论著

文章编号:1000-5404(2014)24-2432-05

中缅边境地区部分传疟按蚊蚊种的形态学及分子鉴定

钟 敏[1,2],王 英[1],付蒙颖[1],于莎莎[1],赵 清[1] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院热带医学研究所[1];665000 云南 普洱,云南省普洱卫生学校临床教研室[2])

[摘要] **目的** 通过形态学特征和ITS2序列扩增分析对中缅边境地区部分按蚊进行蚊种鉴定,分析其传疟潜力。**方法** 从中缅边境地区采集部分按蚊标本,首先根据其形态学特征进行蚊种鉴定;然后提取基因组DNA,进行ITS2区段PCR扩增和测序;通过NCBI Blast分析所测序列与GenBank中不同按蚊的序列同源性;最后利用MEGA5软件将测序结果与GenBank中其他按蚊的ITS2序列进行序列比对,并构建系统进化树。综合以上形态学特征和分子鉴定结果,确定按蚊种类,分析其传疟潜力。**结果** 经形态学鉴定为微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊的ITS2序列分别为506、575 bp和517 bp。BLAST结果提示,根据ITS2序列进行的按蚊蚊种分子鉴定结果均与之前的形态学鉴定一致。通过与GenBank中其他按蚊的ITS2序列进行比对,系统进化树显示捕获的微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊分别形成单独的支系。**结论** 本研究综合利用传统形态学鉴定和分子生物学技术明确了中缅边境地区部分按蚊蚊种为微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊。

[关键词] 按蚊;蚊种鉴定;形态学;ITS2;疟疾

[中图法分类号] Q964;R969.442.2;R382.31 [文献标志码] A

Species identification of anopheles mosquitoes from the bordering area of China and Myanmar based on morphological and molecular characters

Zhong Min[1,2], Wang Ying[1], Fu Mengying[1], Yu Shasha[1], Zhao Qing[1] ([1]Institute of Tropical Medicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Clinical Medicine, Pu'er Health School, Pu'er, Yunnan Province, 665000, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the species of anopheles mosquitoes from the China-Myanmar bordering area based on morphological characters and sequence analysis of the second internal transcription spacer (ITS2) of ribosomal DNA. **Methods** The anopheles mosquitoes were collected from the bordering area of China and Myanmar. Firstly, the mosquito species were identified according to the morphological characters. Then, the genomic DNA was extracted from the anopheles mosquitoes. The ITS2 sequences of the anopheles mosquitoes were obtained by PCR amplification and sequencing. And the ITS2 sequences were analyzed by online BLAST method. Finally, the ITS2 sequences were aligned with their homologs of other anopheles obtained from GenBank, and the phylogenetic tree was built using MEGA5 software. **Results** The ITS2 sequence lengths of *Anopheles minimus*, *Anopheles peditaeniatus* and *Anopheles kochi* identified morphologically were 506 bp, 575 bp and 517 bp, respectively. The results of BLAST showed that the molecular identification results of the anopheles species according to the ITS2 sequences were the same as the morphological identification results. The phylogenetic tree showed that the collected *Anopheles minimus*, *Anopheles peditaeniatus* and *Anopheles kochi* formed the separate branches. **Conclusion** In the present study, some anopheles species in the bordering area of China and Myanmar are identified as *Anopheles minimus*, *Anopheles peditaeniatus* and *Anopheles kochi* by both morphological and molecular biological methods.

