

文章编号: 1003-4692(2009)04-0288-02

【论著】

乙酰胆碱酯酶在不同品系和不同性别淡色库蚊的变化

李士根

【摘要】 目的 探讨乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)在不同品系和不同性别淡色库蚊的变化,为应用生物化学方法检测蚊虫抗药性提供依据。**方法** 以碘化硫代乙酰胆碱为底物,5,5'-二硫-双(2-硝基苯甲酸)为显色剂,测定单个蚊虫AChE,以残杀威为抑制剂测定AChE不敏感性。**结果** 抗DDVP(Rd)和抗残杀威(Rp)品系淡色库蚊AChE活性水平高于敏感(S)品系,抗氯氰菊酯(Rc)品系淡色库蚊AChE活性与S品系相近。Rd、Rp品系淡色库蚊不敏感AChE个体频率高于S品系,Rc品系淡色库蚊不敏感AChE个体频率与S品系相近。S、Rd、Rp、Rc 4个品系淡色库蚊3日龄雌雄成虫AChE活性均是雌性大于雄性。**结论** 测定AChE可用来判断蚊虫抗药性状况,不同性别蚊虫应分别制定判断标准。

【关键词】 淡色库蚊;乙酰胆碱酯酶;抗药性

中图分类号:R384.1

文献标识码:A

The changes of acetylcholinesterase in different strains and gender of *Culex pipiens pallens* Li Shi - gen. *Parasitology Department of Jining Medical College, Jining, Shandong 272013, China*

【Abstract】 Objective Study the changes of acetylcholinesterase (AChE) activity in different strains of adult male and female *Culex pipiens pallens*, and provide a basis for the insecticide-resistance detection of mosquitoes by biochemical method. **Methods** The AChE activity of single mosquito was determined, and acetylthiocholine iodide (ATch) as the substrate and 5, 5' - dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as the developer. The insensitivity of AChE to Propoxur was assayed. **Results** The AChE activity of anti-DDVP (Rd) and anti-Propoxur (Rp) strains of *Cx.pipiens pallens* was significantly higher than that of susceptible (S) strains, however, the AChE activity of anti-Cypermethrin (Rc) strains was similar to that of S strain. The individual frequency of insensitive AChE of Rd strain and Rp strain was significantly higher than that of S strain, but that of Rc strains was similar to S strain. For S, Rd, Rp and Rc strains, the AChE activity of 3-day-old female mosquito was higher than that of 3-day-old male mosquito. **Conclusion** The resistance of mosquitoes could be judged by the determination of AChE activity, but a criterion should be different for the male and female mosquitoes.

【Key words】 *Culex pipiens pallens*; Acetylcholinesterase; Resistance

蚊虫被认为是最重要的医学昆虫,它不仅传播疟疾、淋巴丝虫病、登革热等多种疾病,而且叮刺骚扰人类,有效的蚊虫防治不仅是除害灭病的需要,也是一个地区文明程度的标志之一。目前蚊虫化学防治仍为蚊虫综合治理中的主要手段,而蚊虫抗药性成为蚊虫防治中的突出问题^[1]。蚊虫体内乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)对杀虫剂敏感性降低是蚊虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的重要机制之一^[2,3]。本研究旨在了解AChE在不同品系和不同性别蚊虫的差异,为应用生物化学方法检测蚊虫抗药性及科学合理地进行蚊虫化学防治提供依据。

1 材料与与方法

1.1 供试蚊虫 敏感品系(S),室内常规饲养的淡色

库蚊(*Culex pipiens pallens*),未接触过任何杀虫剂;抗性品系(R),在室内分别用DDVP、残杀威、氯氰菊酯逐代汰选的抗DDVP(Rd)、抗残杀威(Rp)、抗氯氰菊酯(Rc)品系淡色库蚊。

1.2 试剂和仪器 93%DDVP、96%残杀威、95%氯氰菊酯,均为上海永康化工有限公司产品。碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATch)为Fluka产品,用时将75 mg ATch溶于100 ml 0.05 mol/L pH值7.4的PBS。5,5'-二硫-双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid),DTNB]为Fluka产品,用时将13 mg DTNB溶于100 ml 0.05 mol/L pH值7.4的PBS。其他化学试剂均为分析纯。TGL-16G台式高速离心机为上海医用分析仪器厂产品。96孔微量滴定板为Nunc产品。MB-Ⅲ型酶标检测仪为北京新技术应用研究所产品。

1.3 AChE测定 将单个冰冻僵死的3日龄雌性(未吸血)或雄性成蚊放入Eppendorf离心管中,加入100 μl 0.05 mol/L pH值7.4的PBS,碾碎混匀,再加入900 μl同相PBS混匀,5000×g离心10 min,取上清液作酶源。

基金项目:山东省卫生厅资助项目(2001CA2CEB1)

作者单位:济宁医学院寄生虫学教研室(山东 济宁 272013)

作者简介:李士根(1966-),男,山东人,博士,副教授,主要从事医学寄生虫学教学与研究。E-mail: shigenli@yahoo.com.cn

将 70 μl 酶液加至 96 孔微量滴定板孔中,每孔再加 70 μl ATCh 溶液, 30 °C 孵育 30 min 后,每孔再加 70 μl DTNB 溶液,反应 5 min,立刻将微量滴定板置于 MB-III 型酶标检测仪上,在 410 nm 波长下读取吸光度(A)值。用 PBS 作为空白对照。

