

# 高效氯氰菊酯抗性家蝇过氧化物酶 性质变化研究

陈德国<sup>1</sup>, 霍新北<sup>2</sup>

(1 山东师范大学生命科学院, 济南 250014; 2 山东省疾病预防控制中心, 济南 250014)

**摘要:** **目的** 研究家蝇抗药性产生机制, 为选择快速准确的监测技术和科学用药提供理论依据。 **方法** 通过对实验室培育的抗高效氯氰菊酯品系、抗性衰减品系及敏感品系家蝇的谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-PX)的活性及SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 观察过氧化物酶对家蝇抗性产生的作用。 **结果** 抗性家蝇GSH-PX的活性明显增高, 抗性品系家蝇相对活性达到165.89%, 抗性衰减品系活性降低到70.13%。3个家蝇品系的电泳图谱中6组条带有较明显的差别。 **结论** 抗高效氯氰菊酯家蝇的过氧化物酶性质发生改变, 对家蝇的抗药性产生可能起比较重要的作用。

**关键词:** 家蝇; 谷胱甘肽-过氧化物酶; 酶活性; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

**中图分类号:** R384.2; S481\*.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2011)02-0128-03

## Study on the glutathione peroxidase activity in *Musca domestica* resistant to beta-cypermethrin

CHEN De-guo<sup>1</sup>, HUO Xin-bei<sup>2</sup>

1 Shandong Normal University, College of Life Sciences Jinan 250014, Shandong Province, China;

2 Shangdong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, Shandong Province, China

Corresponding author: HUO Xin-bei, Email: sdvbc@126.com

Supported by the Science and Technology Development Plan Project of the Health Department of Shandong Province (No. 2007HZ089)

**Abstract: Objective** To get an insight into the resistance mechanisms of *Musca domestica* to beta-cypermethrin so that a theoretical basis was provided for the selection of a rapid and accurate monitoring technique and for the scientific use of insecticides. **Methods** The glutathione peroxidase(GSH-PX) activities of three strains of *M. domestica* cultured in laboratory, the beta-cypermethrin resistant strains, the resistance decay strains and the sensitive strains was detected by SDS-PAGE analysis to evaluate the role of the peroxisome in the development of *M. domestica* resistance. **Results** It was found that GSH-PX activity of the resistant *M. domestica* increased significantly with a relative activity of 165.89% in contrast with the activity of the enzyme that decreased to 70.13% in the resistance decay strains. Significant differences were visualized in 6 bands of the electrophoresis pattern of the 3 strains. **Conclusion** The change in the peroxidase activity in *M. domestica* strains resistant to beta-cypermethrin may play an important role in the development of *M. domestica* resistance.

**Key words:** *Musca domestica*; Glutathione-peroxidase; Activity; SDS-PAGE

家蝇(*Musca domestica*)是与人类生产生活密切相关的卫生害虫,同时也是重要的模式昆虫。因此,对家蝇有很多研究。拟除虫菊酯类杀虫剂当前被广泛应用,因为其杀虫效果显著,在环境中也容易被降解。然而,通过药物的选择,致使家蝇对此类杀虫剂普遍产生较高的抗药性,家蝇的防治也越来越困难。因此,抗药性机制的研究受到普遍关注。抗药性研究中对于解毒酶系的研究是主要的一个方面,过氧化物酶(peroxidase)是重要的解毒酶系,如谷胱甘肽-过氧化物

酶(GSH-PX)是生物体内广泛存在的一种催化过氧化物分解的酶,能特异地催化还原性谷胱甘肽(GSH)对过氧化物的还原反应。GSH-PX作为生物体内重要的抗氧化酶,能有效地消除氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和脂质过氧化物,免除它们对生物细胞的毒害作用<sup>[1]</sup>。国内外一些研究显示<sup>[2-4]</sup>,在许多生物体内抗氧化酶类(如过氧化氢酶)与生物体的耐药性、抗逆性有关。本研究以对高效氯氰菊酯敏感品系、抗性品系、抗性衰减品系的家蝇作为对象,测定3个品系家蝇过氧化物酶活性,并观察过氧化物酶同工酶在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中的电泳情况,研究过氧化物酶作为解毒酶在高效氯氰菊酯抗性家蝇中所起的作用。

