

文章编号: 1000-5471(2011)03-0150-06

正交试验法确定烟草甲成虫 羧酸酯酶反应的最适条件^①

柳琼友, 陈文龙, 顾丁, 高光澜

贵州大学昆虫研究所, 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 应用正交表 $L_{25}(5^5)$ 设计正交试验, 研究了羧酸酯酶质量浓度、体积分数浓度、反应体系的 pH 值、反应温度和反应时间等 5 个因素对烟草甲成虫羧酸酯酶活性检测的影响, 并从试验组合中选出最佳条件. 在进行极差分析、方差分析和多重比较后, 选择各因素的最优水平, 得到了烟草甲成虫羧酸酯酶活性测定的最适条件, 即酶的质量浓度为 1 头/mL、底物的体积分数为 5.0×10^{-4} mol/L, pH 值为 7.5, 温度为 42 °C, 时间为 10 min.

关键词: 烟草甲; 羧酸酯酶; 正交试验; 方差分析; 最佳条件

中图分类号: Q969.496.1

文献标志码: A

烟草甲 *Lasioderma serricorne* (Fabricius) 属鞘翅目窃蠹科, 1792 年昆虫学者首次对烟草甲作了科学的描述^[1], 1848 年第一篇关于烟草甲为害烟草的报道发表^[2]. 烟草甲是世界性分布的贮烟害虫, 为我国仓储烟草的重要害虫, 我国绝大部分省、市、区均有分布^[3].

羧酸酯酶(Carboxylesterase, CarE)是一组丝氨酸酶, 广泛存在于生物体的组织与器官, 能够分解外源物质如羧酸酯、硫酸酯和酰胺类物质, 参与酯类和酰胺类前体药物的解毒与代谢. 羧酸酯酶是昆虫体内最重要的解毒酶之一, 在昆虫产生抗药性过程中起着重要的作用. 由于长期单一使用磷化氢熏蒸杀虫, 烟草甲现已对其产生抗性. 要研究烟草甲的抗药性机理, 需要研究测定烟草甲羧酸酯酶的最佳条件.

前人采用 $L_{25}(5^5)$ 正交试验表, 研究了测定意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶反应的最佳条件^[4]. 本研究参考其试验及数据分析方法, 采用正交试验设计, 旨在研究多个变量对测定烟草甲成虫羧酸酯酶活性的影响, 并找出最适测定条件的组合, 为烟草甲羧酸酯酶活性的测定提供方法上的依据.

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

烟草甲采自贵阳复烤厂, 经实验室饲养纯化 3 代, 第 4 代第 4 日成虫供实验用, 不考虑雌、雄性别差异. 实验室饲养条件: 利用 RXZ-1000A 型人工气候箱饲养烟草甲; 饲料为小麦粒、小麦粉和酵母粉, 质量比为 2 : 8 : 1, 小麦粉和酵母粉混匀, 上层撒小麦粒; 温度为 (27 ± 1) °C, 相对湿度为 (76 ± 5) %; 光照周期为 16 L : 8 D.

1.2 化学试剂和仪器设备

α -萘酚 (α -Naphthol), 购自天津光复精细化工研究所; α -萘酚酯 (α -Naphthyl acetate, α -NA), 进口

① 收稿日期: 2009-05-12

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技资助项目(合同号 200901); 贵州大学引进人才科研资助项目[贵大人基合字(2007)031 号].

作者简介: 柳琼友(1975-), 男, 湖南娄底人, 硕士, 主要从事动物学研究.

通信作者: 陈文龙, 教授.

