

• 研究论文 •

抗残杀威和敏感家蝇乙酰胆碱酯酶生化特性研究

袁建忠^{1,2}, 孙晓琴¹, 唐振华^{1,2}, 陶黎明^{*1,3}

(1. 华东理工大学 药学院, 上海 200237 2 中国科学院 上海生命科学院 上海植物生理生态研究所, 上海 200032
3 上海市农药研究所, 上海 200032)

摘要: 对家蝇残杀威抗性 (RR) 和敏感 (SS) 品系乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) (RR-和 SS-AChE) 的生化特性研究后发现, RR-和 SS-AChE 存在着明显的差异: 1) RR-和 SS-AChE 最适反应温度分别为 37°C 和 34°C, 但最适 pH 值均为 7.4; 2) AChE 催化底物的能力不同, RR-AChE 水解碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh)、碘化硫代乙酰胆碱 (BTCh)、碘化硫代丙酰胆碱 (PTCh) 的活力高于 SS-AChE, 其相应的最大反应速率 ($V_{\max}$) 比分别是 SS-AChE 的 2.22、1.08 和 3.41 倍; 3) 从双分子速率常数 (bimolecular constant K_i) 来看, RR-AChE 对 4 种氨基甲酸酯类抑制剂 (残杀威、克百威、甲萘威、灭多威) 的敏感度分别是 SS-AChE 的 46.77、28.15、66.15 和 15.00 倍, 对 4 种有机磷类抑制剂 (马拉氧磷、甲胺磷、氧乐果和氧化三唑磷) 的敏感度分别是 7.66、12.13、3.81 和 2.25 倍; 4) 上述抑制剂与 RR-AChE 分子相互作用的亲和力常数 (K_a) 均大于与 SS-AChE 的值; 5) RR-AChE 的磷酸化或氨基甲酰化常数 (K_2) 值都低于 SS-AChE 的值。表明 RR-AChE 的性质已发生变化。

关键词: 家蝇; 杀虫剂; 乙酰胆碱酯酶; 抗药性; 酶动力学分析

中图分类号: S481.4 Q965.9 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2009)02-0181-05

Study on Biochemical Properties of Acetylcholinesterase from Propoxur-Resistant and Susceptible Strains of the Housefly, *Musca domestica*

YUAN Jian-zhong^{1,2}, SUN Xiao-qin¹, TANG Zhen-hua^{1,2}, TAO Liming^{*1,3}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China;

2 Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3 Shanghai Pesticide Research Institute, Shanghai 200032, China)

Abstract It was found by study of biochemical properties of acetylcholinesterase (RR- and SS-AChE) that the propoxur-resistant (RR) and susceptible (SS)-AChE of the housefly, *Musca domestica* were different in the following aspects: 1) The optimum temperature of AChE in the RR and SS strains was found at 37°C and 34°C, respectively. But the optimum pH value was all the same, 7.4. 2) The capability of substrate hydrolyzed by the two AChEs existed marked difference. The $V_{\max}$ ratios of RR- to SS-AChE were 2.22 for ATCh, 1.08 for BTCh and 3.41 for PTCh. 3) Based on the bimolecular rate constant (K_i), the RR-AChE was 46.77-, 28.15-, 66.15- and 15.00-fold less sensitive to four carbamate propoxur, carbofuran, carbaryl and methomyl than was 7.66-, 12.13-, 3.81 and 2.25-fold

收稿日期: 2008-08-08 修回日期: 2008-12-30

作者简介: 袁建忠 (1969-), 男, 硕士, 助理研究员, E-mail: yuanguang188@126.com; 孙晓琴 (1983-, 并列第一作者), 女, 湖北省人, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 陶黎明 (1958-), 男, 上海人, 博士生导师, 主要从事杀虫剂分子毒理学研究。联系电话: 021-59883850 E-mail: tao lm@sh163.net

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973”计划) 项目 (2003CB114403)。

less sensitive to four organophosphates malaoxon, methanidophos, methoate and triazophos oxon respectively. 4) The affinity constant (K_a) values of the tested inhibitors with RR-AChE were all higher than that of SS-AChE. 5) The phosphorylation or carbamylation constant (K_2) values of RR-AChE were all less than that of SS-AChE. All these data implied that RR-AChE was qualitatively altered.

