

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 以電泳酯酶圖譜探討斑蚊個體間差異

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：CNIS-91-12

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

計畫主持人：田乃月

共同主持人：無

計畫參與人員：陳伊菁

執行單位：工業安全衛生系

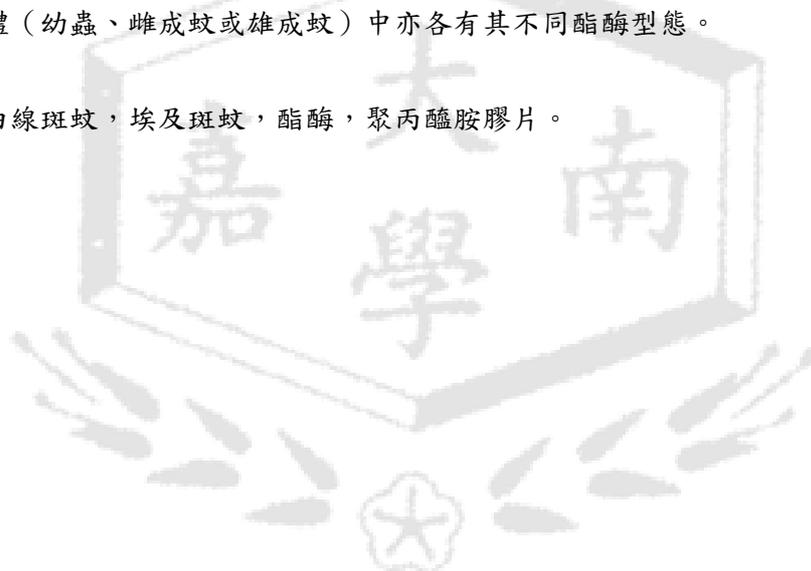
中華民國 九十二 年 二 月 二十六 日

## 摘要

利用不連續聚丙烯酰胺膠片(Polyacrylamide gel)電泳方法,分析比較埃及斑蚊與白線斑蚊的幼蟲、雌成蚊及雄成蚊體內酯酶差異性。分別將各種蚊種個體體內總蛋白質以研磨及離心萃取出,經電泳依蛋白質分子量大小分離後,再將膠片作總酯酶染色(受質: $\alpha$ -naphthyl acetate 與  $\beta$ -naphthyl acetate)。

比較兩種斑蚊(敏感性埃及斑蚊與路竹白線斑蚊)的酯酶,發現後者成蚊酯酶種類較前者複雜。兩者成蚊酯酶分布情形約可定出二至三大群組(前者定出三群,後者為二群),且均以分子量較低的群組含較多酯酶蛋白質帶。將均是敏感性的埃及斑蚊及白線斑蚊作酯酶分析,發現兩者幼蟲體中均有三群酯酶群組。比較分子量較大的兩組酯酶群,則顯示以 NSAA 的數量較多;但分子量較小的第三群組,是以 NSAE 有較多條蛋白質,而 NSAA 則只有 1-2 條。綜合結果顯示,不同斑蚊品種(埃及斑蚊與白線斑蚊)的酯酶群確實有差異性存在,故可應用作為種分類的依據之一。此外,在不同生活史期的蚊蟲個體(幼蟲、雌成蚊或雄成蚊)中亦各有其不同酯酶型態。

