

昆虫乙酰胆碱酯酶研究进展

林璐璐, 陈浩梁, 谢明惠, 苏卫华* (安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 昆虫乙酰胆碱酯酶(AChE)是昆虫体内神经传导的一种关键酶,是有机磷类和氨基甲酸酯类农药的重要作用靶标。介绍了昆虫AChE研究的历史和现状,并分别从昆虫AChE的分子特性、*ace*基因、昆虫抗药性和农药残留检测4个方面进行了探讨,以期能为昆虫AChE的深入研究提供理论依据。

关键词 昆虫;乙酰胆碱酯酶;*ace*基因;抗药性;农药残留检测

中图分类号 S186 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)07-02053-03

Research Progress in Insect Acetylcholinesterase

LIN Lu-lu, SU Wei-hua et al (Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract Acetylcholinesterase (AChE) is one of the key enzymes in the insect nerve conduction, and also is the important target of organophosphate and carbamate pesticide. The history and status of research on insect AChE were introduced, and 4 aspects were separately discussed, including the molecular formula, *ace* gene, insect resistance and application in pesticide residue testing, so as to provide a theoretical basis for further study of insect AChE.

Key words Insect; Acetylcholinesterase; *ace* gene; Insect resistance; Pesticide residue testing

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)是生物体内神经传导过程中执行重要功能的一种关键酶。该酶通过催化降解神经递质乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach),终止其对神经突触后膜兴奋的刺激作用,以维持神经冲动在生物体内的正常传递^[1]。此外,也有人研究发现在神经系统以外的其他部位也存在AChE,这些酶分子作为调控因子诱导轴突生长和突触形成,参与细胞迁移、粘附和凋亡等过程^[2]。在国内有关AChE的研究中,对昆虫AChE的研究占主要部分,包括昆虫AChE的分子特性、*ace*基因、昆虫抗药性和农药残留检测等方面。笔者介绍了AChE的研究历史和现状,并分别从昆虫AChE的分子特性、*ace*基因、昆虫抗药性和农药残留检测等方面进行了探讨,以期能为昆虫AChE的深入研究提供理论依据。

1 昆虫AChE的分子特性

AChE是一种多分子型糖蛋白,依照分子特征可将其分为球型(对称型)和尾型(不对称型),其中球型包括催化亚基单体(G1)、二聚体(G2)、四聚体(G4),而尾型为胶原尾样亚基连接形成的不对称形,包括四聚体(A4)、八聚体(A8)、十二聚体(A12)^[3-4]。

在昆虫体内,AChE的主要存在形式会因昆虫种类的不同而有所不同。在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内AChE主要以有糖酯锚的疏水型二聚体存在^[5]。在豆莢草盲蝽(*Lygus hesperus*)体内,AChE则存在2种分子形式,并以亲水型二聚体形式存在为主^[6];在马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)体内,AChE也存在2种分子形式,其中亲水型二聚体占92%,两性单体占8%^[7]。

此外,AChE有2个主要的活性部位。一个是用以固定底物和决定底物特异性的阴离子部位(Anionic site, AS),另一个是能催化部位(Catalytic site, CS)。AChE在水解底物时必须先与阴离子部位结合,进而使其易于受能催化部位的攻击;其余结合部位还包括疏水部位电荷转移复合物形成部位、酚结合部位、空间异构部位(作用阴离子部位)和疏基结合部位^[8]。

2 昆虫AChE的编码基因

2.1 昆虫*ace*基因 自从1986年Hall和Spierer克隆出第1个昆虫*ace*基因(黑腹果蝇的*ace*基因)以来^[8],昆虫*ace*基因分析逐渐成为昆虫AChE研究领域的热点问题。迄今为止,至少有43种昆虫的*ace*基因被克隆出来^[9]。根据昆虫AChE在氨基酸序列上与果蝇(*Drosophila melanogaster*)AChE的相似程度,可将其划分为AP-AChE(Ace-paralogous AChE)和AO-AChE(Ace-orthologous AChE)。其中,AP-AChE与果蝇AChE同源性较低,称为I型乙酰胆碱酯酶(AChE1);AO-AChE与果蝇AChE同源性较高,称为II型AChE(AChE2)^[10-12]。

