。为了进一步研究甲酸乙酯进入昆虫体内后, 对昆虫的其他酶有无影响, 在离体条件下研究了甲酸乙酯和甲酸对玉米象 *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) 酯酶和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验用玉米象为武汉工业学院室内饲养种群, 饲养条件为: 温度 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $75\% \pm 5\%$, 以整粒小麦饲养。饲料所用小麦需 80°C 灭菌 2 h 后调节含水量为 $13\% \pm 1\%$, 试虫为羽化 7~14 d 的成虫。

1.2 主要试剂

α -萘酚 (分析纯, 湘中地质试验研究所); 牛血清白蛋白 (Roche 分装, 武汉华顺生物技术有限公司); 考马斯亮蓝 G-250 (进口分装, 武

^{*} 资助项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD02A18 - 01)。

^{**} 通讯作者, E-mail: xianld@163.com

收稿日期: 2009-07-03, 修回日期: 2009-09-01

汉华顺生物技术有限公司);碘化硫代乙酰胆碱(进口分装,国药集团化学试剂有限公司);二硫双对硝基苯甲酸(DTNB)(进口分装,国药集团化学试剂有限公司);十二烷基硫酸钠(电泳级,武汉凌飞科技生物技术有限公司);坚固兰B盐(sigma进口,武汉华顺生物技术有限公司); α -NA(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲酸(分析纯,天津市东丽区天大化学试剂厂);甲酸乙酯(分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司)。

1.3 酯酶活性的测定及计算

酯酶活性测定参照 Van Asperene^[3]的方法,以 α -NA溶液为底物测定酯酶活性。

1.3.1 α -萘酚标准曲线的制备 以不同含量的 α -萘酚溶液,在600 nm处测OD值,以 α -萘酚含量为纵坐标,以OD值为横坐标绘制标准曲线。

$$\text{酯酶比活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}) = \frac{\alpha\text{-萘酚产量}(\mu\text{g})}{\alpha\text{-萘酚分子量} \times \text{样品体积}(\text{L}) \times 30\text{ min} \times \text{样品蛋白浓度}}$$

1.4 酶源蛋白含量测定

参照 Bradford^[4]记述的考马斯亮蓝 G250 染色法测定。

1.4.1 蛋白质标准曲线的制备 取各浓度的牛血清白蛋白溶液 0.5 mL 于试管中,对照组取 0.5 mL 纯净水,再加入 2.5 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂,25℃ 水浴加热 2 min,595 nm 下测定 OD 值,以牛血清白蛋白的含量为纵坐标,以 OD 值为横坐标绘制标准曲线。

1.4.2 酶源的制备 与所测的酶活酶源制备方法相同。

1.4.3 测定方法 吸取酶液 0.5 mL 于试管中,对照管中则加入 0.5 mL 纯净水,加入 2.5 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂,混匀 25℃ 恒温水浴下放置 2 min,595 nm 下比色测定 OD 值,重复 3 次,取平均值,根据标准曲线计算出蛋白质含量。

1.5 AChE 活性的测定

1.5.1 酶源的制备 同酯酶酶源的制备,所不同的是以 0.5% TritonX-100 的磷酸缓冲溶液作

1.3.2 酶源的制备 试虫先用水漂洗 2~3 次,再用 0.1 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液漂洗 2~3 次,将虫体分成 3 个重复组,每个重复组的虫体加入 1 mL 0.1 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液溶液于冰水浴中充分匀浆,4℃,12 000 g 离心 15 min,取上清液作为待试酶液。

1.3.3 酯酶比活力测定 将酶液用匀浆缓冲液稀释 25 倍,使测得的数值在标准曲线范围内。在 225 μ L 酶液中加入 2 025 μ L 0.3 mmol α -NA 溶液(抑制剂体积占酶液的 1/10,抑制 5 min 后加底物),放入 37℃ 电热恒温水浴锅内反应 30 min。取出,再加入 750 μ L 固蓝 B 溶液,室温放置 15 min 后在 600 nm 处比色,以磷酸缓冲液为空白对照。根据所测定 OD 值和 α -萘酚标准曲线计算出每 mL 酶液生成的 α -萘酚的量,计算出酯酶的比活力。