**基金项目:** 山东省卫生厅科技发展计划项目(2007HZ089)

**作者简介:** 陈德国(1981-),男,在读硕士,主要从事媒介生物学及控制研究工作。

**通讯作者:** 霍新北, Email: sdvbc@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 家蝇品系 敏感品系(S),山东省疾病预防控制中心病媒所长期饲养的家蝇(室内正常饲养10年以上,未接触过任何杀虫剂);抗性品系(R),在实验室对敏感品系通过喷雾处理选育20代以上;抗性衰减品系(DR),在实验室对抗性品系停止用药后培育10代以上。

1.1.2 主要试剂 97.3%高效氯氰菊酯原药,扬州农药厂生产;丙酮(≥99.5%),莱阳经济技术开发区精细化工厂生产;无水乙醚(≥99.5%),天津富宇精细化工有限公司生产;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、GSH-PX测试盒,南京建成生物工程研究所产品;考马斯亮蓝G2250、丙烯酰胺(acr)、甲叉双丙烯酰胺(bis),分析纯,Fluka产品;Tris碱、SDS,分析纯,Sigma产品;牛血清白蛋白,电泳纯,上海生工生物工程有限公司产品。

1.1.3 主要仪器 TU-1810型紫外线可见光分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产品;PICO17型高速台式离心机,基因有限公司产品;电子天平(HR-120),日本AND公司产品;微量移液器,日本NICHIRYO公司产品;电热恒温水浴锅,北京医疗设备厂产品;北京六一电泳槽。

### 1.2 方法

1.2.1 生物测定<sup>[5]</sup> 将羽化后3~5 d的家蝇成虫用乙醚麻醉,选取雌虫用点滴法测定。将高效氯氰菊酯配制成一定浓度的母液后,用丙酮稀释成系列浓度,然后用微量点滴器将药液点于家蝇的中胸背板上,在26℃,相对湿度为60%的条件下饲养24 h后检查家蝇死亡数,实验重复3次。通过SPSS 17.0软件对数据进行分析,得出3种品系的半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)及95%置信区间(95%CI)。

1.2.2 酶源制备<sup>[6]</sup> 随机选取羽化3~5 d的家蝇成虫8~10只,于-20℃低温冰箱中冷冻1 h,称其重量,按重量体积比1:9的比例加入生理盐水,在碎冰中用玻璃匀浆器匀浆,在3000 r/min(离心半径7.45 cm)、4℃离心10 min,取上清液作为酶源。

1.2.3 蛋白质含量测定 按Bradford法进行测定。

1.2.4 过氧化物酶活力测定 GSH-PX活力测定,采用GSH-PX试剂盒(货号:A005)进行测定,用紫外线可见光分光光度计测定412 nm处的吸光度(A)值,实验重复5次。

GSH-PX活性 =  $\frac{\text{非酶管} A \text{值} - \text{酶管} A \text{值}}{\text{标准管} A \text{值} - \text{空白管} A \text{值}} \times \text{标准管浓度}$   
(20 μmol/L) × 稀释倍数(5) / 反应时间(取样量 × 样本蛋白质含量)

