

鸭儿湖摇蚊复组种群酯酶多态性的研究

李¹ 乔传令¹ 徐 盈²

(1. 中国科学院动物研究所; 虫鼠害综合治理国家重点实验室, 北京 100080;
2. 中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 应用淀粉凝胶电泳研究了从湖北鸭儿湖污染区采集的较耐污染的摇蚊复合组幼虫, 结果发现: 在取样种群中存在高活性的 β 酯酶(EST), 其电泳迁移率与致倦库蚊实验参考系均不同; 从甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD) 染色结果发现, 其酶谱与已报道的库蚊 GPD 染色结果有很大不同, 在污染最重的 1 号氧化塘的摇蚊复合组幼虫的 GPD 没有表达; 但在中度污染的 2、3 号氧化塘中, 摇蚊复合组幼虫 GPD 位点呈现明显多态现象。群体遗传学分析结果表明, 取样种群由于杂合子不足造成种群偏离哈迪-温伯格平衡。所分析的 2 号、3 号、4 号塘三个亚种群之间遗传差异不显著, 有效迁移个体数比较少, 亚种群间基因流动少。

关键词: 摇蚊复合组; 多态性; 耐污染; 淀粉凝胶电泳; 酯酶

中图分类号: Q969.44 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)02-0148-07

在我国 60 年代曾一度大量生产广泛使用六六六等廉价的广谱杀虫剂^[1]。据报道, 这些滞留性有机氯污染物能激活生物体内的解毒酶系, 使多功能氧化酶系(MFO), 谷胱甘肽-S-转移酶(GSH) 及羧酸酯酶(Carboxylesterase) 活力升高, 而产生抗性^[2]。由高活性的酯酶引起的抗性已经在 30 多种卫生害虫和农、牧业害虫中研究发现^[3], 它是引起蚊虫对有机磷杀虫剂产生抗性的主要机制^[4-6]。在大多数生物中, 酯酶的多态性都很高, 库蚊的酯酶是迄今为止已知的多态性最高的蛋白之一, 同时现已发现酯酶多态性的现象普遍存在于敏感蚊虫种群中^[7]。本研究选择对鸭儿湖有毒污染物表现出极高的耐受性的摇蚊复合组幼虫, 试图研究其体内是否存在与抗生有关的酯酶(解毒酶), 并从群体遗传学的角度分析摇蚊复合组酯酶等位点的多态性。

1 材料和方法

1.1 材料 摇蚊复合组(*Chironomus complex*) 幼虫, 采自武汉鸭儿湖中严家湖的五个氧化塘的污泥里, 选择三龄—四龄幼虫共 143 只(1 号塘 3 只, 2 号塘 77 只, 3 号塘 15 只, 4 号塘 45 只, 5 号塘 3 只), -20℃ 保存待用, 样品采集点如图 1 所示。

收稿日期: 2000-03-23; 修订日期: 2000-04-20

基金项目: 中国科学院“九五”重大 B 项目; 淡水生态和生物技术国家重点实验室项目

作者简介: 李 (1973—), 女, 北京市人; 研究方向: 分子生物学。致谢: 法国科学院科学与进化研究所 Raymond 教授惠赠致倦库蚊 Tem-R 系, 酯酶 β^1 的标准品系; 致倦库蚊 Selax 系酯酶 $\alpha 2/\beta$ 的标准品系

通讯作者: 乔传令, qiaocl@panda.ioz.ac.cn

1.2 实验参考系 Tem-R 系: 致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*), 酯酶 β^1 的标准品系。1994 年采自美国加州野生品系繁衍而来, 近来已被证明为酯酶 β^1 过量产生的纯合型品系^[8,9] Selax 系: 致倦库蚊, 酯酶 α^2/β^2 的标准品系, 来源于美国加州野外有机磷抗性致倦库蚊种群^[10]。以上所有的标准系均系法国科学院科学与进化研究所 Raymond 惠赠, 液氮速冻后, 在 -70℃ 冰箱中保存备用。