昆虫的*ace*基因存在不同的转录产物(如黑腹果蝇的*ace*基因存在415和418 kb的2种转录产物),并且昆虫*ace*基因的基因编码区长度通常在2 kb左右[如埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和马铃薯甲虫的*ace*基因最大转录长度均超过了10 kb,但基因编码区长度均约为2 kb]^[13-14]。此外,昆虫*ace*基因启动子的结构因虫种而异,如黑腹果蝇启动子区存在TA-TA框结构^[15],而埃及伊蚊*ace*基因的启动子区则缺少TATA框或CAAT框,但却含有调控因子序列TCAGT^[16]。

2.2 昆虫*ace*基因类型 关于编码AChE的基因类型,有些昆虫中只有1种[如黑腹果蝇、家蝇(*Musca domestica*)、澳大利亚铜绿丽蝇(*Lucilia cuprina*)、油橄榄果实蝇(*Bactrocera oleae*)、马铃薯甲虫及褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)等],这些昆虫中的AChE均由单基因*ace-2*编码^[17-18];而另一些昆虫的

基金项目 公益性行业(农业)科研专项(201003025);安徽省农业科学院院长青年基金项目(13B1111)。

作者简介 林璐璐(1984-),女,河南三门峡人,研究实习员,硕士,从事农业昆虫与害虫防治的研究。*通讯作者,副研究员,从事地下害虫方面的研究。

收稿日期 2014-02-12

AChE 至少是由 2 种 *ace* 基因编码,如在棉蚜 (*Aphis gossypii*)、桃蚜 (*Myzus persicae*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、烟青虫 (*Heliothis assulta*)、台湾稻螟 (*Chilo auricilius*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)、三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*) 和蜚蠊类等昆虫中均发现同时存在 2 种 *ace* 基因 (*ace-1* 基因和 *ace-2* 基因)^[19-21]。其中,*ace-1* 基因编码昆虫 AChE1,而 *ace-2* 基因编码昆虫 AChE2,二者的主要区别是 AChE1 中缺少 1 个含有 31 个氨基酸的“亲水肽片段”。

关于这 2 种 *ace* 基因的进化关系,有人认为在节肢动物分化以前,它们来源于同一个基因^[22]。Weill 等^[23]报道了冈比亚按蚊的 2 个 AChE 序列,并推测大多数昆虫中同时存在 2 种 *ace* 基因,而高等双翅目昆虫中缺少 *ace* 基因可能是由于此基因在进化过程中丢失造成的。Lu 等^[24-25]比对了多种昆虫的 *ace* 基因序列,发现不同昆虫 *ace-1* 或 *ace-2* 之间的序列同源性为 48% ~ 96%,而同种昆虫 2 种 *ace* 基因的同源性为 31% ~ 36%,这证实了 2 种 *ace* 基因进化关系的假设。

3 昆虫 AChE 与抗药性的关系

昆虫 AChE 能够迅速水解兴奋性神经递质 ACh 而保持神经突触传递的正常功能,是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的主要作用靶标^[26]。这 2 类杀虫剂通过使 AChE 活性部位磷酸化或氨基甲酰酯化而抑制 AChE 的活性,使 ACh 在突触间的作用时间延长,以引起突触后膜乙酰胆碱受体过度兴奋,然后通过干扰胆碱能突触引起神经系统的严重障碍,从而达到杀虫的目的^[27]。反之,具有抗药性的昆虫则主要是由于编码靶标的基因突变和扩增导致昆虫 AChE 的结构变化,造成靶标对杀虫剂的敏感性降低,从而产生抗药性。

近年来研究表明,抗性昆虫的 AChE 变构是由 *ace* 基因点突变引起的。在小菜蛾、棉铃虫、二化螟 (*Chilo suppressalis*)、苹果蠹蛾 (*Cydia pomonella*)、果蝇、家蚕追寄蝇 (*Exorista sorbillans*)、家蝇、马铃薯甲虫、冈比亚按蚊、尖音库蚊 (*Culex pipiens*)、三带喙库蚊、桃蚜、棉蚜、禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 中均发现了与抗性相关的点突变,且大部分突变位于酶的活性位点附近^[9]。

