ABSTRACT

Name : HISHAM AHMED MOHAMED IBRAHEEM SOROUR

Title of thesis : Advanced Kinetic Studies on the Esterase isomers in the Haemolymph of Cotton Leafworm

Degree : Ph.D Thesis, Faculty of Science, Cairo university 2004/2005

Non-specific esterase isozymes were separated from laboratory strain of *Spodoptera littoralis* haemolymph by (PAGE). 4 bands (E_1, E_2, E_3 and E_4) were selected for purification. Chemical characterization, indicated that esterase isozyme E_1 was Butylcholinesterase, while E_2, E_3 and E_4 were carboxylesterases. Subunit molecular mass of 70, 63, 64 and 62 kDa for E_1, E_2, E_3 and E_4 esterase isozyme proteins were estimated. Extensive kinetic studies were conducted on each isozyme (optimum pH , pH inactivation , optimum temperature , incubation temperature , Michaelis constant (K_m) for α-NA substrate and V_{max}).

The results of substrate specificity indicated that esterase isozyme E_1 was the only esterase isozyme that showed activity against butyrylthiocholine, esterase isozyme E_4 was active against malathion as a substrate .we suggested that Esterase isozymes E_1 and E_2 are the main susceptible *S. littoralis* haemolymph esterases, E_1 is cholinesterase, E_2 is the wild type charboxylesterase, E_3 was the muted type of E_2 and has a high affinity to different OP insecticides , E_4 is the malathion CaE which muted from esterase isozyme E_2, and capable of hydrolyzing malathion. Accordingly, it is postulated that the recorded high resistance of cotton leafworm to OP insecticides could be attributed to the presence E_3 and E_4.

Key words: esterase, isozyme, purification, kinetic cotton, leafworm, resistance, electrophoresis, polyacrylamide gel, inhibitor.

Supervisors:

1- Pro. Dr. ***Fakiha M. El-Taib Heakal***
2- Prof. Dr. ***Mohamed Farag El-Said***

Prof. Dr. ***Refaat Hasan Helal***

Chairman of Chemistry Department
Faculty of Science – Cairo University

مستخلص

الاســـــم : هشام أحمد محمد ابراهيم سرور

عنـــوان الرسالة : دراسات حركية متقدمة لمشابهات إنزيمات الإستريزات فى هيموليمف دودة ورق القطن

الدرجة : دكتوراه الفلسفة فى العلوم (كيمياء فيزيائية)

ملخص البحث تـم فـصل انزيمات الاستيريز المحللة لمادة خلات الألفا نفثايل من هيموليمف دودة ورق القطـن المـصرية (*Spodoptera littoralis*) باسـتخدام تقنـية الهجرة الكهربائية على جيلاتين الاكريلاميد . وقد أظهر الفصل الكهربائى وجود أربعة مشابهات رئيسية لإنزيمات "E_1" و"E_2" "E_3" و "E_4". تـم تنقـية هذه المشابهات الأنزيمية الأربعة ، وقدرت الكتلة الجـزيئية للمشابات الأربعة . وتم إجراء تجارب حركية على هذه المشابهات الاستيريزية الأربعـة (الاس الهيروجينـى الأمـثل ، وتأثير تحضين المشابهات فى نطاق مختلف من الاس الهيدروجينى على نشاط المشابهات ، واقصى درجة حرارة عندها يصل عندها نشاط المـشابهات ، وكذلك فترة التحضين المثلى لإتمام التفاعل الإنزيمي لكل متشابه ، وحساب ثابـت "ميخائـيل" (K_m) الخاص لمادة ألفا خلات النفثايل وكذلك سرعة التفاعل القصوى (V_{max}) . وقد أظهرت تجارب تخصص الإنزيم أن المشابه الاستيريزى (E_1) هو المشابه الوحيد الذى أظهر نشاطا يمكن قياسه فى تحليل مادة البيوتريل ثيوكولين. وفى نفس الوقت كان المشابه الإنزيمي (E_4) هو الوحيد الذى اظهر نشاطا فى تحليل مادة الملاثيون.

ويمكـن القول بأن المشابهين (E_1) و (E_2) هما المشابهين الرئيسيين فى هيموليمف يرقات دودة ورق القطـن الحساسة ، وأن المشابه (E_1) الأول هو استريز كولينى غير متخصص بينما المشابه(E_2) هو المشابه الاستيريزى الكاربوكسيلى الاساسى لليرقة، أما المشابه (E_3) فهـو نـوع طافـر مـن المشابه (E_2) و يمتلك قابلية عالية للارتباط بالعديد من المبيدات الفـسفورية. و المـشابه (E_4) هو أيضا نوع طافر من المشابه (E_2) و يمتلك القدرة على تحلـيل مبيد المالاثيون ، ونؤكد أن مقاومة يرقات دودة ورق القطن المصرية للكثير من المبـيدات الفـسفورية يمكن إرجاعها إلى هذين النوعين الطافرين من المشابه الاستيريزى الكاربوكسيلى (E_2).