[基金项目] 全军后勤科研"十二五"计划面上项目(CWS12J017);国家自然科学基金面上项目(81271875);美国NIH重大国际合作课题(U19A1089672)

[通信作者] 王 英,E-mail:wangyingtmmu@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1110.009.html(2014-11-06)

[**Key words**] anopheles; mosquito species identification; morphology; internal transcription spacer; malaria

Supported by the General Program of Military Scientific Research of China (CWS12J017), the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271875) and the Major Internation Coorperation Project of National Institutes of Health, USA (U19AI089672). Corresponding author: Wang Ying, E-mail: wangyingtmmu@126.com

中缅边境地区由于其特殊的地理位置,导致疟疾常年发生。与我国云南省德宏州盈江县那邦镇隔河相望的缅甸可钦地区,是疟疾的高发区[1]。该地区是我国输入性疟疾的重要来源之一,对我国疟疾的防治工作带来了严峻的挑战。按蚊是传播疟疾等传染病的主要媒介生物,严重威胁着人类的健康。然而,不同按蚊在传疟能力上存在较大差异。因此,对当地按蚊进行蚊种鉴定,为后期开展疟疾防治工作和疾病预警具有重要意义。传统的形态学鉴定方法对鉴定者的技术水平要求高、费时费力、可能存在诊断错误等问题,且对形态上极其相似的近缘按蚊种类鉴定较为困难。核酸分子鉴定是对形态学鉴定的一个很好补充,其以生物大分子DNA为依据,从分子水平上阐明近缘种间的差别。经研究证实多拷贝的核糖体基因(ribosome DNA, rDNA)中的第二内转录间隔区(ITS2)序列具有种内高度保守、变异小的特点,可作为近缘种鉴别的分子标志。本研究综合利用传统的形态学鉴定和分子生物学技术,根据捕获按蚊的形态学特征,并通过对不同按蚊ITS2的扩增、序列分析和构建系统树,对采集于缅甸克钦地区部分按蚊进行了种类鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 利用灯诱法在缅甸克钦地区采集按蚊,选择部分按蚊进行研究。

1.1.2 试剂 Biospin组织基因组DNA提取试剂盒、PCR试剂盒和GoodView核酸染料分别购自杭州博日科技有限公司、欣百诺生物科技有限公司和赛百盛公司。

1.1.3 引物 引物由赛百盛公司合成。按蚊ITS2通用引物,序列如下:上游引物5′-TGTGAACTGCAGGACACAT-3′;下游引物5′-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3′。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 体式显微镜下观察所采集按蚊的形态学特征,根据《按蚊分类检索表》和《云南蚊类志》对按蚊种类进行鉴定。

1.2.2 单只按蚊基因组DNA的提取 将经形态学鉴定过的单只雌蚊,分别置入1 mL匀浆器中研磨,组织磨碎后,分别装入3只1.5 mL EP管中;各加入120 μL FL Buffer和2 μL PK solution,混合均匀,于56 ℃温浴2.5 h;14 000 × *g* 离心3 min;各取出100 μL的上清液至1.5 mL EP管中,各加入140 μL Binding Buffer和60 μL无水乙醇,颠倒混匀;将混合液分别转移至3只Spin Column中,10 000 × *g* 离心1 min;各加入100 μL PW Buffer,10 000 × *g* 离心30 s;各加入120 μL Wash Buffer洗涤2次,10 000 × *g* 离心30 s;再次10 000 × *g* 离心1 min后,将Spin Column分别转移至3只新的1.5 mL EP管中;各加入10 μL去离子水,并于室温静置1 min;10 000 × *g* 离心1 min 30 s,EP管中的液体即为DNA溶液。

1.2.3 ITS2区段的PCR扩增 每只PCR管加入12.5 μL SinoBio 2 × Master Mix,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL,模板5 μL,补充去离子水至25 μL反应体系。反应设置:95 ℃预变性5 min;然后95 ℃ 1 min, 42 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 共35个循环;最后72 ℃延伸10 min, 终止反应。

1.2.4 PCR产物电泳分析 分别取4 μL上述3只按蚊的PCR扩增产物和0.5 μL 10 × loading buffer混合物,3 μL 100 bp DNA Ladder依次加入1%琼脂糖凝胶电泳,紫外分析仪下观察结果并拍照。

1.2.5 PCR产物测序 将剩余的PCR产物委托上海英俊公司测定ITS2区段的序列,并提供上、下游引物各10 μL用于测序。

1.2.6 ITS2序列分析与进化树分析 用http://www.ncbi.nih.gov/blast/和Editseq提供的软件工具进行序列分析;通过Clastalx1.83软件进行序列相似性比较。在GenBank数据库中查找出其他按蚊的ITS2序列。用Clustal W软件进行多序列比对,MEGA5软件制作进化树。