为均浆缓冲液。

1.5.2 AChE 比活力测定 参照 Ellman 等^[5]的方法测定 AChE 活性。取待测酶液 0.15 mL 与 0.15 mL ATCh 混匀(抑制剂体积占酶液的 1/10,抑制 5 min 后加底物),30℃ 水浴反应 15 min 后加入 2.7 mL 显色剂(DTNB)中止反应,在 412 nm 下测定 OD 值。AChE 催化 ATCh 水解产生硫代胆碱和乙酸。硫代胆碱与 DTNB 结合生成黄色的 5-硫-2-硝基苯甲酸盐离子,此物质在 412 nm 处有最大吸收峰。

AChE 比活力

$$(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\Delta OD/\text{mg} \times V}{\epsilon \times L}$$

其中: $\Delta OD = OD/\text{反应时间}$ (单位为 min); V 为反应总体积(单位为 mL); ϵ 为产物与 DTNB 络合物的摩尔消光系数 = 13 600 L/mol/cm; L 为比色杯的光程 = 1 cm。

1.6 数据统计分析

数据用 SPSS 13.0 软件处理,进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 蛋白质标准曲线和 α -萘酚标准曲线

由牛血清白蛋白浓度与吸光度的相关关系,得回归直线方程为: $y = 159.94x - 2.5358$ ($R^2 = 0.997$);由 α -萘酚与吸光度相关关系,得回归直线方程为: $y = 12.356x - 0.1183$ ($R^2 = 0.9988$)。

2.2 甲酸乙酯对玉米象酯酶和 AChE 活性的影响

从表 1 可以看出,甲酸乙酯对玉米象酯酶活性影响不大,虽然药剂处理后酯酶活性略有提高,但酶活变化没有显著性差异($P > 0.05$)。由表 2 可以看出,甲酸乙酯对玉米象 AChE 也没有抑制作用,药剂处理后 AChE 活性反而有一定提高。这说明,甲酸乙酯不直接抑制玉米象酯酶和 AChE 的活性,相反,当浓度升高到一定值时会提高 AChE 活性。

2.3 甲酸对玉米象酯酶及 AChE 活性影响

从表 3 可看出,甲酸对玉米象酯酶有抑制作用,随着甲酸浓度的增大,酯酶比活力逐渐减少。甲酸对玉米象 AChE 有同样的抑制规律,

随着甲酸浓度的增加,AChE 比活力逐渐减少,但是其抑制中浓度都较高,甲酸对玉米象酯酶和 AChE 的抑制中浓度(I_{50})分别为 0.26 mol/L、0.31 mol/L,远远高于甲酸乙酯对玉米象的致死中浓度(LC_{50}) 1.20×10^{-7} mol/L。

表 1 甲酸乙酯对玉米象酯酶活性影响

甲酸乙酯的浓度 (mol/L)	酯酶比活力 (nmol/min/mg)	抑制率 (%)
0	86.97	—
10^{-7}	89.32	$-2.85 \pm 0.05a$
10^{-5}	94.69	$-9.01 \pm 0.04a$
10^{-3}	95.45	$-9.89 \pm 0.05a$
10^{-1}	92.85	$-6.90 \pm 0.05a$

注:结果表示为平均值 $\pm$ 标准差($n = 3$);平均值后的相同字母表示同一列的校正比活力没有显著差异(LSD Fisher's 多重比较 $P > 0.05$)。(下表同)

