

白纹伊蚊溴氰菊酯抗性和敏感品系羧酸酯酶性质比较^{*}

刘洪霞^{1**} 冷培恩¹ 徐仁权¹ 姬淑红² 刘 曜¹

(1. 上海市疾病预防控制中心 上海 200336; 2. 上海杨浦区疾病预防控制中心 上海 200090)

摘 要 本文对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 溴氰菊酯抗性品系和敏感品系羧酸酯酶的生物化学性质进行了比较。白纹伊蚊抗性品系和敏感品系羧酸酯酶随底物浓度(α -乙酸萘酯或 β -乙酸萘酯)的变化比活力变化趋势一致,但抗性品系对这2种底物的比活力均高于敏感品系,抗性品系羧酸酯酶的米氏常数和最大反应速度与敏感品系有显著差异。胆碱酯酶抑制剂测定结果表明,抗性品系羧酸酯酶对敌敌畏和磷酸三苯酯的敏感性高于敏感品系,对残杀威的敏感性低于敏感品系。2个品系羧酸酯酶对脱叶磷的敏感性差异不大。说明羧酸酯酶可能与白纹伊蚊对溴氰菊酯抗性有关。

关键词 白纹伊蚊, 羧酸酯酶, 溴氰菊酯, 抗药性

Comparison of the biochemical characteristics of deltamethrin resistant and susceptible populations of *Aedes albopictus*

LIU Hong-Xia^{1**} LENG Pei-En¹ XU Ren-Quan¹ JI Shu-Hong² LIU Yao²

(1. Shanghai Municipal Centre for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China;

2. Yangpu District Centre for Disease Control and Prevention of Shanghai, Shanghai 200090, China)

Abstract The biochemical characteristics of carboxylesterase (CarE) were investigated in deltamethrin resistant and susceptible populations of *Aedes albopictus*. The ability of CarE activity to hydrolyze α -naphthyl acetate (α -NA) or β -naphthyl acetate (β -NA), dependent on substrate concentration, was similar in both populations. This specific activity was, however, significantly higher in the resistant population than in the susceptible population. CarE from the resistant population was more sensitive to DDVP (dichlorvos) and TPP (triphenyl phosphate) than that of the susceptible population. However, there was no significant difference in sensitivity to DEF (S,S,S-tributyl phosphorotrithioate) between resistant and susceptible populations.

Key words *Aedes albopictus*, carboxylesterase, insecticide resistance, deltamethrin

白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 是我国登革热的主要传播媒介之一,主要孳生于小型容器积水中,一般不容易产生抗药性。但由于卫生杀虫剂的大量滥用以及园林、林业等药剂使用,直接或间接导致白纹伊蚊抗性的产生。经调查研究,全国大部分地区白纹伊蚊都对不同药剂产生了不同程度的抗药性(马林等, 2000; 曾林海等, 2005, 2010; 蔡松武等, 2006; 李志强和钟俊鸿, 2008)。

拟除虫菊酯类杀虫剂具有高效、广谱、低毒、

低残留等特点,它的出现为一些卫生害虫的控制做出了巨大贡献,在目前和今后相当时期内,仍将是卫生害虫控制的有利武器。但随着该类药物的连续、大量使用,害虫逐渐产生了抗药性。通过对上海地区白纹伊蚊溴氰菊酯抗性调查结果来看,大部分区、县的白纹伊蚊已经产生中低抗性(刘洪霞等, 2009),个别区县的最高抗性甚至达到50多倍,大大影响药剂的控制效果。

羧酸酯酶是昆虫体内一类重要的解毒酶系,

* 资助项目:上海市公共卫生优秀青年人才培养项目(08GWQ14)。

**E-mail: hxliu@sdc.sh.cn

收稿日期:2012-01-17,接受日期:2012-03-07

其活性增高是某些昆虫对药剂产生抗性的重要机理之一。目前国内有关这方面的系统研究尚未见到相关报道(吴家红等,2005)。作者通过室内筛选溴氰菊酯抗性白纹伊蚊品系,分析比较白纹伊蚊抗性品系羧酸酯酶的生化特征,为在生化水平初步了解抗性机制以及检测野外抗性白纹伊蚊品系奠定基础,对延缓白纹伊蚊抗性产生以及指导其防治具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 白纹伊蚊敏感品系,作者所在实验室常规饲养至今,未接触任何杀虫剂;白纹伊蚊抗溴氰菊酯品系,室内溴氰菊酯选育,抗性倍数达到 20 倍以上备用。