2 结果

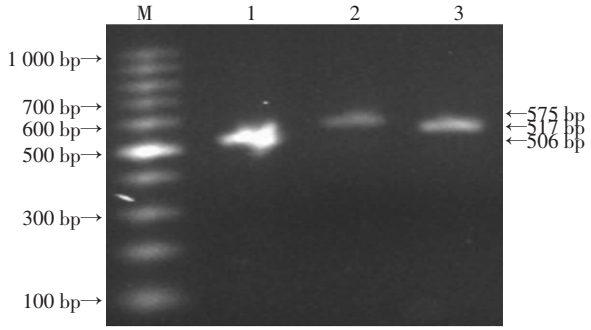
2.1 采集按蚊的形态学特征和鉴定

本研究对所采集的50只按蚊进行了形态学鉴定,根据其形态特征鉴定出了3种不同的按蚊,3种按蚊分别符合微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊的形态学特点。微小按蚊是小型至中型棕黄色按蚊,前缘脉白斑最少为4个,足股和胫节无白星斑,后足跗节无长白环,V.3大部分淡色,触须顶次白环等长,翅V6无翅缝白斑,喙一致暗色。带足按蚊是中型黑色按蚊,前缘脉白斑少于4个,触须有4个白环,唇基两侧有鳞丛后跗仅基末有白环,V6有2个黑斑,翅前缘脉基部一致暗色,后跗第1~4除有较宽的末端白环外,跗4还有基白环,第三白环的长度约为跗4全长的1/3~1/4,后跗白环宽,第三白环长约跗4全长的3/4,V.5.2通常无翅缝白斑。可赫按蚊的前缘脉有白斑4个以上,股、胫节有星斑,后足跗节Ⅲ~Ⅴ有长环,触须有黄、白、黑三色环,腹节Ⅱ~Ⅶ腹面有黑鳞丛。

2.2 ITS2区段的PCR扩增产物电泳结果

取上述3种按蚊各2~3只(实验重复),进行单只按蚊基

因组 DNA 的提取和 PCR 扩增。根据条带显示:以微小按蚊基因组 DNA 为模板扩增出 500～600 bp 之间的单一条带,以带足按蚊基因组 DNA 为模板扩增出 600～700 bp 之间的单一条带,以可赫按蚊基因组 DNA 为模板扩增出 500～600 bp 之间的单一条带(图 1)。



M:1 000 DNA 标准;1:微小按蚊 ITS2 区段 PCR 扩增结果;2:带足按蚊 ITS2 区段 PCR 扩增结果;3:可赫按蚊 ITS2 区段 PCR 扩增结果

图 1 微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊 rDNA ITS2 扩增结果

2.3 ITS2 区段的序列与同源性比较

对每只按蚊进行正反双向测序,拼接后获得可靠 ITS2 序列。各实验重复之间,序列相同。测序结果显示微小按蚊 ITS2 序列长 506 bp,带足按蚊 ITS2 序列长 575 bp,可赫按蚊 ITS2 序列长 517 bp。3 种按蚊 ITS2 序列进行对比排序,显示出 3 种按蚊在碱基组成上存在多态性(图 2)。

将拼接后的序列通过 NCBI Blast 分析结果显示,所测的微小按蚊 ITS2 序列与 GenBank 数据库中微小按蚊(FN646403)和微小按蚊 A(AF230461)ITS2 序列的同源性均为 99%;所测的带足按蚊 ITS2 序列与 GenBank 数据库中带足按蚊(AF543862)ITS2 序列的同源性为 99%;所测的可赫按蚊 ITS2 序列与 GenBank 数据库中可赫按蚊(EU650424)ITS2 序列的同源性为 99%。