GSH-PX相对活性 =  $\frac{\text{处理组 GSH-PX 活性}}{\text{敏感品系 GSH-PX 活性}} \times 100\%$

1.2.5 SDS-PAGE<sup>[7]</sup> 采用5%浓缩胶,12%分离胶,待胶填封好后,将50 μl酶液和50 μl的2×上样缓冲液混匀,根据家蝇各品系蛋白质的含量,每个样品上样孔加入的蛋白质含量相同。

## 2 结果

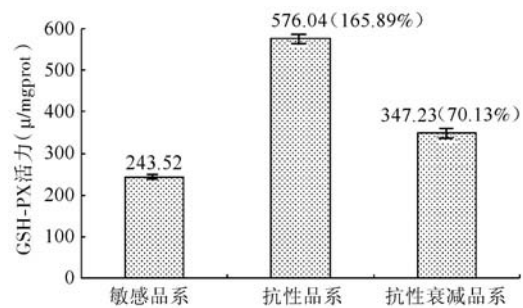
2.1 高效氯氰菊酯对家蝇的生物测定 由表1可以看出,通过对家蝇持续用药20代以上,抗性倍数达到105倍,这对家蝇的防治产生很大困难。抗性品系在停止用药培育10代以上,抗性倍数明显降低,从105倍降到7倍,说明家蝇品系的抗药性是药物选择作用的结果,如果对家蝇停止用药,抗性也将随之降低。

表1 高效氯氰菊酯对3种品系家蝇的毒力

Table 1 The toxicity of beta-cypermethrin to the three strains of *M. domestica*

家蝇品系	毒力方程 ( $y=a+bx$ )	LD <sub>50</sub> 及其95%CI (μg/只)	抗性 倍数
敏感	6.752+1.666x	0.0280(0.0229~0.1597)	1
抗性	-1.601+1.647x	2.9353(2.1870~4.6575)	105
抗性衰减	0.616+2.684x	0.1853(0.0920~0.2889)	7

2.2 家蝇过氧化物酶活力测定 图1显示,随着家蝇的抗性增长,抗性品系的GSH-PX活性增加明显,相对活性达到165.89%,说明通过药物作用对GSH-PX有明显的诱导作用。但随着对家蝇停止用药,其酶的活性明显降低,相对活性降低到70.13%,说明停止药物的刺激,GSH-PX活性会逐渐向敏感品系的水平靠近。可以看出GSH-PX活力的增强与家蝇抗药性的产生有关。

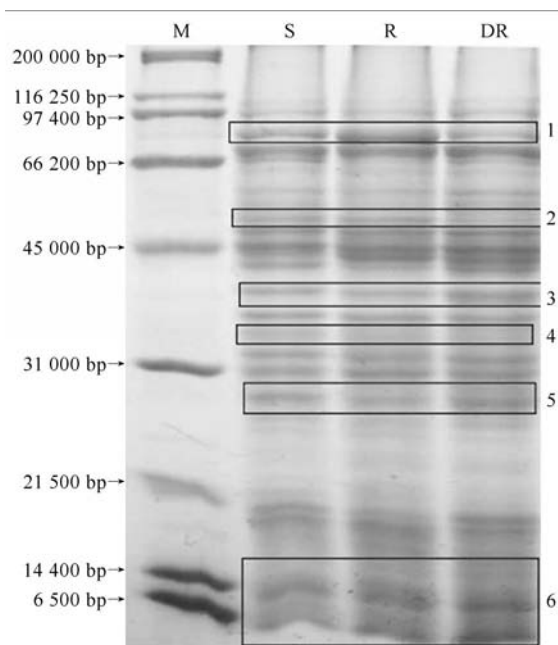


注:括号内数据为相对活性。

图1 GSH-PX活性

Fig. 1 The activity of Glutathione peroxidase

2.3 SDS-PAGE电泳结果 由图2可以看出,蛋白质Marker图谱显示,蛋白质的分离效果较好,在图2的6个方框内3个品系的蛋白质条带有比较明显的差异,但3个品系蛋白质条带在数量上差别不大,只有在方框4内,抗性品系及抗性衰减品系的条带有所缺失,在其他5个方框内条带亮度上有所差别,第1和第2方框内抗性品系蛋白质条带亮度高,在第3、第5和第6方



注:M. 蛋白质 Marker; S. 敏感品系; R. 抗性品系; DR. 抗性衰减品系。

图2 家蝇SDS-PAGE电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of GSH-PX in *M. domestica*

