



## 家蠅乙醯膽鹼酯酶活性及其對陶斯松、氧化態陶斯松與安丹之感受性

張淑貞、周桃美、高靜華\*

行政院農業委員會農業試驗所應用動物組 41362 台中市霧峰區中正路 189 號

\* 通訊作者 email: [chkao02@tari.gov.tw](mailto:chkao02@tari.gov.tw)

收件日期：2016 年 9 月 19 日 接受日期：2016 年 12 月 7 日 線上刊登日期：2017 年 3 月 6 日

### 摘 要

因應農產品農藥殘留快速篩檢需求，農業試驗所應用長期飼養於室內之感性品系家蠅 (*Musca domestica* (Linnaeus, 1758)) 頭部所純化之乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase)，於 1985 年推出可快篩有機磷 (organophosphates) 及胺基甲酸鹽類 (carbamates) 殺蟲劑之生化檢測技術。為增進家蠅乙醯膽鹼酯酶之產製效率及評估以其他蠅類生產乙醯膽鹼酯酶之可行性，本研究以長期飼養於室內之感性品系家蠅、東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912)) 及瓜實蠅 (*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett, 1899)) 頭部萃取之乙醯膽鹼酯酶進行測試。比較不同日齡家蠅頭部之乙醯膽鹼酯酶，可知家蠅在 3 日齡時乙醯膽鹼酯酶比活性 (specific activity) 最高。雄蠅乙醯膽鹼酯酶比活性顯著高於雌蠅，但兩性間的乙醯膽鹼酯酶總活性差距不大。另比較 3 種蠅類頭部之乙醯膽鹼酯酶，得知家蠅雄蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性最高，為 0.925  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein，為東方果實蠅雄蠅的 2.1 倍。東方果實蠅雄蠅對陶斯松最敏感，陶斯松對其乙醯膽鹼酯酶活性之半抑制濃度 (median inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 為 1.334  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，家蠅雄蠅則略高為 1.489  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。顯示 3 種蠅類中，家蠅最適用來生產乙醯膽鹼酯酶。將家蠅之乙醯膽鹼酯酶進一步以管柱純化，其比活性增高為 3.513  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein，陶斯松 (chlorpyrifos)、氧化態陶斯松 (chlorpyrifos oxon) 及安丹 (propoxur) 對此純化酵素之  $\text{IC}_{50}$  則分別下降至 0.246、0.051 及 0.021  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。相較於電鰻 (*Electrophorus electricus*)，此家蠅乙醯膽鹼酯酶比活性雖低於電鰻，但其對陶斯松、氧化態陶斯松與安丹之敏感性則遠高於電鰻。可見感性品系家蠅，對藥劑相對較為敏感，用來生產乙醯膽鹼酯酶檢測農產品農藥殘留最為適切。

**關鍵詞：**家蠅、乙醯膽鹼酯酶、陶斯松、氧化態陶斯松、安丹。

### 前 言

乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase) 是分解神經傳導物質乙醯膽鹼 (acetylcholine) 之主要酵素，藉由水解乙醯膽鹼成乙酸 (acetic acid) 和膽鹼 (choline)，終止神經衝動過度傳導。Ellman method

則是基於此原理，藉由提供硫代乙醯膽鹼 (acetylthiocholine) 為受質，經乙醯膽鹼酯酶水解成乙酸和硫代膽鹼 (thiocholine)，硫代膽鹼再和呈色劑 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 反應，釋出黃色的 5-thio-2-nitro-benzoic acid (TNB)，藉由檢測其最大吸光值 412 nm 下的吸光

值變化，即可推估乙醯膽鹼酯酶的活性 (Ellman *et al.*, 1961)。因 Ellman method 可檢測乙醯膽鹼酯酶活性的特性，故也提供此方法應用在檢測作用機制在乙醯膽鹼酯酶上之殺蟲劑的可能性。有機磷類 (organophosphates) 及胺基甲酸鹽類 (carbamates) 殺蟲劑會與乙醯膽鹼酯酶結合，導致乙醯膽鹼無法與乙醯膽鹼酯酶結合而被水解，故乙醯膽鹼累積在細胞突觸間，引發神經衝動過度傳導，造成肌纖維過度抽蓄、肌肉麻痺、痙攣死亡 (Yu, 2008)。故藉由 Ellman method 可快速估測乙醯膽鹼酯酶的活性，並藉此推論這兩類殺蟲劑之存在狀況。

由於此二類殺蟲劑殺蟲效率快速，素為農民喜愛使用，尤其是陶斯松 (chlorpyrifos) 更長居台灣農產品超標檢出名單中。但在台灣，衛生福利部食品藥物管理署 (食藥署) 公告的食品中殘留農藥檢驗方法需以 LC/MS/MS 與 GC/MS/MS 檢測農藥，其相應的檢體萃取、儀器與資料庫價格及執行人員的專業要求，都限制了此方法的時效及應用範圍。故農業試驗所 (農試所) 自 1985 年開始，即採用家蠅 (*Musca domestica* (Linnaeus, 1758)) 之乙醯膽鹼酯酶發展並推廣農產品之農藥殘留快篩技術，至 2014 年已輔導設置逾 380 處工作站，當年檢驗逾 87 萬件蔬果 (Cheng *et al.*, 2015)，2015 年則檢驗逾 111 萬件蔬果。相對於食藥署每年在台灣抽檢兩千多件農產品而言 (Tsai *et al.*, 2015)，農藥殘留快篩技術對食品安全把關之成效卓著。因為乙醯膽鹼酯酶篩檢農藥之快速、易執行，國外應用乙醯膽鹼酯酶檢測農藥殘留亦日漸受到重視 (Bajet and Tejada, 1995; Kim and Boo, 2004; Kim *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2011; Arora and Kumar, 2015)。農試所更進一步將此農藥殘留快篩技術推廣至東南亞及中南美等國家。

