

影响叶螨磷酸酯酶活性的四因子数学模型*

郭凤英 邓新平 赵志模

(西南农业大学植物保护系, 重庆 400716)

摘要 应用二次回归通用旋转组合设计, 组建了影响叶螨磷酸酯酶(酸性和碱性)活性的四因子(缓冲液 pH 值 X_1 、温浴时间 X_2 、反应温度 X_3 、底物浓度 X_4) 数学模型: $Y_{\text{酸性}} = 0.456380 + 0.107889X_2 + 0.069027X_3 - 0.026836X_1^2 - 0.030794X_3^2$, $F = 24.98$, $P < 0.01$; $Y_{\text{碱性}} = 0.267286 - 0.200736X_1 + 0.049541X_2 + 0.030930X_3 - 0.049063X_1X_2 + 0.053585X_1^2 - 0.049665X_2^2$, $F = 57.68$, $P < 0.01$ 。结果表明, 温浴时间是影响叶螨酸性磷酸酯酶活性的关键因子, 在缓冲液 pH 4.4、底物浓度 8.5×10^{-3} mol/L、42℃温浴 40 min 测得该酶活性最强。影响碱性磷酸酯酶活性的关键因子则是缓冲液 pH 值, pH 9.0、37℃恒温 30 min、底物 7.5×10^{-3} mol/L 的条件下, 光密度值最大。两种酶的最大吸收峰波长为 405 nm。

关键词 叶螨, 磷酸酯酶, 影响因子, 数学模型

不少研究表明, 害虫对某些杀虫剂产生抗药性的主要原因之一是酯酶活性发生了变化^[1~3]。测定与害虫抗药性有关的酯酶活性的高低或酶含量的多少, 不仅是深入研究害虫抗药性机理的一项基础工作, 而且还逐渐用于抗药性监测。目前对一些昆虫离体酶的测定, 已有一些成熟的方法, 但对较易产生抗药性的螨类, 其离体酶测定方法的研究还未见报道。为此, 以朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) 为材料, 应用回归设计组建数学模型, 研究其磷酸酯酶的测定条件。

1 材料与方 法

1.1 制备酶液

两支匀浆器中各放朱砂叶螨雌成螨 200 头, 一支加 0.1 mol/L 冰冷醋酸缓冲液 1.0 mL, 另一支加 0.05 mol/L 冰冷碳酸缓冲液 1.0 mL。缓冲液 pH 值依设计表而定。将螨体充分匀浆, 4℃, 3 500 r/min, 离心 15 min, 取上清液为酶源。

1.2 因子编码

选择在酶活性测定中, 对光密度值影响较大的缓冲液 pH 值、温浴时间、反应温度、底物浓度作为实验因子, 按四因子五水平二次回归通用旋转组合设计实施实验^[4,5]。四因子水平编码见表 1。

* 高等学校博士点专项科研基金资助项目
1997-12-24 收稿, 1999-03-24 收修改稿

表1 因子及水平编码
Table 1 Code of factors and level

因子 Factor X_i	水平编码 Level code				
	-2	-1	0	+1	+2
缓冲液 X_1 (pH 值)	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0
Buffer pH	(9.0)	(9.5)	(10.0)	(10.5)	(11.0)
温浴时间 X_2 (min)	10	20	30	40	50
Reaction time					
反应温度 X_3 (°C)	27	32	37	42	47
Temperature					
底物浓度 X_4 ($X \times 10^{-3}$ mol/L)	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
Substrate concentration					

注: ① X_1 在括号内和括号外的水平值分别为碱性和酸性磷酸酯酶测定中所用的缓冲液 pH 值 (Values of X_1 in parentheses and with out parentheses are buffer pH in determining alkaline phosphatase and acid phosphatase, respectively); ② X_2 、 X_3 、 X_4 在两种酶的测定中各水平值相同 (Level values of X_2 , X_3 and X_4 are same in determining alkaline and acid phosphatases)

