

嘉南藥理學院教師專題研究計畫成果報告

計畫名稱：不同齡期斑紋幼蟲酯酶活性分析

計畫編號：CNIS-89-01

執行期間：88年9月1日至89年6月30日

計畫類別：個別型

整合型：

主持人：田乃月

計畫總主持人：

協同研究：

協同研究：

摘要

近年登革熱病毒藉病媒蚊(埃及斑蚊與白線斑蚊)傳播，橫行於全臺灣地區。研製各類殺蟲劑防治病媒蚊滋生，但因其體內各種酵素化學作用產生具抗藥性的新品系蚊蟲。本專題以白線斑蚊進行研究，瞭解其生長發育情形，並分析比較其幼蟲體內所含之酯酶存在狀況與活性。經由蛋白質電泳分離及染色實驗，結果顯示不同採樣來源的白線斑蚊的幼蟲所含之酯酶狀況及種類有差異性存在，推判可能已有抗藥性因素存在，可再深入探討。另外以不同受質作 Esterase 染色顯現所採樣的白線斑蚊酯酶種類存在差異性；至於不同齡期的白線斑蚊及蛹體內均呈現有相似的酯酶種類與活性。

關鍵字：白線斑蚊，酯酶

前言

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。

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。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)。本研究乃針對白線斑蚊幼蟲研究其體內酯酶含量、種類及性質等特性，欲了解不同齡期的白線斑蚊幼蟲其間是否有差異，及是否與斑蚊的抗藥性有相關。

本文

材料與方法

(一) 研究對象之選取

本實驗研究對象為白線斑蚊，採樣來源計有兩種：(1)從本校校園中某一棄置積水的塑膠水筒中所撈取而來的幼蟲，定名：嘉藥白線斑蚊(嘉藥 AA)；(2)從大林郵局邊水溝撈取的幼蟲，定名：大林白線斑蚊(大林 AA)；兩者均持續在實驗室內進行蓄養為幼蟲或成蟲產卵，以供作實驗材料。另有敏感性白線斑蚊(NSAA)作為對照實驗。

(二) 方法

蚊蟲體液檢體樣品之萃取：取新鮮的白線斑蚊幼蟲進行研磨，在玻璃研磨器內放入幼蟲及研磨液開始研磨至解體為止。將此體液吸入至微量離心管，離心 15 分鐘 (4°C，轉速 15000 次/分鐘)。離心後再將上清液分裝成 100 μ l/管，將所製備之所有樣品，冷藏於 -20°C 中或進行不聯連續聚丙烯醯胺膠片電泳分析。電泳後進行膠片染色，採兩種不同的染色方式：Coomassie blue 染色法與 Esterase 染色法，以利日後對照之用。Coomassie blue 染色法是將膠片浸於 Coomassie blue 染劑中，需適度的搖動，使染色均勻，再將膠片浸於脫色劑中脫色數次，直到背景清澈。Esterase 染色法先將膠片浸於 Esterase 染色劑中 (30 分鐘)，並蓋上鋁箔紙隨候再浸於 70% 總酯酶固定液 (5 分鐘)，等呈色清楚後，即浸於 50% 甲醇 (5 分鐘) 中固定，同時準備玻璃紙進行封片乾燥。

結果

由於所採樣的白線斑蚊飼養繁殖實驗過程相當順利，而雌蚊的產卵率也相當可觀，由此可知實驗室所設定的生活環境頗適合此白線斑蚊的生長繁殖。

嘉藥 AA 幼蟲的總蛋白質與酯酶分析：經電泳分析完成後，將電泳膠片分別進行 Coomassie blue 染色與 Esterase 活性染色，其結果分別列為圖一 (A 與 B)；其圖一 (A) 乃是以 Coomassie blue 染色，其各列的原液來源是由嘉藥 AA 四齡幼蟲研磨上清液所取得的。結果顯示每列所呈現出總蛋白質群，其分子量大小均相同。圖一 (B) 是以 Esterase 活性染色。

經電泳分析完成後，將電泳膠片進行 Esterase 活性染色分別搭配受質 α -NA 及受質 β -NA 染色，結果依次為圖二 (A) 與圖二 (B)。其中圖二 (A) 乃是以受質 α -NA 染色，各列的原液來源是由嘉藥 AA 四齡幼蟲研磨上清液所取得的。結果顯示每列呈現出均有三群總酯酶，而每群有三條。圖二 (B) 是以受質 β -NA 染色，結果顯示每列所呈現出三群總酯酶。

