

# 北京市温带臭虫击倒抗性基因突变检测

刘念<sup>1</sup>, 周小洁<sup>2</sup>, 戚广浩<sup>3</sup>, 李梅<sup>1</sup>, 邱星辉<sup>1</sup>

1 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101; 2 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 3 北京市通州区疾病预防控制中心, 北京 101100

**摘要:** 目的 对温带臭虫电压门控钠离子通道(*vgsc*)基因进行测序分析, 检测抗药性相关的基因突变, 为该地区的臭虫治理提供依据。方法 利用 DNA 测序技术, 获得 *vgsc* 基因片段序列, 分析击倒抗性相关位点的基因型。结果 与参照品系相应的序列比对, 现场采集的 6 只温带臭虫的 *vgsc* 基因序列均存在有义突变, 导致编码的电压门控钠离子通道(VGSC)的氨基酸替换, 即 V419L 和 L925I 突变, 突变频率为 100%。结论 调查的样品均携带可导致击倒抗性的 VGSC 在 419 和 925 两个位点的突变, 表明该温带臭虫种群对拟除虫菊酯类杀虫剂具有较高水平抗性。

**关键词:** 温带臭虫; 电压门控钠离子通道; 基因突变; 击倒抗性; 拟除虫菊酯类杀虫剂

中图分类号: R384.3; Q343.1\*3 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)05-0524-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.05.010

## Detection of knockdown resistance mutations in a *Cimex lectularius* field population in Beijing, China

LIU Nian<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-jie<sup>2</sup>, QI Guang-hao<sup>3</sup>, LI Mei<sup>1</sup>, QIU Xing-hui<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Beijing Center for Disease Control and Prevention; 3 Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: QIU Xing-hui, Email: qiuxh@ioz.ac.cn

**Abstract: Objective** To analyze genetic mutations, predict the level of resistance to pyrethroid insecticides in the bedbug *Cimex lectularius* and provide a guide for bed bug control in this region. **Methods** Partial sequences of *vgsc* gene that encodes the target of pyrethroid insecticides (voltage gated sodium channel) were obtained by DNA sequencing, and the knockdown resistance-related mutations were examined. **Results** The six bed bugs collected on site were found to have genetic mutations at codons 419 and 925, leading to double amino acid substitutions (V419L and L925I) with a frequency of 100%. **Conclusion** All the investigated bed bugs carry *kdr* mutations at positions 419 and 925 of the voltage gated sodium channel, predicting that this bed bug population has a higher level of resistance to pyrethroid insecticides.

**Key words:** *Cimex lectularius*; Voltage-gated sodium channel; Genetic mutation; Knockdown resistance; Pyrethroid insecticides

臭虫属于半翅目臭虫科昆虫, 靠吸食血液生殖繁衍<sup>[1]</sup>。中国常见的臭虫有温带臭虫(*Cimex lectularius*)和热带臭虫(*C. hemipterus*) 2 种<sup>[2]</sup>。人被臭虫叮咬后会出现皮肤红肿、瘙痒等免疫反应症状, 从而引起焦虑和失眠等<sup>[3]</sup>。

电压门控钠离子通道(voltage gated sodium channel, VGSC)是拟除虫菊酯类和有机氯类杀虫剂的主要作用靶标<sup>[4]</sup>。击倒抗性(knockdown resistance, *kdr*)指因昆虫 VGSC 对药物的敏感度降低而引起的抗药性。击倒抗性现象最早在家蝇(*Musca domestica*)中发现, 其分子基础主要是 VGSC 的 1014 位点发生了氨基酸替换, 即由敏感型的亮氨酸(L)突变为抗性型的苯丙氨酸(F)。之后在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、尖音库蚊(*Culex pipiens*)、德国小蠊(*Blattella germanica*)和臭虫等多

种病媒昆虫中也发现 VGSC 的点突变与拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性有关<sup>[4-5]</sup>。就温带臭虫而言, 已发现 V419L、L925I 和 I936F 突变与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性有关<sup>[6-8]</sup>, 本研究检测北京市温带臭虫中是否存在该基因的抗性突变。

