

· 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<sup>1,2</sup>, 孙晓琴<sup>1</sup>, 唐振华<sup>1,2</sup>, 陶黎明<sup>\*1,3</sup>

(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 和 34 ,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)、碘化硫代丁酰胆碱 (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 ( $K_s$ )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<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-qin<sup>1</sup>, TANG Zhen-hua<sup>1,2</sup>, TAO Liming<sup>\*1,3</sup>

(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 and 34 , respectively. But the optimum pH value was all the same, 7. 4. 2) The capability of substrate hydrolyzed by the two AChEs existed markedly 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 carbamates propoxur, carbofuran, carbaryl and methomyl and 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: yuangang188@126.com; 孙晓琴 (1983-), 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: taolm@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, methamidophos, omethoate 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<sup>[1]</sup>,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了解毒酶活性增高外,还有靶标酶——乙酰胆碱酯酶(AChE, EC, 3. 1. 17)敏感度降低<sup>[2,3]</sup>。在许多昆虫中已被证实靶标抗性与AChE基因(ace)突变有关<sup>[4]</sup>。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<sup>[5~8]</sup>。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<sup>[5,9]</sup>,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<sup>[5,9]</sup>。

### 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)、98.5%甲胺磷(methamidophos)、95%氧乐果(omethoate)、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;PERKIN ELMER GeneAmp 2400PCR仪。

### 1.3 实验方法

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

其头部,按每400头加5mL冰冷磷酸缓冲液(PB, 25mmol/L, pH 7.4, 含1%曲通-100)的比例,于冰上匀浆。匀浆液于4℃12000×g离心24min,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Elman<sup>[10]</sup>比色法,并经改进<sup>[11]</sup>。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412nm下测定光密度值(OD),计算AChE活力。

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

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

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50μL酶液,加入450μL 25mmol/L的Elman溶液中,室温下混匀,在蛋白核酸分析仪上测定其在412nm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 50μL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10min后加入到450μL Elman溶液中,在蛋白核酸分析仪上测定其在412nm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1μmol/L至200mmol/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Foumier<sup>[12]</sup>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  $\mu$ L 加入到 450  $\mu$ L 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 Main<sup>[13]</sup> 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  $\mu$ L 加入到 450  $\mu$ L 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 Main 的公式求出  $K_2$  和  $K_a$ 。

1.3.8 AChE 热稳定性测定 参考 Shi 的方法<sup>[6]</sup>,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  $\mu$ L 酶液,加入到 450  $\mu$ L 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<sup>[14]</sup>。

## 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。

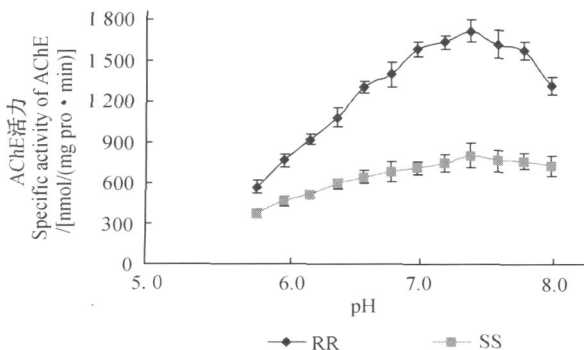


图 1 缓冲液 pH 对 RR-和 SS-AChE 活力的影响

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。

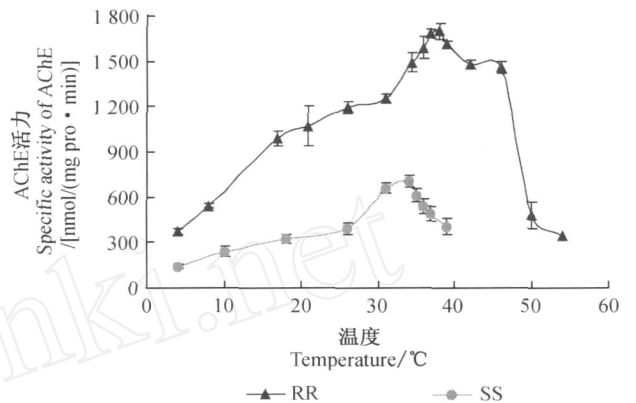


图 2 温度对 RR-和 SS-AChE 活力的影响

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 ( $1/\text{K}$ ) 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 CBs 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 A TCh, B TCh and P TCh 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	
A TCh	72.38 $\pm$ 9.08	283.95 $\pm$ 50.40	3.92	1275.28 $\pm$ 98.34	2827.88 $\pm$ 333.61	2.22
B TCh	75.61 $\pm$ 1.61	129.71 $\pm$ 19.74	1.72	285.94 $\pm$ 3.64	309.56 $\pm$ 19.49	1.08
P TCh	139.54 $\pm$ 9.88	197.93 $\pm$ 23.81	1.41	388.28 $\pm$ 14.24	1322.30 $\pm$ 85.23	3.41

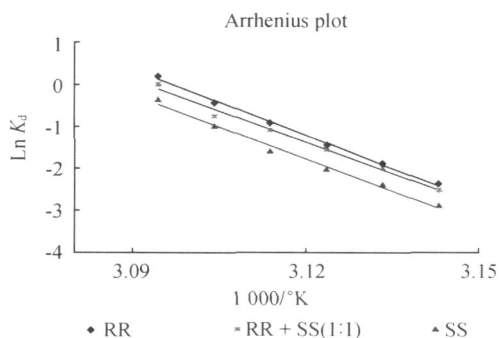


图 3 RR和 SS-AChE的热稳定性

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<sup>[5]</sup>,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 $\pm$ 0.01	0.62 $\times 10^{-2}$ $\pm$ 0.02 $\times 10^{-2}$	46.77*
灭多威 methomyl	0.30 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.01	15.00*
克百威 carbofuran	0.76 $\pm$ 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 $\pm$ 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 methamidophos	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<sup>[4]</sup>。昆虫的 ace突变有可能导致 AChE对 OPs和 CBs的敏感度降低<sup>[8, 15-17]</sup>。抗性马铃薯叶甲 *Lep tino trsa decem lineata*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<sup>[15]</sup>。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<sup>[18]</sup>。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<sup>[6, 18]</sup>。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<sup>[5]</sup>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 A TCh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 A TCh、B TCh、P TCh的水解能力也存在差异,RR-AChE对 A TCh和 P TCh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 carbofuran	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<sup>[2]</sup>。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] LIMei (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 L M, SHIM A, YUANG J Z, 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] KOZAKI T, SHONO T, TOMITA 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 Management 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] ELLMAN G L, COURTNEY 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 F, et al Acetylcholinesterase: Two Types of Modifications Confer Resistance to Insecticide [J]. Biochem J, 1992, 267: 14270-14274.
- [13] MANA 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 Azinphosmethyl 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] TAYLOR 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 S H)