

昆虫解毒酶解毒机理及其在药污染治理中的应用

黄菁, 乔传令

(中国科学院动物研究所 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 根据有关文献资料, 综合评述了昆虫解毒酶的解毒机理及其在农药污染治理中的应用前景。昆虫解毒酶是昆虫在农药的长期施用下, 体内产生的可代谢包括农药在内的成千上万种化合物的一类酶, 该酶在消除农药的环境污染方面有好的应用前景, 为实现农药污染的生物治理提供了新思路。

关键词: 昆虫解毒酶; 农药污染; 生物防治

中图分类号: Q819, Q891 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 0267(2002)03 - 0285 - 03

Mechanism and Application of Insect Detoxification Enzymes in Bioremediation of Pesticide Contamination

HUANG Jing, QIAO Chuan-ling

(The State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Academia, Sinica, Beijing, 100080, P. R. China)

Abstract: The use of pesticides does not only bring benefit to human being but also cause large - scale pesticide pollution. Currently, a method called as "no efficient program" can be used in bioremediation for pesticide pollution. The method is based on the constant application of pesticides to insects, as insect's detoxification enzymes can catalyze and degrade many xenobiotic agents including pesticides. And the use of insect detoxification enzymes provides a novel way in bioremediation of pesticide contamination.

Keywords: insect detoxification enzymes; pesticide pollution; bioremediation

农药治虫为人类带来巨大经济效益的同时, 也带来环境污染和人畜中毒等各种社会问题。目前对于农药污染的生物整治还没有切实可行的办法。昆虫解毒酶是昆虫在农药的长期施用下, 体内产生的一类可代谢包括农药在内的成千上万种化合物的酶。它的产生加大了农药治虫的难度, 从而加剧了农药对环境的污染。然而由于昆虫解毒酶对农药的代谢作用, 使其在化解农药的环境污染方面有好的应用前景, 为实现农药的生物整治提供了新思路。

1 我国农药的生产及其对环境的污染

我国以占世界 7% 的耕地面积养活着世界 22% 的人口, 取得了巨大成就。其中农药的防治作用功不可没。但由于农药生产管理上的落后, 所带来的生态环境污染损失也高达 50 多亿元^[1]。

戈峰将农药防治带来的生态副效应大致分为以下四个方面^[2]: (1) 有益生物被杀伤, 控害作用减弱。当害虫与天敌之间

的自然平衡遭到严重破坏, 会导致次要害虫的猖獗, 危害程度更甚于从前。(2) 害虫抗药性增加, 防治成本成倍提高, 对自然的污染也加重。新的杀虫药剂的研制速度赶不上害虫对杀虫药剂抗性生成速度。(3) 农副产品遭农药污染, 造成粮食减产, 出口减少, 影响人们生活质量。(4) 污染土壤和水体, 危害人畜健康。

2 解毒酶的解毒机理

人类对害虫的化学防治, 使害虫产生适者生存现象, 最终导致抗性的产生。通常杀虫剂被分为 4 类: 有机氯类, 有机磷类, 拟除虫菊酯类和氨基甲酸类。有机氯和拟除虫菊酯类农药主要通过改变轴突膜的离子通道通透性, 影响膜的电位差, 从而阻断轴突传导, 来达到除虫目的。有机磷和氨基甲酸类农药则主要通过抑制昆虫乙酰胆碱酯酶的活性实现除虫作用。环二烯类杀虫剂的作用位点是 GABA 受体。昆虫则主要通过降低表皮和神经膜穿透作用, 降低靶标部分的敏感性和增强对农药的代谢能力这三种途径实现对农药的抗性。昆虫代谢抗性主要涉及的酶是混合功能氧化酶系 (mixed function oxidases, MFOs)、羧酸酯酶 (carboxylesterases, CaE) 和谷胱甘肽 S - 转移酶 (Glutathione - S - transferases, GSTs)。它们通过增强对农药的转化和降解作用以降低毒性或通过阻隔作用保护自己的靶

收稿日期: 2001 - 06 - 14

基金项目: 中国科学院重大 B(KZ951 - B1 - 210 - 03) 和知识创新项目 (C2900047) 资助

作者简介: 黄菁 (1972—), 男, 硕士研究生, 研究方向为抗性分子遗传学。

标位点。因此我们将昆虫中具有代谢农药能力的酶称做昆虫解毒酶。

2.1 羧酸酯酶(CaE)