1.3 选择波长

本文是根据酸性磷酸酯酶在酸性条件下、碱性磷酸酯酶在碱性条件下水解对硝基苯基磷酸二钠产生黄色的对硝基苯酚, 用分光光度计比色测定两种酶的活性。因此, 有必要选择最大吸收峰的波长。借鉴陈巧云的方法^[6], 根据表2的步骤和参数, 按表1中零水平的设置, 用721A分光光度计测波长。

表2 测定磷酸酯酶活性的操作步骤
Table 2 Procedure of determining phosphatase activity

序号 NO.	加入试剂及处理方法 Reagent added and treatment	酸性磷酸酯酶 Acid phosphatase		碱性磷酸酯酶 Alkaline phosphatase		
		对照 CK	待测 Test	参比 RE, CK	对照 CK	待测 Test
		1	0.1 mol/L (pH=?) 醋酸缓冲液 (mL)	2.3	2.3	
2	0.05 mol/L (pH=?) 碳酸缓冲液 (mL)			2	2	2
3	? mol/L 对硝基苯基磷酸二钠 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
4	酶液 (100 头/mL) (mL)	-	0.2			
5	酶液 (200 头/mL) 或水 (mL)			1*	-	1
6	0.1 mol/L 氢氧化钠 (mL) ? °C 温浴 ? min	2	-	-	2	-
7	0.1 mol/L 氢氧化钠或酶液 (mL) 10 min 后 1 cm 比色杯比色	0.2**	2	2	1**	2

注: ① 表中? 处根据表1设计而定 (Question marks are values according to design of Table 1); ② * 加蒸馏水, ** 加酶液 (* Adding distilled water, ** Adding enzyme solution)

2 结果与分析

2.1 实验波长

由图 1 可以看出两种酶的最大吸收峰波长为 405 nm，这与陈巧云（1980）用 751 紫外分光光度计测淡色库蚊的酯酶时所用波长 400 nm 稍有差异。说明分光光度计不同、酶源不同其最大吸收峰波长也不相同，所以在测定一种酶之前，应先选择波长。本研究在 405 nm 读取磷酸酯酶的光密度值（OD 值）。

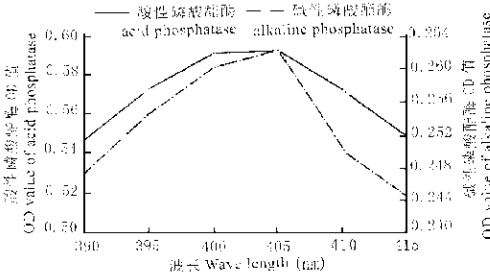


图 1 磷酸酯酶的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectrum of the phosphatases

2.2 模型的建立与检验

按表 3 的结构矩阵，对不同组合进行实验，重复 3 次，每重复测 3 个样本，每样本测 3 次光密度值。方差分析表明，同一实验组合内其重复间和样本间光密度值均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。因此本文将每组合的样本平均值作为实测值（表 3），应用 STATGRAPHICS 计算机软件建立多维反映面数学模型：

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i < j} b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2$$

该模型各系数项的值如表 4 所列，回归系数的 t 检验（表 4）结果表明，酸性磷酸酯酶模型中， b_0 、 b_2 、 b_3 达极显著水平 ($P < 0.01$)， b_{11} 和 b_{33} 达显著水平 ($P < 0.05$)；碱性磷酸酯酶模型中 b_0 、 b_1 、 b_2 、 b_{12} 、 b_{11} 、 b_{22} 达极显著水平 ($P < 0.01$)， b_3 达显著水平 ($P < 0.05$)。由于本实验具有正交性，各回归系数间不相关，可以只保留模型中回归系数显著的项，得简化模型如下：

$$Y_{\text{酸性}} = 0.456380 + 0.107889 X_2 + 0.069027 X_3 - 0.026836 X_1^2 - 0.030794 X_3^2 \quad (1)$$

$$R^2 = 0.7935, Se = 0.0655, F_{\text{回}} = 24.98 > F_{0.01} = 4.14$$

$$Y_{\text{碱性}} = 0.267286 - 0.200736 X_1 + 0.049541 X_2 + 0.030930 X_3 - 0.049063 X_1 X_2 + 0.053585 X_1^2 - 0.049665 X_2^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.9351, Se = 0.0603, F_{\text{回}} = 57.68 > F_{0.01} = 3.67$$

