

广西北海市家蝇杀虫剂抗性基因频率的检测与分析

丁岩¹, 杨婵¹, 李梅¹, 冯向阳², 邱星辉¹

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 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028

摘要: **目的** 通过检测杀虫剂抗性基因频率对广西壮族自治区北海市家蝇的抗药性现状进行分析, 为该地区家蝇的防治提供依据。**方法** 通过限制性片段长度多态性聚合酶链反应方法对野外采集家蝇的细胞色素 P450 *CYP6D1* 基因、钠离子通道基因 (*Vssc*) 和乙酰胆碱酯酶 (*AChE*) 基因 (*ace*) 进行分型, 统计其基因型频率。**结果** 北海市的 63 只家蝇样本经过检测, 未发现 *CYP6D1* 抗性纯合个体, 而敏感纯合个体所占比例高达 96.83% (61/63), 杂合个体频率为 3.17% (2/63), *CYP6D1* 抗性等位基因频率仅为 1.59%。在同一样本中, 检测到 *Vssc* 杂合子 (1014L/F) 的基因频率为 6.35% (4/63), 敏感纯合子 (1014L/L) 的个体基因频率高达 93.65% (59/63), 未发现 1014F 的纯合个体及 1014H 突变个体。在北海市的 38 只家蝇样本中, 检测到 342G/A 和 342A/V 两种 *AChE* 基因型个体, 其频率分别为 5.26% 和 94.74%, 抗性等位基因频率总和 (342A + 342V) 高达 97.37%。**结论** 北海市家蝇样本中的 *CYP6D1* 和 *Vssc* 抗性等位基因频率均较低, 而 *AChE* 抗性等位基因频率极高, 提示目前北海市可使用拟除虫菊酯类杀虫剂防治家蝇; 同时在该地区减少使用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂进行灭蝇, 避免家蝇种群抗性基因频率继续升高, 以延缓抗性的发展。

关键词: 家蝇; 抗药性; *CYP6D1*; 钠离子通道; 乙酰胆碱酯酶; 北海市

中图分类号: R384.2; S481+.4 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2017)01-0012-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2017.01.004

Frequency of alleles associated with insecticide resistance in a field housefly population from Beihai city, Guangxi Zhuang Autonomous Region

DING Yan¹, YANG Chan¹, LI Mei¹, FENG Xiang-yang², QIU Xing-hui¹

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

Corresponding authors: QIU Xing-hui, Email: qiuxh@ioz.ac.cn; FENG Xiang-yang, Email: 13077712341@163.com

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004219)

Abstract: Objective To understand the current status of insecticide resistance of housefly in Beihai city of Guangxi Zhuang Autonomous Region by molecular tools. **Methods** The genotypes of three genes (*CYP6D1*, *Vssc* and *ace*) in a field population of housefly from Beihai city were detected by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analyses, and corresponding frequencies for each genotype were recorded. **Results** In 63 houseflies collected from Beihai city, no homozygote for *CYP6D1* resistant allele was detected, while the frequencies of susceptible homozygotes and heterozygotes were 96.83% (61/63) and 3.17% (2/63) respectively. No 1014H mutation of *Vssc* was observed in these samples, but 1014F mutation was present in heterozygotes in a low frequency of 6.35% (4/63). The frequency of 1014L/L (susceptible) homozygote was very high (59/63, 93.65%). In 38 individuals, we observed two *ace* genotypes, namely 342G/V and 342A/V, in frequencies of 5.26% and 94.74% respectively. Notably, the frequency of resistant alleles (342A and 342V) reached 97.37%. **Conclusion** The frequencies of resistant alleles of both *CYP6D1* (1.59%) and *Vssc* (3.18%) were low, suggesting that pyrethroids can be used for housefly control in this area. In contrast, extremely high frequencies of resistant alleles of *ace* were detected in housefly samples from Beihai city, indicating that failure may occur if using organophosphates and carbamates for control of house flies in the sampling region.