關鍵詞：白線斑蚊，埃及斑蚊，酯酶，聚丙烯酰胺膠片。



## 前言暨文獻探討

近年來登革熱在世界許多地區猖獗，而台灣氣候環境屬濕熱型，易滋生病媒蚊蟲傳播登革熱病毒，故全省尤其在南部地區不斷有登革熱病例發生。登革熱原文名為 Dengue fever，在台灣地區常俗稱「天狗熱」或「斷骨熱」，主要係由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 兩種病媒蚊傳播登革熱病毒所造成的急性病毒性熱疾。上述兩種斑蚊的分佈領域有別，埃及斑蚊分佈在北迴歸線以南，其活動主要在家戶室外，少部分在室內，所以在人口高密度都市具有重要的傳染地位；而白線斑蚊分佈遍及全島，但大多數均生活在野外陰暗處，如樹叢竹林內或有積水處。登革熱病毒目前只發現存在於人、猴及病媒蚊體內，且此病毒必須藉由病媒蚊叮咬方能在人體間傳播，傳染途徑是屬於生物性蟲媒傳染。為撲滅病媒蚊杜絕登革熱傳染，研究學者積極研發各式殺蟲劑；噴灑殺蟲劑雖可有效防治蚊蟲，但長期使用後則會造成蚊蟲開始產生抗藥性的問題，致使現有之殺蟲劑失去功效，而必須研發新的殺蟲藥劑；或是加重噴灑藥劑量，則可能因此影響傷害人體或其它環境生物的健康，均是影響控制蚊蟲媒介疾病流行的障礙。根據路等人 (1987) 以七種殺蟲劑測試台北、台中、屏東及花蓮等四個地區之熱帶家蚊，結果顯示台中及屏東的熱帶家蚊對亞特松 (Pirimifos-methyl) 的抗藥性增加最多，對大利松 (Diazinon) 的抗藥性亦有提升。因此如何避免蚊蟲產生抗藥性，或者研發出不易使蚊蟲產生抗藥性的新型殺蟲劑，是目前研究者面對蚊蟲抗藥性管理的重要議題。

昆蟲體內具有多樣化重要酵素系統，以便應付週遭環境諸多有毒物的侵害，或應用於協助蟲體本身變態發育成長的進行。一般昆蟲對殺蟲劑產生抗藥性的原因，可分成行為上及生理生化上的抗藥性。當以滴滴涕 (DDT) 防治蚊蟲時，發現蚊蟲不停留在噴灑過藥劑的牆壁，但以強迫接觸法測試滴滴涕藥效時，卻發現滴滴涕仍能有效的防治該品系的蚊子，故先前蚊蟲之反應乃屬於行為上的抗藥性。至於生理生化上的抗藥性，則是昆蟲利用體內酵素系統改變對殺蟲劑的滲透、運送、貯存及排泄等生理反應所致。已知蚊蟲產生抗藥性的重要原因主要是其體內解毒酵素活性增高 (Oppenoorth, 1984)，而其中酯酶的水解酯鍵作用對多種殺蟲劑有解毒代謝功能 (Terriere, 1984)。

## 研究目的

本研究乃針對白線斑蚊肆虐台灣南部引起登革熱流行，而衛生防疫單位與民眾經常噴灑使用各式殺蟲劑以防治蚊蟲，為能有效撲滅蚊蟲且期望降低蚊蟲產生抗藥性的比率，故擬研究探討白線斑蚊體內酯酶含量、種類及性質等特性。

## 研究方法

### (一) 研究對象之選取

路竹白線斑蚊 (路竹-*Aedes albopictus*，路竹 AA) 來源取得是從高雄縣路竹鄉一棄置積水的廢輪胎中所撈取的幼蟲。敏感性埃及斑蚊 (Normal strain-*Aedes aegypti*，NSAE) 則是國立台灣大學昆蟲學系徐爾烈教授研究室所提供卵片，再自行養殖孵化繁殖後代供作實驗材料。

### (二) 實驗流程

蚊蟲蓄養與繁殖 → 組裝電泳膠片鑄造器 → 製作不連續聚丙烯醯胺膠片 → 萃取蚊體內

的蛋白質液→蛋白質液電泳分析進行膠片染色（進行酯酶染色法）→染色後膠片封片乾燥法

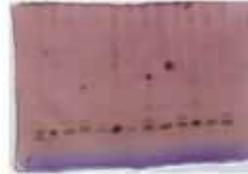
## 結 果

### (一) 敏感性埃及斑蚊雌蚊的酯酶分析

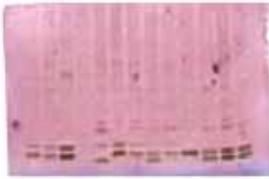
A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



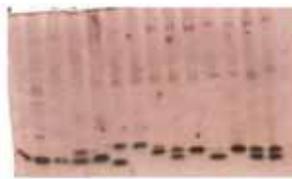
B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



