



## 【Research report】

### 小菜蛾幼蟲中腸鹼性磷酸每生化特性之研究【研究報告】

鄭旗志\*、顧淑慧\*\*、馬堪津\*\*

\*通訊作者E-mail :

Received:    Accepted:    Available online: 1985/09/01

## Abstract

### 摘要

本報告之主旨一則在探討小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 幼蟲中腸鹼性磷酸每生化反應所須最適宜的條件。二則在比較中腸及中段體節之鹼性磷酸每與酯每代謝馬拉松之活性。以硝基酚磷每為受質，幼蟲中腸磷酸每作用於酸鹼值 10.6 之二乙醇胺緩衝液中，溫度為攝氏四十一度時反應速率最快；在五十分鐘之內其反應隨時間之增加而增加。體節中之磷酸每亦顯示出逐增現象。鎂離子能促進此每之生化反應，EDTA能抑制此每之活性，巴拉松氧化物則否。以 酚磷酸每為受質，氨基乙酸一氫氧化鈉為緩衝液，染以Fast Blue BB，在波長 410nm 下亦可測得此每之反應結果，發現其反應最佳狀況與前一受質者相同。而新鮮蟲隻之鹼性磷酸每活性與冷藏蟲隻者相較並無明顯差別。以同位素碳一十四標識之馬拉松與此每作用之結果顯示：中腸的磷酸每代謝物約二倍於中段體節者。而路竹小菜蛾中腸每之活性高於宜蘭者。可證實磷酸每可行消化功能，亦可行解毒功能。

### Key words:

### 關鍵詞:

Full Text:  [PDF\(0.5 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

## 小菜蛾幼蟲中腸鹼性磷酸酶生化特性之研究

鄭旗志\* 顧淑慧\*\* 馬堪津\*\*

\*國立屏東農專植物保護科

\*\*中央研究院動物研究所

### 摘 要

本報告之主旨一則在探討小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 幼蟲中腸鹼性磷酸酶生化反應所須最適宜的條件。二則在比較中腸及中段體節之鹼性磷酸酶與酯酶代謝馬拉松之活性。以硝基酚磷酸酶為受質，幼蟲中腸磷酸酶作用於酸鹼值 10.6 之二乙醇胺緩衝液中，溫度為攝氏四十一度時反應速率最快；在五十分鐘之內其反應隨時間之增加而增加。體節中之磷酸酶亦顯示出逐增現象。鎂離子能促進此酶之生化反應，EDTA 能抑制此酶之活性，巴拉松氧化物則否。以萘酚磷酸酶為受質，氨基乙酸-氫氧化鈉為緩衝液，染以 Fast Blue BB，在波長 410nm 下亦可測得此酶之反應結果，發現其反應最佳狀況與前一受質者相同。而新鮮蟲隻之鹼性磷酸酶活性與冷藏蟲隻者相較並無明顯差別。以同位素碳-十四標識之馬拉松與此酶作用之結果顯示：中腸的磷酸酶代謝物約二倍於中段體節者。而路竹小菜蛾中腸酶的活性高於宜蘭者。可證實磷酸酶可行消化功能，亦可行解毒功能。

### 前 言

三十年來，小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 一直是本省十字花科蔬菜最重要的害蟲之一，而防治方法則以化學藥劑的施用為主，其中有機磷劑佔了相當大的部分 (植保手冊, 132~134頁)。六十年末期，陶氏 (1973) 已注意到田間小菜蛾對農藥產生抗性，其他人士 (Liu and Sun, 1978; Cheng, 1981; Maa and Guh, 1985; Wang and Feng, 1985) 先後在田間採集的小菜蛾族群中測出抗性品系之存在。各氏在小菜蛾抗性機制的研究上，也作了以活體實驗 (*In Vivo*) 為主之探討，然對於個別參與解毒之酶，其生化特性的研究多未見報導。而比較解毒酶之生化研究，却是瞭解昆蟲抗藥代謝機制必須預知的要件。鱗翅目昆蟲有機磷劑 (Organophosphorous compound) 水解酶之研究報告中頻頻提及者包括酯酶 (Esterase) 及磷酸酶 (Phosphatase) 兩類 (Krueger and O'Brien, 1959; Cook *et. al.*, 1968)。