Key words: *Musca domestica*; Insecticide resistance; *CYP6D1*; Voltage-sensitive sodium channel; Acetyl cholinesterase; Beihai city

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004219)

作者简介: 丁岩, 女, 满族, 在读本科, Email: dingyanddy@foxmail.com

通信作者: 邱星辉, Email: qiuxh@ioz.ac.cn; 冯向阳, Email: 13077712341@163.com

网络出版时间: 2016-12-06 17:10 网络出版地址: http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

家蝇 (*Musca domestica*) 是一种重要的媒介昆虫,常孳生于生活垃圾等场所,其携带大量致病菌,可通过污染食物或饮用水而在人、畜中传播,对人类健康和畜牧业生产造成威胁^[1]。家蝇的防治手段主要是滞留喷洒化学杀虫剂,但长期大规模使用杀虫剂可导致家蝇产生严重的抗药性。目前,抗药性已成为家蝇防控的难题^[2]。

在我国,家蝇抗药性普遍存在^[3],但广西地区家蝇的抗药性水平和抗性基因频率的现状还无相关报道。本研究以广西壮族自治区(广西)北海市采集的家蝇为材料,采用分子检测方法,调查家蝇杀虫剂抗性等位基因的种类和频率,了解北海市家蝇的抗药性现状,为化学药物防治家蝇提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 家蝇 2015 年 11 月采自广西北海市新世纪大道和南珠广场养猪场周边外环境,家蝇成虫置于 100%乙醇溶液中,带回实验室于 4 °C 保存。

1.2 家蝇基因组 DNA 的提取 参考 Rinkevich 等^[4]方法提取单只家蝇头部和胸部的基因组 DNA。

1.3 家蝇细胞色素 P450 *CYP6D1* 基因的基因型测定 采用引物 Qxh6d1F 和 Qxh6d1R(表 1),以家蝇基因组 DNA 为模板,扩增家蝇抗性相关细胞色素 P450 *CYP6D1* 基因片段,并采用 *Hpy188 III* 对 PCR 扩增产物进行酶切,区分个体的基因型,其原理参考 Rinkevich 等^[4]方法。

表 1 实验所用引物信息
Table 1 Primers information

鉴别基因	引物名称	引物序列(5'~3')
<i>CYP6D1</i>	Qxh6d1F	ATT TGC CCC GTC ATT TAC AA
	Qxh6d1R	GCC GGC TTG AAG AAC AAA TA
1014H	qkdrFA	AGCTGTATACCCTTCTCT
	mdkdrgrR	CGAAGTTGGACAAAAGCAAA
1014F	kdrDIGLongF	TCGCTTCAAGGACCATGAACCTACCGCGCTG
	kdrDIGLongR	CCGAAGTTGGACAAAAGCAAAAGCTAAGAAAA
<i>ace</i>	Md-Ace-F	CGGTGCATTTGGGTTTCTAC
	Md-Ace-R	CGTAACCGCTAAGATCTGCTG

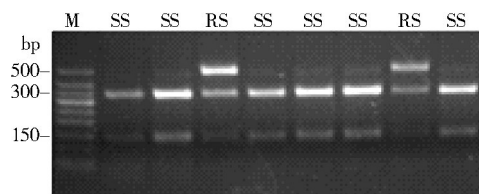
1.4 家蝇钠离子通道(*Vssc*)基因型测定 分别用引物对 qkdrFA - mdkdrgrR 和 kdrDIGLongF - kdrDIGLongR(表 1),对每个家蝇样本的钠离子通道 *Vssc* 基因片段进行 PCR 扩增;利用 *MluC I* 酶对以 kdrDIGLongF - kdrDIGLongR 为引物扩增产物进行酶切,判定样本是否包含 1014F 基因突变^[4]。利用限制性内切酶 *Nla III* 酶对以 qkdrFA - mdkdrgrR 为引物的扩增产物进行酶切,判定样本是否包含 1014H 基因突变^[5]。

根据上述 2 个酶切结果判断家蝇个体的基因型。

1.5 家蝇乙酰胆碱酯酶(AChE)基因型测定 采用引物 Md-Ace-F 和 Md-Ace-R(表 1)对每个家蝇样本的乙酰胆碱酯酶基因(*ace*)片段进行 PCR 扩增,再利用 *Bsp1286 I* 酶和 *Eae I* 酶对 PCR 扩增产物分别进行酶切反应,综合 2 种限制性内切酶的酶切结果,鉴定 AChE342 位点的基因型,其原理和步骤参照文献^[5]。