分装, 购自北京奇华盛生物技术发展中心; 毒扁豆碱, 为 Sigma 公司产品; 固蓝 B 盐为 Sigma 公司产品; SDS(十二烷基硫酸钠), 为 Sigma 公司产品; 考马斯亮蓝 G-250, 美国, 进口分装, 购自北京奇华盛生物技术发展中心; 牛血清白蛋白, 购自北京奇华盛生物技术发展中心; 95%乙醇、85%磷酸、丙酮、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠均为国产分析纯。

Sigma-3K30 高速冷冻离心机, 购自德国 Sartorius 公司; 酶标仪, 购自奥地利 Tecan 公司; 电子分析天平, 购自德国 Sartorius 公司; 电热恒温水温箱, 购自北京永光明医疗仪器厂; 超低温冰箱, 购自美国 Thermo 公司; Hg-4 多头磁力加热搅拌器, 购自江苏富华仪器有限公司; XK96-A 快速混匀器, 购自江苏新康医疗器械有限公司。

1.3 酶液制备

取新鲜烟草甲成虫或贮存在 $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的烟草甲成虫, 按 5 头/mL 在预冷的 0.04 mol/L 磷酸缓冲液中冰浴匀浆; 匀浆液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为酶源。

1.4 羧酸酯酶活性测定

参考 Van Asperen^[5]的方法, 按正交表 $L_{25}(5^6)$ 所列的 25 个处理组合进行实验, 取待测酶液 0.1 mL, 再加 0.5 mL a-乙酸萘酯(含体积分数为 1×10^{-5} mol/L 的毒扁豆碱液)混匀, 在恒定温度下水浴反应 10, 15, 20, 25, 30 min 后加入 0.1 mL 显色剂并终止反应, 显色 30 min. 每孔加 200 μL 反应终止液到可拆式酶标板中, 每组反应液加 3 孔, 于 600 nm 处利用酶标仪测定反应终止液的 OD 值, 重复测定 3 次. 以失活酶液做对照, 测定反应终止液在 600 nm 处的 OD 值. 通过 a-萘酚标准曲线求出反应生成的 a-萘酚的量。

酶液蛋白质含量测定参照 Bradford^[6]考马斯亮蓝 G-250 法。

羧酸酯酶比活力的计算公式:

羧酸酯酶比活力 = 反应生成的 a-萘酚量 / (酶液蛋白质量 \times 反应时间)

1.5 正交试验设计

本实验中研究的因素(表 1)是影响酶促反应的一些主要因素, 如酶质量浓度、底物质量分数、反应体系的酸碱度、反应温度和反应时间等, 采用正交表为 $L_{25}(5^6)$ 。

表 1 正交试验中的影响因素及水平

水平	酶质量浓度/(头 $\cdot\text{L}^{-1}$) (A)	底物体积分数/(mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) (B)	pH 值 (C)	温度/ $^{\circ}\text{C}$ (D)	反应时间/min (E)
1	1	1.0×10^{-4}	6.0	22	10
2	2	2.0×10^{-4}	6.5	27	15
3	3	3.0×10^{-4}	7.0	32	20
4	4	4.0×10^{-4}	7.5	37	25
5	5	5.0×10^{-4}	8.0	42	30

注: 1, 2, 3, 4 和 5 分别代表各因素的 5 个水平; A, B, C, D 和 E 分别代表酶质量浓度、底物体积分数、pH 值、温度和反应时间. 下同。

1.6 数据处理

采用 SPSS 13.0 和 Excel 2003 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的测定

烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的测定及计算结果见表 2。

2.2 正交试验结果的极差分析

表 3 是对表 2 的数据进行极差分析的结果, 从中得出各因素对烟草甲成虫羧酸酯酶比活力测定影响的大小顺序依次为温度、pH 值、时间、底物体积分数、酶质量浓度. 其中反应温度的极差最大, 表明该因素对测定烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的影响最大。