為瞭解家蠅乙醯膽鹼酯酶最有效率之產製方法，評估利用其他蠅類生產乙醯膽鹼酯酶之可行性，以及瞭解現有用於農藥檢測之乙醯膽鹼酯酶對農藥的敏感性，故進行此研究；並首次於報告中同時比較家蠅、東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912)) 及瓜實蠅 (*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett, 1899)) (Hendrichs *et al.*, 2015) 之乙醯膽鹼酯酶活性，及其對陶斯松與氧化態陶斯松之感受性。

## 材料與方法

### 蟲體與材料

試驗所需之家蠅為農試所室內繁殖逾 50 年未接觸藥劑之感性品系，瓜實蠅及東方果實蠅則已於農試所室內繁殖 16 年未接觸藥劑之感性品系。室內繁殖溫度  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相對濕度  $75 \pm 10\%$ 、光週期 9:15 (L:D)。

藥品 acetylthiocholine iodide (ATChI)、5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 購自 Sigma-Aldrich。殺蟲劑陶斯松 (chlorpyrifos)、氧化態陶斯松 (chlorpyrifos oxon) 及安丹 (propoxur) 等標準品購自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)。溴水 (bromine) 購自 Merck。

### 乙醯膽鹼酯酶比活性分析

將成蠅置於  $-20^\circ\text{C}$  冷凍 1 h 致死後，切取 10 隻成蠅頭部，記錄重量。再加入 1 mL phosphate buffer (0.1 M pH8.0；內含 0.15 M NaCl 及 1% Triton X-100)，在  $4^\circ\text{C}$  研磨並以 10,000 g 離心 1 h，上清液經紗布過濾、記錄體積，此即酵素源粗萃取液。將此粗萃取液以 Ellman method (Ellman *et al.*, 1961) 分析其乙醯膽鹼酯酶活性，並參考 Chiu *et al.* (1991) 之乙醯膽鹼酯酶活性分析方法，等比例縮減體積為 1/3，以分析其乙醯膽鹼酯酶活性，即在  $25^\circ\text{C}$ ，取 1 mL phosphate buffer (0.1 M pH 8.0)，加入 2  $\mu\text{L}$  粗萃取液與 4.7  $\mu\text{L}$  研磨用緩衝液、6.7  $\mu\text{L}$  ATChI (75 mM) 受質、33.3  $\mu\text{L}$  呈色劑 DTNB (10 mM；溶於 0.1 M pH8.0 phosphate buffer)。待其反應 1 min，以分光光度計 (U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan) 測量產物 5-thio-2-nitrobenzoic acid dianion (TNB) 在 412 nm 的吸光值變化，並以莫耳消光係數 ( $\epsilon = 14.14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Eyer *et al.*, 2003) 計算其每分鐘生成產物之莫耳濃度，再進而以總體積 1.0467 mL 推算出莫耳數。另以 Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 進行此粗萃取液之蛋白質定量。再將此蛋白質濃度結合上述乙醯膽鹼酯酶活性分析結果，估算其乙醯膽鹼酯酶比活性，即粗萃取液中每單位蛋白質每分鐘可生成產物之莫耳數。最後由酵素體積、蛋白質定量結果與乙醯膽鹼酯酶比活性，估算每隻成蠅頭部之乙醯膽鹼酯酶總活性。

### 家蠅成蠅日齡及性別對乙醯膽鹼酯酶活性之影響

分別取感性品系家蠅羽化後 1~6 日齡之雌、雄

個體，10 隻為 1 重複，每處理各 5 重複，秤頭部重量，以上述乙醯膽鹼酯酶活性分析方法計算其比活性與總活性，以比較家蠅成蠅不同日齡及性別之乙醯膽鹼酯酶活性。

### 殺蟲劑對乙醯膽鹼酯酶之抑制

參考 Chiu *et al.* (1911) 與 Tan *et al.* (2011) 之方法，稍加修改後進行殺蟲劑對乙醯膽鹼酯酶之抑制評估。因不同來源酵素溶液的乙醯膽鹼酯酶濃度及活性都不同，且在不同酵素活性下，同一殺蟲劑濃度的抑制率亦不同。故先測試反應 1 min 後生成產物最終吸光值為 0.83~0.90 OD 時所需之酵素源量，再以此相同酵素活性下，建立各自的 IC<sub>50</sub> (median inhibitory concentration) 值，以比較彼此間的差異。殺蟲劑對乙醯膽鹼酯酶之抑制評估方法為取 1 mL phosphate buffer (0.1 M pH 8.0；內含 0.15 M NaCl 與 1% Triton X-100)，加入經上述 buffer 補足至體積為 6.7 μL 之酵素源，隨即加入 6.7 μL 溶於甲醇之殺蟲劑溶液，反應 3 min 後，再加入 6.7 μL ATChI (75 mM) 及 33.3 μL DTNB (10 mM)，記錄在 412 nm 一分鐘之吸光值變化。抑制率為：(對照組吸光值變化 - 處理組吸光值變化) / 對照組吸光值變化×100%。每個處理進行 5 個殺蟲劑濃度測試，重複 5 次。得到的抑制率取平均值後與反應液中殺蟲劑濃度的對數值 (logarithm) 進行回歸分析，並以此回歸線推算抑制 50% 乙醯膽鹼酯酶活性時之殺蟲劑濃度即 IC<sub>50</sub>。

### 家蠅、瓜實蠅及東方果實蠅之乙醯膽鹼酯酶活性及對陶斯松、氧化態陶斯松之感受性比較

取羽化後 3 日齡家蠅，與羽化後 12 日齡之瓜實蠅、東方果實蠅，10 隻為 1 重複，雌雄各 5 重複，以上述乙醯膽鹼酯酶比活性分析方法計算其乙醯膽鹼酯酶比活性，及陶斯松對其乙醯膽鹼酯酶抑制率之 IC<sub>50</sub>。另取上述 3 種蠅類之雌蠅，進行氧化態陶斯松對其乙醯膽鹼酯酶之抑制率分析並推算其 IC<sub>50</sub>。