1.3 化学试剂 水解淀粉(Starch hydrolyzed), 法国科学院科学与进化研究所产品, 苹果酸(Malic acid), 德国 Merck 公司产品, 固蓝 RR 盐(Fast blue RR salt), Fluka 公司, 辅酶(NAD)、辅酶(NADP)、吩嗪甲硫酸(Phenazine methosulfate, PMS)、氮蓝四唑(Tetrazolium nitro blue, NBT)、噻唑蓝(Tetrazolium salt, MTT)、磷酸甘油(α -D, L-Glycerophosphate)、琼脂糖(型)均为 Sigma 公司产品, Tris, 加拿大 Sangon 有限责任公司产品。

1.4 电泳 参照 Pasteur 等^[11] 方法, 采用 Tris-Maleate-EDTA (TME) 缓冲液系统, 测定单个摇蚊的酯酶活性。单个摇蚊匀浆后, 用 Whatman No. 3 制成的沁子沾湿沁子。上样时沁子的下端要接触胶模盘, 沁子之间约 2—3mm, 每块胶要有已知酯酶的蚊虫沁子作为对照。在 TME 7.4 缓冲液系统下进行水平切片淀粉凝胶电泳, 淀粉胶浓度为 13.6%, 在稳压 110V, 4℃ 恒温下电泳。电泳完毕后, 将厚胶切成数个薄片, 移入染色盒进行染色。

1.5 胶染 苹果酸脱氢酶(MDH E.C. 1.1.1.37), 染色前将 Tris-A 缓冲液(Tris/HCl 0.2mol/L-pH8.0), 苹果酸(2mol/L, pH7.0) 各 2mL, MgCl₂(0.5mol/L) 0.3mL, NAD 2mL 混合放在三角瓶中备用。在放有凝胶切片的染色盒中, 将备用的混合液再加入 NBT 1mL, PMS 0.3mL, MTT 0.5mL 混合后, 与 10mL 加热的 1.5% 琼脂糖混合后快速均匀的铺盖在凝胶切片上, 放在暗处直到谱带出现。

苹果酸酶(ME E.C. 1.1.1.40), 染色前将 Tris-A (Tris/HCl 0.2mol/L-pH8.0) 10mL, MgCl₂(0.5mol/L) 1.5mL, 苹果酸(2mol/L) 1mL, NADP 0.1mL 混合放在三角瓶中备用。在放有凝胶切片的染色盒中, 将备用的混合液再加入 PMS 0.1mL, NBT 0.2mL, MTT 0.2mL 混合后, 再与 10mL 加热的 1.5% 的琼脂糖混合后快速均匀的铺盖在凝胶切片上, 放在暗处直到谱带出现。

1.6 液染 酯酶(EST E.C. 3.1.1.1), 在放有凝胶切片的染色盒中加入 40mL 磷酸-F 缓冲液(KH₂PO₄, 0.067mol/L; NaH₂PO₄, 0.034mol/L), 2mL α -乙酸萘酯(2% 丙酮溶液)和 2mL β -乙酸萘酯(2% 丙酮溶液), 温育 6min 后加入固蓝 RR 盐 100mg 继续温育, 直到谱带出现。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD E.C. 1.1.1.8), 在放有凝胶切片的染色盒中加入 Tris-A 缓冲液 40 mL, NAD 1mL, α -D, L, 磷酸甘油 100mg, 染色前加 NBT 1mL, PMS

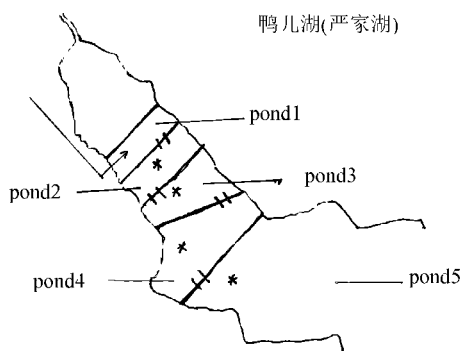


图1 严家湖五个氧化塘的示意图
Fig.1 Schematic diagram of 5 oxidation ponds in the Yanjia Lake

* 样品采集地点

* sample collected place.

