

一个致倦库蚊杀虫剂敏感品系的筛选

岳秋娟^{1,2#}, 姚淑敏^{1#}, 刘洋洋², 刘石娟¹, 崔峰^{2*}

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165;

2. 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)

摘要: 化学防治是控制蚊虫传播疾病的主要方法, 抗性监测表明我国蚊虫已对有机磷、有机氯、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂产生了不同程度的抗性。蚊虫抗药性的分子机制主要包括靶标抗性和三大解毒酶家族带来的代谢抗性。筛选对杀虫剂敏感的品系是抗性监测和抗性机理研究必不可少的材料。本研究通过从一个致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 野生种群筛选无乙酰胆碱酯酶 G119S 突变且具有低活性羧酸酯酶、P450 单加氧酶和谷胱甘肽-S-转移酶的单雌系, 建立了一个对杀虫剂敏感的致倦库蚊品系。该品系的羧酸酯酶活性是敏感品系 S-lab 的 2.5 倍, P450 单加氧酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活性与 S-lab 相当。生物测定表明, 与 S-lab 相比, 该品系对有机磷杀虫剂有低于 2 倍的抗性, 对氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂没有抗性, 可以作为相对敏感品系用于抗性监测。

关键词: 致倦库蚊; 敏感品系; 乙酰胆碱酯酶; 羧酸酯酶; P450 单加氧酶; 谷胱甘肽-S-转移酶; 抗药性

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)04-0379-06

Screening of an insecticide-susceptible strain of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

YUE Qiu-Juan^{1,2#}, YAO Shu-Min^{1#}, LIU Yang-Yang², LIU Shi-Juan¹, CUI Feng^{2,*} (1. College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Chemical control is the main method to control mosquitoes that are the primary vectors of human diseases. Previous resistance investigations showed that mosquitoes in China had become resistant to organophosphates, organochlorines, carbamates and pyrethroids. There are two main resistance mechanisms, *i. e.*, the target resistance and the metabolism resistance that three detoxification enzyme families are involved in. An insecticide-susceptible strain is indispensable for resistance monitoring and studies of resistance mechanisms. In this study, we established an insecticide-susceptible strain of *Culex pipiens quinquefasciatus* from a field population by screening the isofemale lines without the G119S mutation in the acetylcholinesterase and with the low activity of carboxylesterases, P450 monooxygenases, and glutathione-S-transferases. Compared to another susceptible strain, S-lab, the strain screened here had 1.5-fold higher carboxylesterase activity and equivalent P450 and glutathione-S-transferase activities. Insecticide bioassay showed that this strain had a less than 2-fold resistance to organophosphates and no resistance to carbamates and pyrethroids compared to the S-lab. Therefore this strain can be applied as an insecticide-susceptible strain in resistance monitoring.

Key words: *Culex pipiens quinquefasciatus*; insecticide-susceptible strain; acetylcholinesterase; carboxylesterase; P450 monooxygenase; glutathione-S-transferase; insecticide resistance

蚊虫是传播多种人类疾病的重要媒介, 如库蚊传播脑炎、丝虫病 (Buss and Callaghan, 2004), 伊

蚊传播登革热、黄热病, 按蚊传播疟疾等 (Strode *et al.*, 2008)。防治蚊虫的方法主要有物理防治、化

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004219)

作者简介: 岳秋娟, 女, 1986 年生, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为生物资源的利用和开发, E-mail: yueqiujuan06@163.com;

姚淑敏, 女, 1967 年生, 山东临清人, 副教授, 研究方向为微生物生理生化, E-mail: yaoshumin299@163.com

共同第一作者 Authors with equal contribution

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cuif@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2012-11-12; 接受日期 Accepted: 2013-03-01

学防治、生物防治(Strode *et al.*, 2008), 其中化学防治以其高效、快速、便捷等优势成为最常用的防治方法。我国从 20 世纪 50 年代中期开始使用化学杀虫剂, 抗性监测表明我国蚊虫已对有机磷、有机氯、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂产生了不同程度的抗性(Cui *et al.*, 2006b)。目前监测和鉴定蚊虫抗药性的方法有 4 种: 毒效生物测定法(包括半数致死量法、区分剂量法)、酶测定法、遗传学方法和免疫学方法(常海静等, 2011)。以上方法均需要敏感品系作为参照, 否则现场测试不能判断种群的抗药性水平, 只能在不同地区之间进行横向比较。