2.3 四因子与 Y 值的关系

分别将模型 (1)、(2) 中的两个因子设在零水平，可以得到 6 个一元偏回归方程。将编码值代入方程 (3)~(8)，分别求得酸性和碱性磷酸酯酶的理论光密度值，并依方程作图。

$$Y_{\text{酸}1} = 0.456380 - 0.026836 X_1^2 \quad (3)$$

$$Y_{\text{酸}2} = 0.456380 + 0.107889 X_2 \quad (4)$$

$$Y_{\text{酸}3} = 0.456380 + 0.069027 X_3 - 0.030794 X_3^2 \quad (5)$$

$$Y_{\text{碱}1} = 0.267286 - 0.200736 X_1 + 0.053585 X_1^2 \quad (6)$$

$$Y_{\text{碱}2} = 0.267286 + 0.049541 X_2 - 0.049665 X_2^2 \quad (7)$$

$$Y_{\text{碱}3} = 0.267286 + 0.030930 X_3 \quad (8)$$

表3 结构矩阵与实验结果
Table 3 Construction matrix and experiment results

实验组 合编号 NO.	X_1	X_2	X_3	X_4	酸性磷酸酯酶 Acid phosphatase		碱性磷酸酯酶 Alkaline phosphatase	
					实测值 Actual value	理论值 Simulated value	实测值 Actual value	理论值 Simulated value
					1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	+1	0.19378	0.20949	0.37900	0.37133
3	-1	-1	+1	-1	0.31922	0.27682	0.43500	0.44539
4	-1	-1	+1	+1	0.38700	0.32116	0.44300	0.44324
5	-1	+1	-1	-1	0.46889	0.41522	0.57700	0.52845
6	-1	+1	-1	+1	0.56367	0.51027	0.61500	0.54446
7	-1	+1	+1	-1	0.51656	0.48982	0.29200	0.66668
8	-1	+1	+1	+1	0.62600	0.56338	0.75267	0.68328
9	+1	-1	-1	-1	0.16289	0.16075	0.07867	0.11573
10	+1	-1	-1	+1	0.19133	0.17842	0.12500	0.10940
11	+1	-1	+1	-1	0.37000	0.38375	0.07100	0.10063
12	+1	-1	+1	+1	0.39100	0.37992	0.07867	0.09489
13	+1	+1	-1	-1	0.32389	0.35008	0.11500	0.07385
14	+1	+1	-1	+1	0.41933	0.39697	0.12900	0.08628
15	+1	+1	+1	-1	0.59500	0.51453	0.15033	0.12566
16	+1	+1	+1	+1	0.56456	0.53992	0.15700	0.13868
17	-2	0	0	0	0.25244	0.35222	0.80300	0.88310
18	+2	0	0	0	0.34122	0.34585	0.08700	0.08015
19	0	-2	0	0	0.14556	0.15332	0.03000	0.03046
20	0	+2	0	0	0.48822	0.58487	0.03400	0.16771
21	0	0	-2	0	0.18856	0.19515	0.22000	0.28926
22	0	0	+2	0	0.37344	0.47126	0.40900	0.41299
23	0	0	0	-2	0.32356	0.36160	0.31300	0.31899
24	0	0	0	+2	0.38644	0.45281	0.26200	0.32926
25	0	0	0	0	0.45322	0.45638	0.26900	0.26929
26	0	0	0	0	0.45889	0.45638	0.26900	0.26729
27	0	0	0	0	0.45889	0.45638	0.26700	0.26729
28	0	0	0	0	0.45322	0.45638	0.26600	0.26729
29	0	0	0	0	0.44900	0.45638	0.26900	0.26729
30	0	0	0	0	0.46311	0.45638	0.26600	0.26729
31	0	0	0	0	0.45833	0.45638	0.26500	0.26729