### 低溫貯存對雄家蠅乙醯膽鹼酯酶活性之影響

取羽化後 3 日齡感性品系雄家蠅，分別在 -20°C 低溫貯存 1 天、2 天、1 個月及 2 個月後，以上述乙醯膽鹼酯酶比活性分析方法計算其乙醯膽鹼酯酶比活性。10 隻為 1 重複，各 5 重複，並列出其平均值與平均值標準差 (standard error of mean)。

### 家蠅與電鰻之乙醯膽鹼酯酶活性及其對殺蟲劑之敏感性比較

取 3 日齡家蠅頭部 100 g，以 Chiu *et al.* (1991) 之方法先以正丁醇 (*n*-butanol) 與牛黃膽鹼鈉 (Na-taurocholic acid) 溶出乙醯膽鹼酯酶，再以硫酸銨 (ammonium sulfate) 沈澱法與管柱層析 (Sephadex G-100) 純化其乙醯膽鹼酯酶，重複 3 次。另購入源自電鰻之乙醯膽鹼酯酶 Type V (C2888, Sigma-Aldrich)，與 Type VI (C3389, Sigma-Aldrich)。以上述乙醯膽鹼酯酶比活性分析方法測量其乙醯膽鹼酯酶比活性，並參照上述殺蟲劑對乙醯膽鹼酯酶之抑制評估方法測量陶斯松、氧化態陶斯松及安丹對其乙醯膽鹼酯酶之 IC<sub>50</sub>，並比較其差異。

其中純化的家蠅酵素，另測量溴化後的陶斯松對其乙醯膽鹼酯酶之 IC<sub>50</sub>，以比較陶斯松、氧化態陶斯松及溴化後的陶斯松對家蠅乙醯膽鹼酯酶之抑制差異，重複 3 次。另取 8 ng/mL 氧化態陶斯松參照上述殺蟲劑對乙醯膽鹼酯酶之抑制評估方法，測量其對純化之家蠅酵素的抑制率，並比較在反應酵素活性降至一半時，其對酵素活性的抑制率，各 3 重複，並列出其平均值與平均值標準差。

陶斯松的溴化處理：取 2 mL 溶於甲醇的陶斯松溶液 25 mg/mL 於玻璃試管中，加入 0.4% 紅色溴水溶液 100 μL，再放入等體積的棉花，震盪 1 min，於抽氣櫥中靜置 1 h，即可吸出陶斯松溶液備用。

### 統計分析

各項試驗資料利用 SAS-EG 7.1 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA) 統計分析軟體先進行變方分析，再以最小顯著差法 (Fisher's least significance test, LSD) 或 *t* 值測試法檢測，並採 *p* < 0.05 顯著水準比較處理間平均值之差異。

## 結 果

### 家蠅成蠅日齡及性別對乙醯膽鹼酯酶活性之影響

雄家蠅 1~6 日齡頭部參與反應之粗萃取液中含蛋白質量 2.0~3.5 μg，雌家蠅則為 2.8~4.0 μg。家蠅成蠅在 1~3 日齡時，雌雄蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性逐日顯著上升至 1.5 倍 (表一)。4 日齡成蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性則皆顯著下降，雌蠅下降至與 1 日齡時相近，雄蠅則明顯低於 1 日齡時的比活性。5 日齡時，雌雄蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性再次顯著上

表一 感性品系家蠅成蠅不同日齡及性別之乙醯膽鹼酯酶活性

Table 1. Acetylcholinesterase activities of aging males and aging females from a susceptible strain of housefly

	Adult age (d)					
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
AChE specific activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)						
Male	0.618 $\pm$ 0.034Ac	0.846 $\pm$ 0.017Ab	0.925 $\pm$ 0.028Aa	0.496 $\pm$ 0.012Ad	0.847 $\pm$ 0.030Ab	0.871 $\pm$ 0.027Aab
Female	0.404 $\pm$ 0.013Bd	0.469 $\pm$ 0.014Bc	0.585 $\pm$ 0.017Ba	0.394 $\pm$ 0.014Bd	0.520 $\pm$ 0.015Bb	0.514 $\pm$ 0.021Bbc
Ratio ( $\delta/\text{♀}$ )	1.53	1.80	1.58	1.26	1.63	1.70
Head weight (mg/head)						
Male	1.480 $\pm$ 0.049Ba	1.440 $\pm$ 0.024Ba	1.320 $\pm$ 0.020Bb	1.420 $\pm$ 0.020Ba	1.420 $\pm$ 0.020Ba	1.320 $\pm$ 0.037Bb
Female	1.860 $\pm$ 0.045Ad	2.000 $\pm$ 0.045Ac	1.840 $\pm$ 0.040Ad	2.420 $\pm$ 0.020Aa	2.220 $\pm$ 0.037Ab	1.900 $\pm$ 0.032Acd
Ratio ( $\delta/\text{♀}$ )	0.80	0.72	0.72	0.59	0.64	0.69
Head protein (mg/head)						
Male	0.065 $\pm$ 0.003Bb	0.051 $\pm$ 0.002Bc	0.050 $\pm$ 0.002Bc	0.087 $\pm$ 0.002Aa	0.055 $\pm$ 0.002Bc	0.051 $\pm$ 0.001Bc
Female	0.087 $\pm$ 0.002A2b	0.078 $\pm$ 0.002Ac	0.070 $\pm$ 0.002Ad	0.095 $\pm$ 0.004Aa	0.077 $\pm$ 0.002Acd	0.077 $\pm$ 0.002Acd
Ratio ( $\delta/\text{♀}$ )	0.74	0.73	0.61	0.90	0.58	0.74
Total AChE activities (nmol/min/head)						
Male	40.0 $\pm$ 0.8Ac	43.2 $\pm$ 0.8Ab	45.7 $\pm$ 0.5Aa	42.9 $\pm$ 0.4Ab	46.4 $\pm$ 1.1Aa	44.3 $\pm$ 0.6Aab
Female	34.9 $\pm$ 3.6Bc	36.5 $\pm$ 0.7Bc	40.7 $\pm$ 0.9Ba	37.4 $\pm$ 0.9Bbc	40.0 $\pm$ 0.7Bab	34.9 $\pm$ 1.7Bab
Ratio ( $\delta/\text{♀}$ )	1.15	1.18	1.12	1.15	1.15	1.13

<sup>1)</sup> With the heads from 10 adults per treatment, 5 replicates. Means ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) within each column followed by a different uppercase letter are significantly different ( $p < 0.05$ , paired samples  $t$ -test). Means ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) within each row followed by the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ , Fisher's protected LSD test).