表 2 甲酸乙酯对玉米象 AChE 的影响

甲酸乙酯的浓度(mol/L)	AChE 比活力 (nmol/min/mg)	抑制率 (%)
0	4.52×10^{-3}	—
0.1	4.56×10^{-3}	$-0.88 \pm 0.03a$
0.2	4.79×10^{-3}	$-5.93 \pm 0.05ac$
0.4	5.33×10^{-3}	$-17.91 \pm 0.72bd$
0.8	5.25×10^{-3}	$-16.20 \pm 0.07cd$

表 3 甲酸对玉米象酯酶和 AChE 的影响

甲酸 浓度 (mol/L)	酯酶		AChE	
	比活力 (nmol/min/mg)	抑制率 (%)	比活力 (nmol/min/mg)	抑制率 (%)
0	110.39	—	5.79×10^{-3}	—
0.1	8.23	$19.94 \pm 0.04a$	4.52×10^{-3}	$22.01 \pm 0.03a$
0.2	65.07	$40.79 \pm 0.09b$	3.69×10^{-3}	$36.36 \pm 0.02b$
0.4	26.21	$76.20 \pm 0.03c$	1.45×10^{-3}	$75.00 \pm 0.02c$
0.8			4.90×10^{-4}	$91.55 \pm 0.03d$

3 讨论

AChE 是生物神经传导中一个关键性的酶,它通过迅速水解神经递质乙酰胆碱(ACh)而终止突触传递。在昆虫中 AChE 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标。高浓度的甲酸乙酯在体外对玉米象 AChE 没有抑制作用,唐培安等研究表明在离体条件下甲酸乙酯对米象 AChE 也没有明显的抑制作用^[6],这说明甲酸

乙酯不直接作用于 AChE。实验表明较高浓度的甲酸对玉米象 AChE 有一定的抑制作用,但是其抑制中浓度远远高于甲酸乙酯对玉米象的致死中浓度,这说明甲酸对玉米象 AChE 的抑制作用并不是甲酸乙酯杀虫的主要机理,AChE 不是甲酸乙酯的杀虫靶标酶。

酯酶是一类可以水解酯键的酶,通过破坏药剂的酯键而使药剂失去杀虫活性,所以它在昆虫的体内主要起解毒的作用,并在昆虫毒理

学中将其作为判断害虫抗药性上升的主要指标^[7]。但是,甲酸乙酯不同,因为甲酸乙酯酯键断裂后,水解为有毒物甲酸,而甲酸对害虫具有明显的杀伤作用,酯酶活性越高,越有利于甲酸乙酯杀虫。较高浓度的甲酸乙酯对玉米象酯酶没有抑制作用,而高浓度的甲酸对酯酶有一定的抑制作用,三者之间的关系还有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Damcevski K. A. , Annis P. C. Two old fumigants for the new millennium. In: Zalucki M. P. , Drew R. A. I. ,White G. G. (eds.). Pest management—future challenges , Proceedings of the Sixth Australasian Applied Entomological Research Conference , Brisbane , Australia , vol. 2. University of Queensland , 1998. 307.
- 2 Haritos V. S. , Dojchinov G. Cytochrome c oxidase inhibition in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) by formate , the toxic metabolite of volatile alkyl formates. *Comp. Biochem. Physiol.* , 2003 , **136**: 135 ~ 143.
- 3 Van Asperen K. A studies of house fly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* , 1962 , **8**: 401 ~ 416.
- 4 Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *J. Analytical Biochemistry* , 1976 , **72**: 248 ~ 254.
- 5 Ellman G. L. , Courtney K. D. , Andres V. J. A new and rapid colorimetric determination of an acetylcholinesterase activity. *J. Biochemical Pharmacology* , 1961 , **7**: 88 ~ 94.
- 6 唐培安. 甲酸乙酯对储粮害虫的熏蒸活性及作用机理研究, 硕士学位论文, 重庆: 西南大学 2006.
- 7 李士根, 刘永春. 蚊类抗药性机制研究进展. 中国媒介生物学及控制杂志 2001 , **12**: 76 ~ 78.