

• 研究进展 •

分子生物学技术在按蚊近缘种鉴定的应用进展

钟敏^{1,2}, 蔺应学³, 王英^{1*}

1.第三军医大学军事预防医学院热带医学研究所,重庆 400038;2.云南省普洱卫生学校,云南 普洱 665000;

3.德宏州盈江县疾病预防控制中心,云南 德宏 679300

摘要:按蚊是传播疟疾等疾病的主要媒介生物,按蚊属包括几个甚至十几个近缘种组成的复合体,某些近缘种之间的形态极其相似,但其生态习性却明显不同,传病能力也有显著差异,因此正确进行蚊种鉴定对疾病预警等非常重要。单纯靠传统的形态学鉴定已不能满足按蚊近缘种和种内变异鉴别的需要,近年来,分子生物学技术在鉴定按蚊近缘种方面已成为研究的热点,本文就PCR技术、DNA探针、RAPD、RFLP、分子标志等分子生物学技术在按蚊近缘种鉴定的应用进展进行综述。

关键词:分子生物学技术;按蚊;种鉴定

中图分类号:R384.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2014)12-1529-04

Progress of the application of molecular biological techniques in identification of sibling anopheline species

ZHONG Min^{1,2}, LIN Ying-xue³, WANG Ying¹

1. Institute of Tropical Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; P. R. China;

2. Puer Health School, Puer 665000, Yunnan, P. R China;

Corresponding author: WANG Ying, E-mail: wangyingtmmu@126.com

Abstract: Anopheline mosquitoes are the main vectors for transmission of malaria and other diseases. Anopheline mosquitoes include some complexes consisting of several sibling species. The morphologic features of some sibling species are very similar. However, their ecological habits and vector capacities are distinctly different. So, accurate identification of mosquito species is particularly important to early warning of infectious diseases. The traditional morphological identification method can't meet the requirement of species identification of sibling anopheles and intraspecific variation. In recent years, more and more researches were focused on anopheline species identification using molecular biological techniques. The progress of application of molecular biological techniques such as PCR, DNA probe, RAPD, RFLP, molecular markers, etc. in identification of sibling Anopheline species are summarized in this paper.

Key words: Molecular biological technique; Anopheles; Species identification

按蚊属是按蚊亚科中最大的属,已记录的有近500种^[1],其中一些按蚊物种可以传播疟疾、丝虫病等疾病^[2],严重地威胁着人类的健康。以往常用形态学方法来鉴定按蚊的种类,即依靠长期进行媒介生物形态鉴定的专业人员和形态学鉴定专家根据医学媒介分类检索表,对其卵、幼虫、蛹及成虫进行种类鉴定,因此该方法存在着鉴定人员数量有限、鉴定周期长、鉴定效率低等问题。按蚊属包括由几个甚至十几个近缘种组成的复合体,它们虽然形态相似,但不同按蚊在生态习性、疾病传播等方面可能存在显著差异。由于按蚊复合体近缘种和种内变异的出现,因此单纯运用形态学方法进行蚊种鉴定已不可靠。近年来,分子生物学技术在按蚊近缘种鉴定方面取得突飞猛进的发展。分子生物学技术是以生物大分子DNA为依据,从分子水平上阐明近缘种间的差别,主要包括聚

合酶链反应(PCR)技术、DNA探针技术、随机引物扩增多态性DNA(RAPD)、基因测序、限制性酶切片段多态性(RFLP)技术,以及引入多种分子标志如微卫星DNA、线粒体基因(COI、COII)和核糖体基因(ITS1、ITS2)等。

1 聚合酶链反应技术

聚合酶链反应技术(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种酶促扩增反应,通过对特定的DNA片段解链-退火-延伸等步骤的多次循环,使特定的DNA片段得到大量扩增,然后对片段进行序列分析,比较其碱基差异和序列长度,可对蚊种进行有效、准确地鉴定。以往报道中,已有大量采用PCR技术对按蚊复合体进行分类的研究,但对近缘种进行鉴别时采用合适的目的片段则显得至关重要。经研究证实多拷贝的核糖体基因(Ribosome DNA, rDNA)中的第二内