升。雌雄家蠅 3 日齡時的頭部重量與蛋白質量皆低於其他日齡，差異顯著性如表一。雌家蠅頭部乙醯膽鹼酯酶總活性，在 3 日齡時最高，但與 5、6 日齡差異不顯著；雄家蠅則在 5 日齡時最高，但與 3、6 日齡差異不顯著。

同一日齡雄蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性則皆顯著高於雌蠅，為其 1.26~1.80 倍，但雄蠅頭部重量與蛋白質含量皆低於雌蠅，僅為雌蠅的 0.58~0.90 倍。總計後同日齡雄家蠅頭部乙醯膽鹼酯酶總活性皆高於雌家蠅，但兩者間的比值已降低至 1.12~1.18 倍。

#### 家蠅、瓜實蠅及東方果實蠅之乙醯膽鹼酯酶活性及對陶斯松、氧化態陶斯松之感受性

家蠅成蠅在 4 日齡時開始大量產卵，產卵前 1 日（即 3 日齡）是乙醯膽鹼酯酶比活性的第一波高峰，故選取 3 日齡家蠅進行乙醯膽鹼酯酶萃取及活性測量。瓜實蠅及東方果實蠅亦皆選取產卵前 1 日（即 12 日齡）進行試驗。此時期雄、雌家蠅頭部參與反應之粗萃取液中含蛋白質量各為 2.2·2.6  $\mu\text{g}$ ，雄、

雌瓜實蠅各為 2.8、3.3  $\mu\text{g}$ ，雄、雌東方果實蠅各為 2.6、3.0  $\mu\text{g}$ 。結果顯示家蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性最高，為瓜實蠅、東方果實蠅的 1.6~2.1 倍（表二），東方果實蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性最低。各雄蠅乙醯膽鹼酯酶比活性皆顯著高於雌蠅為其 1.2~1.6 倍。

陶斯松對瓜實蠅乙醯膽鹼酯酶之  $\text{IC}_{50}$  明顯高於家蠅與東方果實蠅，為其 1.7~2.2 倍；家蠅之  $\text{IC}_{50}$  則略高於東方果實蠅，為其 1.1~1.2 倍。瓜實蠅與東方果實蠅雌雄間之  $\text{IC}_{50}$  皆相近，雌家蠅則高於雄家蠅，為其 1.1 倍。此 3 種蠅類乙醯膽鹼酯酶抑制率與陶斯松濃度之直線回歸方程式如表三，其中以家蠅之斜率最大，其餘二者相近。直線回歸圖如圖一，在相同陶斯松濃度時，瓜實蠅乙醯膽鹼酯酶之抑制率明顯最低，家蠅與東方果實蠅之抑制率則較高，低濃度時東方果實蠅乙醯膽鹼酯酶之抑制率較高，但高濃度時二者則相近。

以上結果顯示，家蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性顯著高於東方果實蠅與瓜實蠅；東方果實蠅乙醯膽鹼

表二 感性品系家蠅、東方果實蠅及瓜實蠅成蠅之乙醯膽鹼酯酶活性及陶斯松、氧化態陶斯松對其之 IC<sub>50</sub>  
 Table 2. Acetylcholinesterase activities and IC<sub>50</sub> values for chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon of susceptible strains of *Musca domestica*, *Bactrocera dorsalis* and *Zeugodacus cucurbitae*

Acetylcholinesterase	Sex	<i>M. domestica</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Z. cucurbitae</i>
AChE activities <sup>1)</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Female	0.585 $\pm$ 0.017Aa	0.325 $\pm$ 0.015Ab	0.370 $\pm$ 0.012Ab
	Male	0.925 $\pm$ 0.028Ba	0.433 $\pm$ 0.027Bb	0.441 $\pm$ 0.008Bb
Chlorpyrifos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1,2)</sup>	Female	1.702 $\pm$ 0.055Ab	1.344 $\pm$ 0.021Ac	2.953 $\pm$ 0.077Aa
	Male	1.489 $\pm$ 0.022Bb	1.334 $\pm$ 0.027Ac	2.889 $\pm$ 0.055Aa
Chlorpyrifos oxon ( $\text{ng}/\text{mL}$ ) <sup>1,2)</sup>	Female	0.409 $\pm$ 0.005b	0.295 $\pm$ 0.003c	0.641 $\pm$ 0.008a

<sup>1)</sup> With the heads from 10 adults per treatment, 5 replicates. Means ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) within each column followed by a different uppercase letter are significantly different ( $p < 0.05$ , paired samples *t*-test). Means ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) within each row followed by the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ , Fisher's protected LSD test).

<sup>2)</sup> IC<sub>50</sub> was the median inhibitory concentration of AChE by chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon. AChE Inhibition (%) =  $(\Delta\text{OD}_{\text{control}} - \Delta\text{OD}_{\text{sample}}) / \Delta\text{OD}_{\text{control}} \times 100\%$ .