昆虫的抗药性分子机制包括代谢抗药性和靶标抗药性(崔峰和乔传令, 2007; Cui *et al.*, 2007), 其中代谢抗药性主要由羧酸酯酶、P450 单加氧酶和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)参与。在尖音库蚊复组 *Culex pipiens complex* 中, 羧酸酯酶的过量产生是引起蚊虫对有机磷杀虫剂产生抗性的代谢机制(Buss and Callaghan, 2004), 通常由基因扩增或转录水平的上调引起。这些羧酸酯酶为 B 型酯酶, 它的活性位点是一个丝氨酸残基, 占虫体总蛋白的 0.4%, 能迅速结合、缓慢降解杀虫剂(崔峰和乔传令, 2007)。细胞色素 P450 单加氧酶(P450s)是一个含亚铁血红素的酶家族, 在有机体内代谢多种外源和内源物质。在昆虫体内, P450 单加氧酶把有机磷类杀虫剂从硫代磷酸盐氧化成毒性更大的磷酸盐, 之后再进一步分解。P450 酶活性升高可以导致蚊虫对许多杀虫剂产生抗性, 且通常伴有其他酶活性的改变。谷胱甘肽-S-转移酶可以催化亲电子的内源和外源化合物与谷胱甘肽结合, 使这些化合物被排出体外或被进一步降解, 也可以在 P450 氧化产物的二级代谢中起催化作用。GST 活性增加导致昆虫对有机磷、拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性, 活性增加是由于转录水平上升或基因扩增引起的酶量增多。乙酰胆碱酯酶是氨基甲酸酯类和有机磷类杀虫剂的作用靶标, 其主要功能为在胆碱神经突触处迅速水解乙酰胆碱而中止神经冲动的传递。杀虫剂通过磷酸化或氨基甲酰化酶活性位点中的丝氨酸而抑制酶活性(崔峰和乔传令, 2007)。昆虫中一般有 *ace-1* 和 *ace-2* 两个编码乙酰胆碱酯酶的基因, 蚊虫中只有 *ace-1* 与抗药性相关, *ace-1* 发生点突变降低了酶对杀虫剂抑制的敏感性。已报道的 *ace-1* 基因的点突变有 G119S 和 F331W。在尖音库蚊复组、白足按蚊 *Anopheles albimanus* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的抗性品系中均发现 G119S 突变

(Weill *et al.*, 2004; Ahoua Alou *et al.*, 2010), F331W 突变只在三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 抗性品系中发现(崔峰和乔传令, 2007)。

S-lab 品系是一个来自美国加利福尼亚州的致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 实验室品系, 不含抗性乙酰胆碱酯酶基因和过量表达的羧酸酯酶基因, 常作为敏感参照品系用于许多抗药性研究(Mouches *et al.*, 1990; Kilian *et al.*, 2008; Mosqueira *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012)。但 S-lab 与我国蚊虫种群的遗传差异很大, 在我国蚊虫抗性研究中可能会产生一些背景噪音, 影响实验结果, 因此需要筛选起源于我国的敏感品系。本研究通过从一个致倦库蚊野生型种群筛选无乙酰胆碱酯酶 G119S 突变且具有低活性羧酸酯酶、P450 和 GST 的单雌系, 建立了一个新的致倦库蚊敏感品系, 生物测定表明, 与 S-lab 相比, 该品系对有机磷杀虫剂有低于 2 倍的抗性, 对氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂没有抗性, 可以作为相对敏感品系用于抗性监测。

1 材料和方法

1.1 试虫及试剂

1.1.1 试虫: 致倦库蚊野生种群 SG 采自广东省佛山市; S-lab 为致倦库蚊标准敏感品系(Georghiou *et al.*, 1966); SB1 (Mouches *et al.*, 1987)、SA2 (Berticat *et al.*, 2002)、LING(Weill *et al.*, 2001) 和 WU(Cui *et al.*, 2006a) 为标准抗性品系, 分别含有纯合 *Ester*^{B1}, *Ester*², *Ester*⁹ 和 *Ester*¹¹ 基因, 过量表达羧酸酯酶 B1, A2-B2, A9-B9 和 A11-B11。蚊虫在实验室长期饲养, 条件为温度 26 ± 2°C, 相对湿度 50%~70%, 光周期为 16L:8D。