الكلمات الدالة : (١) أنزيم (٢) أستريز (٣) دراسات حركية (٣) تنقية (٥) دودة ورق القطن (٦) فصل كهربى

المشرفون :

(١) أ. د / فكيهة محمد الطيب هيكل التوقيع

(٢) أ. د / محمد فرج السيد التوقيع

يعتمـــــد ،،،،

أ. د / رفعت حسن هلال

رئيس مجلس قسم الكيمياء

كلية العلوم –جامعة القاهرة

CONTENTS

PAGE

I. INTRODUCTION 1

II. REVIEW OF LITERATURE 3

1. Identification and classification of non-specific esterase isozymes 4
2. Purification and kinetic analysis of insect's non-specific esterase isozymes :..... 13
3. Properties of Spodoptera littoralis esterases 23

III. MATERIALS AND METHODS 30

A. Materials:

A.1. Materials and sources..... 30
A.2. Buffers and solutions 32
A.3. Solutions and reagents:..... 36
A.4. Preparations..... 38

B. Methods 40

B.1. Strain of cotton leafworm 40
B.2. Preparation of haemolymph..... 40
B.3. Isolation of esterase isozymes 40
B.4. Determination of total Protein..... 41
Preparation of standard curve of protein 42
B.5. Determination of non-specific esterases activities: 42
Preparation of standard curves of α-naphthol 44
B.6. Purification of esterases 45
B.7. SDS-PAGE analysis 47
B.8. Characterization of esterase isozymes..... 48
B.9. Determination of Molecular Mass..... 49
B.10. Temperature optima 49
B.11. Thermal stability 49

CONTENTS

PAGE

B.12. pH optima and stability 50
B.13. Incubation period. 50
B.14. Substrate concentration. 51
B.15. Substrate specificity. 51
B.16. Inhibition analysis. 54
B.17. Data Analysis. 54

IV. RESULTS AND DISCUSSION 56

1. Separation of esterase isozymes. 56
2. Purification of esterase isozymes 59
3. Characterization of esterase isozymes 61
4. Determination of esterase isozymes molecular mass 64

5.Esterase isozymes kinetics 67
5.1. pH optima and stability. 67
5.2. Optimum temperature 69
5.3. Thermal stability 70
5.4. Incubation period 73
5.5. Substrate concentration 75
5.6. Substrate specificity 79
5.7. Inhibition profiles. 85
6. Relation between esterase isozymes kinetics and insecticide resistance in S. littoralis 91
Conclusions 95
Future prospects 96
V. SUMMARY 97
VI. REFERENCES 100
VII. ARABIC SUMMARY . . . .

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviation	Complete name
AChE	Acetylcholinesterase
APS	Ammonium persulphate
BSA	Bovine serum albumin
BuChE	Butylcholinesterase or pseudo ChE
BW284C51	1,5-bis (4-allyl-dimethylammonium phenyl)-pentan-3-one dibromide
CaE	Carboxylesterase
CNS	Central Nervous System
ρCMB	ρ-Chloromercuribenzoate
ChE	Cholinesterase
DEF	Tributylphosphotrithioate
D.I. water	Deionized water
DTNB	5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
I_{50}	Molar concentration of inhibitor that cause 50% inhibition in enzyme activity
IEF	Isoelectric Focusing
IGR	Insect Growth Regulators
JH III	Juvenile Hormone III
KDa	Kilo Dalton
K_m	Michaelis-Menten constant
MCE	Malathion Carboxylesterase
M_r	Molecular ratio
α-NA	α-naphthylacetate

Abbreviation	Complete name
β-NA	β-naphthylacetate
NM	Nano mole
O.D.	Optical Density
OP	Organophosphorus compounds
Rm	Relative mobility
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction technique for mRNA detection
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pI	isoelectric point
Pmol	Picomole
SDS	Sodium dodecyl sulphate
S. littoralis	Cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.)
$T_{1/2}$	The incubation temperature that resulted in 50% loss in enzyme activity
Tris	(hydroxymethyl) aminomethane
Unit	(μmol of product/min) Micromole/minute
V_{max}	Maximal velocities
WHO	The World Health Organization
μM	Micro mole