表三 感性品系東方果實蠅、家蠅及瓜實蠅之乙醯膽鹼酯酶抑制率與陶斯松濃度之直線回歸方程式  
 Table 3. Linear regression equations of acetylcholinesterase inhibition by chlorpyrifos from susceptible strains of *Bactrocera dorsalis* (BD), *Musca domestica* (MD), and *Zeugodacus cucurbitae* (ZC)

Species		Regression equation <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>
Female	BD	$y = 40.9203 + 70.6094x$	0.9962
	MD	$y = 30.7501 + 84.0327x$	0.9915
	ZC	$y = 15.4224 + 73.4567x$	0.9863
Male	BD	$y = 41.0227 + 71.8245x$	0.9978
	MD	$y = 34.0767 + 84.7730x$	0.9962
	ZC	$y = 17.3909 + 70.7522x$	0.9932

<sup>1)</sup> y = inhibition percentage of AChE, x = log value of chlorpyrifos concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

酯酶對陶斯松之敏感性優於家蠅與瓜實蠅，但在較高濃度時，東方果實蠅與家蠅對陶斯松之敏感性則趨於一致。

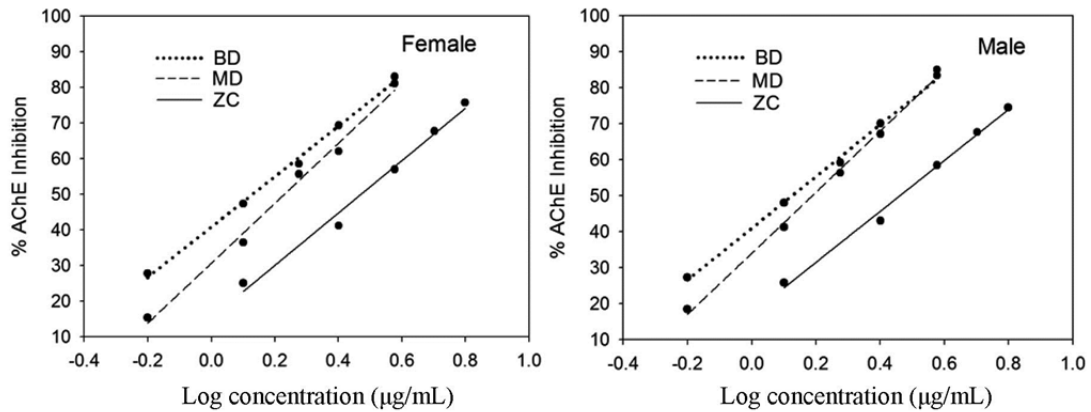
#### 低溫貯存對雄家蠅乙醯膽鹼酯酶活性之影響

羽化後 3 日齡雄家蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性為  $0.925 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein，此 3 日齡雄蠅  $-20^\circ\text{C}$  低溫貯存 1 天、2 天、1 個月及 2 個月後再萃取其乙醯膽鹼酯酶，則其比活性分別降為  $0.789 \pm 0.043$ 、 $0.708 \pm 0.047$ 、 $0.740 \pm 0.021$  及  $0.676 \pm 0.040 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein。可見活雄蠅即時萃取乙醯膽鹼酯酶，其比活性顯著高於經低溫  $-20^\circ\text{C}$  貯存後再萃取酵素者，不同貯存時間之乙醯膽鹼酯酶比活性則無明顯差異 (Fisher's protected LSD test,  $p < 0.05$ )。此即表示  $-20^\circ\text{C}$  低溫貯存雄成蠅會顯著降低其乙醯膽鹼酯酶比活性，故量產乙醯膽鹼

酯酶時，若以低溫貯存成蠅以調節其乙醯膽鹼酯酶之產製流程，貯存 1 天至 2 個月會降低乙醯膽鹼酯酶活性 14.8~23.5%。

#### 家蠅與電鰻之乙醯膽鹼酯酶活性及其對殺蟲劑之敏感性比較

大量並以管柱萃取之家蠅乙醯膽鹼酯酶，比活性為  $3.513 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein，電鰻乙醯膽鹼酯酶 Type V、Type VI 商品酵素之比活性皆明顯高於家蠅，分別為其 151.2 與 50.3 倍 (表四)。陶斯松對家蠅酵素之 IC<sub>50</sub> 為  $0.246 \mu\text{g}/\text{mL}$  即相當於  $0.702 \mu\text{M}$ 。電鰻對陶斯松之敏感性則遠低於家蠅，陶斯松對電鰻乙醯膽鹼酯酶 Type V、Type VI 之 IC<sub>50</sub> 各為家蠅之 16.5 與 24.7 倍。氧化態陶斯松對家蠅酵素之 IC<sub>50</sub> 為  $0.051 \text{ ng}/\text{mL}$  即相當於  $0.145 \text{ nM}$ 。氧化態陶斯松則差距更明顯，其對電鰻乙醯膽鹼酯酶



圖一 陶斯松對感性品系家蠅、東方果實蠅及瓜實蠅成蠅之乙醯膽鹼酯酶抑制曲線。

Fig. 1. The inhibition curves of acetylcholinesterase to chlorpyrifos from susceptible strains of *Bactrocera dorsalis* (BD), *Musca domestica* (MD), and *Zeugodacus cucurbitae* (ZC). Each data point represents the mean of five replicates.

Type V、Type VI 之  $IC_{50}$  各為家蠅之 466.5 與 521.6 倍。陶斯松對家蠅乙醯膽鹼酯酶之  $IC_{50}$  為氧化態陶斯松之 4823.5 倍，陶斯松對電鰻 Type V、Type VI 之  $IC_{50}$  則為氧化態陶斯松之 170.8 與 228.3 倍。安丹對家蠅酵素之  $IC_{50}$  為  $0.021 \mu\text{g/mL}$  即相當於 59.9 nM。安丹對電鰻 2 型乙醯膽鹼酯酶之  $IC_{50}$  為家蠅之 11.8~12.4 倍。顯示家蠅乙醯膽鹼酯酶比活性雖低於電鰻，但對陶斯松、氧化態陶斯松及安丹卻遠較電鰻敏感。