D 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

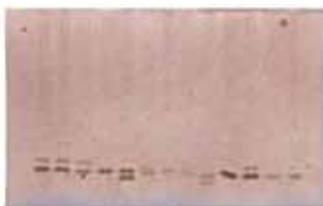


表一： 敏感性埃及斑蚊雌蚊的總酯酶分析

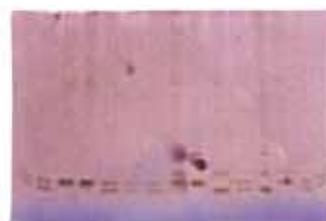
敏感性埃及斑蚊雌蚊號碼	3.6.7.9.12	35	1	2	4.10.	5.17.	31	33	8	43	45	46.	32
	19.20.22.	37	16	11	13.14.	29.34					47	49.	
	23.24.25.		21	27	15.18.	36.38						50.	
	26.28.30.				40.41.	39.						51.	
	48				42.44.								
隻數	15	2	3	3	10	7	1	1	1	1	2	4	1
第三群組	數 <sup>1</sup> 目	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	4	1
	種 <sup>2</sup> 類	D	C	DE	AD	BD	CD	BE	B'C	ABD	AA'B	AA'B	A'AD
										E	D	E	B
表現率 <sup>3</sup>	29.4%	3.9%	5.9%	5.9%	19.6%	13.7%	1.9%	1.9%	1.9%	1.9%	3.9%	7.8%	1.9%

### (二) 敏感性埃及斑蚊雄蚊的酯酶分析

(A) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



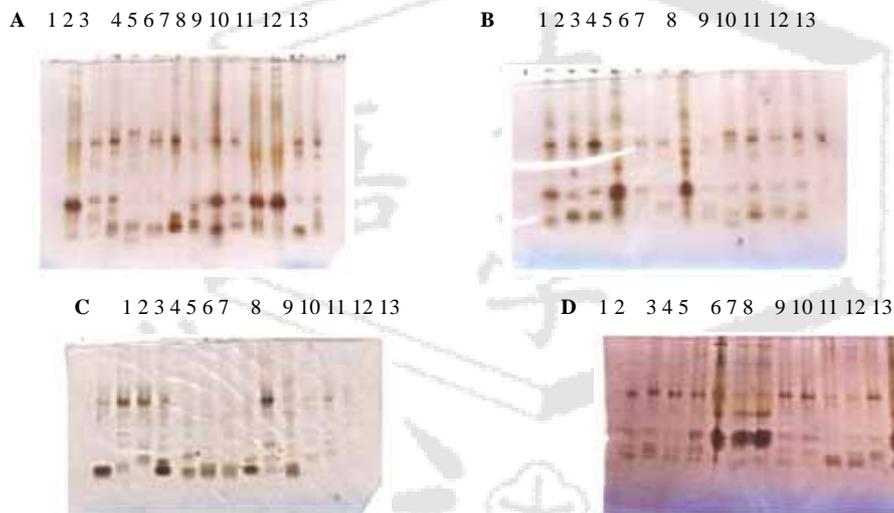
D 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



表二：敏感性埃及斑蚊雄蚊的總酯酶分析

敏感性埃及斑蚊雄蚊號碼	4.7.8.10. 12.16.17. 37.52	38 40	1.2.3.6.11 21.26.36. 47.	5.9.14.15.18. 19.20.32.39.48 24.27.28.29.30 31.34.35.42.51	22.45 49.	23.33	25.43 44.46	41.50	
隻數	9	2	10	20	3	2	4	2	
第三群組	數 <sup>1</sup> 目	1	1	2	2	2	2	3	3
	種 <sup>2</sup> 類	C	B	CD	CD	AC	BD	ABD	ACD
表現率%	17.3	3.8	19.23	38.5	5.8	3.8	7.7	3.8	

(三) 路竹白線斑蚊雌蚊的酯酶分析



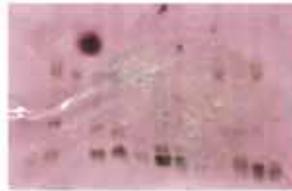
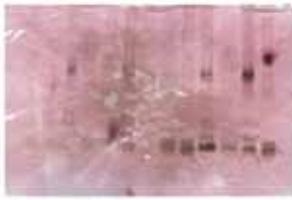
表三：路竹白線斑蚊雌蚊的總酯酶分析