Key words *Musca domestica*; insecticides; acetylcholinesterases; resistance; AChE kinetic analysis

据报道,家蝇对常用杀虫剂均已产生抗性^[1],其中对有机磷(OP)和氨基甲酸酯类(CB)杀虫剂的主要抗性机理除解毒酶活性增高外,还有靶标酶——乙酰胆碱酯酶(AChE, EC, 3.1.17)敏感度降低^[2,3]。在许多昆虫中已被证实靶标抗性与AChE基因(ace)突变有关^[4]。不少学者应用定点突变技术,对不同突变组合的ace表达的AChE蛋白的功能进行了研究,进一步揭示了ace不同位点的突变及其组合与抗性的关系^[5-8]。笔者曾对残杀威抗性(RR)和敏感(SS)家蝇品系的抗性谱和抗性机理进行了研究,并对这两个品系的ace基因进行了克隆和序列比较,发现其抗性与4个基因突变(V261L、G343A、F408Y和D422V)有关,并对这些突变基因进行了表达和功能的研究^[5,9],但对RR和SS品系的AChE(RR-和SS-AChE)的生化特性尚未进行详细研究,也未见相关报道,本文就这方面的研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

敏感(SS)和抗性家蝇(RR)品系的选育和抗性谱见前文^[5,9]。

1.2 试剂及仪器

二硫双对硝基苯甲酸(DTNB)、曲通X-100、碘化硫代乙酰胆碱(ATCh)、碘化硫代丙酰胆碱(PTCh)、碘化硫代丁酰胆碱(BTCh)均为Sigma公司产品;98%灭多威(methomyl)、99.9%残杀威(propoxur)、97.7%甲萘威(carbaryl)、99.4%克百威(carbofuran)、98.3%甲胺磷(methanidophos)、95%氧乐果(methoate)、95.5%马拉氧磷(malaoxon)、94%氧化三唑磷(triazophos oxon)均为迪马公司产品;考马斯亮蓝G-250和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为Fluka公司产品。

Backman DU-640蛋白核酸分析仪;PERKINELMER GeneAmp 2400PCR仪。

1.3 实验方法

1.3.1 家蝇粗酶源的制备 将羽化后2~3 d的家蝇成虫置于-72℃的超低温冰箱内30 min,取

其头部,按每400头加5 mL冰冷磷酸缓冲液(PB, 25 mmol/L, pH 7.4含1%曲通-100)的比例,于冰上匀浆。匀浆液于4℃ 12 000×g离心24 min,经脱脂棉过滤,取上清液作为酶源,4℃下保存备用。

1.3.2 家蝇AChE活性测定 采用Ellman^[10]比色法,并经改进^[11]。以AChE水解底物生成的巯基与DTNB结合产生黄色产物的量作为AChE活力的指标。于412 nm下测定光密度值(OD),计算AChE活力。

500 μL酶反应体系中含有50 μL酶和450 μL 25 mmol/L的Ellman溶液。其中,25 mmol/L的Ellman溶液由50 mL显色剂和50 μL 1 mol/L的ATCh(PTCh或BTCh)组成。

显色剂的配制:称取DTNB 91 mg和碳酸氢钠37.5 mg用25 mmol/L的PB缓冲液溶解并定容至1 L。

1.3.3 RR-和SS-AChE最适反应pH值测定 用pH值为5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0的PB缓冲液,分别从抗性和敏感家蝇中提取RR-和SS-AChE,再分别取50 μL酶液,加入450 μL 25 mmol/L的Ellman溶液中,室温下混匀,在蛋白核酸分析仪上测定其在412 nm处的OD值,分别计算RR-和SS-AChE的活力。每处理至少重复3次。