基金项目:军队课题(No.CWS12J017);国家自然科学基金(No.81271875)

作者简介:钟敏(1981~),女,硕士,研究方向:蚊种的分子鉴定和生物防治。

***通讯作者:**王英, E-mail: wangyingtmmu@126.com

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。陈国英^[3]等对现场捕获的181只按蚊分别进行了形态特征鉴别和基因鉴别及比较,通过对ITS2区段的PCR扩增鉴定出了形态学方法未发现的八代按蚊;PCR扩增结果显示嗜人按蚊、中华按蚊、八代按蚊样本的扩增产物大小分别约为400 bp、250 bp和550 bp。PCR技术是目前最为常用的一项分子生物学技术,原理简单,操作简便,敏感性高,所需蚊虫标本材料少(单只按蚊或部分组织即可),不受蚊虫虫期、性别的影响。此外,利用PCR技术可快速、批量地对不同按蚊进行分子鉴定,省时省力,且较形态学鉴定方法更为准确。PCR技术已被广泛应用于蚊虫近缘种的分类鉴定中。

2 DNA探针技术

DNA是生物遗传信息的载体,在不同蚊虫种类中有特异的DNA片段,将其进行克隆、纯化,制成DNA探针,可用于按蚊复合体近缘种的鉴别。DNA探针技术对蚊种鉴别显示出高度的特异性、精确性和敏感性。刘斌^[4]等应用光敏生物素标记的质粒pAD-320插入片断,只与海南大劣按蚊基因组DNA发生杂交反应,与其他蚊种杂交反应均呈阴性。用光敏生物素标记质粒pAD-320,其最大优点是放射性污染,方法简单,快速可靠,易于重复,标记好的探针稳定性好,在大劣按蚊的实验室研究和流行病学调查中,有较好的应用前途。在Cooper等^[5]对刻点按蚊复合体(*An. punctulatus* complex)、Cockburn等^[6]对四斑按蚊复合体(*An. quadrimaculatus* complex)、Copeland等^[7]对巴拉巴按蚊复合体(*An. balabacensis* complex)进行蚊虫近缘种分类研究中,均利用了DNA探针技术。

3 随机引物扩增多态性DNA

随机引物扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术是在PCR基础上发展起来的一种新方法,由于不同物种的基因组中与引物相匹配的碱基序列的空间位置和数目均有不同,因此扩增产物的大小和数量也可能存在差异,这些差异则可以通过凝胶电泳显示出来。扩增产物具有种间多态性和种内多态性,可用于分类和系统发育关系分析。卢钟山^[8]等通过随机引物多态性DNA(RAPD)技术获取四川、云南、江苏等三个不同分布区嗜人按蚊的DNA指纹图谱,比较嗜人按蚊不同地理株基因组DNA的多态性,结果显示各地理区域嗜人按蚊之间的DNA片段在绝大部分相同的情况下存在差异。金玉明^[9]等对收集自海南、四川、江苏的嗜人按蚊标本,通过蚊基因组DNA的提取纯化及RAPD-PCR扩增和产物检测,最终筛选出3条引物并制定出稳定的

RAPD图谱,结果显示三地嗜人按蚊绝大部分谱带完全相同,但其中又存在明显不同的谱带,可以确定三地嗜人按蚊存在种型差异。王学忠^[10]等用随机扩增多态DNA(RAPD)对来自泰国、广西、云南3个不同地理区域的30只微小按蚊进行分析,构建分子系统树,进而可以看出来自不同地理群体的微小按蚊的遗传关系。RAPD技术可在缺乏分子生物学背景材料的情况下开展工作,所需DNA材料极微量,并可高效、低耗费地找出生物遗传学标志。RAPD技术是一种快速、灵敏、简便的检测技术,已被广泛应用于种群、种型鉴定、遗传作图及遗传多样性分析^[11]。