在 GenBank 数据库中查找出中华按蚊、嗜人按蚊、微小按蚊、大劣按蚊、斯氏按蚊、冈比亚按蚊、溪流按蚊、五斑按蚊、萨氏按蚊、林氏按蚊、带棒按蚊、米赛按蚊、可赫按蚊、带足按蚊的 ITS2 序列。用 Clustal W 软件进行多序列比对,MEGA5 软件构建进化树(图 3)。由系统进化树图形可以看出微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊 ITS2 序列各单独形成一簇。

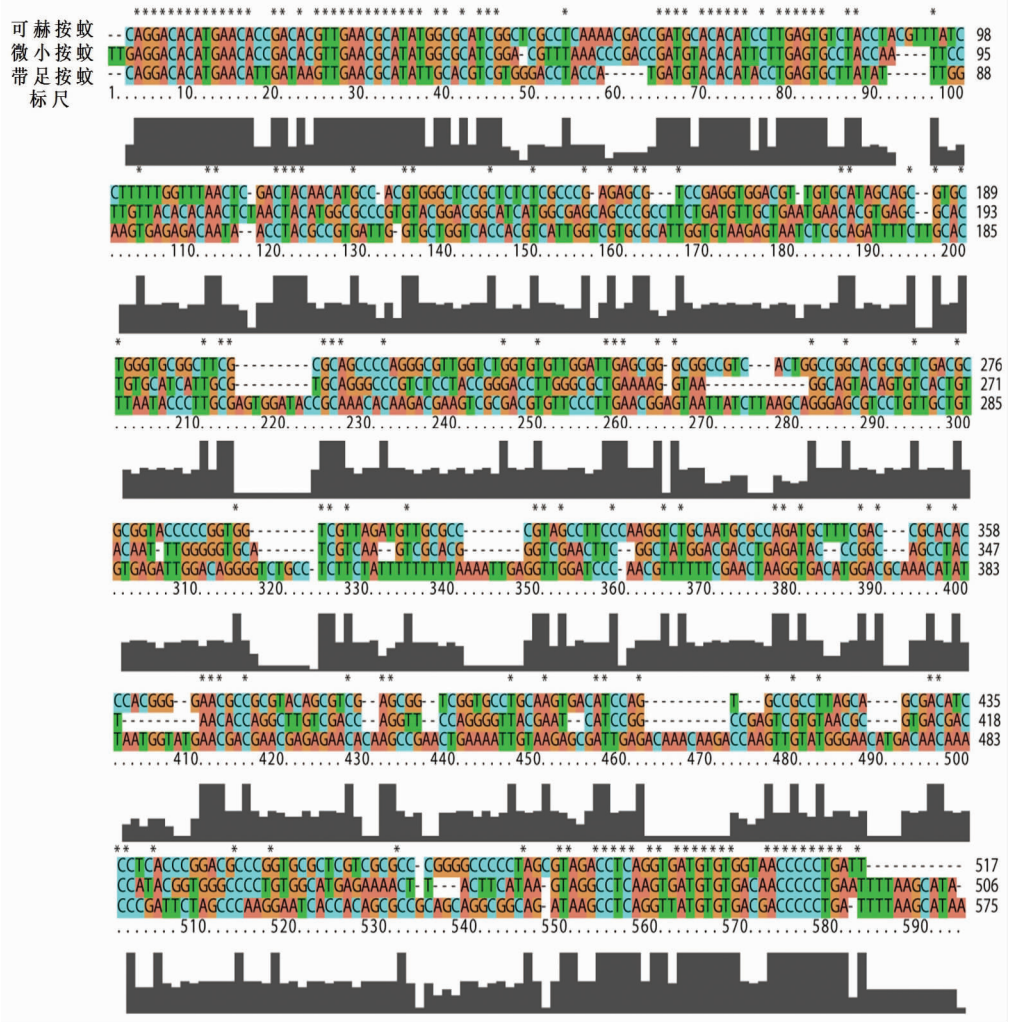
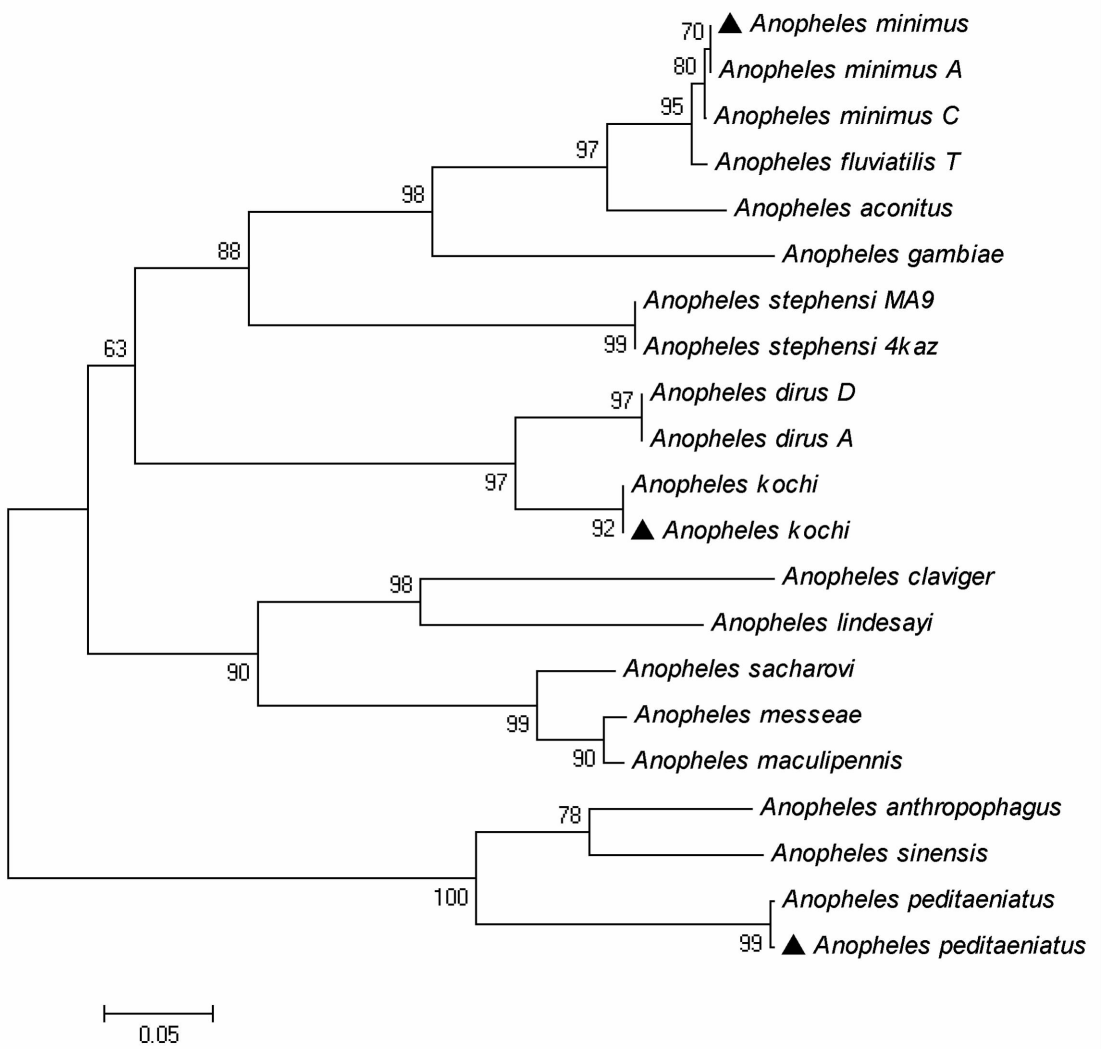