表 2 烟草甲成虫羧酸酯酶不同处理组合测定的比活力值

编号	处理组合	羧酸酯酶比活力		编号	处理组合	羧酸酯酶比活力	
		/[nmol·(min·mg) ⁻¹]				/[nmol·(min·mg) ⁻¹]	
1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁ E ₁	8.310 8	±1.189 1	14	A ₃ B ₄ C ₁ D ₃ E ₅	6.784 9	±0.729 4
2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂ E ₂	4.644 5	±0.441 4	15	A ₃ B ₅ C ₂ D ₄ E ₁	9.317 5	±0.515 6
3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃ E ₃	11.646 2	±1.728 2	16	A ₄ B ₁ C ₄ D ₂ E ₅	5.558 4	±0.130 2
4	A ₁ B ₄ C ₄ D ₄ E ₄	13.109 8	±1.392 8	17	A ₄ B ₂ C ₅ D ₃ E ₁	9.853 5	±0.933 7
5	A ₁ B ₅ C ₅ D ₅ E ₅	13.330 8	±1.076 4	18	A ₄ B ₃ C ₁ D ₄ E ₂	6.727 0	±0.644 9
6	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃ E ₄	5.042 6	±0.181 1	19	A ₄ B ₄ C ₂ D ₅ E ₃	8.624 5	±0.255 9
7	A ₂ B ₂ C ₃ D ₄ E ₅	9.783 5	±1.225 1	20	A ₄ B ₅ C ₃ D ₁ E ₄	9.166 6	±0.110 0
8	A ₂ B ₃ C ₄ D ₅ E ₁	16.086 3	±0.122 0	21	A ₅ B ₁ C ₅ D ₄ E ₃	5.805 2	±1.171 1
9	A ₂ B ₄ C ₅ D ₁ E ₂	7.405 2	±0.067 8	22	A ₅ B ₂ C ₁ D ₅ E ₄	10.381 0	±0.853 7
10	A ₂ B ₅ C ₁ D ₂ E ₃	6.620 4	±0.257 7	23	A ₅ B ₃ C ₂ D ₁ E ₅	3.890 2	±0.215 8
11	A ₃ B ₁ C ₃ D ₃ E ₂	11.584 8	±1.745 8	24	A ₅ B ₄ C ₃ D ₂ E ₁	10.925 7	±0.293 0
12	A ₃ B ₂ C ₄ D ₁ E ₃	7.453 5	±0.480 6	25	A ₅ B ₅ C ₄ D ₃ E ₂	11.174 5	±0.616 7
13	A ₃ B ₃ C ₅ D ₂ E ₄	6.805 5	±0.253 7				

注:按 L₂₅(5⁶)正交表安排的 25 个处理组合进行试验,下脚标表示各因素的不同水平.每个处理重复 3 次,每个重复测定 3 次.

应用极差分析的结果可以得出各因素的最优水平,直观分析结果见图 1. A 因素的最优水平是 1,即酶的质量浓度为 1 头/mL; B 因素的最优水平是 5,即底物的体积分数为 5.0×10^{-4} mol/L; C 因素的最优水平是 4,即反应体系的 pH 值为 7.5; D 因素的最优水平是 5,即反应温度是 42 °C; E 因素的最优水平是 1,即反应时间为 10 min.

表 3 L₂₅(5⁶)正交实验极差分析

处理组合	1	2	3	4	5
	酶质量浓度 /mL	底物体积分数 /($\times 10^4$ mol·L ⁻¹)	pH 值	温度 /°C	时间 /min
K ₁	153.126 4	108.905 7	116.472 7	108.678 8	163.481 3
K ₂	134.814 0	126.348 1	94.557 9	103.663 7	124.608 3
K ₃	125.838 5	135.465 7	159.320 3	133.505 5	120.449 6
K ₄	119.790 3	140.550 1	160.147 6	134.228 8	133.516 3
K ₅	126.529 8	148.829 4	129.600 6	180.022 2	118.043 5
k ₁	10.208 4	7.260 4	7.764 8	7.245 3	10.898 8
k ₂	8.987 6	8.423 2	6.303 9	6.910 9	8.307 2
k ₃	8.389 2	9.031 0	10.621 4	8.900 4	8.030 0
k ₄	7.986 0	9.370 0	10.676 5	8.948 6	8.901 1
k ₅	8.435 3	9.922 0	8.640 0	12.001 5	7.869 6
R 值	2.222 4	2.661 6	4.372 6	5.090 6	3.029 2
最佳水平	1	5	4	5	1

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.

2.3 正交试验结果的方差分析

将正交试验的结果进行方差分析(表 4、图 1).从表 4、图 1 可以看出,5 个因素对烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的测定都有极显著影响,其影响大小顺序依次为温度、pH 值、时间、底物体积分数、酶质量浓度.方差分析能准确地估计误差,并在合并误差后提高了检验的精确性,因而方差分析得出的结论较为准确,并且试验中与极差分析得出的 5 个因素对羧酸酯酶测定影响的大小顺序一致,即影响烟草甲成虫羧酸酯酶比活力测定的因素中,反应温度为最重要的影响因素,其他依次为反应体系的 pH 值、反应时间、底物体积

分数、酶质量浓度.