示的二个标准系的结果。在污染最重的 1 号塘 GPD 没有表达, 5 号塘的 GPD 表达也较弱, 2、3 号塘 GPD 位点较为丰富(图 3, 2#, 3#), 2 号塘中有的个体出现三个 GPD 位点, 三个中度污染的塘 GPD 的位点呈多态现象。

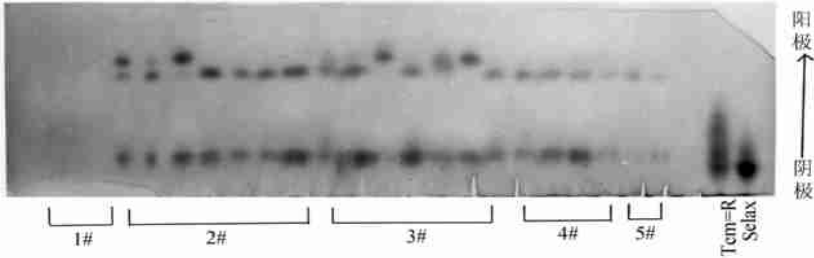


图 3 鸭儿湖摇蚊复合组 5 个亚种群 GPD 酶谱照片

Fig. 3 Zymogram of GPD of *Chironomus* complex individuals from the Ya-Er Lake subpopulations

2. 3 有关群体遗传学分析

采用 GENEPOP 软件(3.1 版) 共分析了 143 只摇蚊复合组幼虫在 7 个基因位点(*Est*-1、*Est*-2、*Gpd*-1、*Gpd*-2、*Mdh*-1、*Mdh*-2、*Me*) 上的基因型。其中主要分析了 2 号、3 号、4 号塘的摇蚊复组幼虫。

2. 3. 1 哈迪-温伯格平衡检验 种群是否符合哈迪-温伯格平衡是种群遗传结构分析的第一步, 外界选择压力、不同种群的混合或者非随机交配等因素都可能导致种群偏离哈迪-温伯格平衡。检验表明: 所有偏离哈迪-温伯格平衡的情形都是由亚种群内的杂合子不足造成的, (表 1)。以 2 号塘为例, 用 Levene 校正的方法计算杂合子或纯合子的期望值也得到了同样的结论, (表 2)。

表 1 哈迪-温伯格平衡检验和 *F*_{is} 值
Tab. 1 Hardy-Weinberg balance test and *F*_{is}

位点		2#	3#	4#
<i>Est</i> -1	<i>F</i> _{is}	+ 0. 479	+ 0. 503	+ 0. 442
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	4 × 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
<i>Est</i> -2	<i>F</i> _{is}	+ 1	+ 1	-
	<i>P</i>	0. 286	-	-
<i>Me</i>	<i>F</i> _{is}	+ 1	+ 1	+ 0. 973
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
<i>Mdh</i> -1	<i>F</i> _{is}	+ 0. 917	+ 1	+ 1
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
<i>Mdh</i> -2	<i>F</i> _{is}	+ 1	+ 1	+ 1
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
<i>Gpd</i> -1	<i>F</i> _{is}	+ 0. 968	+ 1	+ 0. 223
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
<i>Gpd</i> -2	<i>F</i> _{is}	+ 1	+ 1	+ 1
	<i>P</i>	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	1 × 10 ⁻⁴

P 假设 *H*₀= 种群处于哈迪-温伯格平衡状态的检验的 *P* 值
Refers to the *P* value when testing the hypothesis *H*₀= Hardy-Weinberg equilibrium.