羧酸酯酶,活性中心为 ser-his-clu 三联体,属丝氨酸酶,在有机磷化合物的解毒作用中起着重要作用。含羧酸键的农药(如马拉硫磷,苯醚菊酯)可被羧酸酯酶特异性降解。而对含磷酸酯、硫酯的农药则以阻隔作用为主,降解作用为辅。经测算每只蚜虫(*Myzus persicae*)中,E4 酶可阻隔 2.5 ng 对氧磷,而水解速度仅为 $0.83\text{ng} \cdot \text{h}^{-1}$,占阻隔量的 33.2%^[3]。昆虫羧酸酯酶与有机磷农药的结合力非常强,如 *Cx quinquefasciatus* Est B2 与对氧磷的结合速度为 $1.7 \times 10^7 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[4]。许多有机磷农药化合物在生理浓度为 1—10 nmol · L⁻¹ 时都可与 CaE 迅速地反应,所以昆虫靶标酶能够避免浓度极低的农药的攻击。因此,在抗性昆虫中,羧酸酯酶代谢能力的增强,一般以增加羧酸酯酶的数量而非质量来实现的。

2.2 混合功能氧化酶系(MFOs)

细胞色素 P450 酶系能接受并代谢各种各样的外源化合物,表现出很大的非专一性。这种机制使昆虫很易对杀虫剂产生抗性,是化学防治虫害的一个主要障碍。P450 酶系中起中心作用的是细胞色素 P450,目前已有近 100 个昆虫 P450 基因被克隆,这些基因仅属 CYP6 和 CYP4 两个家族^[5]。CYP6A1 是第一个从昆虫中分离到的细胞色素 P450 基因。CYP6A1 抗体可强烈地抑制微粒体七氯环氧化作用,说明 CYP6A1 主要代谢环二烯类杀虫剂。抗性昆虫中,调控基因突变导致 P450 酶的过量产生是引起其对各类杀虫剂高抗性的主要原因。但是,氨基酸替换也会引起昆虫抗药性的增强^[6]。Berge 将野生的和突变的 CYP6A2 的 cDNA 插入大肠杆菌表达载体,在大肠杆菌中表达得到有活性的解毒酶蛋白,发现氨基酸替换后酶对 DDT 的代谢活性明显提高。

2.3 谷胱甘肽转移酶(GSTs)

谷胱甘肽转移酶是一类催化还原型谷胱甘肽与各种亲电化合物亲核加成反应的酶。GST 基因的克隆和异源表达促进了酶作用的分子机制的研究。研究表明,GST 有代谢多种农药的能力,昆虫杀虫剂抗性水平与 GST 活性水平相关。Tang 和 Tu 首次证明 *E. coli* 中表达的果蝇 GST D1 基因的产物具有 DDT 脱氢化酶活性^[7]。Syranen 通过对表达的家蝇 GST 同工酶的性质分析表明,MdGST3 对甲基对硫磷和林丹的活性最高,表明它是有机磷抗性主要因素^[8]。

3 解毒酶基因的应用

3.1 转基因昆虫,实现生态治虫

目前国内外许多学者都认为化学防治与生物防治结合即可达到良好效果又能降低农药用量,延缓害虫抗性产生。天敌产生抗性速度比害虫要慢得多。迄今为止,只在 31 种天敌中发现抗性。其原因可能是经化学防治后生存下来的害虫会有丰富食物(即作物),而同时天敌却难于发现其食物而不易生存。人为选育抗性天敌,不仅费时费力,所获抗性水平低,又易丢失。目前转基因技术的发展,使转基因抗性天敌的产生成为可

能。1982 年 Rubin 和 Sprading 就成功地利用 P-专座子将外缘基因成功的转入果蝇胚胎细胞的染色体并得到表达^[9]。最近英国科学家又成功地培育了不感染疟疾的转基因蚊虫^[10]。据新闻报道,2001 年夏天美国 Miller 教授将在凤凰城附近的政府棉田里释放 3 600 个含有水母荧光基因的棉铃虫蛾,用来监控转基因昆虫可能带来的生态影响。总之,随着分子生物学、抗性分子遗传学的发展,及对天敌的遗传背景的不断了解,转基因抗性天敌的问世及其应用已为期不远。

3.2 解毒酶对污染粮食的治理

化学防治往往造成粮食的污染,因而人们迫切希望有一种解毒酶能方便而又快捷地降解残留农药。这种酶一般应有以下特性:(1)解毒酶应由单一基因编码的仅有一个亚基因组成的酶,同时该酶应不需辅酶或辅基即可在生物体外长时间保存活性。(2)解毒酶应具有很高亲和力。因为被污染的粮食中农药浓度一般为 mg · kg⁻¹ 级,这就要求解毒酶对农药必需具有较高的亲和力,迅速与农药结合并具有较高的转化效率,将农药降解成无毒或低毒产物。(3)酶的稳定性好,消长半衰期长,且在较宽的 pH 和温度范围内保留较高酶活性。(4)解毒酶要有较宽的底物专一性,对多种农药有降解作用。(5)该酶必须能以低廉的成本生产。