以不同染色受質分析嘉藥 AA 與 NSAA 酯酶差異：經電泳分析完成後，將電泳膠片進行 Esterase 活性染色分別搭配受質 α -NA 及受質 β -NA 染色，結果依次為圖三 (A) 與圖三 (B)。其中圖三 (A) 乃是以受質 α -NA 染色，各列的原

液來源是由嘉藥 AA 及敏感性白線斑蚊四齡幼蟲研磨上清液，結果顯示每列呈現出均有三群總酯酶。圖三 (B) 以受質 β -NA 染色，結果顯示每列所呈現出三群總酯酶。但 NSAA 與嘉藥 AA 各酯酶群之蛋白質帶數有明顯不同。

以不同染色受質分析大林 AA 四齡幼蟲的酯酶差異：經電泳分析完成後，將電泳膠片進行 Esterase 活性染色分別搭配受質 α -NA 及受質 β -NA 染色，結果依次為圖四 (A) 以受質 α -NA 染色、(B) 以受質 β -NA 染色、(C) 以受質 $\alpha+\beta$ -NA 染色。結果顯示分別以受質 α -NA 與受質 β -NA 染色呈現的酯酶分布情況不同(包括蛋白質分子量大小及帶數均有差異)。

將不同齡期(孵化成幼蟲天數不同)的大林 AA 以 Esterase 活性染色配合受質 $\alpha+\beta$ -NA 呈色。結果顯示於圖五(A)(5 μ l/well)、(B) (15 μ l/well)，發現不同齡期的白線斑蚊及蛹體內均有相似的酯酶種類與活性。

討論

蛋白質是生物細胞新陳代謝及生理作用最重要的有機成分，其中又以各種酵素為催化生理反應之主要媒介，故本研究首先著重於利用不連續膠體電泳系統搭配兩種不同染色方式嘗試了解白線斑蚊體內的總蛋白質與酯酶狀況。在圖一 (A) 中發現蛋白質帶呈色有濃淺之差異情形，其原因可能有 (1) 原本實驗設計原液量的減少，取樣遞減所造成 (2) 膠片的製作過程可能疏失 (3) 因研磨儲存液在冷凍儲存時其中之蛋白質會有沉澱現象，而在配製電泳樣品時，若疏忽未將儲存液作適當攪拌所致。染色分析嘉藥 AA 體內酯酶的情形，由結果可在膠片上發現有 3 大群的酯酶帶呈現其分子量分別為 (1) 200Kda 以上 (1 條)，(2) 68~43KDa (3 條) 及 29~18.4KDa (2 條)。在此膠片亦有添加蛋白質分子量標準液 (高分子量) 進行比對，但因標準液之蛋白質不具酯酶特性，故在此染色法中無法呈現。本實驗設計欲了解，何種原液蛋白質取量最恰當，故在不同分析列中加入不同含量的研磨受質 α -NA、 β -NA 染色，取量設計依次由多至寡 (15、10、5、3、1 μ l)。酯酶染色分析後發現不同列的酯酶含量確實有多遞減；經比對後決定往後實驗分析時，採用吸取 15 μ l 的研磨儲存液，進行電泳與酯媒分析。圖二 (A 與 B) 中分別以 FBRS 搭配受質 α -NA 或 β -NA 進行染色，此圖中發現在第一與第二 well 中，呈色明顯較淡，可能因此儲存液在 -20 $^{\circ}$ C 中儲存時間較長而造成酯酶活性有衰減的現象，故認為往後實驗中應以新鮮研磨萃取液進行酯酶活性分析較佳。本膠片中依然可發現三大群的酯酶分布，分子量依次為 (1) 200KDa (3 條)、(2) 68~43KDa (2 條)、(3) 29~18.4 (3 條)；其中各群中的蛋白質帶顏色深淺不同，世因蛋白質濃度的差異有關，故表示 CNAA 體內不同分子量的酯酶濃度含量不同。圖二的 (A)、(B) 是以不同受質分開染色 (α -NA, β -NA) 但發現結果相似。

圖二與圖一 (B) 中的所分析呈現的酯酶蛋白質帶數量有所不同，圖一 (B) 中只見到一條 200Kda 左右的蛋白質，但圖二中卻可見到約有三條，推測此原因可能是圖一 (B) 的膠片跑電泳的時間較短，以致無法將所有蛋白質帶區分開來。圖三 (A 與 B) 類似與圖二 (A 與 B) 的染色方式。此圖中發現在第六與第七 well