### 1 材料与方法

1.1 材料 于 2018 年 9 月采集北京市大兴区某公司宿舍的活体臭虫, 带回实验室置 -20 °C 冰箱保存。样品虫体前胸前缘凹陷较深, 两端向外延伸成薄片状, 前胸背板宽与长的比值在 2.85~2.93 之间, 为温带臭虫<sup>[9-10]</sup>。

1.2 电压门控钠离子通道(*vgsc*)基因片段扩增 参考 Rinkevich 等<sup>[11]</sup>的方法提取单只臭虫的基因组 DNA, 用 nano drop 测定样品的 DNA 浓度。以单只

作者简介: 刘念, 女, 在读硕士, 主要从事昆虫抗药性研究, Email: nianliu95@163.com

通信作者: 邱星辉, Email: qiuxh@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2019-08-07 07:00 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

臭虫基因组 DNA 为模板,分两段扩增出 *vgsc* 中包含已知抗性位点的 DNA 片段:第 1 段采用引物 BBpara-F 和 BBpara-R 扩增,其产物包含 419 位点的密码子;第 2 段采用引物 CHVG-SC-F 和 CHVG-SC-R (表 1),该扩增片段包含 925 位点以及 936 位点的密码子。PCR 反应体系组成:2 × Taq Master Mix (TIANGEN) 12.5 μl;正、反向引物各 6 μmol/L;DNA 模板 50~100 ng,无菌 H<sub>2</sub>O 加至 25 μl。PCR 反应条件:95 °C 2 min;94 °C 30 s;52 °C 或 58 °C 30 s;72 °C 50 s;34 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,反向引物测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.3 数据分析 人工核实测序结果,检查测序质量以及是否存在杂合位点。核实结果与美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中的核酸序列进行比对,验证是否为臭虫的 *vgsc* 序列。使用在线软件 ClustalW2 进行多序列比对,判别抗性相关位点的基因型。

表 1 北京市温带臭虫电压门控钠离子通道(*vgsc*)基因 PCR 引物的核苷酸序列及退火温度

Table 1 The nucleotide sequences of primers and annealing temperature for PCR of the voltage-gated sodium channel (*vgsc*) gene of *Cimex lectularius* in Beijing

| 引物名称      | 引物序列(5'~3')              | 退火温度(°C) | 文献  |
|-----------|--------------------------|----------|-----|
| CHVG-SC-F | GGAATTGAAGCTGCCATGAAGTTG | 52       | [8] |
| CHVG-SC-R | TGCCTATTCTGTCGAAAGCCTCAG |          | [8] |
| BBpara-F  | AACCTGGATACATGCCTTCAAGG  | 58       | [8] |
| BBpara-R  | TGATGGAGATTTGCCACTGATG   |          | [8] |

## 2 结果

2.1 *vgsc* 序列分析 实验分别扩增出长度约为 550 和 800 bp 的 PCR 产物。将第 1 段(550 bp)测定结果在删除两端不可靠序列后,得到 489 bp 的有效序列,该段序列(BJ-CHVSGC-1)经 BLAST N 比对,与温带臭虫基因组测序结果(JRLE01000129.1)的对应区域有 3 处不同,即 1 个碱基替换和 2 个碱基插入(图 1)。第 2 段(800 bp)获得的 751 bp 有效序列(BJ-CHVSGC-