在含有 2 种 *ace* 基因 (*ace-1* 和 *ace-2*) 的昆虫中,其中有 1 种 *ace* 突变基因与抗性有关。丙硫磷抗性小菜蛾和敏感性小菜蛾的 *ace-2* 基因序列无明显差异,但抗性小菜蛾的 *ace-1* 基因却有 3 个氨基酸位点突变。由此可见,小菜蛾的抗性与 *ace-1* 发生的 3 个点突变有关^[28]。另外,尽管正常小菜蛾的 *ace-1* (novel *ace-1*) 与已知昆虫的 *ace-1* 高度同源,并同时存在于抗性和敏感性小菜蛾中,但抗性 *ace-1* 的转录水平是敏感性的 2 倍^[29]。

抗性突变,既可以是单个突变,也可能组合构成不同的突变,因此它们的抗性谱和抗性是不同的。Roussel 等^[30]将由 AChE 敏感度降低引起的抗性分为 2 种:I 型抗性和 II 型抗性。I 型抗性的特点是对氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性比(或 AChE 敏感性下降)远高于对有机磷类杀虫剂的抗性比。II 型抗性的特点是对氨基甲酸酯的抗性比和对有机磷类杀虫剂

的抗性比(或 AChE 敏感性下降)大约相等,或对有机磷类杀虫剂具有专一抗性。Vaughan 等^[31]在埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的研究中发现突变的 *ace* 基因位点 G285A 和 F350Y 与对有机磷的抗性相关,而突变的 *ace* 基因位点 F105S、G285A 和 F305Y 则与对氨基甲酸酯的抗性有关。

此外,在有些昆虫中也存在不敏感的 AChE,但尚未发现相关的 *ace* 基因突变,如棉粉虱 (*Bemisia tabaci*)、温室粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*)、黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*)、微小牛蝉 (*Boophilus microplus*) 和棉铃虫等^[17]。

4 昆虫 AChE 在农药残留检测中的应用

基于重组 AChE 的农药快速检测方法灵敏度较高,稳定性较强,可广泛应用于粮食作物和蔬菜中农药残留的快速检测。酶抑制法是目前农药残留快速检测的常用方法,该方法操作简便、快捷、成本低(不需要昂贵的大型仪器),适用于现场检测及大批量样品的检测。

酶抑制法主要包括试纸法、比色法、色谱分析法和生物传感器法。①试纸法:试纸法的检测限一般为 0.300 ~ 10.000 mg/kg。美国研制的“酶标签”检测限为 0.100 ~ 10.000 mg/L,而南京理工大学化学学院研制的植物酶片和底物片的检测限则可达 0.040 ~ 10.000 mg/L。②比色法:以生成有色化合物的显色反应为基础,通过比较或测定有色物质溶液颜色深度来确定待测组分含量的方法。目前常用的比色法检测限为 0.029 ~ 10.000 mg/L。③色谱分析法:气相色谱法、高效液相色谱法和气相色谱-质谱法等已被广泛应用于检测有机磷杀虫剂,且结果准确,但这些方法的缺点为仪器贵重、操作复杂、耗时长,不便于现场检测。④生物传感器:具有操作简单、响应快速、灵敏度高、仪器成本低等优点,因而被广泛应用于农药残留的快速检测中,其检测限为 20.0×10^{-9} mg/L^[32-33]。