本報告針對此，以小菜蛾末齡幼蟲中腸所含的鹼性磷酸酯源為對象，以硝基酚磷酸酶與萘酚磷酸酯兩種不同受質，測定該酶源生化反應所須的最適條件，內容包括：酸鹼度、溫度、反應時間、受質濃度及酶源濃度之測定。影響磷酸酶活性之其他因素，如儲存溫度、金屬離子及抑制劑等，也一併測定，以建立一份初步的資料，作為進一步研究小菜蛾幼蟲磷酸酶生化特性的參考。同時，並以中腸所含酶源之活性與中腸同段體節所含的酶源活性作比較。此外，我們也比較了抗藥性強弱之兩族群間其中腸酶活性的差異，藉以推測此酶在抗性機制上可能扮演的角色。

## 材 料 及 方 法

### 一、供試材料

(一) 昆蟲：本實驗所使用的小菜蛾係民國七十二年採自高雄縣路竹鄉及宜蘭縣壯五鄉兩地菜田中之族群。取第二日之末齡幼蟲為供試之蟲源。飼育的方法如 Maa and Chaung 1983 所述。

(二) 化學藥品：本實驗所應用之藥品皆為分析級，分別購自西德 Merck 及美國 Sigma 公司者。馬拉松 (O, O, -dimethyl-S-(1, 2-di(ethoxycarbonyl ethyl) phosphorodithioate)) 為百分之九十九純度者，係購自美國之 Chem. Service 公司。同位素碳一十四標識之馬拉松，其標識之碳居丁二酸酯處，放射能純度為 4.6 m Ci/mole，係購自英國之 Amersham 公司。

(三) 酶源：本實驗之酶源取自兩種生物。一為粗純化之魚腸鹼性磷酸酶，係由中央研究院植物所蕭介夫先生所提供者 (Shaw and Chu, 1985) 另一為取自小菜蛾幼蟲中腸及中段體節者。酶源除冷藏於攝氏負八十度之幼蟲外，一律使用新鮮之供試昆蟲。

(四) 酶液之製備：切下小菜蛾幼蟲第三對胸足至最後一對腹足之間的體節，即可從中抽出中腸。取中腸或中段體節，去其內含物，加入少許緩衝液以磨臼器研磨二十下，用吸管將研磨液全部吸出，放入離心管內，以 1000 重力之速率離心十分鐘。取出上層液，再依所須體積及比例加入緩衝液調配 (每 0.1 毫升之緩衝液含二分之一或一個中腸或中段體節)，作為酶液。取出部分之酶液，放入攝氏百度水中加熱十五分鐘，作為酶液之比較液。

### 二、實驗方法

所有的溶液皆須臨實驗前配製，不宜使用久存者。實驗過程皆在暗處行之，以免受質因光分解而干擾實驗結果。實驗初期。由酸鹼度 (pH 值) 之測定開始，再測受質溶液濃度，酶液之濃度，反應溫度及時間對產物生成之影響，依序進行。

#### (一) 受質溶液之配製及酸鹼度之測定

萘酚磷酸酯 (Naphthyl phosphate: NPP) 溶液之配製，是將 NPP 溶于 0.1 M, pH 10.4 之甘氨酸-氫氧化鈉 (Glycine-NaOH) 緩衝液中，再調配以 8.6 至 10.8 共十二種不同酸鹼度，製成  $1 \times 10^{-3}$  M 的 NPP 溶液備用。硝基酚磷酸酯 (Nitrophenyl phosphate: NTP) 溶液的配製則以蒸餾水加入二乙醇胺 (Diethanolamine) 配成 1.25 M, pH 10.8 之緩衝液，同時，以此液溶 NTP 為  $5 \times 10^{-4}$  M 之 NTP 溶液，溶液之酸鹼度亦為十二種。以定量之受質溶液與小菜蛾幼蟲之酶液混合後，置於水浴振盪器內作用。若以 NTP 為受質則在作用畢立即以光電比色儀測其 410 nm 波長的吸收值；若受質為 NPP，則在反應終了時加入 Fast Blue BB 染劑，染色三十分鐘後，以 300 nm 及 410 nm 波長測其吸收值。以比較兩種受質與酶液作用後之情形。

#### (二) 作用溶液濃度之測定及蛋白質之定量

受質溶液濃度之測定是以  $1 \times 10^{-5}$  至  $1 \times 10^{-3}$  M 之 NTP 溶液與酶液作用三十分鐘後，測其 410 nm 波長之吸收值，以決定反應過程中最適宜之受質濃度。酶液濃度之測定是以每一試管盛一份或二分之一等份之中腸酶液與兩受質作用，測其最適於畢爾定理測量所須酶液之濃度。蛋白質之定量是依 Read and Northcote (1981) 之法行之。