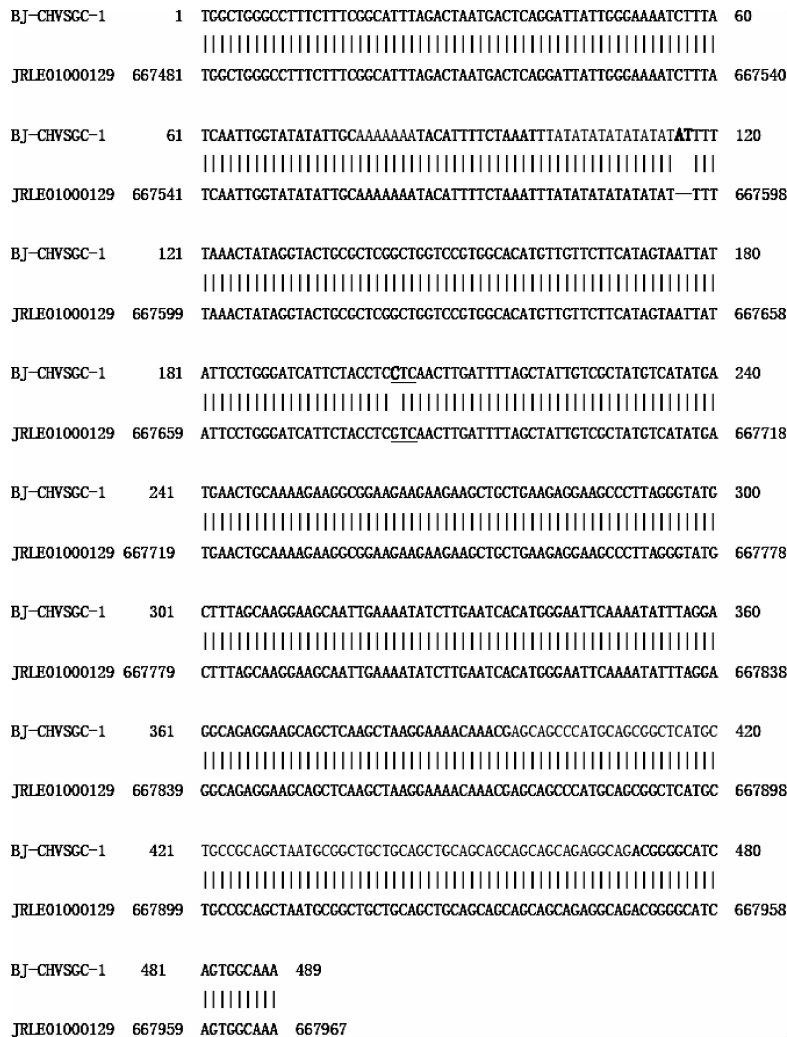


图 1 北京市温带臭虫电压门控钠离子通道(*vgsc*)基因序列 BJ-CHVSGC-1 与基因组数据库对应序列比对结果  
Figure 1 Alignment of the voltage gated sodium channel(*vgsc*)gene sequence BJ-CHVSGC-1 of *Cimex lectularius* in Beijing with the corresponding sequence from the genome database

1) 与 JRLE01000129.1 比对发现存在 1 个碱基差异 (图 2)。相对于参考序列,本研究测定的样品第 1 段序列的碱基插入是在内含子区,不影响蛋白编码,但其碱基替换(由 G 变为 C)为非同义替换,将导致编码的氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸,即 V419L (图 3A);第 2 段的碱基突变(C 变为 A)发生在外显子区,由此造成 VGSC 的 L925I 点突变(图 3B)。

2.2 抗性相关突变类型与频率 3 个抗性相关位点的分析显示,419 和 925 位点为抗性纯合基因型,其密码子分别为 CTC 和 ATT,编码亮氨酸和异亮氨酸,但 936 位点为敏感型 ATT,而不是抗性基因型 TTT (图 3)。6 个样品的检测结果显示,VGSC 419 和 925 位点的抗性突变频率为 100%,而 936 位点的抗性突变频率为 0(表 2)。