生物传感器检测方法一般是利用有机磷杀虫剂对 AChE 的不可逆抑制作用,通过检测 AChE 催化水解氯化乙酰硫代胆碱 (Acetylthiocholine, ATCl) 产生硫代胆碱氧化电流的大小,实现痕量有机磷农药的检测。尽管有机磷农药对 AChE 的抑制率与硫代胆碱氧化电流的减小量成正比,但是其氧化电位较高,其他干扰物质在此电位下也会氧化,产生氧化电流,造成干扰。罗飞飞等^[33]基于生物催化纳米金的生成和纳米金粒子电催化银沉积实现 2 次信号放大的原理,构建了一种快速灵敏的乙酰胆碱酯酶电化学传感器,用于检测有机磷农药,结果发现其极大提高了传感器检测的灵敏度,将其应用于湘江水样中马拉硫磷的检测,回收率可达 95.5% ~ 102.2%。曲慧等^[34]以 AChE 为酶源,以玻璃纤维素壳聚糖膜为载体,以 5% 戊二醛为交联剂,并加入少量的 BSA 和 PBS 制备固定化酶,所得固定化酶活力较高,稳定性较好,可被应用于蔬菜水果中有机磷农药残留的快速检测。

5 展望

昆虫 AChE 的研究包括昆虫 AChE 和 *ace* 基因的结构与功能的分析、昆虫抗性靶标分子的探索以及农药残留快速检测方法的开发。这些研究阐明了昆虫的抗药性主要与 AChE

变构及造成该变构的基因突变有关,这些突变既可以单个突变存在,又可以重组为不同的突变组合形式。但是,昆虫 *ace* 基因调控功能和分子进化过程研究还处于初级阶段,昆虫 AChE 为多基因编码的实质及其生物学意义尚不清楚。相信这些问题会随着科学技术的进步和昆虫 AChE 研究的深入被逐步解决和阐释,进而使其更为广泛地应用于农业、环保和医学等领域。

参考文献

- [1] FOURNIER D, MUTERA A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 108(0):19-31.
- [2] SOREQ H, SEIDMAN S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2:294-302.
- [3] 张明,李盾,陈仪本,等. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J]. *农药*, 2006, 45(1):8-11.
- [4] 叶东平,陈斌,何正波. 乙酰胆碱酯酶的分离纯化及生物学研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(7):3811-3814.
- [5] ARPAGAUS M, FOURNIER D, TOUTANT J P. Analysis of acetylcholinesterase molecular forms during the development of *Drosophila melanogaster* evidence for the existence of an amphiphilic monomer [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1988, 18(6):539-549.
- [6] ZHU K Y, BRINDLEY W A. Enzymological and inhibitory properties of acetylcholine esterase purified from *Lygus Hesperus* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1992, 22:245-251.
- [7] ZHU K Y, CLARK J M. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1994, 24(5):453-461.
- [8] HALL L M C, SPIERER P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader [J]. *Embo J*, 1986, 5:2949-2954.
- [9] 李保玲. 褐飞虱在三唑磷诱导下的上调表达基因及其两种乙酰胆碱酯酶基因特性分析[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [10] LI F, HAN Z. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34:397-405.
- [11] LEE D W, KIM S S, SHIN S W, et al. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenee) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2006, 1760:125-133.
- [12] SEINO A, KAZUMA T, TAN A J, et al. Analysis of two acetylcholinesterase genes in *Bombyx mori* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 88:92-101.
- [13] ZHU K Y, CLARK J M. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25:1129-1131.
- [14] LIU H T, STILWELL G, ANTHONY N, et al. Analysis of a mosquito acetylcholinesterase gene promoter [J]. *Insect Mol Biol*, 1998, 7:11-17.
- [15] FOURNIER D, KARCH F, BRIDE J M, et al. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene: structure, evolution and mutations [J]. *J Mol Biol*, 1989, 210:15-22.