1.1.2 供试试剂和仪器 敌敌畏(dichlorvos, DDVP, 80%)、残杀威(97%)、溴氰菊酯(98.2% 原药),由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室提供。 α -乙酸萘酯(α -naphthyl acetate, α -NA)、 β -乙酸萘酯(β -naphthyl acetate, β -NA)购自 Sigma 公司;磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPP)购自国药集团化学试剂有限公司;脱叶磷(S, S, S-tributyl phosphorotriothioate, DEF)由中国农业大学昆虫毒理实验室提供,丙酮、乙醚为国产分析纯。

冷冻离心机, BioRad 公司;紫外-可见分光光度计, 上海光学仪器公司产品;电子天平(Sartorius 2004MP), Opton 公司产品;恒温水浴锅, 上海科技器材有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 白纹伊蚊抗性品系的选育 取 3 龄末 4 龄初的白纹伊蚊幼虫,根据上一代对溴氰菊酯的毒力测定结果,配制杀死种群 50%~70% 的药剂剂量。采用幼虫浸渍法,处理 24 h 后,将存活的幼虫转移至干净的搪瓷盆中正常饲养,繁殖下一代。逐代筛选,隔代进行一次毒力测定。

1.2.2 生物测定 采用幼虫浸渍法。将溴氰菊酯用丙酮等比例稀释至 5~7 个浓度,取 1 mL 药液加入含有 199 mL 脱氯自来水的搪瓷碗中。每处理 30 头幼虫,以丙酮处理作对照。试验重复 3 次。24 h 后统计幼虫死亡数据,并用 POLO 软件分析。

1.2.3 羧酸酯酶酶液的制备 挑选均一大小的 4 龄初白纹伊蚊幼虫,4℃ 冰浴加入磷酸缓冲液(0.04 mol/L, pH7.0)匀浆,匀浆液在 4℃, 10 000 g 下离心 15 min,取上清并用滤纸抽滤后作为粗酶液。-80℃ 冻存备用。

1.2.4 羧酸酯酶活性的测定 羧酸酯酶比活力的测定方法参照 van Aspern(1962)的方法并加以修改(孙鲁娟等,2002;曾晓芃等,2004)。在每个试管中依次加入 1.8 mL 含有 3×10^{-4} mol/L 底物和毒扁豆碱的磷酸缓冲液(0.04 mol/L, pH7.0)和 0.5 mL 粗酶液。30℃ 反应 15 min 后,加入固蓝 B 缓冲液(1% 固蓝 B 盐:5% SDS, 2:5)终止反应并显色,静置 5~10 min 后在 600 nm(α -NA)或 550 nm(β -NA)下测定吸光值。对照管中在加入固蓝 B 缓冲液之后补加酶液。实验重复 3 次。

1.2.5 羧酸酯酶蛋白质含量的测定 蛋白含量测定方法参考 Bradford 考马斯亮蓝 G250 法。取含 10~120 μ g 酶蛋白溶液于试管中,用磷酸缓冲液稀释至 0.5 mL,然后加入 2.5 mL 考马斯亮蓝,充分混和,2 min 后于 595 nm 测定光吸收值,空白对照加相等量的磷酸缓冲液。

1.2.6 羧酸酯酶底物专一性测定 将底物稀释成 8 个系列浓度,测定羧酸酯酶在不同浓度下的比活力。实验重复 3 次。数据用 Enzfit 软件计算米氏常数(Michaelis constants, K_m)和最大反应速度(maximal velocities, V_{max})。

1.2.7 不同胆碱酯酶抑制剂对离体羧酸酯酶的抑制率 将不同浓度的抑制剂与白纹伊蚊 CarE 粗酶液在 30℃ 水浴中保温 10 min 后,分别加入底物终止抑制反应,测其比活力。每个药剂 10 个浓度,每个浓度重复 3 次。抑制剂分别为 DDVP、残杀威、DEF 和 TPP。

1.3 数据处理与分析

2 个底物的米氏常数和最大反应速度用 Enzifit software 分析,数据采用 GraphaPad Instat 3.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 白纹伊蚊抗性品系的选育

经过 17 代的室内选育,白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的 LC_{50} 从 0.00045 mg/L 增加至 0.0163 mg/L,抗性倍数达到 36.22 倍,表明连续 17 代的筛选

使白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的抗性变化比较明显(表1)。

从图1白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的抗性发展趋势可看出,白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的抗性发展可分为3个阶段,第1阶段为筛选的前4代,抗性发展比较缓慢,第2个阶段抗性发展比较迅速,LC₅₀值从 0.45×10^{-3} mg/L增加至 14.4×10^{-3} mg/L,之后,抗性增长较为缓慢。