1.3.4 RR-和SS-AChE最适反应温度测定 将用最适pH值的PB缓冲液提取的AChE 50 μL置于聚合酶链反应(PCR)管中,在PCR仪上设定温度在4~50℃之间,分别保育10 min后加入到450 μL Ellman溶液中,在蛋白核酸分析仪上测定其在412 nm下的OD值,计算不同反应温度下RR-和SS-AChE的活力。每处理至少重复3次。

1.3.5 RR-和SS-AChE最适底物比较 分别以1 μmol/L至200 mmol/L的ATCh、BTCh和PTCh为底物,在最适反应温度下水解,混匀后测定RR-和SS-AChE的活性。每处理至少重复3次。

1.3.6 RR-和SS-AChE双分子速率常数(K_i)值的测定 参照Fournier^[12]方法,将酶与抑制剂混合

后,在最适 pH 值及 25 mmol/L 的 PB 中孵育。分别在不同时段取其 50 μL 加入到 450 μL Ellman 溶液中,测定剩余酶活力。剩余自由酶 $[E]/[E_0]$ 随时间的变化可用剩余酶活力 $[A]/[A_0]$ 来表示。抑制动力学的测定采用不同浓度的抑制剂;以抑制剂的浓度和作用时间作为变量,利用多重非线性回归软件 GOSA 1.0 分析 K_i 值。

1.3.7 RR-和 SS-AChE 磷酸化或氨基甲酰化常数 (K_2) 和亲和力常数 (K_a) 的测定 参考 $M_{ain}^{[13]}$ 的方法,将酶与不同浓度的抑制剂混合后,在最适 pH 值及 25 mmol/L 的 PB 中孵育。3 min 内,于不同时间段取出 50 μL 加入到 450 μL Ellman 溶液中,测定剩余酶活力。以抑制剂的浓度和作用时间为变量,通过 M_{ain} 的公式求出 K_2 和 K_{a0} 。

1.3.8 AChE 热稳定性测定 参考 Shi 的方法^[6],将 RR-和 SS-AChE 分别置于 40~60℃ 下进行热变性。在热变性过程的不同时间(时间间隔为 2 min)各取出 50 μL 酶液,加入到 450 μL Ellman 溶液中,测定剩余酶活力。一级变性速率常数 (K_d) 用非线性回归软件 GOSA 1.0 分析。

1.3.9 蛋白质含量测定 参考 Bradford 考马斯亮蓝法^[14]。

2 结果与分析

2.1 pH 值对 AChE 活力的影响

通过对 RR-和 SS-AChE 反应速度与缓冲液 pH 值关系的研究发现, pH 值为 7.4 时, RR-和 SS-AChE 活力均最高(图 1)。pH 值 < 7.4 时, SS-和 RR-AChE 活力随 pH 值的升高而升高, pH 值 > 7.4 时,酶活力随 pH 值的升高而降低。

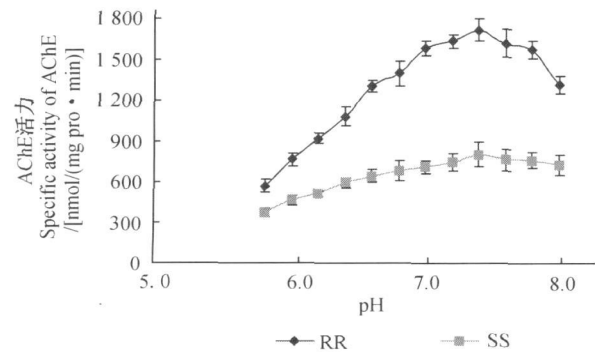


图 1 缓冲液 pH 对 RR-和 SS-AChE 活力的影响
Fig 1 Effect of pH values on specific activity of AChE from RR and SS strains