图 2 微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊的 rDNA ITS2 序列比较



An. minimus A，微小按蚊 A 株 ITS2（AF230461）；An. minimus C，微小按蚊 C 株 ITS2（AF416784）；An. fluviatilis T，溪流按蚊 T ITS2（AY953514）；An. aconitus，乌头按蚊 ITS2（AJ626947）；An. gambiae，冈比亚按蚊 ITS2（X67157）；An. stephensi MA9，斯氏按蚊 MA9 ITS2（AY365049）；An. stephensi 4kaz，斯氏按蚊 4kaz ITS2（AY702486）；An. dirus D，大劣按蚊 D ITS2（U60411）；An. dirus A，大劣按蚊 A ITS2（U60410）；An. kochi，可赫按蚊 ITS2（EU650424）；An. claviger，带棒按蚊 ITS2（AJ555157）；An. lindesayi，林氏按蚊 ITS2（AJ620898）；An. sacharovi，萨氏按蚊 ITS2（AM269899）；An. messeae，米赛按蚊 ITS2（AM409783）；An. maculipennis，五斑按蚊 ITS2（AM269898）；An. anthropophagus，嗜人按蚊 ITS2（AY803801）；An. sinensis，中华按蚊 ITS2（AY316156）；An. peditaeniatus，带足按蚊（AF543862）；除了带三角形符号来自于实验结果的微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊以外，其余按蚊 ITS2 序列均自 GenBank 中获取；序列比对进行约 5 000 次，进化树数值是比对成功的百分率

图3 微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊 ITS2 序列及其他按蚊 ITS2 序列之间的分子进化树

3 讨论

目前，按蚊种类的鉴定主要依赖于传统的形态学方法和 ITS2 等分子鉴定技术。形态学鉴定虽存在前述的不足，但对仪器设备和技术方法的要求较低，操作方便，适合于野外工作的蚊种初步鉴定。此外，对于 GenBank 中缺乏序列信息的蚊种鉴定以及新蚊种的发现，尚离不开形态学鉴定方法。分子技术在研究蚊种种群动态时可作为提供重要信息强有力的工具，它能够详细地阐明其中一种蚊种的媒介能量、基因组成及地理学起源等[2-4]。其中多拷贝的核糖体 DNA（RibosomeDNA，rDNA），主要由 5.8S、18S 和 28S RNA 编码区、基因间隔区（IGS）、第一、第二内转录间隔区（ITS1、ITS2）和外转录间隔区（EST）组成，编码区的序列高度保守，间隔区的序列存在种间差异。应用 rDNA 内 ITS2 区段在种内变异很小，而其在种间变异很大的原理，可用作蚊媒种属鉴别的分子遗传学标志[5]。这两类方法各有优缺点，本研究综合应用形态

学鉴定和分子鉴定两种方法进行了按蚊种类鉴定,取长补短,明确了中缅边境地区的部分按蚊的蚊种,为今后更有针对性地开展蚊虫防治和疾病预警奠定了基础。

本研究首先对在缅甸克钦邦边境地区捕获的部分按蚊进行了形态学鉴定,结果显示其中部分按蚊符合微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊的形态学特征。继而,对这3种按蚊进行了DNA提取、ITS2区段PCR扩增和测序,通过NCBI Blast方法分析了所测得序列与GenBank中不同按蚊ITS2的序列同源性,进一步确定了蚊种,确定这3种按蚊蚊种均与形态学鉴定一致。将这3种按蚊ITS2序列与从GenBank中获取的其他按蚊ITS2序列进行多序列比对,建立系统进化树;根据进化树图形可以看出微小按蚊、带足按蚊及可赫按蚊ITS2序列形成独立的三簇,提示3种按蚊具有不同的基因型,但其中微小按蚊和可赫按蚊的亲缘性较带足按蚊更近。进化树在生物学中,用来表示物种之间的进化关系。我们根据各类生物间的亲缘关系的远近,把各类生物安置在有分枝的树状的图表上,简明地表示了生物的进化历程和亲缘关系。本研究结果提示,我们所发现鉴定的微小按蚊与微小按蚊A株亲缘关系最近,其次是微小按蚊的其他株,与溪流按蚊和乌头按蚊亲缘关系也较近;带足按蚊则与中华按蚊和嗜人按蚊有着很近的亲缘关系;可赫按蚊与大劣按蚊有着较近的亲缘关系。此外,本研究中的进化树在BLAST的结果基础上,也更为直观地证实了蚊种分子鉴定的结果。