表1 白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的抗性发展
Table 1 History of selections with deltamethrin of the resistant *Aedes albopictus*

代数 Generation	LC ₅₀ 及95%置信限 LC ₅₀ (95% FL) ($\times 10^{-3}$ mg/L)	Slope 值	抗性倍数 Ratio
SS	0.45 (0.50—0.41)	2.12	1.00
F ₁	0.51 (0.55—0.48)	2.70	1.13
F ₃	0.64 (0.70—0.59)	1.96	1.42
F ₅	1.90 (2.40—1.50)	0.91	4.22
F ₇	6.90 (8.60—5.50)	0.93	15.3
F ₉	10.7 (14.3—8.00)	0.95	23.8
F ₁₁	14.4 (20.0—10.4)	0.77	32.0
F ₁₃	14.9 (21.7—10.2)	0.67	33.1
F ₁₅	15.3 (19.7—11.9)	1.04	34.0
F ₁₇	16.3 (19.5—13.6)	1.14	36.2

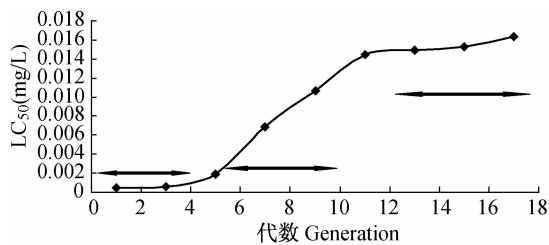


图1 白纹伊蚊幼虫对溴氰菊酯的抗性发展趋势
Fig.1 Development tendency of the resistance to deltamethrin in *Aedes albopictus*

2.2 白纹伊蚊不同品系羧酸酯酶的底物专一性

图2和图3分别为白纹伊蚊溴氰菊酯敏感和抗性品系幼虫羧酸酯酶对 α -NA和 β -NA 2种底物水解的米氏曲线,显示出2个品系蚊幼虫羧酸酯酶对2种底物的水解趋势类似。2种底物相比,白纹伊蚊羧酸酯酶对 β -NA的水解活性较高。相同浓度的底物浓度,抗性品系蚊虫羧酸酯酶比活

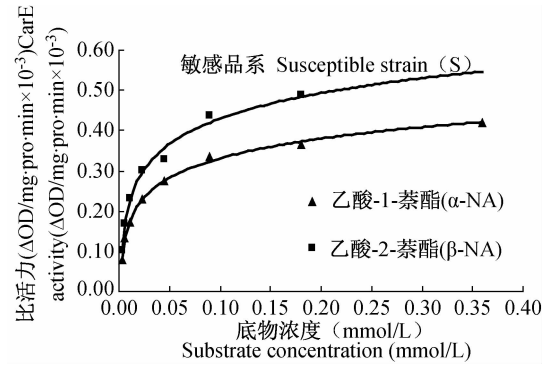


图2 白纹伊蚊敏感品系 CarE 对底物的水解趋势
Fig.2 The hydrolyzing tendency of CarE two from S strain to two substrates

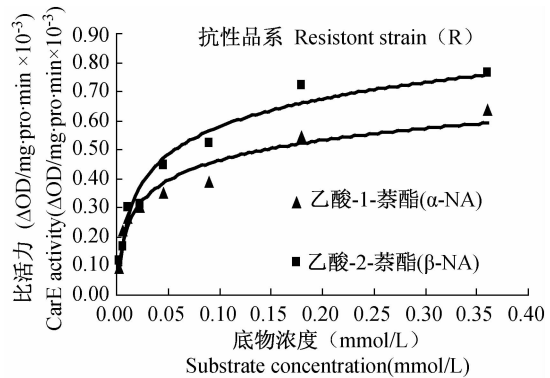


图3 白纹伊蚊抗性品系 CarE 对底物的水解趋势
Fig.3 The hydrolyzing tendency of CarE from R strain to two substrates

力要高于敏感品系,说明羧酸酯酶在溴氰菊酯抗性中起一定的解毒作用。

2.3 白纹伊蚊不同品系的酶动力学常数

白纹伊蚊抗性品系羧酸酯酶对底物 α -NA的米氏常数和最大反应速度与敏感品系相比无显著性差异(表2);但对 β -NA而言,抗性品系的米氏常数和最大反应速度与敏感品系之间有显著性差异,表明羧酸酯酶调节的解毒代谢抗性机制在白纹伊蚊对溴氰菊酯的抗性中起着重要作用。