#### (三) 反應溫度及時間的測定

取兩受質溶液各加入酶液，置於 25°C 至 45°C 或 60°C 等不同溫度處理下，作用三十分鐘後測其吸收值之強弱。反應時間的測定則以五、十、二十、三十、四十、五十、六十及九十分鐘等八個不同作用時間來測定酶液分解受質的有效時間。而反應溶液之酸鹼度為 10.6。

#### (四) 酶活性之差異研究

宜蘭及路竹之小菜蛾幼蟲，取中腸 (Mid-gut) 或中段體節 (Mid-body Section) 為酶源，對 NPP 及 NTP 作活性差異之測定。並比較新鮮及冷藏於攝氏負八十度之幼蟲其酶液之活性。

### (四) 馬拉松之代謝實驗

以同位素碳一十四標識之馬拉松，約 60 n Ci (4.6m Ci/m mole of malathion) 之劑量，與 6.6 $\mu$ M 之無標識馬拉松混合，並將之以氮氣吸乾。用相當於十五個中腸或十五個中段體節之酶液與馬拉松混合於攝氏三十七度，作用四十五分鐘。作用完畢度，以過氯酸 (HClO<sub>4</sub>) 將蛋白凝固，離心沈澱兩次，取懸浮層。以 0.1N 氫氧化鈉調整其酸鹼值為 7.0，繼之以氯仿 (Chloroform) 萃取兩次後備用。萃取後之水溶液再以 0.1N 鹽酸調整其酸鹼值至 2.5，再以氯仿萃取兩次備用。在兩個酸鹼值氯仿萃液中各加入少量無水硫酸鈉 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Anhydrous) 作乾燥處理，處理後之溶液以氮氣濃縮至 0.1 毫升。再將此濃縮液點滴於薄層色層矽片 (Silica pel. 60 F<sub>254</sub> plate) 上，然後置入苯/乙醚/醋酸 (8/2/1) 之均勻混合伸展液中，伸展液展伸至離矽片上端約五公分處時，取出晾乾，噴以 DCQ (2,6-Dibromo-N-chloro-p-quinoneimine) 著色，繼將著色之矽片在攝氏一百度下加熱十分鐘，作呈色反應。再將矽片上呈色之馬拉松代謝物以小刀刮下，放入含 0.4% 之 OMNIFLOUR (98% 2,5-diphenyloxazole and 2% p-bis-(o-methylstyryl) bemene) 之甲苯中，以 $\beta$ 粒子閃爍液量儀計量之。萃取後之除留水溶液也取 0.2 毫升置入 Dioxane 之閃爍液中計量之 (Matthews, 1981)。

## 結 果 及 討 論

### 一、酸鹼度與酶活性之關係

圖一顯示，不論以何種受質與中腸酶液作用，其最高吸收值皆表現在酸鹼度 10.6 之狀況下。此現象反映出中腸水解 NPP 或 NTP 之酶為鹼性磷酸酯 (ED 3、1、3、1)。如作用液之酸鹼度低於 10.0 時，酶之活性則漸趨下降，至酸鹼度 9.0 後，已抵反應最低點。圖一亦顯示出中段體節中之磷酸酯，其活性反應與中腸者適成相反之趨勢；即作用之酸鹼度愈高，酶之作用能力愈低，這反映出存於中段體節中之磷酸酯或不屬於鹼性者。同時，由圖一可看出中腸磷酸酯之活性以 NPP 為受質時，最高點為酸鹼度 10.6 之 0.76 (O.D. 410 nm) 處，較之中段體節最高吸收值之 0.29 (O.D. 410 nm) 者約高出二倍半。這個結果明顯地表示出中腸內之鹼性磷酸酯具有相當高的活性，故能水解含磷酸酯鍵之化合物，如馬拉松者 (具 P-S 或 P-O 結構)。而中腸鹼性磷酸酯之活性理應高出中段體節者，類似結果亦可由馬拉松水解實驗得知 (見表二)。