氧化態陶斯松、經溴水氧化後的陶斯松、陶斯松對家蠅乙醯膽鹼酯酶之  $IC_{50}$ ，即抑制家蠅乙醯膽鹼酯酶一半活性之此 3 種型態陶斯松濃度比為 1 : 1.9 : 4823.5 (表四)。顯示陶斯松經溴水氧化後，對家蠅乙醯膽鹼酯酶之抑制力大幅提高，但抑制力仍略低於氧化態陶斯松。8 ng/mL 氧化態陶斯松 6.7  $\mu\text{L}$  加至反應液中最終濃度為 0.051 ng/mL，以此濃度的氧化態陶斯松測試不同酵素活性時的抑制率差異，即家蠅乙醯膽鹼酯酶反應活性為  $0.87 \pm 0.00$  OD 時，反應液中含 0.051 ng/mL 氧化態陶斯松對其之抑制率為  $52.8 \pm 1.8\%$ ；但是當反應活性降為  $0.53 \pm 0.01$  OD 時，抑制率上升至  $70.5 \pm 3.8\%$ 。

## 討 論

分析農業試驗所之感性品系家蠅成蠅，得知其乙醯膽鹼酯酶比活性在 3 日齡時最高，4 日齡雌、雄家蠅則分別陡然各下降至 3 日齡時的 67.3、53.6%。已知家蠅會隨著交配活動增加而縮短壽命 (Ragland and Sohal, 1973)，而由本研究得知 4 日

齡家蠅乙醯膽鹼酯酶比活性陡然下降，此時亦是家蠅羽化後第一波開始產卵的時間，兩者明顯有相關，但此現象是否為交配及產卵行為的影響尚待進一步確認。而以量產家蠅乙醯膽鹼酯酶為目的時，除了乙醯膽鹼酯酶比活性外，尚須考量乙醯膽鹼酯酶的總活性。家蠅雖然在 3 日齡時有最高的乙醯膽鹼酯酶比活性，但此時頭部的重量與蛋白質含量卻都最低，由此計算而得之乙醯膽鹼酯酶總活性，雌家蠅仍是在 3 日齡時最高，但與 5、6 日齡差異已不顯著；雄家蠅則在 5 日齡時最高，但與 3、6 日齡差異不顯著。顯示以乙醯膽鹼酯酶總活性而言，3 日齡家蠅最適合用來生產乙醯膽鹼酯酶，5、6 日齡亦可，2、4 日齡次之，1 日齡家蠅最不適合。

另  $-20^{\circ}\text{C}$  低溫貯存家蠅會顯著降低其乙醯膽鹼酯酶比活性，所以量產家蠅乙醯膽鹼酯酶時，不適合  $-20^{\circ}\text{C}$  低溫貯存成蠅以調節其乙醯膽鹼酯酶之產製。但若必須貯存成蠅，貯存 1 天至 2 個月間的乙醯膽鹼酯酶比活性降低 14.8~23.5%，彼此間差異不明顯。

不同酵素活性下，同一殺蟲劑濃度對酵素活性表現的抑制率不同。如在本試驗中，以大量純化的家蠅乙醯膽鹼酯酶測試，反應活性為 0.87 或 0.53 OD 時，0.051 ng/mL 氧化態陶斯松對其之抑制率分別為 52.8 與 70.5%。故本試驗在進行不同來源酵素對殺蟲劑敏感性測試時，將所有評估酵素抑制反應的酵素活性都固定在 0.83~0.90 OD，再比較彼此間抑制率的差異。而因為這個酵素特性，在應用乙醯膽鹼酯酶大量篩檢農產品中農藥含量時，更需在同一酵素反應活性時，才可直接以抑制率值為參考

表四 感性品系家蠅及電鰻之乙醯膽鹼酯酶活性及殺蟲劑對其之 IC<sub>50</sub>

Table 4. Acetylcholinesterase activities and IC<sub>50</sub> values for insecticides from a susceptible strain of housefly and electric eel

Acetylcholinesterase <sup>1) 2)</sup>	MD	EV	EVI
AChE (μmol/min/mg protein)	3.513 ± 0.047c	531.100 ± 6.054a	176.697 ± 0.586b
Chlorpyrifos (μg/mL) <sup>3)</sup>	0.246 ± 0.005c	4.064 ± 0.079b	6.072 ± 0.209a
Chlorpyrifos oxon (ng/mL) <sup>3)</sup>	0.051 ± 0.001c	23.794 ± 0.585b	26.601 ± 0.216a
Chlorpyrifos (brominated) (ng/mL)	0.095 ± 0.000	—	—
Propoxur (μg/mL) <sup>3)</sup>	0.021 ± 0.000c	0.260 ± 0.005a	0.248 ± 0.003b

<sup>1)</sup> Means ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) within each row followed by the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ , Fisher's protected LSD test), 3 replicates.

<sup>2)</sup> MDS was AChE of the TARI susceptible strain of housefly prepared by the Chiu *et al.* (1991) method. EV and EVI were electric eel *Electrophorus electricus* acetylcholinesterases, C2888 and C3389, purchased from Sigma-Aldrich.

<sup>3)</sup> IC<sub>50</sub> was the median inhibitory concentration of AChE by insecticides. AChE Inhibition (%) =  $(\Delta\text{OD}_{\text{control}} - \Delta\text{OD}_{\text{sample}}) / \Delta\text{OD}_{\text{control}} \times 100\%$ .