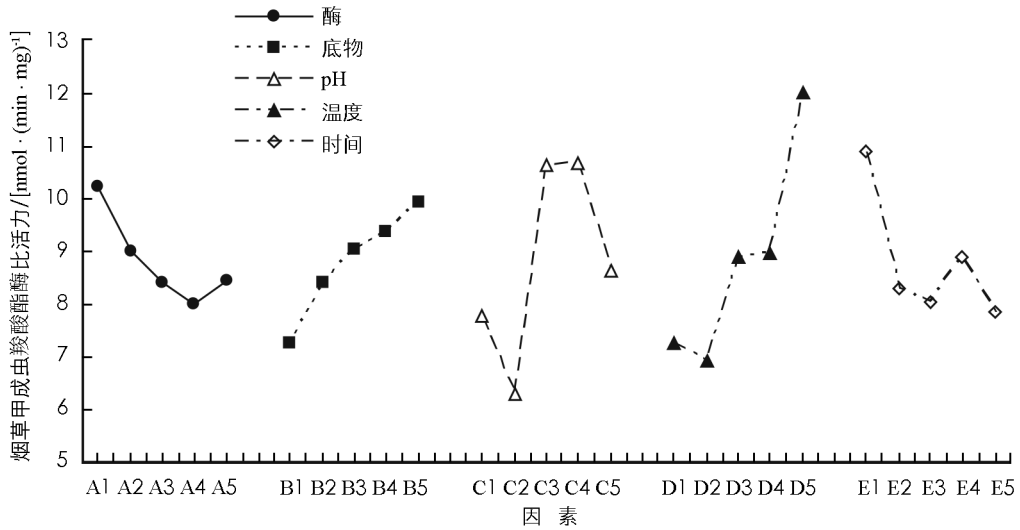


图 1 正交实验的 5 个因素与烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的关系

表 4 $L_{25}(5^6)$ 正交试验方差分析

变异来源	SS(平方和)	df(自由度)	MS(均方)	F
酶质量浓度(A)	44.747 1	4	11.186 8	22.446 4
底物体积分数(B)	62.242 3	4	15.560 6	31.222 4
pH 值(C)	212.496 8	4	53.124 2	106.594 2
温度(D)	244.012 9	4	61.003 2	122.403 5
反应时间(E)	91.746 8	4	22.936 7	46.022 7
合并误差	37.456 4	54	0.693 6	

注: 为提高试验分析的精度, 将 F 值不显著的重复间和空列 2 项合并到误差项中, 表中所列合并误差即为 3 项的合并值.

2.4 试验因素各水平的多重比较

由于经 F 检验的 5 个因素差异均具有高度统计学意义, 因此需要进行 5 个因素各水平的差异显著性检验, 以便从中选出测定烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的最佳条件组合. 本实验采用 Duncan(新复极差)法进行多重比较(表 5).

表 5 正交试验的 5 个影响因素各水平的差异显著性检验(SSR 检验)

水平	羧酸酯酶比活力/[$\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$]				
	A	B	C	D	E
1	10.208 4 aA	7.260 4 dD	7.764 8 cC	7.245 3 cC	10.898 8 aA
2	8.987 6 bB	8.423 2 cC	6.303 9 dD	6.910 9 cC	8.307 2 bcBC
3	8.389 2 bcBC	9.031 bcBC	10.621 4 aA	8.900 4 cB	8.03 cC
4	7.986 cC	9.37 abAB	10.676 5 aA	8.948 6 bB	8.901 1 bB
5	8.435 3 bcBC	9.922 aA	8.64 bB	12.001 5 aA	7.869 6 cC

注: 表中显示的多重比较结果为纵向排列, 比较的是同一因素不同水平的差异显著性. 不同小写字母和大小写字母分别表示差异具有统计学意义($p=0.05$)和高度统计学意义($p=0.01$).