### 二、最適反應物溶液濃度之測定

由實驗結果得知，受質 NTP 在低濃度果，酶之水解作用循受質濃度之升高而加快，當受質濃度高達  $1 \times 10^{-4}$ M 時，水解速率與受質濃度不再遵循畢爾氏定律 (Beer's Law)，而呈偏離現象 (圖四)。當受質濃度增至  $5 \times 10^{-4}$ M 時，反應呈飽和現象。由此可知，就中腸鹼性磷酸酯生化測定之實驗而言，NTP 之作用濃度以  $1 \times 10^{-4}$ M 為宜。實驗也證明，酶液之濃度以二分之一或一個中腸之酶源即可達到鑑定其生化反應最適宜之條件 (未發表資料)。

### 三、溫度之效應

圖二顯示，中腸酶液之活性在攝氏三十三度時出現了一個低讀數，爾後隨溫度之增加而讀數逐漸攀升，至攝氏四十度左右時停止，溫度昇至攝氏四十五度時，酶之活性呈逐降勢，以受質 NPP 為例，溫度昇至六十度時，幾乎測不出酶所表現的活性，由此結果可以看出，溫度在攝氏三十七至四十一度之範圍內，均為中腸鹼性磷酸酯反應之最佳條件。這些結果，較之其他已知的鹼性磷酸酯與溫度關係之特性雷同 (Letelier *et. al.*, 1985; Shaw and Chu, 1985)。

### 四、反應時間

圖三顯示，以 NPP 為受質與酶液作用，在作用六十分鐘內反應速率與反應時間呈正相關，六十分鐘後反應速率不再隨時間之增加而升高。顯示參與反應作用的酶，其活性隨時間逐呈弱勢。以

NTP 為受質之水解反應速率，在五十分鐘之內一如 NPP 者，隨反應時間之增長而增高。而酶分解 NTP 之速率約二倍於分解 NPP 者，其酶液之濃度僅須後者之二分之一，這兩點反映了 NTP 對中腸鹼性磷酸酶有較高的專屬性 (Substrate specificity)。而圖三亦顯示出中腸之酶分解 NTP 的活性六倍於中段體節者。

#### 五、低溫冷藏對酶活性之影響

圖三顯示，蟲隻雖經過攝氏負八十度的低溫冷藏，其體內磷酸酶之活性並不因此而減弱，此結果對於實驗室內蟲隻的供需有所裨益。當新鮮蟲隻不足時，可取用冷藏之蟲隻進行實驗。

#### 六、化合物對酶活性之影響

表一顯示，磷酸酶之活性因反應溶液中加入濃度為  $1 \times 10^{-10}$ M 之巴拉松氧化物 (Paraoxon) 而增加，此結果或許是因為中腸酶液中原含有的酯酶，因 paraoxon 的抑制而使中腸酶液中之磷酸酶能儘量與受質作用，產生更多的水解物所致。而濃度為  $1 \times 10^{-2}$ M 之 EDTA [(Ethylenedinitrilo) tetraacetic acid disodium] 則大大地抑制了酶液之活性。由結果亦可知鎂離子 ( $MgCl_2$ ) 在  $6 \times 10^{-3}$ M 之濃度時，對酶液活性之增高並沒有起多大的作用，反而在與鋅離子 ( $ZnCl_2$ )， $6 \times 10^{-3}$ M 一起存在時，有保持酶液活性不被鋅離子抑制之功能。鋅及鎂離子是磷酸酶活性不可缺的補助元素 (Prosthetic group)，然如鋅離子過高時，反而有抑制之效果 (Stadtman, 1961)。這項實驗數據反映出小菜蛾中腸酶液中，水解磷酸酶的活性，絕大部分是緣自鹼性磷酸酶者。

表一、化合物對小菜蛾中腸水解酶活性之影響

Table 1. The effect of various chemicals on enzymatic activity of mid-gut hydrolases of diamondback moth larvae.

Compound added	Paraoxon	EDTA	Zn <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup>	Control
Absorbance of OD <sub>410nm</sub>	1.41 ± 0.13	0.34 ± 0.01	1.19 ± 0.09	1.27 ± 0.10	1.26 ± 0.10	1.23 ± 0.07

- a. Four assays with mean ± S.D.  
b. Concentrations of additives, see content.