值。且在農產品快篩時間限制下，並無建立農藥濃度與抑制率之標準曲線可供確認農藥濃度，加上篩檢的有機磷與胺基甲酸鹽類殺蟲劑數十種農藥，每種農藥對乙醯膽鹼酯酶的親合性不同，實務上也無法建立所有農藥的標準曲線，更顯得相關快篩檢驗應用抑制率值評估篩檢時，相同酵素反應活性前提的重要。

不同昆蟲間，已知家蠅的乙醯膽鹼酯酶比活性較東方蜜蜂 (*Apis cerana*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、番茄夜蛾 (*Helicoverpa armigera*) 及家蠶 (*Bombyx mori*) 都高 (Shang *et al.*, 2007)。由本研究已知不同日齡的家蠅乙醯膽鹼酯酶比活性不同，而以產卵前一日成蟲之乙醯膽鹼酯酶比活性最高，故比較不同蠅類之乙醯膽鹼酯酶比活性時，皆選取其產卵前一日之蟲齡進行比較。選取農試所感性品系之家蠅、東方果實蠅及瓜實蠅進行分析，結果可見家蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性最高，東方果實蠅之乙醯膽鹼酯酶則對陶斯松最敏感。雖然家蠅之乙醯膽鹼酯酶對陶斯松之敏感性略低於東方果實蠅，但因家蠅之乙醯膽鹼酯酶比活性最高，約為東方果實蠅的 2 倍，且最容易飼養、生活週期最短，所以在產製乙醯膽鹼酯酶以期應用於農藥檢驗時，三種蠅類間仍以家蠅最佳。惟未來如欲應用微生物轉殖、生產乙醯膽鹼酯酶時，可再進一步比較家蠅及東方果實蠅對更多農藥的感受性，以期選擇對多數農藥皆敏感的乙醯膽鹼酯酶基因轉殖來源。

酵素之萃取方式與純度會影響乙醯膽鹼酯酶的比活性及藥劑對其之抑制率，以 Chiu *et al.* (1991) 之乙醯膽鹼酯酶萃取方法，將家蠅頭部以正丁醇與

牛黃膽酸鈉溶出乙醯膽鹼酯酶，再以硫酸銨沈澱法與 Sephadex G100 管柱層析純化後，其比活性相較於雌蠅頭部之粗萃取液提高 6.0 倍；對陶斯松之敏感度，以 IC<sub>50</sub> 比值而言，則更加敏感 6.9 倍，對氧化態陶斯松則敏感 8 倍。顯示酵素的進一步純化有助於其在酵素比活性及對藥劑的敏感性表現。相較於電鰻而言，雖然電鰻之乙醯膽鹼酯酶商品比活性遠高於家蠅，顯示其乙醯膽鹼酯酶之純度較高，但因其本身對陶斯松、氧化態陶斯松、安丹之敏感性遠低於家蠅，故而不利其在蔬果農藥檢測之應用。

有機磷殺蟲劑之 Phosphorothioate subgroup 的 P=S group 可由 cytochrome P450 microsomal monooxygenases 或環境中的氯 (chlorine) 及溴 (bromide)，氧化成對乙醯膽鹼酯酶結合力較強的 P=O analog (Hatano and Scott, 1993; Wu and Laird, 2003; Duirk *et al.*, 2008; Yu, 2008)。本研究以氧化態陶斯松進行其對家蠅乙醯膽鹼酯酶的抑制力評估，其 IC<sub>50</sub> 由陶斯松 0.246 μg/mL 驟降至氧化態陶斯松 0.051 μg/mL，二者 IC<sub>50</sub> 比值为 4823.5 倍，顯示具 P=O group 的氧化態陶斯松對家蠅乙醯膽鹼酯酶的抑制力遠高於陶斯松。若將陶斯松先以溴水氧化處理過，則其對乙醯膽鹼酯酶之 IC<sub>50</sub> 略增為 0.095 μg/mL，與氧化態陶斯松的 IC<sub>50</sub> 相近。陶斯松與溴水處理過的陶斯松之 IC<sub>50</sub> 比值为 2589.5，可見溴水處理過的陶斯松對家蠅乙醯膽鹼酯酶的抑制力增加。顯示陶斯松先以溴水處理過，會將大部分的陶斯松轉換成氧化態陶斯松，即由原來的 P=S group 轉換成 P=O group，對乙醯膽鹼酯酶結合力增強。但以溴水處理過的陶斯松與氧化態陶斯松的

IC<sub>50</sub> 比值僅為 1.9 倍，顯示溴水處理過的陶斯松無法將陶斯松 100% 轉換成氧化態陶斯松，但也已可大幅提升家蠅乙醯膽鹼酯酶對農產品中陶斯松的靈敏度。Arora and Kumar (2015) 亦在溴化後的陶斯松、三落松 (triazophos) 與馬拉松 (malathion) 見到相似結果。故使用此家蠅乙醯膽鹼酯酶檢測農產品農藥殘毒時，於檢體中加入溴水，確實可提高此酵素對有機磷殺蟲劑 phosphorothioate subgroup 的敏感性，進而提升此酵素之檢測靈敏度。

乙醯膽鹼酯酶因與昆蟲對有機磷類及胺基甲酸鹽類殺蟲劑的抗藥性有關，關於其酵素活性及基因已有許多相關研究 (Devonshire, 1975; Devonshire and Moores, 1984; Shi *et al.*, 2001, 2002; Lee *et al.*, 2015)。其中著眼於應用乙醯膽鹼酯酶進行農產品農藥殘留檢測方面，Tan *et al.* (2011) 以酵母菌 (*Pichia pastoris*) 生產經定點突變 (site-directed mutagenesis) 改變 3 個胺基酸後的家蠅乙醯膽鹼酯酶，使其對陶斯松的敏感度大為提升，IC<sub>50</sub> 由原來的 292.911 mM 大幅降低為 0.158 mM。但微生物表現系統向來有微生物大量繁殖後易產生的基因變異問題，且酵母菌的蛋白質表現系統也有蛋白質表現量太少、成本太高的問題，未來若能克服這些問題，應用微生物量產乙醯膽鹼酯酶也可能是發展檢測所需酵素來源的方向。而農試所保有的感品系家蠅，對藥劑極為敏感，極適合用來檢測農產品農藥殘留，在應用面具獨特價值。

## 誌 謝

試驗期間承簡淑貝小姐與朱雅琳小姐協助養蟲與相關試驗執行，謹此致謝。本研究承行政院農業委員會計畫經費補助 103AS-6.2.3-CI-C2。

## 引用文獻

- Arora S, Kumar A. 2015. Binary combinations of organophosphorus pesticides exhibit differential toxicity under oxidised and un-oxidised conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 115: 93-100.
- Bajet CM, Tejada AW. 1995. Pesticide residues in the Philippines: an analytical perspective. *Trends Analyt Chem* 14: 430-434.
- Cheng EY, Huang YB, Chiang MY, Hou YH, Nien