取 SG 种群刚羽化的 1 头雌虫与 3 头雄虫为一个交配组在单独的养虫笼中进行交配; 共设置 30 个交配组。雌虫吸血、产卵后将雌虫和雄虫置于 -80°C 保存, 用于乙酰胆碱酯酶分析, 形成的单雌系连续饲养, 用于三大解毒酶系的酶活性测定和杀虫剂生物测定。

1.1.2 试剂: 敌敌畏(DDVP)、马拉硫磷、辛硫磷、氯菊酯、残杀威为北京市农药检定所标样, α-乙酸萘酯(α-NA)、β-乙酸萘酯(β-NA)和固蓝 B 盐、固蓝 RR 盐购于国药集团化学试剂有限公司, 还原型谷胱甘肽(GSH)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、NADPH 为 Sigma 产品, 二硫代苏糖醇(DTT)、苯基硫脲(PTU)等常用试剂均为国产。

1.2 乙酰胆碱酯酶 G119S 突变的鉴定

单头蚊虫乙酰胆碱酯酶基因 *ace-1* 是否有 G119S 突变, 用肉眼可辨别的乙酰胆碱酯酶显色反应进行鉴定, 具体方法参照常海静等(2011); 以敏感品系 S-lab 作为对照。

1.3 总蛋白提取

羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的测定以 0.2 mol/L 磷酸缓冲液为总蛋白提取缓冲液, P450 酶活性测定以 0.154 mg/mL DTT, 0.152 mg/mL PTU, 0.373 mg/mL EDTA 和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8) 为总蛋白提取缓冲液。每个单雌系及 S-lab 分别取 3 龄幼虫 10 头加入 500 μ L 总蛋白提取缓冲液, 在冰上迅速匀浆。12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液再次离心 10 min, 上清即为总蛋白提取液。利用 Bradford 法测总蛋白浓度(Bradford, 1976)。

1.4 羧酸酯酶活性的测定

以 1.3 提取的总蛋白提取液为样品, 测定羧酸酯酶活性, 具体方法参照常海静等(2011), 反应重复 3 次。

1.5 GST 活性的测定

将 10.35 mmol/L GSH 和 200 mmol/L CDNB 储存液按体积比 188:2 混合。在 190 μ L 上述混合液中加入 10 μ L 适当浓度的蚊虫总蛋白提取液, 迅速混匀后于 340 nm 下用分光光度计读取反应动态曲线, 每隔 5 s 读取一次吸光值, 共读 120 s, 利用 Excel10 进行直线回归分析, 其中斜率值即为酶促反应速率(A/min), 酶比活力(A/min·mg) 为 1 mg 总蛋白 1 min 催化生成产物的增加量。反应重复 3 次。

1.6 P450 活性的测定

将 90 μ L 适当浓度的蚊虫总蛋白提取液与 100 μ L 2 mmol/L 对硝基苯甲醚、10 μ L 9.6 mmol/L 的 NADPH 迅速混匀, 在 27 $^{\circ}$ C 下用分光光度计 405 nm 波长读取动态曲线, 每隔 25 s 记录一次吸光值, 共记录 20 次, 利用 Excel10 进行直线回归分析, 其中斜率值即为酶促反应速率(A/min), 酶比活力(A/min·mg) 为 1 mg 总蛋白反应 1 min 后底物的减少量。反应重复 3 次。

1.7 羧酸酯酶淀粉凝胶电泳

参照 Pasteur 等(1988) 的方法, 单头蚊虫和标准抗性品系的匀浆液一起进行淀粉凝胶电泳, 凝胶浓度 13.6%, 设置稳定功率为 10 W, 于 4 $^{\circ}$ C 环境中电泳 5~6 h, 电泳后切片, 加 α -NA 和 β -NA(以