#### 七、馬拉松的水解及小菜蛾的抗性

鱗翅目的昆蟲水解馬拉松的途徑不外乎由酯酶及磷酸酶行之 (Menzie, 1969)。本實驗中，將馬拉松分別與已純化之酯酶 (由 Sigma Co. 購得) 或鹼性磷酸酶 (由中研院植物所蕭介夫先生供給) 作用，預先找出其主要代謝在薄層矽片上之  $R_f$  值。經實驗，確知未分解之馬拉松位置在第三個點，其相關  $R_f$  值為 0.78。酯酶之代謝物，位於第七個點， $R_f$  值為 0.52。磷酸酶之代謝物為第五點， $R_f$  值 0.70。由 Matthews (1981) 文中所提及之各代謝物也有類似的定位情形。第九點  $R_f$  值 0.25 者可能是馬拉松的二酸衍生物 (diacid of malathion derivative)。其他各點則不清楚，溶於水中之物目前亦未能定其性。表二中欄所列中腸及中段體節未經代謝之馬拉松各為 4472 nM 及 4105 nM。如將此二值依回收百分率來糾正，則糾正後馬拉松之量各應為 4970nM 及 5030nM。若此，兩種組織酶液中諸酶水解馬拉松之速率，就受質消失 (Substrate disappearance) 的方法來估計，理應是彼此活性相當。然而，事實上並非如此，我們發現，如我們以生成物 (Product formation) 的方法來估計，兩種組織酶液的活性彼此間就有了區別。第一，中腸酶液代謝馬拉松所得的產物佔總受質的百分之三十，而中段體節酶液代謝產物却佔了百分之十三，這是兩種組織酶液活性上的差異之一。第二，中段體節酶液與馬拉松作用後所生成的第七號代謝物，即馬拉松  $\beta$ -單酸，其含量高於中腸酶液者三倍有餘，這是兩種組織酶液活性上的差異之二。此外，除了第六號生成物外，所有

其他代謝物之量，體節者均高過中腸者。如果以酶特定的活性 (Specific Enzymatic Activity) 來估量兩種組織酶液活性的差異，因為除以蛋白含量的關係，其結果適與前面所述相反，即中腸酶液之活性強過中段體節者。然而，我們可看出中段體節酶液在酯酶之活性上仍然高出中腸酶液者 (19.40 nM 與 11.95nM 之比)。這表示了不論用何種方法來計量酯酶之活性，兩者之間仍有差別。簡言之，中段體節酶液消化馬拉松的能力，肯定地較中腸酶液者為高，且其中以酯酶的代謝活性為主。

表二、小菜蛾中腸及中段體節之酶液代謝馬拉松所得生成物在薄層分析片上之分佈及定量之簡表  
Table 2. Thin layer chromatography distribution of enzymatic and non-enzymatic metabolites of malathion by tissues of mid-gut and mid-body section.

TLC spot	Rf value	nM nM product/15 organs/45 min <sup>a</sup>		nM product/mg protein/min <sup>b</sup>	
		mid-gut	mid-body sect.	mid-gut	mid-body sect.
3	.78	4472.42±1.30	4104.85± 3.20		
4	.75	7.94±0.24	15.52± 0.24	0.63	0.66
5	.70	65.15±1.50	75.48± 1.40	5.36	3.23
6	.58	40.15±0.67	33.03± 1.28	3.30	1.41
7	.52	145.15±2.03	453.91± 7.51	11.95	19.40
8	.48	15.97±0.51	22.94± 0.21	1.31	0.98
9	.25	3.15±0.24	3.88± 0.04	0.26	0.17
10	.07	9.00±0.51	12.91± 0.62	0.74	0.55
H <sub>2</sub> O		192.18±6.20	249.70±20.18	15.28	10.67

a. Duplicates with  $m \pm S.D.$ , protein content; 0.27 mg per 15 mid-gut and 0.52 mg per 15 mid-body sections.

b. Average of two repeats.

#### 八、路竹及宜蘭小菜蛾磷酸酶活性之比較

三次實驗結果顯示，路竹小菜蛾其酶之活性高於宜蘭者；前者為  $3.7 \times 10^{-5} M$ ，後者為  $2.6 \times 10^{-5} M$ ，為 1.4 與 1.0 之比。

在此以前，我們已經知道此兩地區小菜蛾之酯酶活性也是前者強於後者（尚未發表資料）。目前我們尚無法確定是否這兩種酶的活性直接與這兩地區小菜蛾的抗藥性有所關連。然而，吾人可以由這些結果看出，酶的活性不祇關係到昆蟲正常生理之運作，而且也影響到昆蟲解毒能力之強弱。