2.2 温度对 RR-和 SS-AChE 活力的影响

温度对 RR-和 SS-AChE 活力的影响存在明显差异,其最适温度分别为 37℃ 和 34℃ (见图 2)。温度对 AChE 的作用具有双重影响,一方面温度升高可加速酶反应速度,另一方面由于 AChE 是蛋白质,温度升高可加速蛋白的变性速度,因而在较低的温度范围内,酶反应速度随温度升高而增大,但是超过一定温度后,酶反应速度反而下降。

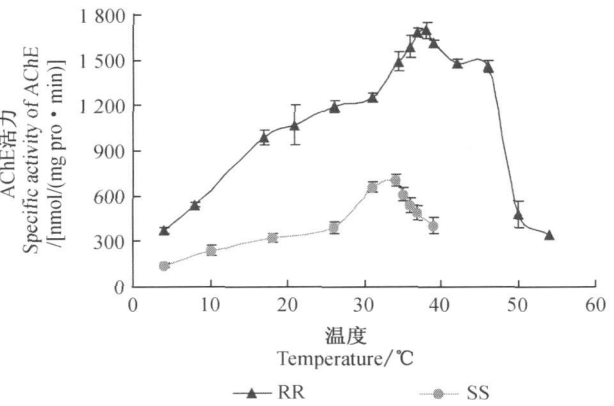


图 2 温度对 RR-和 SS-AChE 活力的影响
Fig 2 Influence of temperature to RR- and SS-AChE activity

2.3 RR-和 SS-AChE 底物特异性

表 1 显示了 SS-和 RR-AChE 对底物 ATCh, BTCh, PTCh 的米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})。比较 SS-AChE 对 3 种底物的 K_m 值,发现其对 ATCh 的 K_m 值最小,说明 ATCh 是该酶的最佳底物。比较 RR-AChE 对 3 种底物的 K_m 值,发现其对 BTCh 的 K_m 值最小, PTCh 次之, ATCh 最大。RR-AChE 对底物 ATCh 的 K_m 值是 SS-AChE 的 3.92 倍, V_{max} 值是 SS-AChE 的 2.22 倍。RR-和 SS-AChE 的 V_{max} 和 K_m 值的差异表明这两个品系存在着不同类型的 AChE。

2.4 RR-和 SS-AChE 的稳定性

采用不可逆性的热灭活方法,变性温度范围从 40℃ 至 60℃。利用一级变性速率常数 (K_d) 与绝对温度的倒数 ($1/°K$) 作图 (Arrhenius plot),发现 RR-AChE 热稳定性趋势要比 SS-AChE 的低(图 3),而 RR 与 SS 混合的 AChE (1:1) 的热稳定性介于两者之间。

2.5 八种抑制剂对 RR-和 SS-AChE 的 K_i 值测定

离体抑制试验发现, RR-AChE 对 8 种抑制剂均存在不同程度的不敏感性。RR-AChE 对 CB 的

表 1 RR-和 SS-AChE水解 ATCh BTCh和 PTCh的米氏常数 (K_m)和最大反应速率 (V_{max})
Table 1 K_m and V_{max} of ATCh, BTCh and PTCh hydrolyzed by RR- and SS-AChE

底物 Substrate	$K_m \pm SE / (\mu\text{mol/L})$		比值 (RR/SS)	$V_{max} / [\mu\text{mol}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})]$		比值 (RR/SS)
	SS	RR		SS	RR	
ATCh	72.38 ± 9.08	283.95 ± 50.40	3.92	1275.28 ± 98.34	2827.88 ± 333.61	2.22
BTCh	75.61 ± 1.61	129.71 ± 19.74	1.72	285.94 ± 3.64	309.56 ± 19.49	1.08
PTCh	139.54 ± 9.88	197.93 ± 23.81	1.41	388.28 ± 14.24	1322.30 ± 85.23	3.41