2% 丙酮溶解) 各 2 mL, 45 mL 磷酸-F 缓冲液(KH_2PO_4 67 mmol/L, Na_2HPO_4 34 mmol/L) 温育 7 min, 加入固蓝 RR 盐 80 mg 进行染色, 条带清晰后固定、脱水、风干保存, 记录实验结果。

1.8 生物测定方法

参照 Raymond 和 Marquine(1994) 方法, 在 99 mL 自来水中吸入 20 头 4 龄初幼虫, 加 1 mL 不同浓度的杀虫药剂, 设置 5 个浓度梯度, 每个浓度 3 个重复, 24 h 后统计幼虫死亡数。

1.9 数据统计与分析

用 PROBIT(Ratsira *et al.*, 1993) 软件计算生物测定的 LC_{50} 、斜率、卡方值、抗性比率及 95% 的置信区间。各单雌系与 S-lab 之间三大解毒酶的活性差异用 *t*-检验进行统计分析(SPSS 13.0)。

2 结果

2.1 筛选无乙酰胆碱酯酶靶标抗性的致倦库蚊单雌系

在不同浓度的残杀威抑制下, 由于乙酰胆碱酯酶残余活性的不同而导致不同的显色反应, 在 30 个交配组中, 只有 8 组的雌雄致倦库蚊成蚊的乙酰胆碱酯酶基因 *ace-1* 没有 G119S 突变, 即有敏感的乙酰胆碱酯酶, 将这 8 个单雌系传代饲养。

2.2 致倦库蚊单雌系羧酸酯酶、GST、P450 酶活性

对无乙酰胆碱酯酶靶标抗性的 8 个单雌系进行羧酸酯酶、GST 和 P450 解毒酶系的活性测定, 结果表明(表 1): 8 个单雌系羧酸酯酶的活性都比对照 S-lab 品系的高, 但只有 3, 4, 6, 7 和 8 号单雌系有显著升高($P < 0.05$); 部分单雌系的 GST 活性比 S-lab 低, 如 4, 6 和 8 号单雌系, 但与敏感品系 S-lab 相比差异不显著($P > 0.05$); 大部分单雌系的 P450 活性比 S-lab 低, 但两者差异不显著($P > 0.05$)。综合三大解毒酶的活性, 4 号单雌系是最佳的敏感品系, 它的羧酸酯酶活性是 S-lab 品系的 2.5 倍, 其 GST 和 P450 活性与 S-lab 相当。

2.3 致倦库蚊 4 号单雌系的羧酸酯酶多态性

将 4 号单雌系单头蚊虫进行淀粉凝胶电泳, 羧酸酯酶活性染色结果表明(图 1), 在检测的 19 头蚊虫中, 大部分个体的酯酶表型类似标样 A11-B11 酯酶, 但许多个体的酯酶活性比标样低, 还有的个体酯酶染色类似 S-lab, 表明没有高活性的酯酶, 是敏感个体, 如 21 号蚊虫。

表 1 致倦库蚊 8 个单雌系的羧酸酯酶、GST、P450 酶活性

Table 1 The activities of carboxylesterases, GSTs and P450s in eight isofemale lines of *Culex pipiens quinquefasciatus*

品系 Strains	羧酸酯酶 Carboxylesterases			GST			P450		
	酶比活力 Specific activity (U/mg)	比值* Ratio*	P 值 P value	酶比活力 Specific activity (A/min·mg)	比值* Ratio*	P 值 P value	酶比活力 Specific activity (A/min·mg)	比值* Ratio*	P 值 P value
1#	0.375 ± 0.082	2.47	0.06	0.063 ± 0.026	2.42	0.29	0.015 ± 0.006	1.95	0.37
2#	0.395 ± 0.166	2.60	0.22	0.052 ± 0.019	2.02	0.35	0.006 ± 0.003	0.83	0.81
3#	0.307 ± 0.041	2.02	0.03	0.066 ± 0.032	2.53	0.33	0.003 ± 0.000	0.39	0.28
4#	0.381 ± 0.037	2.51	0.01	0.020 ± 0.007	0.77	0.75	0.002 ± 0.000	0.28	0.22
5#	0.451 ± 0.250	2.96	0.30	0.035 ± 0.012	1.34	0.68	0.005 ± 0.001	0.61	0.49
6#	0.850 ± 0.147	5.59	0.01	0.007 ± 0.000	0.26	0.30	0.004 ± 0.001	0.48	0.38
7#	0.466 ± 0.030	3.07	0.00	0.024 ± 0.014	0.92	0.92	0.005 ± 0.002	0.68	0.60
8#	0.435 ± 0.019	2.86	0.00	0.012 ± 0.001	0.45	0.43	0.013 ± 0.004	1.80	0.36
S-lab	0.152 ± 0.028	1.00		0.026 ± 0.016	1.00		0.007 ± 0.004	1.00	