2 结果

2.1 家蝇样本 *CYP6D1* 抗性等位基因频率 *CYP6D1* 抗性基因型包含的一段长 15 bp 的片段插入,打断了 *Hpy188 III* 酶切位点^[6],利用本研究所用引物扩增的 PCR 产物无法被 *Hpy188 III* 酶切,但该酶可将携带敏感等位基因家蝇个体的 PCR 产物酶切为长度为 132、329 bp 的 2 个片段。在北海市的 63 只家蝇样本中,杂合型个体(RS)2 只(3.17%),敏感型(SS)61 只(96.83%),未检测到抗性等位基因纯合个体(RR),酶切结果见图 1。*CYP6D1* 抗性等位基因频率为 1.59%,见表 2。



注: M. DNA 分子质量标准; RS. *CYP6D1* 杂合个体; SS. *CYP6D1* 敏感个体。

图 1 *CYP6D1* 扩增产物经 *Hpy188 III* 酶切结果

Figure 1 Restriction digest of amplified *CYP6D1* fragments by *Hpy188 III* enzyme

表 2 北海市野生家蝇种群抗性基因频率

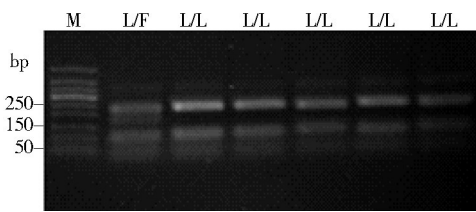
Table 2 Frequency of alleles associated with insecticide resistance in a field housefly population in Beihai city

基因	样本数(只)	抗性等位基因频率(%)	抗性等位基因类型	互作农药
<i>Vssc</i>	63	3.18	1014F	拟除虫菊酯/DDT
<i>CYP6D1</i>	63	1.59	含 15 bp 插入	拟除虫菊酯
<i>ace</i>	38	97.37	342A + 342V	有机磷/氨基甲酸酯

2.2 家蝇样本 *Vssc* 抗性等位基因频率 利用引物 qkdrFA 和 mdkdrgrR 扩增获得 220 bp 片段。限制性内切酶 *Nla III* 可将含 1014H 突变的抗性等位基因产物酶切为长度为 170、50 bp 的 2 个片段^[5]。在所检测的 63 只家蝇个体中,未检测到含有 1014H 等位基因的个体。

采用引物 kdrDIGLongF 和 kdrDIGLongR 进行 PCR 扩增,得到长度为 325 bp 的片段,限制性内切酶 *MluC I* 可将带含有 1014F 突变位点的等位基因产物酶切为长度为 170、95 和 60 bp 的 3 个片段,将不含 1014F 突变位点的等位基因酶切为长度为 230、95 bp

的 2 个片段^[4], 见图 2。



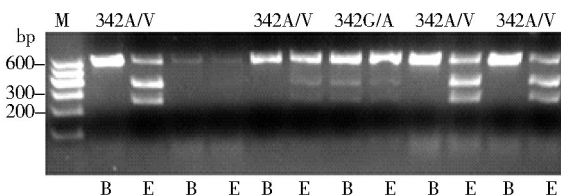
注: M. 分子质量标准; L/F. 1014位点杂合型; L/L. 1014位点敏感纯合型。

图 2 *MluC* I 酶切分型结果

Figure 2 Restriction digest of amplified *Vssc* fragments by enzyme *MluC* I

综合上述 2 个 PCR 酶切结果, 检测样本中共发现 4 个个体的基因型为抗性杂合子(1014L/F), 占检测个体数的 6.35%, 其他 59 个个体的均为敏感纯合子, 占 93.65% (59/63), 抗性位点基因(1014F)频率为 3.18%, 见表 2。

2.3 家蝇样本 *ace* 抗性位点基因频率 引物 Md-Ace-F 和 Md-Ace-R 经 PCR 扩增获得长度为 609 bp 的片段, 采用 *Bsp*1286 I 和 *Eae* I 酶的酶切产物图谱可对 PCR 产物进行基因分型^[5]。在检测的 38 只家蝇样品中, 共发现 2 种基因型, 即 342G/A 和 342A/V, 其中 342G/A 为敏感与抗性杂合子, 频率为 5.26%; 342A/V 为双突变型杂合子, 频率为 94.74%, 酶切结果见图 3。抗性位点基因频率总和(342A+342V)为 97.37%, 见表 2。