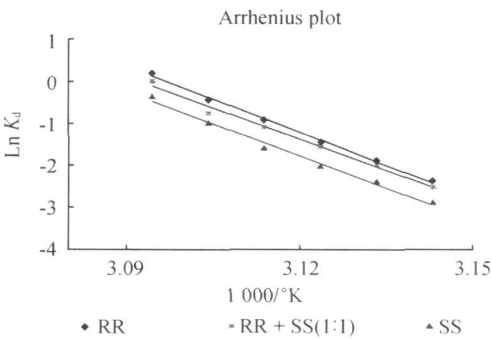


图 3 RR-和 SS-AChE的热稳定性

Fig 3 The thermal stabilization of RR- and SS-AChE

不敏感性要高于对 OPs, 这一结果与活体的生物测定结果相吻合^[5], 即 K_i (SS/RR) 比值越大, LD_{50} (RR/SS) 比值越大。其中对甲萘威的不敏感性最高, K_i 比 (SS/RR) 达 66.15 倍, 其次为残杀威、克百威和灭多威, 分别为 46.77、28.15 和 15.00 倍; 对 4 种 OPs 的抗性较低, 对甲胺磷、马拉氧磷、氧乐果和氧化三唑磷的抗性分别为 12.13、7.66、3.81 和 2.25 倍。同时通过酶与抑制剂的亲和力常数 (K_a) 值的测定发现, RR 品系的 K_a 值均高于 SS 品系, 但 K_2 值均低于 SS 品系 (表 3)。

3 讨论

昆虫对 OP 和 CB 类杀虫剂的靶标抗性与 ace

表 2 八种抑制剂对 SS-和 RR-AChE 的双分子反应速率常数 (K_i) 值

Table 2 Bimolecular rate constants (K_i) of eight inhibitors to SS- and RR-AChE

抑制剂 Inhibitor	$K_i \pm SE / (\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$		比值 Ratio (SS/RR)
	SS	RR	
残杀威 propoxur	0.29 ± 0.01	$0.62 \times 10^{-2} \pm 0.02 \times 10^{-2}$	46.77
灭多威 methomyl	0.30 ± 0.03	0.02 ± 0.01	15.00
克百威 carbofuran	0.76 ± 0.15	$0.27 \times 10^{-1} \pm 0.04 \times 10^{-1}$	28.15
甲萘威 carbaryl	$0.43 \times 10^{-1} \pm 0.04 \times 10^{-1}$	$0.65 \times 10^{-3} \pm 0.09 \times 10^{-3}$	66.15
马拉氧磷 malaoxon	0.49 ± 0.02	$0.64 \times 10^{-1} \pm 0.04 \times 10^{-1}$	7.66
氧乐果 omethoate	$0.61 \times 10^{-2} \pm 0.04 \times 10^{-2}$	$0.16 \times 10^{-2} \pm 0.02 \times 10^{-2}$	3.81
氧化三唑磷 triazophosoxon	$0.54 \times 10^{-2} \pm 0.05 \times 10^{-2}$	$0.24 \times 10^{-2} \pm 0.04 \times 10^{-2}$	2.25
甲胺磷 methidaphos	$0.97 \times 10^{-3} \pm 0.02 \times 10^{-3}$	$0.80 \times 10^{-4} \pm 0.06 \times 10^{-4}$	12.13

* $P < 0.05$

突变有关, 目前涉及 ace 突变的昆虫已有 20 多种^[4]。昆虫的 ace 突变有可能导致 AChE 对 OPs 和 CBs 的敏感度降低^[8, 15~17]。抗性马铃薯叶甲 Leptinotarsa decemlineata 的 AChE 的丝氨酸突变为甘氨酸, 不仅会导致其对谷硫磷敏感度降低, 还会对马铃薯叶甲的内禀增长率和相对适合度产生负面影响^[15]。Shi 等研究表明, 抗性果蝇适合度与 AChE 基因突变也有一定的负相关性^[18]。在大多数 AChE 变构引起的昆虫抗性中, 抗性程度与 K_i 之间具有良好的相关性^[6, 18]。笔者通过对抗残杀威家蝇的活体 (in vivo) 与离体 (in vitro) 测定结果表明, 家蝇 RR 与 SS 品系的 LD_{50} 的比值^[5]与 SS