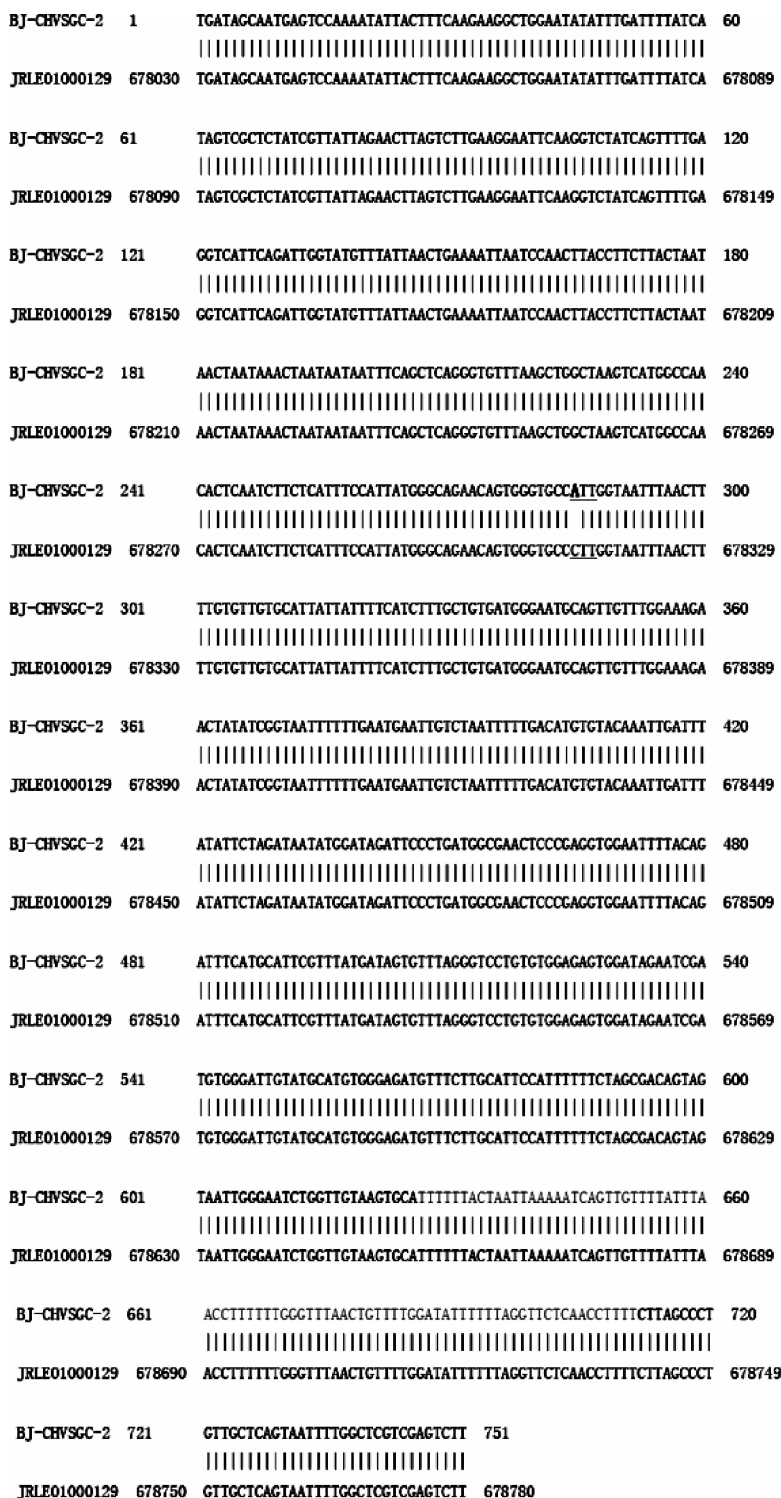
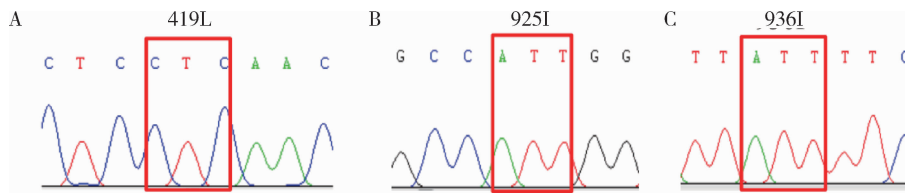