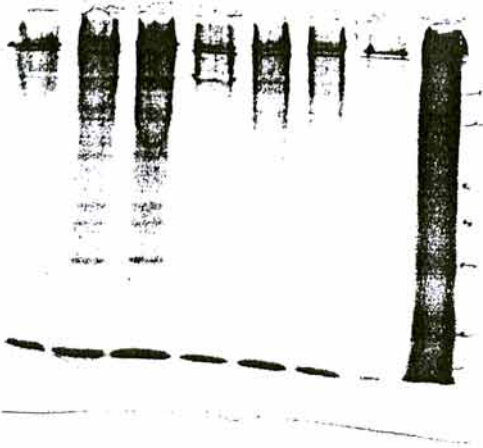
中，呈色明顯較淡，原因亦是因研磨液儲存過久，酯酶的活性衰減所致。本圖當中前半部(1~4列)主要是分布敏感性白線斑蚊(NSAA)幼蟲體內酯酶活性狀況，結果發現NSAA幼蟲亦有三大群的酯酶分布，其分子量範圍類似於嘉藥AA幼蟲，但各群酯酶的蛋白質帶數有所差異，其中在68~43Kda範圍中NSAA含有三條明顯蛋白質帶，但嘉藥AA幼蟲只有二條；而在29~18.4KDa中NSAA只有一條很明顯濃度相當濃的蛋白質帶，但CNAA卻有二條。由以上可知，CNAA與NSAA幼蟲體內的酯酶種類有所不同，故往後實驗就此項差異再深入研究探討。

參考文獻

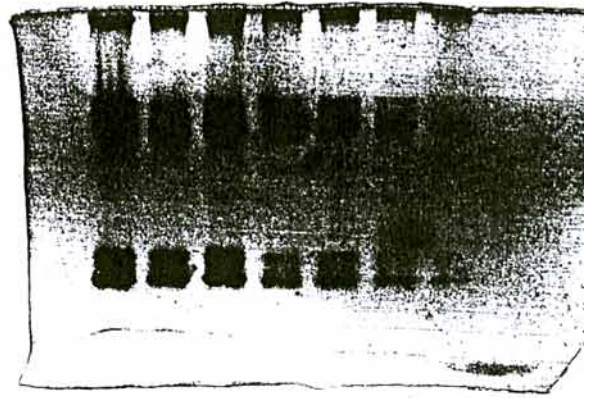
- 游淑峰，潘建宏 1999. 登革熱為何再熱？ 大地地理雜誌，132：p126
- 羅怡珮 1997. 登格熱及其它環境害蟲鼠之防治工作手冊（編號：EPA-86-J104-09-07），p7
- 莊榮輝、蘇仲卿 1995. 蛋白質膠體電泳檢定法，國立台灣大學農化學系，p69-84.
- 羅怡珮 1992. 台灣白線斑蚊抗藥性之研究，台灣大學植物病蟲害學研究所
- Oppenoorth, F.J. 1984. Biochemistry of insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22:187-193.
- Terriere, L.C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann. Rev. Entomol. 29:71-88.

圖一：

A.

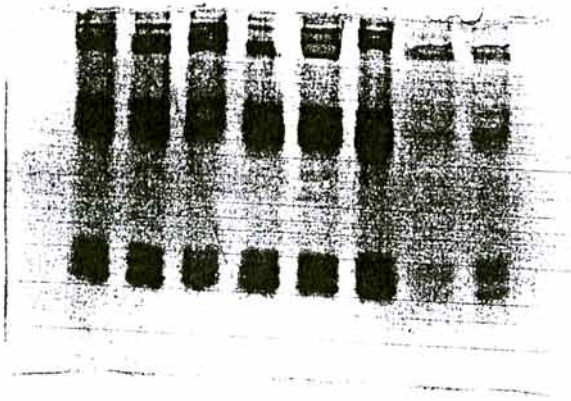


B.

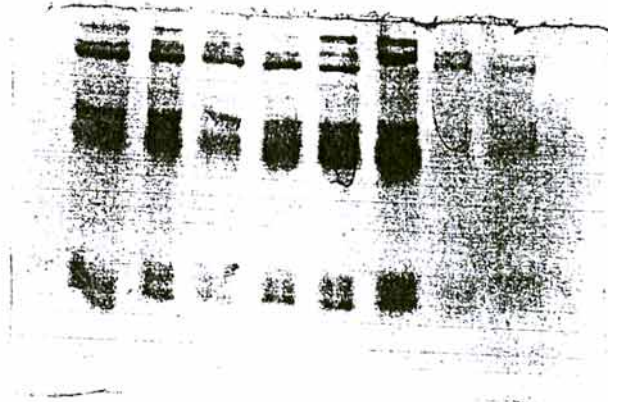


圖二：

A.