2.4 不同胆碱酯酶抑制剂对离体羧酸酯酶的抑制

在相同抑制剂浓度下,抑制剂对酶的抑制率的差异反应了酶性质的差异,抑制率越大说明酶对抑制剂越敏感,反之抑制率越小酶对抑制剂越不敏感。从DEF对白纹伊蚊敏感和抗性品系羧酸酯酶活性抑制曲线来看(图4),敏感和抗性品系

表 2 白纹伊蚊不同品系羧酸酯酶动力学常数测定

Table 2 Kinetic parameters to two substrates in the R and S strain

底物种类 Substrate	米氏常数 K_m (mol/L $\times 10^{-6}$)		最大反应速度 V_{max} (OD/mg·pro·min $\times 10^{-4}$)	
	抗性品系 Resistant strain	敏感品系 Susceptible strain	抗性品系 Resistant strain	敏感品系 Susceptible strain
	抗性品系 Resistant strain	敏感品系 Susceptible strain	抗性品系 Resistant strain	敏感品系 Susceptible strain
α -乙酸萘酯(α -NA)	8.39 $\pm$ 1.52	8.49 $\pm$ 0.89	5.27 $\pm$ 1.16	3.79 $\pm$ 0.21
β -乙酸萘酯(β -NA)	14.7 $\pm$ 3.49a	8.43 $\pm$ 1.25b	7.18 $\pm$ 0.23a	5.27 $\pm$ 0.89b

注:同行数据后标有不同字母表示两者之间差异性显著($P < 0.05$)。

Data followed by different letters within the same raw indicate significant difference at 0.05 level.

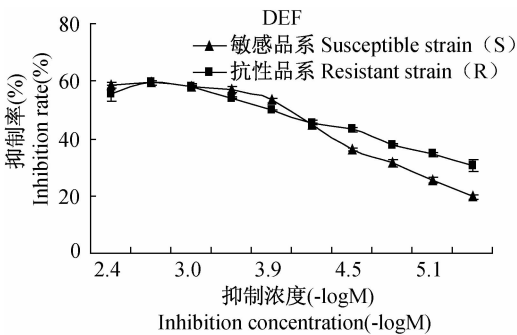


图 4 DEF 对白纹伊蚊抗性品系和敏感品系抑制率比较

Fig. 4 Comparison of the inhibition of esterase by DEF from the R and S strain

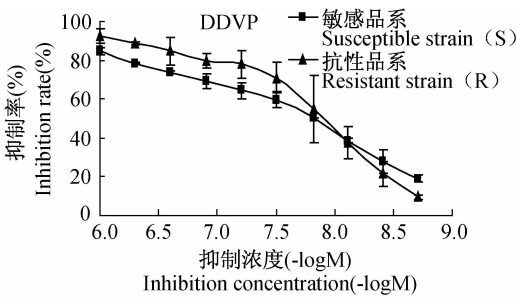


图 5 DDVP 对白纹伊蚊抗性品系和敏感品系抑制率比较

Fig. 5 Comparison of the inhibition of esterase by DDVP from the R and S strain

的羧酸酯酶对 DEF 的敏感性没有很大差别,不同浓度抑制率的趋势基本一致。

但 DDVP、残杀威和 TPP 对白纹伊蚊敏感和抗性品系羧酸酯酶的抑制存在差异(图 5 ~ 7)。相同浓度下,DDVP 和 TPP 对白纹伊蚊抗性品系羧酸酯酶的抑制率要高于敏感品系,说明白纹伊蚊抗溴氰菊酯品系的羧酸酯酶比敏感品系羧酸酯酶