与 $RR K_i$ 的比值之间有一定的正相关性 (表 2)。同时通过对家蝇 RR-和 SS-AChE 生化性质的研究发现, 家蝇 RR-和 SS-AChE 性质存在很大的差异。主要体现在: 1) RR-和 SS-AChE 水解底物 ATCh 的最适温度存在差异 (分别为 37℃ 和 34℃), 而最适 pH 值均为 7.4。这一结果告诉我们, RR-和 SS-AChE 的特性存在差异, 若在同一条件下测定两者 AChE 活性, 则所得结果将是不确切的。2) 在最适的反应条件下, RR-和 SS-AChE 对 3 种底物 ATCh、BTCh、PTCh 的水解能力也存在差异, RR-AChE 对 ATCh 和 PTCh 两种底物的水解效率有明显的增高, V_{max} 值分别是 SS 的 2.22 和 3.41 倍; 而

表 3 八种抑制剂与 SS-和 RR-AChE 的亲和力常数 (K_a)和磷酸化或氨基甲酰化常数 (K_2)

Table 3 Affinity (K_a) and phosphorylation or carbamylation (K_2) constants of eight inhibitors with SS- and RR-AChE

抑制剂 Inhibitor	$K_a \pm SE / \mu\text{mol}$		RR / SS	$K_2 \pm SE / (\text{min}^{-1})$		RR / SS
	SS	RR		SS	RR	
残杀威 propoxur	87.87 $\pm$ 5.23	3.02 $\pm$ 0.11	29.10	0.55 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.04	0.63
灭多威 methomyl	52.63 $\pm$ 3.59	2.93 $\pm$ 0.04	17.96	0.76 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.03	0.87
克百威 carbosulfan	56.26 $\pm$ 3.69	3.12 $\pm$ 0.09	18.03	1.52 $\pm$ 0.04	2.38 $\pm$ 0.43	0.64
甲萘威 carbaryl	335.1 $\pm$ 23.7	24.16 $\pm$ 1.23	13.87	0.22 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.02	0.21
马拉氧磷 malaoxon	11.25 $\pm$ 1.53	4.38 $\pm$ 0.03	2.57	0.72 $\pm$ 0.05	2.13 $\pm$ 0.19	0.34
氧乐果 omethoate	88.2 $\pm$ 22.6	78.49 $\pm$ 8.22	11.10	0.31 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.03	0.69
氧化三唑磷 triazophosoxon	261.1 $\pm$ 15.6	163.7 $\pm$ 19.9	1.60	0.64 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.06	0.73
甲胺磷 methamidophos	1.54 $\times 10^4 \pm$ 1360	5294 $\pm$ 551	2.90	1.24 $\pm$ 0.96	5.12 $\pm$ 0.21	0.24

对 3 种底物的亲和力均有不同程度的下降, K_m 值比分别是 SS-AChE 的 3.92、1.72 和 1.41 倍, 尤其对底物 ATCh 的亲和力下降最为明显, 表明 RR 家蝇在对杀虫剂形成抗性时有可能产生一个催化效率更高的 AChE^[2]。3) RR-AChE 水解 ATCh 的活力明显高于 SS-AChE。4) RR-AChE 的热稳定性要低于 SS-AChE。5) RR-AChE 对各种抑制剂的 K_i 值和磷酸化或氨基甲酰化常数 (K_2) 均低于 SS-AChE, 而抑制剂与 RR-AChE 的亲和力常数 (K_a) 值均大于 SS-AChE。

这些研究结果不仅对研究抗性和敏感昆虫 AChE 具有重要的提示作用, 而且无论从活体、离体到基因水平和异体表达的功能蛋白都证明抗性和敏感品系的 AChE 在性质上不同, 这为设计合成和筛选反抗性化合物提供了重要依据。

参考文献:

[1] LIM ei (李梅), HE Feng-qin (何凤琴), QIU Xing-hui (邱星辉). 家蝇抗药性的分子遗传机制 [J]. Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica (寄生虫与医学昆虫学报), 2005, 12(4): 238-244.