酶质量浓度的第 1 水平与其他各水平差异均具有高度统计学意义; 第 2 水平与第 4 水平差异具有高度统计学意义, 与其余水平差异不具有统计学意义; 第 3、第 4 和第 5 水平间差异不具有统计学意义. 底物体积分数的第 1 水平与其他各水平差异均具有高度统计学意义, 第 2、第 3、第 4 和第 5 水平相互间差异不具有统计学意义. pH 值的第 3 与第 4 水平间差异不具有统计学意义, 它们与其他水平差异具有高度统计学意义, 第 1、第 2 与第 5 水平相互间差异具有高度统计学意义. 温度的第 5 水平与其余各水平差异均具有高度统计学意义, 第 4、第 3 水平与第 1、第 2 水平间差异具有高度统计学意义, 其他温度间差异不具有统计学意义. 时间第 1 水平与其他水平之间差异具有高度统计学意义, 第 4 水平和第 3、第 5 水平差异具有高度

统计学意义, 他们与第 2 水平差异不具有统计学意义.

综合极差分析及方差分析的结果, 5 个因素对测定烟草甲成虫羧酸酯酶的比活力均有影响, 因此在测定时都需要控制. 选择各因素的最优水平, 可以得到测定烟草甲成虫羧酸酯酶活性时的最佳条件组合: 酶质量浓度为 1 头/mL、底物质量分数为 5.0×10^{-4} mol/L、pH 值为 7.5、温度为 42 °C、时间为 10 min. 这时测定烟草甲成虫羧酸酯酶的比活力灵敏度最高, 比活力值最大.

3 讨 论

有关羧酸酯酶测定方法的报道, 从酶源制备、所用酶质量浓度、反应温度、底物体积分数、pH 值、反应时间及测定所用仪器等都有所不同. 高希武等^[7]报道了应用酶标仪动力学方法来测定羧酸酯酶的方法; 吴海花等^[8]的测定条件为 37 °C, 15 min, 0.3 mmol/L 的底物体积分数, 用酶标仪终点法测定; 姚洪渭等^[9]测定方法为: 反应体系 4 mL, 0.067 mol/L pH 值为 7.2 PBS, 底物体积分数 0.3 mmol/L, 温度 37 °C, 时间 10 min; 宋春满等^[10]测定方法为: 2.5 mL PBS (0.02 mol/L, pH=8.0), 1 mL 0.3 mmol/L α -NA, 20 μ L 酶液, 37 °C, 反应 10 min; 郑炳宗等^[11]、陈巨莲等^[12]的测定方法为: 3.6 mL α -NA, 0.9 mL 抑制剂, 0.1 mL 酶液, 30 °C, 15 min; 唐振华等^[13]测定方法为: 反应体系 4 mL, 0.3 mmol/L α -NA, 27 °C, 5 min. 本试验设计的反应体系为 0.6 mL, 利用酶标仪测定 OD 值, 本研究表明酶标仪终点法对于测定烟草甲成虫羧酸酯酶的比活力是有效的, 在一定范围内, 适当增加或减少反应体系的体积对测定结果没有影响.

源自不同种或取自一个生物不同组织的一种酶, 其活性测定的最适条件经常变化. 最通常改变的是最适 pH 值、底物体积分数及温度^[5-14]. 因此需要进行烟草甲成虫羧酸酯酶最适条件的研究. 宋春满等^[10]利用 $L_{16}(4^5)$ 正交表研究了底物体积分数、反应温度、温浴时间与 pH 值对测定羧酸酯酶活性的影响, 结果表明 4 个因子的主次关系依次为底物体积分数、反应温度、温浴时间、pH 值, 最佳测定条件组合为底物体积分数 6.0×10^{-4} mol/L, pH=8.0, 37 °C, 反应 20 min. 本研究采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验法, 研究了酶质量浓度、底物体积分数、pH 值、温度、反应时间等 5 个因素, 各因素 5 水平对烟草甲成虫羧酸酯酶比活力测定的影响情况表明, 各因素对测定都有极显著的影响, 其影响大小顺序依次为温度、pH 值、时间、底物体积分数、酶质量浓度, 得出了测定烟草甲成虫羧酸酯酶比活力的最适条件, 为今后研究烟草甲羧酸酯酶打下了一定的基础^[6,15-16]. 研究表明运用正交试验对测定不同酶的比活力均有效, 能得出测定的最佳条件. 在运用不同正交试验法测定来自不同昆虫的羧酸酯酶比活力时, 得出试验因素对测定结果的影响大小是不同的, 这可能与采用不同的试验方法及同一种酶是来自不同昆虫有关.