对 DDVP 和 TPP 敏感。在残杀威的抑制曲线中,残杀威对白纹伊蚊敏感品系的抑制率要高于抗性品系,说明白纹伊蚊抗性品系对残杀威的敏感性低于敏感品系。

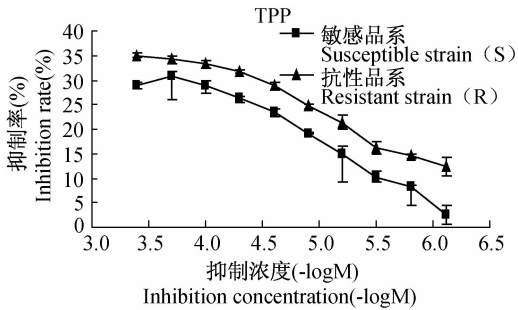


图 6 TPP 对白纹伊蚊抗性品系和敏感品系抑制率比较

Fig. 6 Comparison of the inhibition of esterase by TPP from the R and S strain

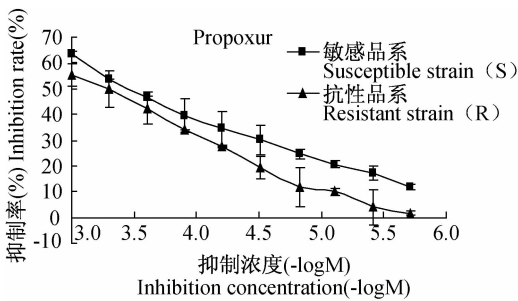


图 7 残杀威对白纹伊蚊抗性品系和敏感品系抑制率比较

Fig. 7 Comparison of the inhibition of esterase by propoxur from the R and S strain

3 讨论

结果表明,白纹伊蚊不同抗性品系均对 α -NA

具有较高的水解活性,说明与 β -NA 相比, α -NA 更易于被白纹伊蚊羧酸酯酶水解,且相同底物浓度下,抗性品系羧酸酯酶活性均高于敏感品系,表明羧酸酯酶与白纹伊蚊对溴氰菊酯的抗性有一定的关系。

羧酸酯酶是重要的解毒酶,在昆虫代谢抗性中具有重要作用(李飞等,2003)。在 DDVP、DEF、TPP 以及残杀威对白纹伊蚊羧酸酯酶的抑制试验中表明,白纹伊蚊敏感和抗性品系羧酸酯酶对 DEF 的敏感性无差异,但在一定范围内抗性品系羧酸酯酶比敏感品系对 DEF 更加敏感,说明其对 DEF 结合能力的增加。与之相反,抗性品系对 DDVP 和 TPP 的敏感性明显高于敏感品系,但在残杀威中,敏感品系的羧酸酯酶对残杀威却更加敏感,表明白纹伊蚊羧酸酯酶在有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药剂抗性中的作用机制不同。

明确白纹伊蚊抗性机制是对其进行有效防治的基础,羧酸酯酶作为昆虫体内重要的解毒酶系,主要以水解蛋白和结合蛋白 2 种方式对杀虫药剂进行解毒(曾晓芑等,2004),昆虫体内羧酸酯酶活性的高低会直接影响其对杀虫剂的敏感性。因此通过比较研究不同抗性品系白纹伊蚊的代谢解毒酶的生化特征,了解其生化抗性机制,并在此基础上探讨其分子抗性机制,为白纹伊蚊的有效防治提供指导。

参考文献 (References)

- 蔡松武,林立丰,段金花,阴伟雄,2006. 广东省白纹伊蚊抗药性现状与抗性治理对策. 中国媒介生物学及控制杂志,17(4):274—276.
- 曾林海,孙定炜,赵伟,李善干,杨霞,2010. 海南省埃及伊蚊和白纹伊蚊对常用杀虫剂的敏感性测定. 中国媒介生物学及控制杂志,21(2):148—149.
- 曾林海,赵伟,王志光,杨霞,李善干,2005. 海南省埃及伊蚊和白纹伊蚊对菊酯类杀虫剂的敏感性测定. 中国热带医学,5(6):1396—1397.
- 曾晓芑,于彩虹,高希武,2004. 德国小蠊抗性及其敏感品系羧酸酯酶生化特征比较研究. 中国媒介生物学及控制杂志,15(2):105—108.
- 李飞,韩召军,唐波,2003. 抗性品系棉蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的变异. 昆虫学报,46(5):578—583.
- 李志强,钟俊鸿,2008. 登革热媒介昆虫抗药性的研究进展. 昆虫知识,45(6):857—862.
- 刘洪霞,冷培恩,徐仁权,王士珍,2009. 上海地区蚊虫对常用杀虫剂的抗性及其防治对策. 中华卫生杀虫药械,15(2):112—115.
- 马林,杨学荣,曹若愚,窦丰满,叶庆临,2000. 成都市蚊虫对常用杀虫剂抗性的调查研究. 医学动物防制,16(9):450—453.
- 孙鲁娟,高希武,郑炳宗,2002. 棉蚜抗氧化乐果品系及敏感品系羧酸酯酶性质的比较. 昆虫学报,45(6):724—727.
- 吴家红,赵彤言,董言德,2005. 五铢白纹伊蚊对溴氰菊酯抗性生物测定和生化检测研究. 中国人兽共患病,21(10):851—854.