CC. 2015. The study of pesticide residues control by the combination of AChE screening and chemical analysis: The Taipei Model. *J Taiwan Agric Res* 64: 53-63. (in Chinese with English Abstract)

- Chiu CS, Kao CH, Cheng EY. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. *J Agric Res China* 40: 188-203. (in Chinese with English Abstract)
- Devonshire AL. 1975. Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Biochem J* 149: 463-469.
- Devonshire AL, Moores GD. 1984. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol* 21: 336-340.
- Duirk SE, Tarr JC, Collette TW. 2008. Chlorpyrifos transformation by aqueous chlorine in the presence of bromide and natural organic matter. *J Agric Food Chem* 56: 1328-1335.
- Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. 2003. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem* 312: 224-227.
- Hatano R, Scott J. 1993. Anti-P450<sub>lpr</sub> antiserum inhibits the activation of chlorpyrifos to chlorpyrifos oxon in house fly microsomes. *Pestic Biochem Physiol* 45: 228-233.
- Hendrichs J, Vera MT, De Meyer M, Clarke AR. 2015. Resolving cryptic species complexes of major tephritid pests. *ZooKeys*: 5-39.
- Kim WT, Boo KS. 2004. Insecticide sensitivity of acetylcholinesterase from a Korean housefly (*Musca domestica*) strain to organophosphates. *J Asia Pac Entomol* 7: 187-193.
- Kim BM, El-Aty AMA, Hwang TE, Jin LT, Kim YS,



- Shim JH.** 2007. Development of an acetylcholinesterase-based detection kit for the determination of organophosphorus and carbamate pesticide residues in agricultural samples. *Bull Korean Chem Soc* 28: 929-935.
- Lee SH, Kim YH, Kwon DH, Cha DJ, Kim JH.** 2015. Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: Implications for pesticide resistance and tolerance. *Pestic Biochem Physiol* 120: 118-124.
- Ragland SS, Sohal RS.** 1973. Mating behavior, physical activity and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Exp Gerontol* 8: 135-145.
- Shang JY, Shao YM, Lang GJ, Yuan G, Tang ZH, Zhang CX.** 2007. Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells. *Insect Sci* 14: 443-449.
- Shi MA, Yuan JZ, Wu J, Zhuang PJ, Tang ZH.** 2001. Studies on the kinetics of acetylcholinesterase in the resistant and susceptible strains of housefly (*Musca domestica*). *Insect Sci* 8: 30-38.
- Shi MA, Yuan JZ, Wu J, Zhuang PJ, Wu XF, Tang ZH.** 2002. Kinetic analysis of acetylcholinesterase in a propoxur-resistant strain of housefly (*Musca domestica*) from Shanghai, China. *Pestic Biochem Physiol* 72: 72-82.
- Tan F, Wang L, Wang J, Wu X, Zhu H, Jiang L, Tao S, Zhao K, Yang Y, Tang X.** 2011. Enhanced pesticide sensitivity of novel housefly acetylcholinesterases: A new tool for the detection of residual pesticide contamination. *Bioprocess Biosyst Eng* 34: 305-314.
- Tsai YF, Su HC, Yu WT, Liu FM, Lin YR, Wang TS, Yang SF, Chiang YC, Fu CH, Shih YH, Huang WJ, Chen PY, Huang YF, Lee MS.** 2015. Monitoring of pesticide residues in agricultural products from markets in Taiwan. *Ann Rept Food Drug Res* 6: 86-108.
- Wu J, Laird DA.** 2003. Abiotic transformation of chlorpyrifos to chlorpyrifos oxon in chlorinated water. *Environ Toxicol Chem* 22: 261-264.
- Yu SJ.** 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. Boca Raton: CRC press. 276 pp.

# Activities of the Housefly Acetylcholinesterase and its Susceptibility to Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Oxon and Propoxur

Shu-Chen Chang, Tau-Mei Chou, and Ching-Hua Kao \*

Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taichung City, Taiwan

\* Corresponding email: chkao02@tari.gov.tw

Received: 19 September 2016    Accepted: 7 December 2016    Available online: 6 March 2017

## ABSTRACT

In Taiwan, acetylcholinesterases (AChE) purified from the heads of a susceptible housefly strain (*Musca domestica* Linnaeus, 1758) has been used since 1985 for fast screening of cumulative toxicities of organophosphorus and carbamate insecticides in agricultural products by the Taiwan Agricultural Research Institute (TARI). To evaluate the efficiency of AChE of currently available insect colonies, comparative studies using housefly, oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912)) and melon fly (*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett, 1899)) were conducted. The highest AChE specific activity was recorded in three-day-old adult houseflies, and the specific activity of the male fly was higher than that of the female, although the total AChE activity of both male and female housefly was similar. The results of the AChE specific activity of three flies showed that the male housefly retained the highest activity (0.925  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein), the AChE from the male oriental fruit fly showed the highest sensitivity against chlorpyrifos, with an  $\text{IC}_{50}$  of 1.334  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , second was the male housefly with 1.489  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Further purification of the housefly AChE, by column chromatography, increased the specific activity to 3.513  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, and the  $\text{IC}_{50}$  to chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and propoxur was decreased to 0.246  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.051  $\text{ng}/\text{mL}$  and 0.021  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Although the specific activity of commercial AChE from the electric eel, *Electrophorus electricus*, is higher than that of the housefly colony in TARI, the AChE sensitivity of the housefly to chlorpyrifos and propoxur was much greater than that from the electric eel. In general, TARI's susceptible housefly strain retains a high sensitivity to insecticides, and is by far the best insect material that is adequate for effective residue control.

**Key words:** *Musca domestica*, acetylcholinesterase, chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, propoxur