#### 謝 辭

本文係中華民國國家科學委員會第 74—0201—Boola—31 計畫補助研究之一部分。試驗期間，承蕭介夫博士提供由魚腸純化之鹼性磷酸酶及一些實驗所必須的試劑。一併在此誌謝。

## 參考文獻

- 臺灣省政府農林廳1970植物保護手冊。經濟部植物保護技術審議委員會審定。南投，臺灣，自由中國。共291頁。
- Cheng, E. Y. 1981. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. II. A general survey (1980-81). J. Agric. Res. China 30:285-293.
- Cook, B. J., D. R. Nelson and P. Hipps, 1969. Esterases and *Periplaneta americana*. J. Insect Physiol. 15: 581-589.
- Krueger, H. R. and R. D. O'Brien. 1959. Relationship between metabolism and differential toxicity of malathion in insects and mite. J. Econ. Entomol. 52 (6): 1063-1067.
- Letelier, M. E., Repetto, Y., J. Aldunate and A. Morello, 1985. Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. 81B (1): 47-51.
- Liu, M. Y., Y. J. Tzeng and C. N. Sun, 1982. Insecticide resistance in the diamondback moth. J. Econ. Entomol. 75: 153-155.
- Maa, C. J. W. and M. L. Chung 1983. Esterases of diamondback moth I. (*Plutella xylostella* L.) I. Enzymatic properties of larval esterases. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, Taiwan, ROC. 22 (2): 123-131.
- Maa, C. J. W. and S. H. Guh 1985 Malathion degradation in Larvae of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). Submitted to comp. Biochem. Physiol.
- Matthews, W. A. 1980. The metabolism of malathion *in vivo* by two strains of *Rhyzopertha dominica* (F.), the lesser grain borer. Pestic. Biochem. Physiol. 13: 303-312.
- Menzie, C. M. 1969. Metabolism of Pesticides. Specific Scientific report of Wildlife no. 127, pp. 230-235. USDIFW.
- Read, S. M. and D. H. Northcote. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. Analyst. Biochem. 116: 53-64.
- Shaw, J. F. and H. H. Chu. 1985. Alkaline phosphatases from of fishes of Taiwan. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, Taipei, Taiwan, ROC. 24 (2): 297-301.
- Stadtman, T. C. 1961. Alkaline phosphatases. in "The Enzymes". ed. by P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback. Acad. Press, NY. NY.
- Tao, C.C. 1973. A review of vegetable insect pests in Taiwan during seven years. (in Chinese). Sci. Agric. 21: 230-240.
- Wang, T. C. and H. T. Feng. 1985. Diamondback moth resistance and cross resistance to 4 commonly used insecticides in Taiwan. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica. Taipei, Taiwan, ROC. 25 (1): (in press).

## ENZYMATIC PROPERTIES OF MID-GUT ALKALINE PHOSPHOTASE (S) OF DIAMONDBACK MOTH LARVAE (*Plutella xylostella* L.)

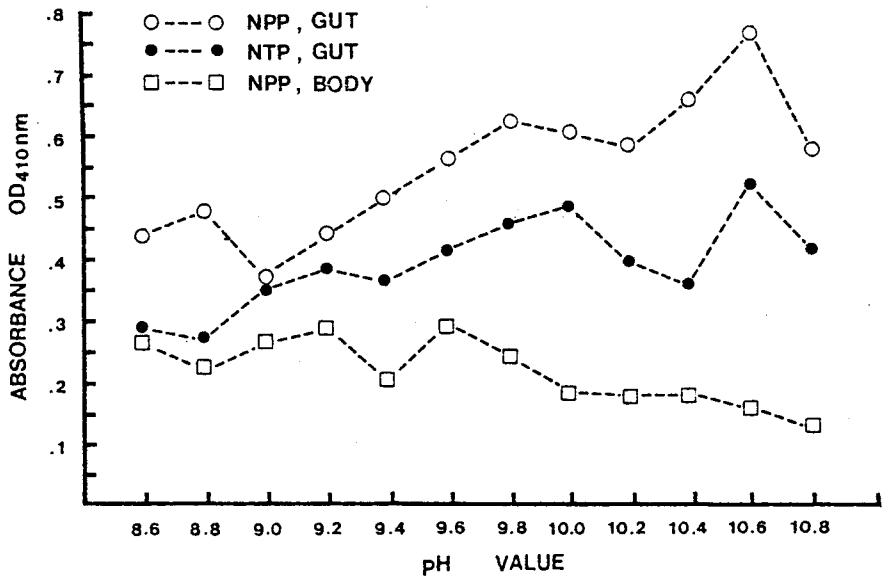
Jeng, \*C. J., \*\*S. H. Guh and \*\*W. C. J. Maa