本研究综合利用形态学和分子生物学技术,鉴定出了在中缅边境地区存在的3种按蚊。Bashar等[6]在微小按蚊、带足按蚊和可赫按蚊唾液腺中检测到了疟原虫子孢子的存在,提示这3种按蚊均可以作为疟疾的传播媒介。因此,在疟疾的防治工作中,应加强对这3种按蚊消长动态的监测和传播阻断的研究。尤其应着重对微小按蚊的防治,因为本课题组前期研究发现,微小按蚊是中缅边境地区的最优势按蚊蚊种,带足按蚊也较为常见,可赫按蚊相对较少见到;此外,在当地微小按蚊体内已发现疟原虫子孢子的存在,按蚊的携带率约为1%,这提示微小按蚊可能是该地区的主要传疟媒介[7]。近年来报道过有关微小按蚊复合体分类基础上的传疟作用[8]等。Trung等[9]的调查发现,微小按蚊A较微小按蚊C有较高的嗜人血习性和经产率,微小按蚊A的传疟作用高于微小按蚊C。本研究进一步确定了该地区的微小按蚊是A株,因此对于中缅边境地区微小按蚊在疟疾传播上的作用和特点值得进一步研究。本研究提示,在缅甸可钦地区至少同时存在这3种传疟媒介,它们在该地区的疟疾传播能量、作用及特点,有待于进一步深入研究。本研究利用形态学方法和分子生物学技术对该地区部分按蚊的准确定种,为进一步研究当地按蚊的生态习性、行为特征和传疟能力等提供了基础资料,同时也为当地后期开展疟疾防治工作和疾病的预警提供重要参考。

参考文献:

[1] Li N, Parker D M, Yang Z, *et al*. Risk factors associated with slide positivity among febrile patients in a conflict zone of north-eastern Myanmar along the China-Myanmar border[J]. Malar J, 2013, 12: 361.

[2] Stump A D, Fitzpatrick M C, Lobo N F, *et al*. Centromere-proximal differentiation and speciation in Anopheles gambiae[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(44): 15930-15935.

[3] Boakye D A, Adasi K, Appawu M, *et al*. Patterns of household insecticide use and pyrethroid resistance in Anopheles gambiae sensu stricto (Diptera: Culicidae) within the Accra metropolis of Ghana[J]. African Entomology, 2009, 17(2): 125-130.

[4] Pinto J, Lynd A, Vicente J L, *et al*. Multiple origins of knockdown resistance mutations in the Afrotropical mosquito vector Anopheles gambiae[J]. PLoS One, 2007, 2(11): e1243.

[5] 耿艺介, 高世同, 黄达娜, 等. 淡色库蚊rDNA-ITS2基因的克隆分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(9): 887-890.

[6] Bashar K, Tuno N, Ahmed T U, *et al*. False positivity of circumsporozoite protein (CSP)-ELISA in zoophilic anophelines in Bangladesh[J]. Acta Trop, 2013, 125(2): 220-225.

[7] Yu G, Yan G, Zhang N, *et al*. The Anopheles community and the role of Anopheles minimus on malaria transmission on the China-Myanmar border[J]. Parasit Vectors, 2013, 6(1): 264.

[8] 郑彬, 汤林华, 马雅军, 等. 云南微小按蚊A和C栖性的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(3): 146-149.

[9] Trung H D, Van-Bortel W, Sochantha T, *et al*. Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia[J]. Trop Med Int Health, 2004, 9(2): 230-237.

(**收稿**:2014-08-21;**修回**:2014-09-29)

(编辑 张 维)