表 2 用 Levene 校正的方法计算杂合子或纯合子的期望值
Tab. 2 expectation of heterozygote or homozygous with emendation method of Levene

位点	期望值		观察值	
	Expectation value		Observed value	
	纯合子 Homozygote	杂合子 Heterozygote	纯合子 Homozygote	杂合子 Heterozygote
<i>Est-1</i>	15.82	61.18	45	32
<i>Est-2</i>	1.14	2.86	4	0
<i>Me</i>	12.01	64.99	77	0
<i>Mdh-1</i>	15.32	59.68	70	5
<i>Mdh-2</i>	10.57	64.43	75	0
<i>Gpd-1</i>	13.66	61.34	73	2
<i>Gpd-2</i>	9.50	57.50	67	0

2.3.2 摇蚊复合组种群间的遗传差异 种群间的遗传差异的检验常用 F 统计中的一个统计量 F_{st} 值来衡量。本实验检测结果, F_{st} 值在 0.0334—0.1026 之间遗传差异不显著, 由此可见, 2#、3#、4# 塘摇蚊复合组亚种群间基本没有分化(表 3)。

表 3 摇蚊复合组亚种群间的遗传分化分析(亚种群间遗传差异检验中的 F_{st} 值)
Tab. 3 The F_{st} value when testing genetic differentiation between subpopulations

种群	2#	3#	4#
2#	—	0.0334	0.0616
3#	0.0334	—	0.01024
4#	0.0616	0.1024	0.0616

2.3.3 居群每代迁移数(N_m) 检测的三个塘中有效迁移个体数都比较少, 表明这三个塘间的基因流动较少(表 4)。

表 4 摇蚊复合组亚种群间居群每代迁移数(N_m)
Tab. 4 The number of migrants of per generation (N_m) among the subpopulation

N_m	2#	3#	4#
2#	—	7.24	3.18
3#	7.24	—	2.19
4#	3.81	2.19	—

3 讨论

运用淀粉凝胶电泳对采自鸭儿湖污染区的摇蚊复合组种群进行研究后, 发现存在高活性的酯酶, 但其电泳迁移率与致倦库蚊 T_{em-R} 及 S_{elax} 标准系蚊虫迁移率不同, 取样种群中存在两种 β 酯酶基因。鸭儿湖尤其严家湖 1 号塘内有机氯污染物长期污染作用的

结果,使得摇蚊复合组体内产生一种与库蚊个体内检测不同的高活性 β 酯酶。有关鸭儿湖污染区摇蚊复合组酯酶的特征有待进一步分析,如能将此特殊环境下选择出的高活性酯酶克隆,再用于对这些特殊污染物的降解中,则有重大的应用价值。摇蚊复合组幼虫在厌氧污泥中生存的特点,通常被用作污染程度现场监测的指示。在严家湖这四个污染最严重的塘中采得摇蚊复合组个体中,所检测的七个位点上的基因大多处于纯合状态,由于杂合子不足造成偏离哈迪-温伯格平衡,在鸭儿湖污染区中亚种群间的遗传差异不显著,基因交流也比较少。杂合子的比率是遗传多样性的标志,杂合子的比率高是遗传多样性高的标志,因为每一杂合子携带不同的等位基因,代表着变异的存在^[19]。在污染较重的1号塘,GPD没有表达,但在中度污染的2、3、4号塘GPD位点呈现多态性。通常GPD被认为是与杀虫剂的选择无直接关系的中性酶,但是在二 类化合物重度和中度污染塘的摇蚊幼虫中,它的变化如此显著,是非常有趣的,可以说是二 类污染物选择出了丰富的GPD等位基因位点,但为什么重度污染塘GPD没有表达?GPD的多态现象是如何被选择出来的?它在污染物的净化过程中起了什么作用,都有待深入研究。

参考文献:

- [1] Xu Y, Wu W Z. Mobility and transfer of residual Hexachlorocyclohexane (HCH) in aquatic environment [J]. *Fresenius Envir. Bull.*, 1994, **3**: 557- 562
- [2] 翟启惠. 昆虫分子生物学的一些进展: 杀虫剂抗性的分子基础[J]. *昆虫学报*, 1995, **38**: 493—500
- [3] Hemingway J, S H P P Karunaratne. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism [J]. *Med. Vet. Entomol.*, 1998, **12**: 1- 12
- [4] Herath P R, Hemingway J. The detection and characterization of malathion resistance in field population of *Anopheles Culicifacies* B in Sri Lanka Pestic [J]. *Biochem. Physiol.*, 1987, **29**: 157- 162
- [5] Bisset J A, Rodriguez M M, Hemingway J, et al. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of primiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms [J]. *Med. Vet. Entomol.*, 1991, **5**: 223- 228
- [6] Karunaratne S H P P, Jayawardena K G I, Hemingway J, et al. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus* [J]. *Biochem J*, 1993, **294**: 575- 579
- [7] Raymond M, Qiao C L, Callaghan A, et al. Esterase polymorphism in insecticide susceptible populations of the mosquito *Culex pipiens* [J]. *Genet Res Camb*, 1996, **67**: 19- 26
- [8] Ranasinghe L E, Georgiou G P. Comparative modification of insecticide resistance spectrum of *Culex fatigans* Wied by selection with temephos and temephos/synergist combinations [J]. *Pestic Science*, 1979, **10**: 502- 508
- [9] Georgiou G P, Pasteur N, Hawley M K, et al. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase B in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say from California [J]. *J Econ Entomol.* 1980, **73**: 301- 305
- [10] Wirth M C, Marquine M, Georgiou G P, et al. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in organophosphate resistance and linkage studies [J]. *Med Entomol*, 1990, **27**: 202- 206
- [11] Pasteur N, Pasteur G, Catalan J, et al. Practical Isozyme Genetics [M]. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England. 1988
- [12] Haldane J B C. An exact test for randomness of mating [J]. *J Genet*, 1954, **2**: 631- 635
- [13] Louis E J, Dempster E R. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles [J]. *Biometrics*, 1987, **43**: 805- 811

- [14] Guo S W, Thompson E A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles [J]. *Biometrics*, 1992, **48**: 361- 372
- [15] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F -statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, **38**: 1358- 1370
- [16] Fisher R A. Statistical methods for research workers (14th Edit) [M]. Edinburgh: Oliver and Boyd. 1970
- [17] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F -statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, **38**: 1358- 1370
- [18] Wright S. Evolution and genetics of populations Vol.2. 1969. The theory of gene frequencies [M]. Chicago: Chicago University Press.
- [19] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia Univ press. 1987

STUDIES ON THE ESTERASE POLYMORPHISM OF THE *CHIRONOMUS* COMPLEX POPULATION IN THE YA-ER LAKE NEAR WUHAN

LI Xuan¹, QIAO Chuan-ling¹ and XU Ying²

(1.State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; 2. Institute of Hydrobiology, The Chinese
Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: This paper dealt with the high resistant larvae of *Chironomus* complex which were collected from the Ya-Er Lake near Wuhan. The results indicated that high-active esterases existed in the population, the R_f is difference from conference population of *Culex pipiens*. The data of the GPD from *Chironomus* complex in four ponds indicated that the pattern of the electrophoresis is difference from the populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquitoes. In the middle polluted 2#, 3# pond, the GPD locus of the larvae of *Chironomus* complex demonstrated polymorphisms. The analysis results by GEN EPOP software showed that the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium was rejected. There was systemic heterozygote deficit in these sub-populations, no significant differentiation was found among the three sub-populations- 2#, 3#, 4#, the gene flow among them was low according to the number of migrants of per generation (Nm).

Key word: *Chironomus* complex; Polymorphism; Telorance; Starch gel electrophoresis; Esterases