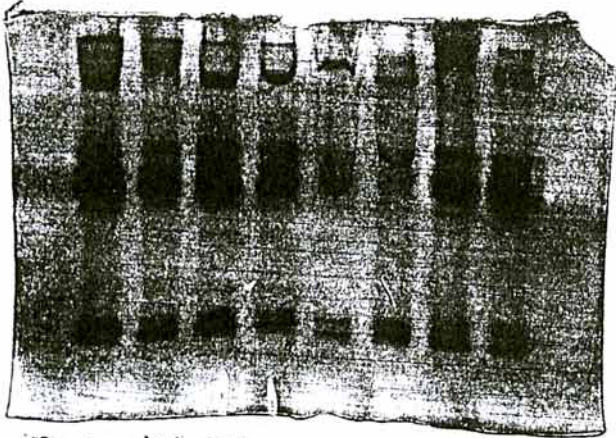


B.

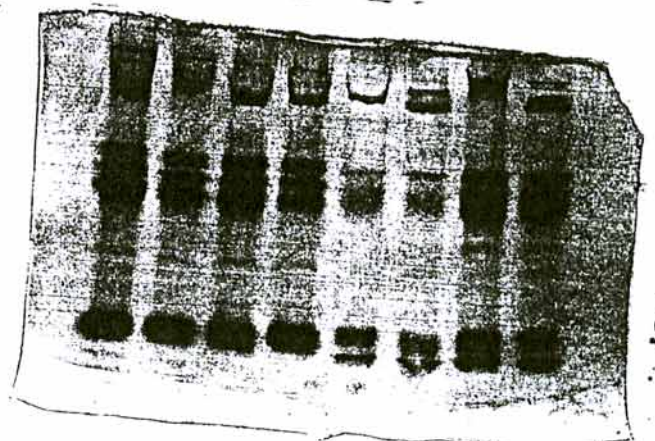


圖三：

A.

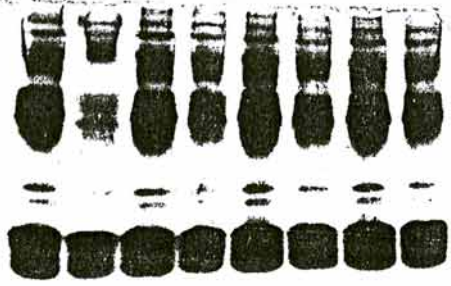


B.



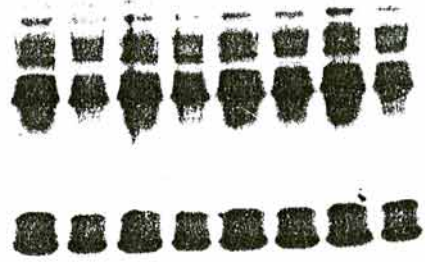
图四.

A.



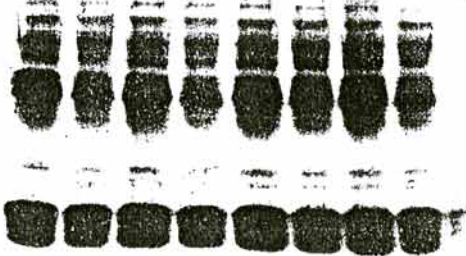
B.

X



B

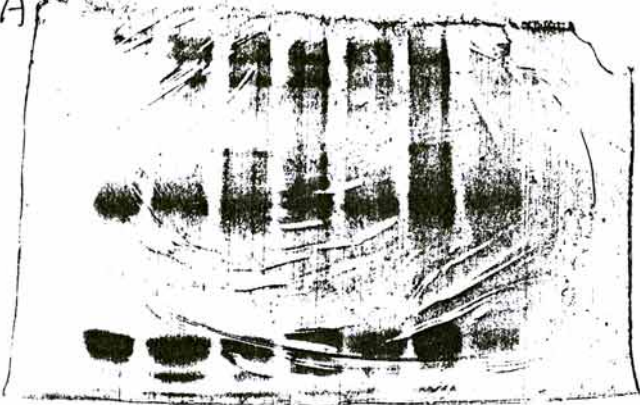
C.



X
+
B

图五.

A.



B.