注: M. 分子质量标准; B. *Bsp*1286 I 酶切; E. *Eae* I 酶切。

图 3 北海市家蝇 *Bsp*1286 I 和 *Eae* I 酶切结果

Figure 3 Restriction digest of amplified *ace* fragments by *Bsp*1286 I and *Eae* I

3 讨论

家蝇抗药性分子机制的研究进展为抗药性检测提供了分子手段。细胞色素 P450 *CYP6D1* 的过量表达已被证实可导致家蝇对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性^[4]。*CYP6D1* 基因的 5' 端在抗性家蝇中有一段长 15 bp 的片段插入, 该插入会增加 *CYP6D1* 基因的转录, 从而增加 *CYP6D1* 酶的量而加速对含有苯氧苄基的拟除虫菊酯类杀虫剂的解毒作用^[7], 该插入因打断了 1 个 *Hpy*188 III 内切酶的酶切位点, 因此, 被用于抗性位点基因检测的分子标记。在本研究检测北海市的家蝇样本中, 未发现 *CYP6D1* 抗性纯合个

体, 杂合个体频率为 3.17%, 而敏感纯合个体所占比例高达 96.83%。*CYP6D1* 抗性位点基因频率仅为 1.59%, 与济南地区接近, 远低于广东和北京种群^[2]。细胞色素 P450 介导的杀虫剂代谢作用增强是昆虫产生抗药性的普遍机制, *CYP6D1* 抗性位点基因在检测样品中频率低, 预示样品采集地区的家蝇保持了对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性。另一种可能性是家蝇存在其他细胞色素 P450 介导的抗性机制^[1,8]。

昆虫的钠离子通道是拟除虫菊酯类和 DDT(滴滴涕)农药的作用靶标。以往研究表明, 钠离子通道 1014 位点的氨基酸点突变会导致昆虫对拟除虫菊酯类和 DDT 产生抗性。在家蝇中已发现两种不同的 1014 位点的抗性突变^[2,4], 即苯丙氨酸(1014F)和组氨酸(1014H)^[2], 其中 1014F 突变导致的抗性高于 1014H^[4]。在北海市的 63 只家蝇个体中, 检测到抗性杂合 1014L/F 个体的频率为 6.35%, 敏感纯合 1014L/L 个体频率高达 93.65%, 未发现 1014H 突变。家蝇种群抗性位点基因类型单一(1014F), 且频率很低(3.18%), 表明钠离子通道 1014 位点点突变抗性机制对该地区家蝇的抗药性贡献不大。

昆虫的 AChE 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标。至今已在杀虫剂抗性品系中鉴定了多个与抗性相关的遗传变异^[2,9-10]。生理生化证据已证明家蝇 AChE 的 342 位点氨基酸突变可以降低昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感性^[9]。在家蝇 AChE 的 342 位点发现了两种抗性相关的点突变, 即 G342A 和 G342V^[2,9-10]。理论上 342 位点可以有 6 种不同的基因型, 但在检测的 38 只家蝇个体中, 只检测到两种基因型, 即 342G/A 和 342A/V, 其频率分别为 5.26% 和 94.74%, 而未检测到在我国其他地区存在的 342A/A 基因型^[2]。342A 和 342V 均为抗性基因型, 在本样本中的频率高达 97.37% (342A+342V), 该结果与我国广东等 5 省的检测结果类似^[2]。现有的研究结果显示, AChE 抗性突变以高频率广泛存在于我国家蝇野生种群中, 可能与这些地区大规模、长期使用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂有关。

从北海市家蝇样本来看, *CYP6D1* 和 *Vssc* 抗性位点基因的频率均较低, 推断该地区的家蝇对拟除虫菊酯类和 DDT 杀虫剂的抗性程度极低, 现场可继续使用拟除虫菊酯类杀虫剂进行防控。相反, 由于样本中检出 AChE 抗性位点基因频率极高, 因此, 在该地区应减少使用有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂。

参考文献

- [1] 邱星辉. 细胞色素 P450 在家蝇抗药性中的作用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25(6): 591-593.
- [2] Wang QM, Li M, Pan J, et al. Diversity and frequencies of

- genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica* L.) from China [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 102(2):153-159.
- [3] Scott JG, Leichter CA, Rinkevich FD, et al. Insecticide resistance in house flies from the United States: resistance levels and frequency of pyrethroid resistance alleles [J]. Pestic Biochem Physiol, 2013, 107(3):377-384.
- [4] 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.
- [5] Qiu XH, Pan J, Li M, et al. PCR-RFLP methods for detection of insecticide resistance-associated mutations in the house fly (*Musca domestica*) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 104(3):201-205.
- [6] Seifert J, Scott JG. The *CYP6D1v1* allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca domestica* [J]. Pestic Biochem Physiol, 2002, 72(1):40-44.
- [7] Tomita T, Scott JG. cDNA and deduced protein sequence of *CYP6D1*: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly [J]. Insect Biochem Molec Biol, 1995, 25(2):275-283.
- [8] Gao Q, Li M, Sheng CF, et al. Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (*Musca domestica*) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 104(3):252-260.
- [9] Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, et al. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance [J]. Biochem J, 2001, 359(1):175-181.
- [10] 邱星辉. 家蝇抗药性的分子机制:乙酰胆碱酯酶介导的抗药性[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2014, 21(2):134-137.

收稿日期:2016-09-07

(上接第3页)

这两种鼠检测恙虫病东方体核酸均为阳性,推测东方纤恙螨可能是该疫源地的传播媒介,但确认媒介还需进一步调查和研究。

本次调查期间,该县有大量居民上山采蘑菇,居民很可能被携带病原体的恙螨叮咬而发病,所以应对该地区发热患者开展恙虫病调查。本次和以往研究均证实东北地区存在广泛恙虫病疫源地^[5],医疗卫生机构应重视该病,针对基层医生开展恙虫病的诊断、治疗技术培训,提高医务人员对恙虫病的认识,以避免误诊。目前,恙虫病尚未列入我国法定报告传染病,但2013年后其年报告发病数已超过万例。因此,应尽快将该病纳入法定报告传染病管理。我国多数地区存在恙虫病疫源地的可能性,但相关恙虫病传播媒介研究仅局限在部分地区,应在新发病地区开展恙虫病传播媒介恙螨种类、分布及发病季节的系统调查,为疾病预防控制提供依据。

参考文献

- [1] 刘国栋,刘国平,金理华,等. 吉林省珲春地区恙虫病及其他立克次体病调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(5):41-42.
- [2] 胡玲美,鲁志新,蔡增林,等. 珲春地区野鼠体内恙虫病立克次体的分离和初步鉴定[J]. 中国公共卫生学报, 1993, 12(3):189-190.
- [3] 鲁志新,胡玲美,蔡增林,等. 东北地区恙虫病自然疫源地宿主调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8(3):222-223.
- [4] 鲁志新,温青莉,解志刚,等. 东北三省部分地区人血清恙虫病立克次体抗体调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 27(4):106.
- [5] Wu YC, Qian Q, Soares Magalhaes RJ, et al. Spatiotemporal dynamics of scrub typhus transmission in Mainland China, 2006-2014[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(8):e0004875.
- [6] 鲁志新,吴建平,蔡宁,等. 吉林省珲春地区恙虫病感染季节的调查[J]. 沈阳部队医药, 1997, 10(6):526-527.
- [7] 付秀萍,刘玉英,张宝华,等. 首次实验室证实北京平谷地区恙虫病东方体暴发流行[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2):137-140.
- [8] 黎家灿,郑小英,奚志勇. 我国恙螨与恙虫病的研究[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(9):773-775.
- [9] 郭醒华,赵玉贵,杨春光. 东北三省恙虫病自然疫源地自然景观及影响因素分析[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(5):406-407.
- [10] Traub R, Wisseman CL Jr. Ecological considerations in scrub typhus. 1. Emerging concepts [J]. Bull World Health Organ, 1968, 39(2):209-218.
- [11] 鲁志新,胡玲美,蔡增林,等. 珲春:新发现的恙虫病自然疫源地[J]. 中华流行病学杂志, 1994, 15(1):31-33.
- [12] 刘国平,陶增琰,全理华,等. 我国东北边境地区恙螨区系和生态调查[J]. 生态学杂志, 1988, 7(2):13-16.
- [13] 刘国平,李东力,陈春田,等. 我国东北三省的恙螨[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2003, 14(6):444-446.

收稿日期:2016-11-16