表中数据为平均值 ± 标准误; 表 2 同。Data in the table are mean ± SE. The same for Table 2. * 各单雌系与 S-lab 的酶比活力比值 The ratio of the specific activity of an isofemale line to that of the S-lab.

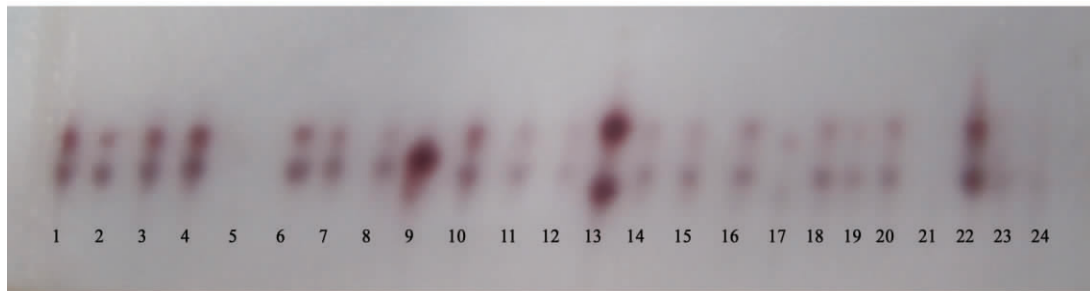


图 1 致倦库蚊 4 号单雌系单头蚊虫的淀粉凝胶电泳酯酶活性染色

Fig. 1 High-activity esterases in single adult mosquitoes from the 4# isofemale line of *Culex pipiens quinquefasciatus* analyzed in starch gel electrophoresis

1-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-21, 23-24: 4 号单雌系 (The 4# isofemale line); 5: 标样 S-lab (Standard sample S-lab); 9: 标样 B1 (Standard sample B1); 13: 标样 A2-B2 (Standard sample A2-B2); 17: 标样 A9-B9 (Standard sample A9-B9); 22: 标样 A11-B11 (Standard sample A11-B11).

2.4 致倦库蚊 4 号单雌系的抗性水平

对 4 号单雌系 4 龄幼虫进行杀虫剂生物测定, 结果表明 (表 2): 与 S-lab 相比, 4 号单雌系对 DDVP 和马拉硫磷分别有 1.5 和 1.6 倍的抗性 ($P \leq 0.05$), 而对辛硫磷的 LC_{50} 与 S-lab 的相当; 对残杀威和氯菊酯的 LC_{50} 与 S-lab 的相当。因此, 4 号单雌系仅对有机磷杀虫剂有非常低的抗性, 而对氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂没有抗性, 可以作为敏感品系用于抗性监测。

3 讨论

本研究通过检测乙酰胆碱酯酶基因 *ace-1* 有无

G119S 突变及解毒酶系羧酸酯酶、P450 和 GST 的活性, 筛选出一个相对敏感的致倦库蚊品系。与其他敏感品系相比, 该品系仅对有机磷杀虫剂有很低的抗性, 而对氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂没有抗性。昆虫对化学杀虫剂产生靶标抗药性通常涉及到乙酰胆碱酯酶、 γ -氨基丁酸受体、电压门钠离子通道等 (崔峰和乔传令, 2007), 尽管本研究仅检测了乙酰胆碱酯酶, 没有检测其他靶标基因, 但筛选出的敏感品系对拟除虫菊酯没有明显抗性, 说明该品系的电压门钠离子通道基因可能没有产生抗性突变, 如 L1014S 和 L1014F 突变 (Chen *et al.*, 2010; Ndiath *et al.*, 2012)。