图 2 北京市温带臭虫电压门控钠离子通道(vgsc)基因序列 BJ-CHVSGC-2 与基因组数据库对应序列比对结果  
 Figure 2 Alignment of the voltage gated sodium channel(vgsc)gene sequence BJ-CHVSGC-2 of Cimex lectularius in Beijing with the corresponding sequence from the genome database



注:抗性相关位点密码子加框指示; A. 419L 纯合(抗性型); B. 925I 纯合(抗性型); C. 936I 纯合(野生型)

图3 北京市温带臭虫电压门控钠离子通道基因测序结果

Figure 3 Example chromatograms showing the codons of resistance-related loci in the voltage-gated sodium channel gene of *Cimex lectularius* in Beijing

表2 北京市温带臭虫抗性相关位点密码子类型及抗性突变频率

Table 2 Codon types and mutation frequencies of resistance-related loci in *Cimex lectularius* in Beijing

| 抗性相关<br>氨基酸位点 | 样本编号   |        |        |        |        |        | 抗性突变频率(%) |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
|               | DX-1   | DX-2   | DX-3   | DX-4   | DX-5   | DX-6   |           |
| 419           | CTC(L) | CTC(L) | CTC(L) | CTC(L) | CTC(L) | CTC(L) | 100       |
| 925           | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | 100       |
| 936           | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | ATT(I) | 0         |

注:采用密码子(氨基酸)格式表示; L. 为亮氨酸; I. 为异亮氨酸; A、C、T. 为碱基代号

### 3 讨论

臭虫是 20 世纪常见的吸血昆虫,化学杀虫剂的使用对臭虫的控制发挥了重要作用<sup>[12]</sup>。但近年在中国、美国和澳大利亚等国家发现臭虫数量明显上升,工厂宿舍、出租房、火车上较多<sup>[13]</sup>。臭虫再次猖獗的原因包括频繁的国际旅行、有效防治方法的缺乏以及臭虫对杀虫剂的抗药性等。已在多个国家的臭虫种群中检测到拟除虫菊酯类杀虫剂有较高的抗药性<sup>[6,14]</sup>。

温带臭虫 VGSC 点突变 V419L 和 L925I 可以造成臭虫对杀虫剂的敏感度降低<sup>[15]</sup>。研究表明,温带臭虫 VGSC 的 V419L 和 L925I 突变在世界范围内广泛分布<sup>[6]</sup>,它们既可以单独发生,也可以共同存在(即双突变)。另一突变(I936F)与右旋丙烯菊酯的低水平抗性相关联<sup>[16]</sup>,仅在澳大利亚和以色列的温带臭虫中检测到,且频率很低<sup>[7,16]</sup>,该突变对 VGSC 敏感性的影响还缺乏电生理学的实验数据。

本研究对温带臭虫 *vgs*c 基因编码 419、925 和 936 氨基酸位点的密码子进行检测,发现 419 和 925 位点同时发生了抗性相关的基因突变。检测的 6 个个体全部为抗性纯合基因型,抗性突变频率高达 100%。尽管捕获和检测的个体有限,但双位点 100% 的突变频率说明该温带臭虫种群对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性水平较高。据此,应该加大北京市温带臭虫抗药性的检测范围,根据敏感性测定结果合理选择杀虫剂种类。在实施臭虫的化学防治时应制定相应的对策,选用与拟除虫菊酯类杀虫剂作用机制不同的其他药剂,或采用物理方法减少臭虫的危害。