参考文献:

- [1] RYAN L. Post-harvest Infestation Control [M]. London: Chapman & Hall, 1995: 30-85.
- [2] 白旭光. 储藏物害虫与防治 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 294-295.
- [3] 龚信文, 孟国玲, 李传仁. 烟草甲研究新进展 [J]. 湖北农学院学报, 1995, 15(3): 235-240.
- [4] 张莹, 黄建, 高希武. 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 [J]. 昆虫学报, 2005, 48(4): 627-632.
- [5] Van ASPEREN K. A Study of Housefly Esterase by Means of a Sensitive Colorimetric Method [J]. Journal of Insect physiology, 1962, 26(8): 401-416.
- [6] BRADFORD M A. A Rapid and Sensitive Method for the Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [7] 高希武, 郑润勇, 宁世民, 等. 棉蚜不同品系羧酸酯酶的酶标仪动力学测定研究 [J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(5): 59-63.
- [8] 吴海花, 杨美玲, 郭亚平, 等. 中华稻蝗若虫不同龄期酯酶的特性 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(3): 336-339.
- [9] 姚洪渭, 蒋彩英, 叶恭银, 等. 白背飞虱羧酸酯酶与乙酰胆碱酯酶的体区与亚细胞分布特征 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2001, 27(1): 5-10.

- [10] 宋春满, 邓建华, 高家合, 等. 云南烟蚜羧酸酶活力测定条件的研究 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2001, 16(4): 260-262.
- [11] 郑炳宗, 高希武, 王政国, 等. 北京及河北省北部瓜-棉蚜对拟除虫菊酯抗药性的研究初报 [J]. 植物保护学报, 1988, 15(1): 55-60.
- [12] 陈巨莲, 倪汉祥, 孙京瑞, 等. 小麦几种主要次生物质对麦长管蚜几种酶活力的影响 [J]. 昆虫学报, 2003, 46(2): 144-149.
- [13] 唐振华, 张佩军, 韩启发, 等. 上海地区菜缢管蚜对有机磷的抗药性及其生化检测 [J]. 植物保护学报, 1988, 15(1): 63-66.
- [14] TOMPSON H M. Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates [J]. Ecotoxicology, 1999, 18(8): 369-384.
- [15] 张永亮, 曾媛琴, 贾永红, 等. 桑尺蠖多酚氧化酶的纯化及其部分生物化学性质 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(9): 86-90.
- [16] 李 灿, 李子忠, 曹 宇, 等. 高浓度 CO₂ 气调对药材甲羧酸酯酶活性的影响 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 34(1): 89-92.

The Optimization of Conditions for Assaying Activity of Carboxylesterase from the Adults of Cigarette Beetle *Lasioderma serricorne* (Fabricius) by Orthogonal Matrix Method

LIU Qiong-you, CHEN Wen-long, GU Ding, GAO Guang-lan

Institute of Entomology of Guizhou University, Guizhou Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region, Guiyang 550025, China

Abstract: The affects of CarE concentration, substrate *a*-Naphthyl acetate (*a*-NA) concentration, pH of the reaction system, the reaction temperature and the reaction time on assaying of the specific activity of CarE in the adults of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) were studied by orthogonal matrix methods. L₂₅(5⁶) orthogonal matrix was adopted without considering interaction. The optimal conditions for assaying the activity of CarE in the adult beetles, through range analysis, analysis of variance and multiple comparison, were considered as 1 beetle/mL, 5.0 × 10⁻⁴ mol/L substrate, pH 7.5, 42 °C, and 10 minutes.

Key words: *Lasioderma serricorne* (Fabricius); carboxylesterase; orthogonal experiment; variance analysis; optimal conditions

责任编辑 夏 娟