表 2 致倦库蚊 4 号单雌系 4 龄幼虫对不同杀虫剂的抗性水平

Table 2 The insecticide resistance levels in the 4 instar larvae of the 4# isofemale line of *Culex pipiens quinquefasciatus*

杀虫剂 Insecticides	品系 Strains	半数致死浓度(mg/L) LC ₅₀ (95% CI)	斜率 Slope	卡方值 χ^2	抗性比率* Resistance ratio* (95% CI)
敌敌畏 DDVP	S-lab	0.133 (0.105 - 0.183)	3.04 ± 0.82	4.76	1.00
	4 号单雌系 4# isofemale line	0.206 (0.152 - 0.257)	2.85 ± 0.59	0.85	1.56 (1.02 - 2.38)
马拉硫磷 Malathion	S-lab	0.027 (0.025 - 0.029)	9.40 ± 2.08	5.27	1.00
	4 号单雌系 4# isofemale line	0.045 (0.035 - 0.057)	3.26 ± 0.75	0.91	1.69 (1.13 - 2.52)
辛硫磷 Phoxim	S-lab	0.005 (0.005 - 0.005)	12.95 ± 2.98	0.39	1.00
	4 号单雌系 4# isofemale line	0.005 (0.004 - 0.006)	3.36 ± 0.76	0.33	0.91 (0.59 - 1.40)
残杀威 Propoxur	S-lab	0.082 (0.053 - 0.121)	1.69 ± 0.34	2.67	1.00
	4 号单雌系 4# isofemale line	0.093 (0.066 - 0.118)	2.88 ± 0.70	4.85	1.13 (0.75 - 1.73)
氯菊酯 Permethrin	S-lab	0.033 (0.029 - 0.038)	5.48 ± 1.17	1.57	1.00
	4 号单雌系 4# isofemale line	0.037 (0.031 - 0.044)	4.19 ± 0.81	0.60	1.15 (0.73 - 1.81)

* 抗性比率为单雌系品系与 S-lab 的 LC₅₀ 比值 Resistance ratio is the ratio of the LC₅₀ of the isofemale line to that of the S-lab.

本研究筛选出的敏感品系与 S-lab 品系相比, 其羧酸酯酶活性是 S-lab 的 2.5 倍, 其 GST 和 P450 的活性 3 次测定结果的平均值比 S-lab 的低, 但两者差异不显著, 可以作为拟除虫菊酯杀虫剂抗性研究的相对敏感品系。较高的羧酸酯酶活性是导致该品系对有机磷杀虫剂产生低抗的原因。中国尖音库蚊复组野生抗性种群存在 B1, A2-B2, A8-B8, A9-B9, B10 和 A11-B11 高活性羧酸酯酶, 是由酯酶基因在基因组上扩增引起的(乔传令等, 2003; Cui *et al.*, 2007)。A11-B11 在 2003 年的抗性调查中首次被发现(Cui *et al.*, 2006a), 以后获得纯合品系 WU。与敏感品系 S-lab 相比, 纯合品系 WU 中的 A11 基因扩增了 36.5 倍, B11 基因扩增了 19.1 倍, 对有机磷杀虫剂有高达 7.2 倍的抗性(Cui *et al.*, 2007)。与抗性品系 WU 相比, 本研究筛选的敏感品系虽然含有 A11-B11, 但酯酶活性比 WU 品系的低, 可能酯酶基因的扩增水平较低, 从而只带来 1.5 倍左右的有机磷抗性。

参考文献 (References)