微生物来源的解毒酶一般具有较高的降解能力,每分钟分解 10³—10⁶ 有机磷分子,而微生物解毒酶与有机磷农药反应时,达到最大反应速度一半时,底物的浓度(KM)一般在几到几十 n mol · L⁻¹ 之间^[11]。显然低亲和性解毒酶不利于去除粮食蔬菜中的低残留高毒性的农药污染。昆虫的羧酸酯酶对农药有较高的亲和性,且在体外依然表现出降解活性。因此,有望应用于污染粮食的治理。本实验室通过大肠杆菌表达并纯化了昆虫羧酸酯酶 B1,其表现出具有降解农药能力(待发表)。昆虫酯酶的催化能力虽较低,但有研究表明,酯酶基因的突变可大大提高酯酶对农药的降解速率及酶的热稳定性^[12]。因此通过人为对酯酶基因密码子进行改造,改善其对农药的水解能力,可以得到有商业用途的解毒酶。

3.3 解毒酶对污染源及土壤的治理

土壤和水源若长期被农药污染会严重影响人类的健康。昆虫解毒酶在微生物或植物中异源表达为治理污染环境提供了一条方便可行的途径。Andersen 将果蝇 CYP6A1 基因与 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因,同时在大肠杆菌中表达,使转化菌拥有解毒活性^[13]。本实验室曾将羧酸酯酶基因 B1(esterase B1)转入蓝藻中进行表达,用于降解农药^[14]。植物和动物的 P450 基因有一定同源性,将动物 P450 基因转移到植物中高效表达,并利用植物的 P450 还原酶,可以使转基因植物拥有解毒能力^[15]。转基因植物目前已用于生产实践,产生了良好的经济效益。昆虫解毒酶基因经几十年研究已探明其作用机理。因此将解毒酶基因转入植物可望用于农药污染治理。转基因植物具有治理污染易于操作,美化环境,又不会对环境造的二次污染等优点。转基因微生物已可用于农药的生物整治。将转基因微生物或藻类固定于生物反应器中,使污水流经反应器,即净化了污水,又不至于对环境形成潜在危害。

3.4 解毒酶用于人、畜解毒

将昆虫解毒酶应用于人畜解毒也是一有益的探索。如羧酸酯酶可在动物体内与有机磷农药迅速结合保护机体免受伤害,并能进一步降解农药从而降低其毒副作用。本室曾将高效表达的羧酸酯酶应用于鸡的解毒实验,得出了良好的效果^[16]。解毒酶还能添加于禽畜饲料中,降解饲料中残留的农药,避免农药在禽畜体内堆积危害人类。至于解毒酶能否应用于人类的解毒,用药途径如何,是否对人类产生副作用,尚待进一步研究。

4 展望

随着对昆虫解毒机理的不断探究,新的解毒酶基因的不断克隆,昆虫解毒酶在农药污染治理上的应用前景也越来越广阔。但这仍需分子生物学家、昆虫学家、化学家的共同努力才能实现。

参考文献:

- [1] 戈 峰. 我国化学农药使用现状、问题及其减少对策[A]. 见:李典谟. 中国无公害农业的发展策略和途径[C],北京:中国农业出版社,1998. 29-35.
- [2] 戈 峰,等. 病虫危害损失及其防治效益的新观察[A]. 见:张广学,李典谟. 中国昆虫学会 2000 年学术年会论文集[C],北京:中国科学技术出版社,2000. 614-619.
- [3] Paton MG, et al. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes[J]. *Biochem J*; 2000, 346 Pt 1: 17-24.
- [4] Karunaratne SHPP et al. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*[J]. *Biochem J*, 1993, 294: 575-579.
- [5] Feyereisen R. Insect P450 enzymes[J]. *Annu Rev Entomol*, 1999, 44: 507-533.
- [6] Berge J B et al. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide re-

sistance in insects[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, 353: 1701-1705.

- [7] Tang AH et al. Biochemical characterization of drosophila glutathione S-transferases d1 and d21[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 27876-27884.
- [8] Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsbury C, Clark A. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly[J]. *J Mol Evol*, 1996, 43(3): 236-240.
- [9] Rubin GM, et al. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vector[J]. *Science*, 1982, 218: 348-353.
- [10] Catteruccia F, et al. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*[J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 959-962.
- [11] Mc Andersen J F, Utermohlen J G, Feyereisen R. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system[J]. *Biochemistry(USA)*, 1994, 33: 2171-2177.
- [12] Campbell PM, Newcomb R D, et al. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28: 139-150.
- [13] Andersen JF, et al. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(8): 2171-2177.
- [14] 闫艳春, 乔传令, 等. 解毒酶基因在蓝藻中的克隆与表达[J]. 生物工程学报, 2000, 16: 42-45.
- [15] Roe R M, et al. Basic Principles and rationale for the use of insect genes in Bioremediation: esterase, phosphotriesterase, cytochrome P450 and epoxide hydrolase[J]. *Rev Toxicol*, 1998, 2: 169-178.
- [16] 邢建民, 乔传令, 等. 解毒酶基因的克隆表达及应用[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 98-101.