### 参考文献

- [1] Reinhardt K, Siva-Jothy MT. Biology of the bed bugs (Cimicidae) [J]. *Ann Rev Entomol*, 2007, 52: 351-374. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.040306.133913.
- [2] Wang CL, Singh N, Cooper RA, et al. Evaluation of an insecticide dust band treatment method for controlling bed bugs [J]. *J Econ Entomol*, 2013, 106(1): 347-352. DOI: 10.1603/EC12259.
- [3] Susser SR, Perron S, Fournier M, et al. Mental health effects from urban bed bug infestation (*Cimex lectularius* L.): a cross-sectional study [J]. *BMJ Open*, 2012, 2(5): e000838. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-000838.
- [4] Dong K, Du YZ, Rinkevich F, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 50: 1-17. DOI: 10.1016/j.ibmb.2014.03.012.
- [5] Sayono S, Hidayati APN, Fahri S, et al. Distribution of voltage-gated sodium channel (*Nav*) alleles among the *Aedes aegypti* populations in central Java province and its association with resistance to pyrethroid insecticides [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150577. DOI: 10.1371/journal.pone.0150577.
- [6] Dang K, Doggett SL, Singham GV, et al. Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae) [J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1): 318. DOI: 10.1186/s13071-017-2232-3.
- [7] Palenchar DJ, Gellatly KJ, Yoon KS, et al. Quantitative sequencing for the determination of *kdr*-type resistance allele (V419L, L925I, I936F) frequencies in common bed bug (Hemiptera: Cimicidae) populations collected from Israel [J]. *J Med Entomol*, 2015, 52(5): 1018-1027. DOI: 10.1093/jme/tjv103.
- [8] Zhu F, Wigginton J, Romero A, et al. Widespread distribution of knockdown resistance mutations in the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), populations in the United States [J]. *Arch Insect Biochem* (下转第 544 页)

省对外贸易不断增长,2017年进出口总额比2016年增长15.30%;接待入境旅游者比2016年增加8.30%<sup>[19]</sup>,随着“一带一路”项目的持续推进,浙江省对外交流将更加频繁,面临的疟疾防控挑战也越加严峻。为防止本地病例发生,维持消除疟疾状态,仍需继续开展持续、规范的传疟媒介监测,并进一步利用分子生物学技术研究按蚊种群及抗性基因,为浙江省消除后阶段疟疾防控策略提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 浙江统计信息网. 浙江省情[EB/OL]. [2018-11-20]. <http://tjj.zj.gov.cn/col/col1525489/index.html>.
- [2] 姚立农,夏生荣,阮卫,等. 应用rDNA ITS2区段基因序列分析对浙江省传疟媒介的鉴定[J]. 中国病原生物学杂志,2006,1(3):217-218,228. DOI:10.3969/j.issn.1673-5234.2006.03.017.
- [3] 姚顺荣,姚立农,许翔,等. 浙江省2008年15个疟疾重点县监测资料分析[J]. 浙江预防医学,2009,21(9):18-19. DOI:10.3969/j.issn.1007-0931.2009.09.008.
- [4] Gao HW, Wang LP, Liang S, et al. Change in rainfall drives malaria re-emergence in Anhui province, China[J]. PLoS One, 2012,7(8):e43686. DOI:10.1371/journal.pone.0043686.
- [5] 李菊林,朱国鼎,周华云,等. 江苏省传疟媒介按蚊种群及其密度调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2018,29(1):47-49,52. DOI:10.11853/j.issn.1003.8280.2018.01.012.
- [6] 王伟明,周华云,刘耀宝,等. 江苏省不同地区中华按蚊季节消长与夜间活动规律比较[J]. 中国热带医学,2013,13(3):292-295. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2013.03.021.
- [7] 王伟明,曹俊,周华云,等. 江苏省2005-2010年疟疾监测点媒介季节消长监测[J]. 中国热带医学,2013,13(2):152-155. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2013.02.025.
- [8] 李凯杰,尚晓鹏,皮琦,等. 湖北省主要传疟媒介按蚊生态习性及其密度分析[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2015,42(6):328-331. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.06.005.
- [9] 蒋妙根,王克武,万翠英,等. 浙江省疟疾防治历程与现状[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1995,13(3):225-228.
- [10] 浙江省农业农村厅. 浙江省水稻生产概况和特点[EB/OL]. (2006-03-28) [2018-11-09]. <https://wenku.baidu.com/view/4ca436c8d5bbfd0a7956736b.html>.
- [11] 谢月梅,周世卿,罗文飞. 2013-2016年广宁县按蚊种群数量和媒介密度监测结果[J]. 职业与健康,2017,33(9):1253-1256. DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2017.0385.
- [12] 朱韩武,李成华,段良松,等. 2013-2014年郴州市传疟媒介按蚊种群和密度调查分析[J]. 社区医学杂志,2015,13(17):25-27.
- [13] 陈梓聪,李河,刘畅,等. 动态监测数据的日历热图可视化及其R软件实现[J]. 循证医学,2016,16(5):310-313. DOI:10.12019/j.issn.1671-5144.2016.05.015.
- [14] 张丽,丰俊,张少森,等. 2017年全国消除疟疾进展及疫情特征分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(3):201-209.
- [15] Zhang X, Yao LN, Sun JM, et al. Malaria in southeastern China from 2012 to 2016: analysis of imported cases[J]. Am J Trop Med Hyg, 2018, 98(4):1107-1112. DOI:10.4269/ajtmh.17-0476.
- [16] 黄小妹,何明楨,吕来福,等. 江苏省溧阳市境外输入性疟疾疫情分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2016,28(1):66-68. DOI:10.16250/j.32.1374.2015125.
- [17] 孙伯超,曾玉林,夏秒英. 盐城市疟疾流行态势及防控对策探讨[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2012,24(6):672-675. DOI:10.3969/j.issn.1005-6661.2012.06.014.
- [18] 曹俊,刘耀宝,曹园园,等. 中国消除疟疾的持续挑战:输入性疟疾[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(2):93-96.
- [19] 浙江省统计局. 2017年浙江省国民经济和社会发展统计公报[EB/OL]. (2018-02-27) [2018-11-20]. [http://tjj.zj.gov.cn/art/2018/2/27/art\\_1525568\\_20972733.html](http://tjj.zj.gov.cn/art/2018/2/27/art_1525568_20972733.html).