*\*Department of Plant Protection  
National Pingtung Institute of Agriculture*

*\*\*Institute of Zoology, Academia Sinica,  
Taipei, Taiwan, Republic of China*

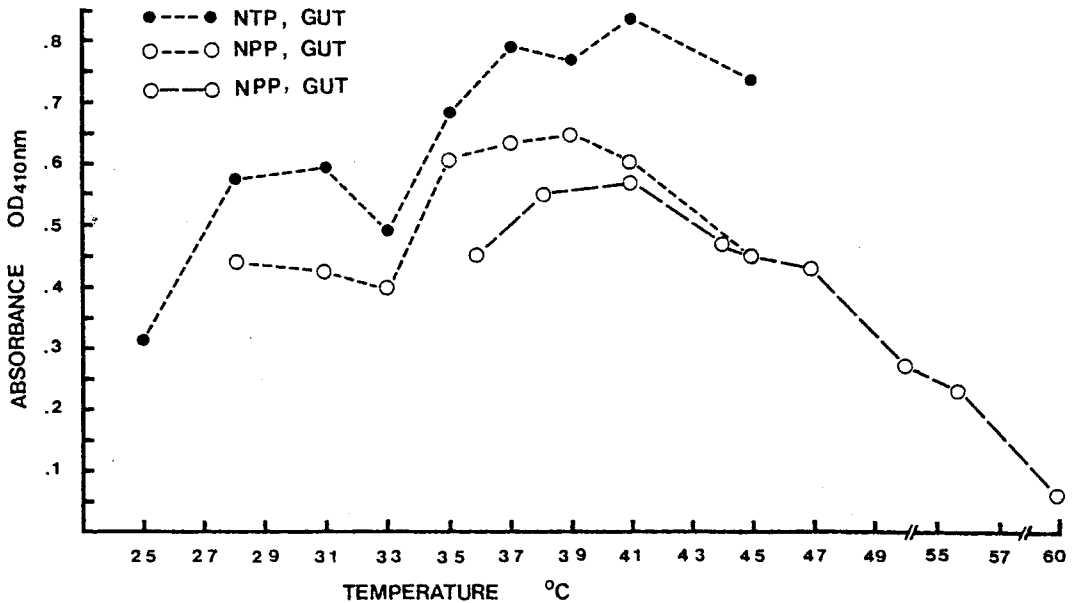
Hydrolytic activity of 4-nitrophenyl phosphate, *a*-naphthyl phosphate by mid-gut homogenate of diamondback moth larvae was investigated. The optimal conditions for mid-gut alkaline phosphatase(s) were determined. Reactions of the enzyme solution with the  $10^{-4}$ M nitrophenyl phosphate in 1.25M diethanolamine buffer of pH 10.6 under  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes, showed the highest great activity. For naphthyl phosphate, a concentration of  $10^{-3}$ M, in 0.05M glycine-NaOH buffer, gave the best result under same conditions mentioned above. The rate of the reaction was linear with incubation time within first 50 minutes, and declined afterwards. No obvious difference was observed between the crude homogenate preparations of  $80^{\circ}\text{C}$  stored larvae and the fresh ones. The enzymes were further characterized by addition of paraoxon, zinc ion, magnesium ion and EDTA. Comparatively, the enzymatic activities of the mid-gut preparation were higher than those of the mid-body section ones. Malathion degradation by the preparations of these two tissue homogenates showed that both esterase and alkaline phosphatase were higher in the mid-gut. The activity of mid-gut alkaline phosphatase from Lu-Chu DBM larvae was higher than that from I-Lan DBM larvae. It hinted that variation in enzymatic activity might be possibly interrelated with the pesticide degradation between the larvae of these two diamondback moth populations.