框内抗性衰减品系蛋白质条带亮度高。可以看出,过氧化物同工酶在3个品系中的组成发生了改变。

### 3 讨论

家蝇抗药性是一种杀虫剂在亚致死浓度的长期选择作用下,抗性倍数明显提高,通过药物的选择作用使抗性高的个体存活,最后使整个群体抗性提高,这也是现实生活中对家蝇防制时不可避免的问题,但是对家蝇停止用药,抗药性又会明显降低,家蝇的抗性是长期选择作用的结果。因此,要防止抗性的产生,在不危害环境的条件下,最好选择完全致死剂量为宜,再就是避免长期使用一种杀虫剂,以免家蝇对此种杀虫剂产生较高的抗性。

过氧化物酶是广泛存在于昆虫体内的一种重要的同工酶,能反映昆虫生长发育特点、体内代谢状况及对外界环境的适应,过氧化物酶是生物体内含有的一类氧化还原酶,一些研究表明,昆虫体内的保护酶活性与昆虫对外界刺激物相应强度的反应与对某些药物的耐药性有关<sup>[8,9]</sup>。本研究显示杀虫剂对GSH-PX活力有明显的诱导作用,抗性品系的GSH-PX活力明显增强,酶

活力的增强一般认为是解毒能力增强,而且随着抗性的降低,GSH-PX活力也随之降低,说明GSH-PX活力与抗药性有明显的相关关系,GSH-PX活力的增强促进了酶促反应,加强了家蝇解毒酶的活力,因此抗性也随之增强。通过对其同工酶谱的观察<sup>[10]</sup>,3个品系的条带亮度和带型有很大差别,说明过氧化物酶的性质发生了改变,抗性的产生与过氧化物酶的代谢有关,但由于过氧化物同工酶的种类较多,也有可能通过改变同工酶的组成来加强解毒能力。

家蝇体内过氧化物酶活力的增强固然增强了家蝇对杀虫剂的解毒能力,但对家蝇来说,也必将付出自身的代价,其生理上也会有较大的改变,将会导致生存适合度的下降。本实验证实家蝇过氧化物酶活力的增强与抗性增强有关,而且同工酶的组成也有一定程度的改变,因此认为过氧化物酶对高效氯氰菊酯抗药性的产生有重要作用,但是不同的同工酶对其抗药性产生的作用有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 霍新北,于国防,马义,等. 氯氰菊酯对德国小蠊谷胱甘肽过氧化物酶的诱导[J]. 中国公共卫生,2004,20(11):1318-1319.
- [2] 曾晓芃,于彩虹,高希武. 德国小蠊抗性及敏感品系羧酸酯酶生化特征比较研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2004,15(2):105-107,109.
- [3] 马义,霍新北,马民,等. 高效氯氰菊酯对德国小蠊乙酰胆碱酯酶抑制效应研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2004,15(4):266-268.
- [4] Moran PJ. Cross-effects of infection of cucumber with fungal and bacterial pathogens, and the role of peroxidase [J]. Bull Ecol Soc Amer,1997,78(4):287.
- [5] 武秀兰,霍新北. 实用医学昆虫学实验技术[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998:314-319.
- [6] 曹晓梅,孙晨熹. 溴氰菊酯抗性家蝇酯酶的生化分析[J]. 医学动物防制,2003,19(3):133-135.
- [7] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1997:112-123.
- [8] 陈尚文. 马尾松毛虫过氧化氢酶及过氧化物酶与耐药性的关系[J]. 昆虫学报,2001,44(1):9-14.
- [9] Han Q, Li GY, Li JY. Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs [J]. Arch Biochem Biophys, 2000,378(1):107-115.
- [10] 张庆华,李飞栋,赵瑞君,等. 家蝇幼虫、蛹、成虫抗菌肽的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析[J]. 热带医学杂志,2007,7(3):205-207.

收稿日期:2010-09-22