收稿日期:2019-04-26 (编辑:卢亮平)

(上接第527页)

- Physiol,2010,73(4):245-257. DOI:10.1002/arch.20355.
- [9] Campbell BE, Koehler PG, Buss LJ, et al. Recent documentation of the tropical bed bug (Hemiptera: Cimicidae) in Florida since the common bed bug resurgence[J]. Fla Entomol, 2016, 99(3):549-551. DOI:10.1653/024.099.0333.
- [10] 王陇德. 病媒生物防制实用指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:94-96.
- [11] Rinkevich FD, Zhang L, Hamm RL, et al. Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States[J]. Insect Mol Biol, 2006, 15(2):157-167. DOI:10.1111/j.1365-2583.2006.00620.x.
- [12] Potter MF. The history of bed bug management-with lessons from the past[J]. Am Entomol, 2011, 57(1):14-25. DOI:10.1093/ae/57.1.14.
- [13] Doggett SL, Russell RC. The resurgence of bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae) in Australia: experiences from down Under [C]//Proceedings of the 6th International Conference on Urban Pests. Pápai, Hungary: OOK Press, 2008:407-425.
- [14] Romero A, Potter MF, Potter DA, et al. Insecticide resistance in the bed bug: a factor in the pest's sudden resurgence? [J]. J Med Entomol, 2007, 44(2):175-178. DOI:10.1093/jmedent/44.2.175.
- [15] Yoon KS, Kwon DH, Strycharz JP, et al. Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae) [J]. J Med Entomol, 2008, 45(6):1092-1101. DOI:10.1093/jmedent/45.6.1092.
- [16] Dang K, Toi CS, Lilly DG, et al. Detection of knockdown resistance mutations in the common bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), in Australia [J]. Pest Manag Sci, 2015, 71(1):914-922. DOI:10.1002/ps.3861.

收稿日期:2019-04-25 (编辑:卢亮平)