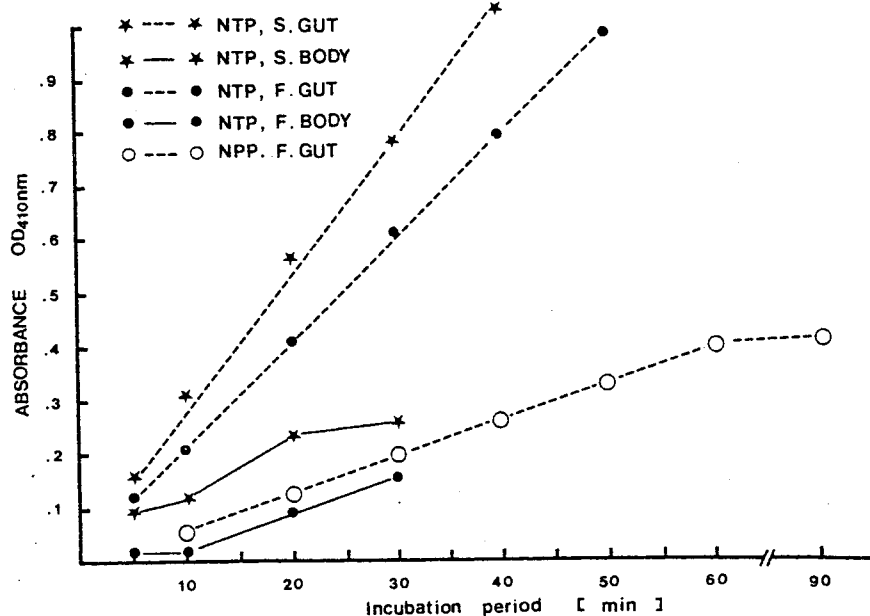
圖一、酸鹼值對中腸及中段體節酶源活性之影響；四次實驗的平均值，NTP 實驗使用二分之一個中腸為酶源，NPP 實驗則使用一個中腸為酶源。

Fig. 1. The effect of pH value on enzymatic activity of mid-gut and mid-body section alkaline phosphatase; average of four assays, half gut for NTP assay, one gut for NPP.



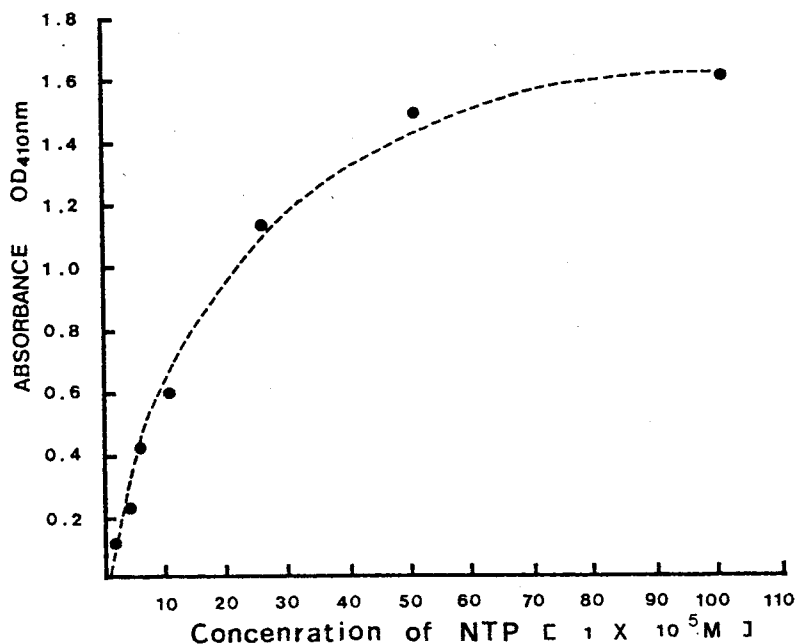
圖二、溫度對中腸酶源活性之影響；四次實驗的平均值，NTP 實驗使用二分之一個中腸為酶源，NPP 實驗則使用一個中腸為酶源。

Fig. 2. The effect of temperature on enzymatic activity of mid-gut alkaline phosphatase; average of four assays, half gut for NTP assay, one gut for NPP.



圖三、反應時間與酶源活性之關係；四次實驗之平均值，NTP 實驗使用二分之一個中腸為酶源，NPP 實驗則使用一個中腸為酶源。

Fig. 3. The Relationship between incubation period and the activity of mid-gut alkaline phosphotase.



圖四、受質溶液濃度與酶源活性之關係；四次實驗之平均值。

Fig. 4. Relationship between concentration of substrate (NTP) and enzymatic activity of alkaline phosphotase; average of four assays.