- [16] CHERBAS L, CHERBAS P. The arthropod initiator: The capsite consensus plays an important role in transcription [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1993, 23:81-90.
- [17] 王敦,唐振华,尚金燕,等. 昆虫乙酰胆碱酯酶基因研究进展[J]. *昆虫学报*, 2006, 49(3):497-503.
- [18] 杨之帆,何光存. 褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *昆虫学报*, 2006, 49(6):1034-1041.
- [19] 刘铭钧,李盾,高俊娥. 乙酰胆碱酯酶基因工程技术研究进展[J]. *生物技术*, 2008, 18(2):84-87.
- [20] 陈惠娟. 家蚕两种乙酰胆碱酯酶基因的表达谱分析[D]. 南京:南京农业大学, 2009.
- [21] 罗光华,李晓欢,张志春,等. “创新驱动与现代植保”——中国植物保护学会第十一次全国会员代表大会暨 2013 年学术年会论文集[C]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2013.
- [22] LABBÉ P, BERTHOMIEU A, BERTICAT C, et al. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens* [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24:1056-1067.
- [23] WEILL M, FORT P, BERTHOMIEU A, et al. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila* [J]. *Proc Biol Sci*, 2002, 269:2007-2016.
- [24] LU Y, PARK Y, GAO X, et al. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum* [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2:288.
- [25] LU Y, PANG Y P, PARK Y, et al. Genome organization, phylogenies, expression patterns, and three-dimensional protein models of two acetylcholinesterase genes from the red flour beetle [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2):32288.
- [26] 曲明静,许新军,韩召军,等. 昆虫乙酰胆碱酯酶基因变异抗性机制研究[J]. *昆虫知识*, 2007, 44(2):191-194.
- [27] 乔惠丽,洪冲,文祯中,等. 昆虫抗性分子机制[J]. *南阳师范学院学报*, 2007, 6(9):50-56.
- [28] BAEK J H, KIM J I, LEE D W, et al. Identification and characterization of ace 1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutellax lostella* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, 81:164-175.
- [29] 刘芳,孙作洋,赵士熙,等. 乙酰胆碱酯酶性质改变与昆虫抗药性的关系[J]. *华东昆虫学报*, 2006, 15(3):187-191.
- [30] RUSSELL R J, CLAUDIANOS C, CAMPBELL P M, et al. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2004, 79:84-93.
- [31] VAUGHAN A, ROCHELEAU T, FRENCH-CONSTANT R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity [J]. *Exper Parasitol*, 1997, 87:237-244.
- [32] 彭少杰,吴卫平,赵翔,等. 基于重组乙酰胆碱酯酶的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留快速检测方法的应用验证[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(7):1636-1638.
- [33] 罗飞飞,廖淑珍,张瑞莲,等. 双重信号放大的乙酰胆碱酯酶电化学传感器检测有机磷农药[J]. *分析化学*, 2013, 41(10):1549-1554.
- [34] 曲慧,车育,姜爱莉,等. 玻璃纤维素壳聚糖膜固定乙酰胆碱酯酶的研究[J]. *烟台大学学报*, 2013, 26(3):178-181.

(上接第 2052 页)

参考文献

- [1] 曹志华,欧阳晶旭,王俊,等. 有机复合酸化剂对艾维茵(AVIAA)肉鸡生长性能、营养成分消化率及胃腺 pH 的影响[J]. *长江大学学报:自然科学版*, 2006, 3(4):164-166.
- [2] 徐春厚,相菲,谢为天. 益生菌 YS 对三黄鸡生长性能和免疫功能的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(9):8-12.
- [3] 黄怡,王士长,崔艳红,等. 多菌种复合益生菌对三黄鸡的生产性能以及肠道主要菌群的影响[J]. *中国家禽*, 2006, 28(8):19-21.
- [4] 张建斌,车向荣,杨华. 大豆寡糖替代抗生素对蛋鸡生长性能和肠道菌群的影响[J]. *饲料工业*, 2010, 31(10):7-9.
- [5] DENLI M, OKAN F, CELIK K. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass

- yield [J]. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2003, 2:89-91.
- [6] 黄冠庆,曹要玲,黄晓亮,等. 酸化剂和益生菌合用对肉仔鸡血清生化指标的影响[J]. *广东农业科学*, 2013(9):106-109.
- [7] 陈代文,王万祥,张克英,等. 酸化剂、益生菌和寡糖对断奶仔猪生产性能的影响及其互作效应研究[J]. *四川农业大学学报*, 2005, 23(4):454-460.
- [8] NRC. Nutrient requirements of poultry (9th. revised edition) [M]. Washington, D. C.: National Academy Press, 1998.
- [9] 袁纛. 动物营养学实验教程 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 2006:92-99.
- [10] 孙冰锋. 酸化剂、益生菌及其组合添加对肉仔鸡的影响及作用机理研究[D]. 杨凌:西北农业大学, 2005.