[2] FOURNIER D, MUTERO A. Modification of Acetylcholinesterase as a Mechanism of Resistance to Insecticides [J]. Comp Biochem Physiol 1994, 108C (1): 19-31.

[3] XU Xin-jun (许新军), HAN Zhao-jun (韩召军), JIANG Xiao-jing (姜晓静). 昆虫 AChE 基因变异抗药性机制研究 [J]. Chinese Bulletin of Entomology (昆虫知识), 2007, 44 (2): 191-194

[4] WANG Dun (王敦), TANG Zhen-hua (唐振华), SHANG Jin-yan (尚金燕), et al 昆虫乙酰胆碱酯酶基因研究进展 [J]. Acta Entomologica Sinica (昆虫学报), 2006, 49 (3): 497-503.

[5] TAO LM, SHIM A, YUANG JZ, et al Resistance Pattern and Point Mutations of Insensitive Acetylcholinesterase in a Carbamate-resistant Strain of Housefly (Musca domestica) [J]. Pestic Biochem Physiol 2006 86: 1-6

[6] WALSH S B, DOLDEN T A, MOORE Sores G D, et al Identification and Characterization of Mutations in Housefly

(Musca domestica) Acetylcholinesterase Involved in Insecticide Resistance [J]. Biochem J, 2001, 359: 175-181

[7] KOZAK I T, SHONO T, TOM IFA T, et al Fenitroxon Insensitive Acetylcholinesterases of the Housefly, Musca domestica Associated with Point Mutations [J]. Insect Biochem Mol Biol 2001, 31: 991-997

[8] KRISTENSEN M, HUANG J QIAO C L, et al Variation of Musca domestica L. Acetylcholinesterase in Danish Housefly Populations [J]. Pest Manage Sci 2006, 62: 738-745.

[9] SHI Ming-an (施明安). Expression and Characterization of Acetylcholinesterases from Drosophila melanogaster and Musca domestica (果蝇和家蝇乙酰胆碱酯酶的表达和功能研究) [D]. Beijing (北京): Graduate University of Chinese Academy of Sciences (中国科学院研究生院), 2003

[10] ELIMAN G L, COUTNY K D, ANDRES V, et al A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity [J]. Biochem Pharmacol 1961, 7: 88-95

[11] GORDON M A, CARPENTER D E, BARRETT H W, et al Determination of Normality of Cholinesterase Solutions [J]. Anal Biochem, 1978, 85: 519.

[12] FOURNIER D, BRIDE J M, HOFFMANN E, et al Acetylcholinesterase: Two Types of Modifications Confer Resistance to Insecticide [J]. Biochem J, 1992, 267: 14270-14274

[13] MAIN A R. Affinity and Phosphorylation Constant for the Inhibition of Esterases by Organophosphates [J]. Science, 1964, 144: 992

[14] BRADFORD M M. 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.

[15] ZHU K Y, LEE S H, CLARK J M. A Point Mutation of Acetylcholinesterase Associated with Aziphosphomethyl Resistance and Reduced Fitness in Colorado Potato Beetle [J]. Pestic Biochem Physiol 1996 55: 100-108

[16] ZHU K Y, CLARK J M. Validation of a Point Mutation of Acetylcholinesterase in Colorado Potato Beetle by Polymerase Chain Reaction Coupled to Enzyme Inhibition Assay [J]. Pestic Biochem Physiol 1997, 57: 28-35

[17] TAYOR P, RADIC Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1994 34: 281-320

[18] SHI M A, LOUGARRE A, ALIES C, et al Acetylcholinesterase Alterations Reveal the Fitness Cost of Mutations Conferring Insecticide Resistance [J]. BMC Evolutionary Biology, 2004, 4: 1471-2148

(Ed JIN SH)