表 4 回归系数显著水平的 t 检验

Table 4 t test of the significance level on the regression coefficients

系数 Coefficient	酸性磷酸酯酶 Acid phosphatase		碱性磷酸酯酶 Alkaline phosphatase	
	b 值 b value	t 值 t value	b 值 b value	t 值 t value
	b_0	0.4564	19.6029**	0.2673
b_1	-0.0016	-0.1267	-0.2007	-16.3231**
b_2	0.1079	8.5808**	0.0495	4.0285**
b_3	0.0690	5.4900**	0.0309	2.5151*
b_4	0.0228	1.8137	0.0026	0.2089
b_{12}	-0.0206	-1.3349	-0.0491	-3.2575**
b_{13}	0.0225	1.4585	-0.0216	-1.4344
b_{14}	-0.0120	-0.7820	-0.0009	-0.0595
b_{23}	-0.0146	-0.9506	0.0167	1.1107
b_{24}	0.0073	0.4744	0.0047	0.3113
b_{34}	0.0054	-0.3490	0.002	0.0098
b_{11}	-0.0268	-2.3298*	0.0536	4.7562**
b_{22}	-0.0218	-1.8944	-0.0497	-4.4083**
b_{33}	-0.0308	-2.6734*	0.0210	1.8604
b_{44}	-0.0123	-1.0673	0.0142	1.2613

注：① 显著水平 $t_{30,0.05} = 2.04$ ，极显著水平 $t_{30,0.01} = 2.75$ (Significance level $t_{30,0.05} = 2.04$, Extremely significant level $t_{30,0.01} = 2.75$); ② *、** 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ (*, ** Indicating $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively)

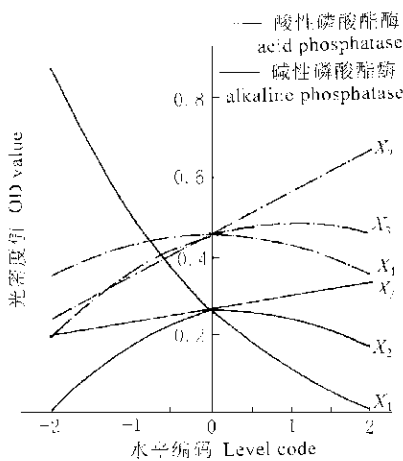


图 2 Y_i 在不同水平值的动态变化

Fig.2 Dynamic of Y_i on difference levels

方程 (3)~(8) 的 F 检验极显著 ($P < 0.01$)。

由图 2 看出，对酸性磷酸酯酶来说， X_1 与 $Y_{酸}$ 值呈开口向下的抛物线关系， X_1 处在零水平时酶活性最强； X_2 与 $Y_{酸}$ 显然呈线性正相关； X_3 与 $Y_{酸}$ 的关系比较复杂，处在 1 水平时光密度值最大。碱性磷酸酯酶的单因子效应则表现出和酸性磷酸酯酶不同的情况， X_1 和 $Y_{碱}$ 之间呈曲线相关，随着 X_1 水平值的升高， Y 值呈先后慢的下降，在 $X_1 = -2$ 时光密度值最大； X_2 与 $Y_{碱}$ 的关系相似于酸性磷酸酯酶的 X_3 与 $Y_{酸}$ 值的关系； X_3 与 $Y_{碱}$ 呈斜率为正的直