测试 AChE 的不敏感性时,将残杀威(作为抑制剂)加至 ATCh 溶液中,使抑制剂浓度为 0.01 mmol/L,按上述同样方法进行测定。不加抑制剂时的测定结果作为全酶活性 A 值,加抑制剂时的测定结果作为残留酶活性 A 值,抑制剂对 AChE 的抑制率按下式计算。根据抑制率来判断 AChE 的不敏感性,即抑制率越低,AChE 的不敏感性越强,本研究将抑制率 ≤ 20% 的蚊虫判为不敏感 AChE 蚊虫。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{全酶活性}A\text{值} - \text{残留酶活性}A\text{值}}{\text{全酶活性}A\text{值}} \times 100$$

1.4 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 软件对所得数据进行成组设计的两样本均数比较的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种品系淡色库蚊 AChE 活性及不敏感性水平 选育的 Rd、Rp、Rc 3 种抗性品系淡色库蚊的抗性水平分别为 S 品系的 12.10、11.21、534.31 倍。如表 1 所示,从全酶活性 A 值看,Rd、Rp 品系与 S 品系差异有统计学意义(*t* 值分别为 3.957、5.847, $P < 0.01$),Rc 与 S 品系差异无统计学意义(*t* 值为 0.436, $P > 0.05$),即 Rd、Rp 品系淡色库蚊 AChE 活性明显高于 S 品系,Rc 品系淡色库蚊 AChE 活性与 S 品系无差别。从 AChE 平均抑制率看,Rd 和 Rp 品系低于 S 品系,Rc 品系与 S 品系相近;从 AChE 抑制率 ≤ 20% 的个体频率看,Rd 和 Rp 品系高于 S 品系,Rc 品系与 S 品系相近。即 Rd 和 Rp 品系淡色库蚊不敏感 AChE 个体频率高于 S 品系,Rc 品系淡色库蚊不敏感 AChE 个体频率与 S 品系相近。

2.2 4 种品系淡色库蚊雌雄成虫 AChE 活性比较 如表 2 所示,S、Rc 品系淡色库蚊 3 日龄雌雄成虫 AChE 活

性(A 值)差异均有统计学意义($P < 0.01$),Rd、Rp 品系淡色库蚊 3 日龄雌雄成虫 AChE 活性(A 值)差异也有统计学意义($P < 0.05$),4 种品系淡色库蚊均是雌性大于雄性。

表 2 4 种品系淡色库蚊 3 日龄雌雄成虫 AChE 活性比较

品系	雌蚊		雄蚊		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	<i>n</i>	A 值($\bar{x} \pm s$)	<i>n</i>	A 值($\bar{x} \pm s$)		
S	129	0.7068 ± 0.1178	48	0.6485 ± 0.1070	2.999	<0.01
Rd	95	0.8170 ± 0.2519	60	0.7382 ± 0.1603	2.380	<0.05
Rp	98	0.8567 ± 0.2321	48	0.7673 ± 0.1049	2.540	<0.05
Rc	84	0.7154 ± 0.1539	60	0.6401 ± 0.1027	3.520	<0.01

3 讨论

蚊虫 AChE 为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的共同靶标,大量使用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂,使蚊虫群体长期处于杀虫剂的选择压力下,AChE 基因发生突变,其所编码的蛋白质——AChE 对杀虫剂的敏感性降低,不易被杀虫剂抑制而产生抗药性^[2,3]。拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性机制主要是引起蚊虫击倒抗性(knock down resistance, *kdr*)和多功能氧化酶(mixed function oxidase, MFO)活性增强^[4]。本研究选择的 DDVP、残杀威和氯氰菊酯分别代表有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯 3 类常用化学杀虫剂。结果显示,Rd 和 Rp 品系淡色库蚊 AChE 活性水平明显高于 S 品系,并且 Rd、Rp 品系淡色库蚊不敏感 AChE 个体频率高于 S 品系,这正是其产生抗药性的重要原因,并构成了测定 AChE 判断蚊虫抗药性状况的基础。S、Rd、Rp、Rc 4 种品系淡色库蚊 3 日龄雌雄成虫 AChE 活性,均是雌性大于雄性,因此,在测定 AChE 判断蚊虫抗药性时,应将同一性别蚊虫相互比较,不同性别蚊虫应分别制定判断标准。

(本研究得到山东省医学科学院甄天民研究员和山东省寄生虫病防治研究所王新国主任医师、赵玉强副主任医师的大力协助,谨此志谢)

参考文献

[1] 陆宝麟. 我国 50 年来蚊虫防制研究概况[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(2): 153-154.
 [2] 吴明玮, 张玲敏. 蚊乙酰胆碱酯酶基因突变与抗药性[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2000, 27(5): 201-204.
 [3] Bourguet D, Roig A, Toutant JP, et al. Analysis of molecular forms and pharmacological Properties of acetylcholinesterase in several mosquito species[J]. Neurochem Int, 1997, 31(1): 65-72.
 [4] 李显春, 王荫长. 昆虫抗药性靶标不敏感机制的研究进展[J]. 昆虫学报, 1998, 41(4): 417-423.

[收稿日期: 2009-02-23]

表 1 4 种品系淡色库蚊 3 日龄雌成虫 AChE 测定

品系	<i>n</i>	全酶活性 A 值 ($\bar{x} \pm s$)	残留酶活性 A 值 ($\bar{x} \pm s$)	平均抑制率 (%)	抑制率 ≤ 20% 个体频率 (%)
S	129	0.7068 ± 0.1178	0.4552 ± 0.1712	35.60	4.65
Rd	95	0.8170 ± 0.2519	0.6286 ± 0.2052	23.06	49.47
Rp	98	0.8567 ± 0.2321	0.7108 ± 0.2453	17.03	73.47
Rc	84	0.7154 ± 0.1539	0.4691 ± 0.1573	34.43	4.76