路竹白線斑蚊雌蚊號碼	44 49	11 24 44	1	3 13	5	6 7 10 22 30	8 15 23 31	13 31	29	40 41	2	9 20 21 27 34 46 48 50	32	39 47	4 14 16	28
隻數	2	3	1	2	1	5	4	2	1	2	1	8	1	2	3	1
第三群	數 <sup>1</sup> 目	1	1	1	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4
	種 <sup>2</sup> 類	A	C	E	AC	BE	DE	CE	AE	DG	AD	ADE	ACE	BDE	AEF	ACDE
表現率%	5.1	7.7	2.6	5.1	2.6	12.8	10.3	5.1	2.6	5.1	2.6	20.5	2.6	5.1	7.7	2.6

〈四〉路竹白線斑蚊雄蚊的酯酶分析

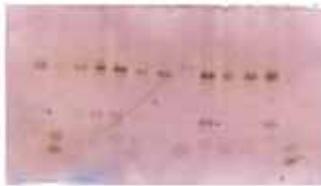
A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

D 1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12 13



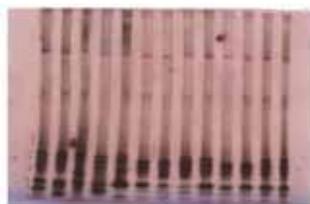
表四：路竹白線斑蚊雌蚊的總酯酶分析

路竹白線	1	11	27	3	8.9	26	38	42	43	48	50	6	15	35	20	
斑蚊雌蚊	2		29		13.19	28						10	17			
號碼	44		30		24.34	39						12				
	46		31		36.45							41				
			49		51.52							47				
隻數	4	1	5	1	10	3	1	1	1	1	1	5	2	1	1	
第	數 <sup>1</sup> 目	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	
三	種 <sup>2</sup> 類	C	D	A	AC	CD	CE	AB	BC	BD	B'D	DE	ABD	ACD	ABC	B'BD
群																E
組																
	表現率 <sup>3</sup>	10.5%	2.6%	13.2%	2.6%	26.3%	7.9%	2.6%	2.6%	2.6%	2.6%	2.6%	13.2%	5.3%	2.6%	2.6%
			%													

〈五〉敏感性埃及斑蚊幼蟲的酯酶分析

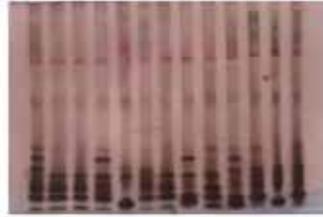
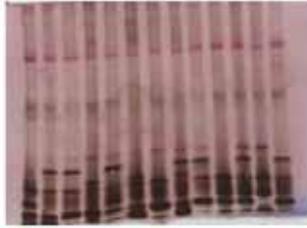
A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