Ahoua Alou LP, Koffi AA, Adja MA, Tia E, Kouassi PK, Koné M,

- Chandre F, 2010. Distribution of *ace-1^R* and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae s. s.* populations from Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*, 9(1): 167 - 173.
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M, 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 1413 - 1416.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248 - 254.
- Buss DS, Callaghan A, 2004. Molecular comparisons of the *Culex pipiens* (L.) complex esterase gene amplicons. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 433 - 441.
- Chang HJ, Liu YY, Jiang H, Qiao CL, Lu XP, Lang ML, Cui F, 2011. Rapid detection of organophosphate resistance in *Culex pipiens* complex by acetylcholinesterase staining. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 22(4): 332 - 335. [常海静, 刘洋洋, 江红, 乔传令, 卢希平, 郎明林, 崔峰, 2011. 酯酶显色法快速检测尖音库蚊对有机磷的抗性. 中国媒介生物学及控制杂志, 22(4): 332 - 335]
- Chen L, Zhong DB, Zhang DH, Shi LN, Zhou GF, Gong MQ, Zhou HY, Sun Y, Ma L, He J, Hong SC, Zhou D, Xiong CR, Chen C, Zou P, Zhu CL, Yan GY, 2010. Molecular ecology of pyrethroid knockdown resistance in *Culex pipiens pallens* mosquitoes. *PLoS ONE*, 5(7): e11681 - e11689.
- Cui F, Lin LF, Qiao CL, Xu Y, Marquine M, Weill M, Raymond M,

- 2006a. Insecticide resistance in Chinese populations of the *Culex pipiens* complex through esterase overproduction. *Entomol. Exp. Appl.*, 120: 211 – 220.
- Cui F, Qiao CL, 2007. The molecular mechanisms of insecticide resistance in mosquitoes. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(5): 621 – 626. [崔峰, 乔传令, 2007. 蚊虫抗药性分子机理. 昆虫知识, 44(5): 621 – 626]
- Cui F, Raymond M, Qiao CL, 2006b. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Manag. Sci.*, 62(10): 1013 – 1022.
- Cui F, Weill M, Berthomieu A, Raymond M, Qiao CL, 2007. Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 1131 – 1137.
- Georghiou GP, Metcalf RL, Giddens FE, 1966. Carbamate resistance in mosquitoes: selection of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (= *Culex quinquefasciatus* Say) for resistance to Baygon. *Bull. World Health Organ.*, 35: 691 – 708.
- Kilian A, Byamukama W, Pigeon O, Atieli F, Duchon S, Phan C, 2008. Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. *Malaria Journal*, 7: 49 – 70.
- Mosqueira B, Duchon S, Chandre F, Hougard JM, Carnevale P, Mas-Coma S, 2010. Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes – Part 1: laboratory evaluation. *Malaria Journal*, 9(1): 340 – 345.
- Mouchès C, Magnin M, Bergé JB, De Silvestri M, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP, 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(8): 2113 – 2116.
- Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, Arnauty VB, Hyrien O, Vincent BRS, Georghiou GP, Pasteur N, 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2574 – 2578.
- Ndiath MO, Sougoufara S, Gaye A, Mazonot C, Konate L, Faye O, Sokhna C, Trape JF, 2012. Resistance to DDT and pyrethroids and increased *kdr* mutation frequency in *An. gambiae* after the implementation of permethrin-treated nets in Senegal. *PLoS ONE*, 7(2): e31943 – e31948.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J, 1988. Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK. 83 – 155.
- Qiao CL, Hemingway J, Li X, 2003. Quantitative differences between populations of *Culex quinquefasciatus* in both the esterases α and β involved in insecticide resistance. *Acta Entomologica Sinica*, 46(1): 11 – 17. [乔传令, J. Hemingway, 李琯, 2003. 有机磷抗性致倦库蚊种群中酯酶基因扩增的定量分析. 昆虫学报, 46(1): 11 – 17]
- Ratsira D, Prato G, Raymond M, 1993. PROBIT, CRNS-UMII, Licence L93019. Avenix, St. Georges d'Orques, France.
- Raymond M, Marquine M, 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *J. Evol. Biol.*, 7: 315 – 337.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes JN, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne P, Hemingway J, William C, Ranson H, 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 113 – 123.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13(1): 1 – 7.
- Weill M, Marquine M, Berthomieu A, Dubois MP, Bernard C, Qiao CL, Raymond M, 2001. Identification and characterization of novel organophosphate detoxifying esterase alleles in the Guangzhou area of China. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 17(4): 238 – 244.
- Zhang HY, Meng FX, Qiao CL, Cui F, 2012. Identification of resistant carboxylesterase alleles in *Culex pipiens* complex via PCR-RFLP. *Parasites & Vectors*, 5: 209 – 225.

(责任编辑: 赵利辉)