线相关。

如将模型(1)、(2)中的一个因子固定在零水平,得6个二元回归方程,可分析两因子共同作用时对 Y_i 值的影响。

$$Y_{\text{酸}1.2} = 0.456380 + 0.107889X_2 - 0.026836X_1^2 \quad (9)$$

$$Y_{\text{酸}1.3} = 0.456380 + 0.069027X_3 - 0.026836X_1^2 \quad (10)$$

$$Y_{\text{酸}2.3} = 0.456380 + 0.107889X_2 + 0.069027X_3 - 0.030794X_3^2 \quad (11)$$

$$Y_{\text{碱}1.2} = 0.267286 - 0.200736X_1 + 0.049541X_2 - 0.049063X_1X_2 + 0.053585X_1^2 - 0.049665X_2^2 \quad (12)$$

$$Y_{\text{碱}1.3} = 0.267286 - 0.200736X_1 + 0.030930X_3 \quad (13)$$

$$Y_{\text{碱}2.3} = 0.267286 + 0.049541X_2 + 0.030930X_3 - 0.049665X_2^2 \quad (14)$$

方程(9)~(14)的 F 检验均达极显著水平($P < 0.01$)。

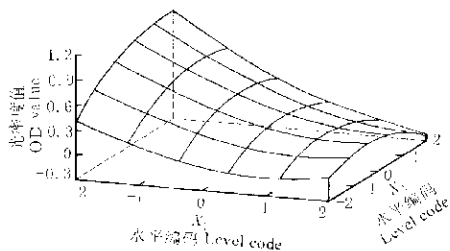


图3 X_1 和 X_2 对 $Y_{\text{碱}}$ 影响的三维图

Fig.3 Three-dimensional figure of the X_1 , X_2 and Y_{alkaline} value

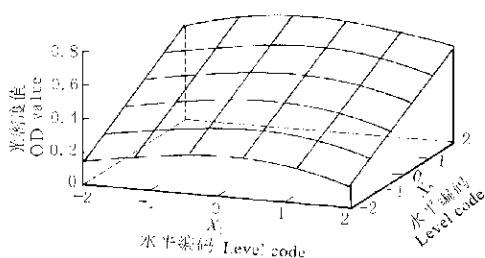


图4 X_1 和 X_2 对 $Y_{\text{酸}}$ 影响的三维图

Fig.4 Three-dimensional figure of the X_1 , X_2 and Y_{acid} value

纵观这些方程,双因子间的交互效应可分为两种类型,第一种是真正交互效应型,如在碱性磷酸酯酶中, X_1 和 X_2 的交互效应, $Y_{\text{碱}1.2}$ 的变化不仅受 X_1 和 X_2 单因子的影响,而且还受乘积项的影响,所以,它表现的三维图(图3)总是呈扭曲的界面。第二种类型是迭加交互效应型,除 $Y_{\text{碱}1.2}$ 外,其余均属此种类型,例如酸性磷酸酯酶中 X_1 和 X_2 的交互效应(图4), $Y_{\text{酸}1.2}$ 在 X_1 的任一编码值上均随 X_2 的增加呈线性增加,同样 $Y_{\text{酸}1.2}$ 在 X_2 的任一编码值上,与 X_1 呈抛物线关系; $Y_{\text{酸}1.2}$ 的最大值所对应的 $X_1 = 0$ 和 $X_2 = 2$,亦分别是单因子效应 $Y_{\text{酸}1}$ 和 $Y_{\text{酸}2}$ 所对应的最高值。

2.3 测定叶螨磷酸酯酶活性的最优条件组合

对表3中酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶的各31个实验组合分别进行了方差分析, $F_{\text{酸}} = 209.24 > F_{0.01} = 1.79$; $F_{\text{碱}} = 999.99 > F_{0.01} = 2.03$,各处理差异达极显著水平。说明不同的四因子组合所测叶螨这两种酶的活性有明显差异。多重比较结果表明,在考虑四因子共同作用于酸性磷酸酯酶时,在第8号组合的实验条件下所测光密度值最高,并与其它各组合的差异极显著($P < 0.01$)。碱性磷酸酯酶在第17号组合的条件下测得光密度值最大,与另30个组合的差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