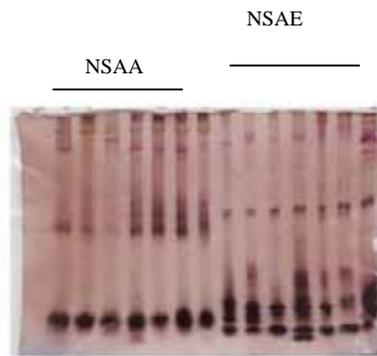


C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

D 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



#### (六) 敏感性埃及斑蚊與敏感性白線斑蚊幼蟲的比較



### 討 論

在實驗過程中可明顯發現不管是敏感性埃及斑蚊或路竹白線斑蚊的品種中，在幼蟲的酯酶成分、種類或濃度都遠多於成蚊，此現象是否顯示幼蟲與成蚊對殺蟲劑的抗藥性能力有不同的差異性存在？例如：酯酶種類多表示抗藥性強？或不同酯酶間濃度高者抗藥性較強。此外，亦發現不論是敏感性埃及斑蚊或路竹白線斑蚊的品種中，幼蟲在個體間的酯酶種類差異性很大，但對於成蚊而言（不論是雄蚊或雌蚊）酯酶種類數量少且差異性較低。此結果顯示幼蟲體內酯酶成分會隨著成長化蛹為成蚊過程，逐漸整合體內酯酶種類及含量。上述結果均值得在後續的研究中進一步詳細的探討。在實驗過程中，可比較出白線斑蚊的酯酶種類或濃度均比埃及斑蚊複雜，在電泳膠片較難呈現清楚故分析難度較高，也因此分析白線斑蚊個體酯酶差異性時較為困難。為何白線斑蚊的酯酶種類或濃度比埃及斑蚊還複雜呢？根據蚊蟲分佈報導顯示白線斑蚊分佈遍及全島，而埃及斑蚊大部分生存在北迴歸線以南，推測白線斑蚊體內酯酶含量較多樣性是否提供其效能適應台灣全島變化不同的氣候型態，而得以有較廣大的分佈族群型態，推論值得在往後的實驗中再做追蹤探討。

在實驗過程中同樣的酯酶成分甚至種類、型態皆一樣者，卻有明顯發現濃度含量有所差異，推測可能的原因有〈1〉是個別蚊體之間的含量確實有差異，而造成濃度的變化；〈2〉操作者在進行萃取、研磨等實驗過程中造成部份樣品量流失所導致濃度的不同；〈3〉萃取研磨液取量的不足，造成無固定的萃取量而影響膠片上濃度呈現差異。上述狀況須在往後的實驗中多加留心注意。

在研磨萃取蚊體液的過程中，因採取在每一管的蚊體樣品中各加 10 $\mu$ l 研磨萃取液（ddH<sub>2</sub>O）的方式但發現在萃取時部分雌蚊的萃取量會較為不足，但雄蚊卻無此情形，推測可能的原因：〈1〉因雌蚊的體型較大，細胞組織成分多，如此微量的萃取液不足以

做完整的萃取，且導致萃取液濃度過於黏稠，於離心後無法取得與雄蚊等量得萃取上清液；〈2〉以廠牌：Glas-Col，型號：099C S62 的研磨棒進行研磨時，發現蚊體的微量組織萃取液易沾附於研磨棒上，而造成部分樣品流失。避免樣品量不足，需盡量注意收集可能沾附於研磨棒與離心管壁的微量萃取液。此外，往後亦考量在不影響電泳分析狀況下，將增加研磨液(ddH<sub>2</sub>O)的量 (>10µl)。

### 參 考 文 獻

- 游淑峰、潘建宏 1999. 登革熱為何再熱？ 大地地理雜誌，132：p126
- 羅怡珮. 1997 登革熱及其它環境害蟲鼠之防治工作手冊（編號：EPA-86-J104-09-07），
- 莊榮輝、蘇仲卿 1995. 蛋白質膠體電泳檢定法. 國立台灣大學農化學系. 生物研究中心專刊，p69-84.
- 羅怡珮. 1992. 台灣白線斑蚊抗藥性之研究，台灣大學植物病蟲害學研究所博士論文
- Curtis, C.F., and Pasteur, N. 1981. Organophosphate resistance in vector populations of the *Culex pipiens* complex. *Bull. Entomol. Res.* 71:153-.
- Georghiou, G.P., and Pasteur, N. 1978. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 71(2):201-205.
- Raymond, M., Beyssat-Arnaouty, V., Sivasubramanian, N., Mouches, C., Georghiou, G.P., and Pasteur, N. 1989. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. *J. Biochem.* 27：417-
- Oppenoorth, F.J. 1984. Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22:187-193.
- Oppenoorth, F.J., and van Asperen, K. 1985. Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Weidemann) (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.* 75:535-.
- Parker, A.G., Russell, R.J., Delves, A.C., and Oakeshott, J.G. 1991. Biochemistry and physiology of esterases in organophosphate-susceptible and -resistant strains of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Pesticide biochemistry and physiology.* 41,305-318.
- Stordeur, E. 1976. Esterases in the mosquito *Culex pipiens pipiens* L.: formal genetics and polymorphism of adult esterases. *Biochem. Genet.* 14(5/6):481-493.
- Terriere, L.C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 29:71-88.

### 計畫結果自評：

本計畫研究結果與原計畫大致相符，執行度有達成預期目標；本研究結果準備在學術期刊發表，目前在撰寫討論中。