由酸性磷酸酯酶各实验因子和光密度值之间的数学模型(1)得知,在本实验所设计的水平范围内,醋酸缓冲液的 pH 值 X_1 和酸性磷酸酯酶活性呈开口向下的抛物线关系,即 pH 值过高或过低对其活性均有抑制作用;该酶活性随温浴时间 X_2 的延长呈线性增加;反应温度 X_3 与该酶活性的关系是在低水平时呈直线相关,随着温度的升高变为抛物线关系,表明酶活性在温度的低水平时随温度的升高而增强,当温度升到一定高度该酶活性开始下降,这和酶的蛋白质特性相一致。底物浓度对酸性磷酸酯酶的影响不显著。温浴时间是影响该酶的关键因子。在考虑四因子相互影响的综合效应时, pH 值 4.4、42℃ 温浴 40 min、底物浓度 8.5×10^{-3} mol/L 时测得该酶活性最强。

对测定碱性磷酸酯酶活性产生显著影响的三个因子中,缓冲液的 pH 值为主要的影响因素,温浴时间次之,反应温度居第三。分析模型(2)得知,碳酸缓冲液 pH 值和该酶活性呈抛物线关系,总趋势是随着 pH 值的加大光密度值降低。温浴时间 X_2 和该酶活性也呈抛物线关系,但和 pH 值曲线方向相反。反应温度 X_3 和光密度值呈一直线关系。四因子综合影响时, pH 9.0、37℃ 温浴 30 min、底物浓度 7.5×10^{-3} mol/L 所测光密度值最大。两种酶于 721A 分光光度计的最大吸收峰波长均为 405 nm。

作者认为,获得的上述两个模型也可用于模拟其它螨类磷酸酯酶(酸性和碱性)的测定条件。

参 考 文 献 (References)

- 1 Anber H A I, Openoorth F J. A mutant esterase degrading organophosphates in a resistant strain of the predacious mite *Amblyseius potentillae* (Garman). Pestic. Biochem. Physiol., 1989, 33: 283~287
- 2 Devonshire A L, Moores G D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pestic. Biochem. Physiol., 1982, 18: 235~246
- 3 谭维嘉,王 荷,曹 煜. 棉蚜对溴氰菊酯不敏感性和水解酶的变化初探. 植物保护学报, 1988, 15 (2): 135~138
- 4 丁希泉. 农业应用回归设计. 长春: 吉林科学技术出版社. 1986
- 5 萧 兵,钟俊维. 农业多因素试验设计与统计方法. 武汉: 湖北科学技术出版社. 1985
- 6 陈巧云,姜家良,林国芳等. 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶与敌百虫抗性的关系. 昆虫学报, 1980, 23 (4): 350~357

MATHEMATICAL MODEL FOR THE FACTORS AFFECTING PHOSPHATASE ACTIVITY IN *TETRANYCHUS* (ACARI: TETRANYCHIDAE)

Guo Fengying Deng Xinping Zhao Zhimo

(Department of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract The regression method was adopted to establish mathematical models for the selection of most effective combination of pH value of buffer, constant temperature, reaction time and substrate concentration, that are four major factors affecting activity of phosphatase, either acidic or alkaline, in *Tetranychus cinnabarinus*. The models are: $Y_{\text{acidic}} = 0.456380 + 0.107889X_2 + 0.069027X_3 - 0.026836X_1^2 - 0.030794X_3^2$, $F = 24.98$, $P < 0.01$; $Y_{\text{alkaline}} = 0.267286 - 0.200736X_1 + 0.049541X_2 + 0.030930X_3 - 0.049063X_1X_2 + 0.053585X_1^2 - 0.049665X_2^2$, $F = 57.68$, $P < 0.01$. It reveals that the acid phosphatase has the highest activity under the combination of buffer pH 4.4, temperature 42°C, reaction time 42 minutes and substrate concentration 8.5×10^{-3} mol/L. The reaction time is a key factor affecting acid phosphatase. The key factor affecting alkaline phosphatase is the buffer pH. The best combination is pH 9.0, 37°C, 30 minutes and 7.5×10^{-3} mol/L.

Key words *Tetranychus*, phosphatase, effect factors, models