4 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术

聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)是在扩增特定DNA片段后,选用限制性内切酶进行酶切,根据酶切片段的大小差异鉴定蚊种,该方法也是在已知蚊种分子背景前提下建立的,不仅适用于种间分类,还可作为按蚊不同地理株种下分化的重要指标。由于按蚊核糖体DNA内的ITS2序列具有种内变异小、种间差异大的特点,所以目前多采用扩增rDNA-ITS2序列片段后行限制性内切酶酶切,根据酶切片段差异鉴定蚊种。高琪^[12]等依据rDNA-ITS2区段基因特征建立的PCR-RFLP技术用于嗜人按蚊和中华按蚊的基因鉴别,结果显示辽宁可疑嗜人按蚊的基因与嗜人按蚊属同种,广东珠海可疑嗜人按蚊的基因与中华按蚊属同种。Cienfuegos AV^[13]等运用ITS2-PCR-RFLP能够有效地鉴别来自哥伦比亚北部和西部的按蚊物种,尤其是在形态学上相似的物种。周华云^[14]等应用聚合酶链式反应连接的限制性片段长度多态性方法(PCR-RFLP)技术,对辽宁省现场捕获的按蚊用特异性ITS2引物进行PCR扩增,限制性内切酶Rsa I和Hinf I消化,琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示中华按蚊的PCR扩增产物能被限制性内切酶Rsa I酶切成350bp和200bp两条酶切DNA条带;嗜人按蚊核糖体DNA(rDNA)的PCR扩增产物能被限制性内切酶Hinf I酶切成410bp的酶切DNA条带;雷氏按蚊的ITS2基因PCR扩增产物能分别被限制性内切酶Rsa I和Hinf I酶切,分别显示350bp和400bp的酶切DNA条带;八代按蚊的PCR扩增产物没有显示明显的限制性内切酶Rsa I或Hinf I酶切条带,说明依据rDNA的ITS2区段基因特征建立的PCR-RFLP技术可用于鉴别赫坎按蚊种团的中华按蚊、嗜人按蚊、雷氏按蚊和八代按蚊4个近缘种按蚊。徐岁^[15]等对赫坎按蚊复合体的嗜人按蚊、雷氏按蚊、中华按蚊、八代按蚊4个近缘种按

蚊 rDNA 基因的 ITS2 区段序列进行限制性内切酶酶切位点预测分析,选择特异性内切酶,建立一种能同时鉴别 4 种近缘种按蚊的聚合酶链反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)单酶切法鉴别技术,并对现场捕获的 452 只按蚊样本进行基因鉴别,结果显示新建立的 PCR-RFLP Dde I 单酶切法基因鉴别技术可准确鉴别赫坎按蚊复合体,比传统的形态学鉴别更为简便、可靠,适合用于复合媒介地区的媒介监测。

5 分子标志

分子标志是在应用分子生物学进行近缘种鉴别中引入的,其具有合适的进化速率、能提供足够的遗传信息、为所有研究对象共有、重复性好、易于扩增、测序或检测等。

5.1 mtDNA-COI mtDNA 为双链闭环分子,位于核外,昆虫的 mtDNA 约为 15.4~16.3kb,包括:2 个核糖体 RNA(12SrRNA,16SrRNA)、22 个 tRNA、1 个细胞色素 b (cytochrome b,cytb)、3 个细胞色素氧化酶亚单位(CO I、CO II、CO III)、6 个 NADH 脱氢酶(ND1-6)和 2 个 ATP 酶(6 和 8)的编码基因,以及包含复制启动子的非编码区段。线粒体细胞色素氧化酶亚基(mtDNA-COI)是编码线粒体细胞色素 3 个氧化酶亚单位中最大最保守的基因片段^[16]。武松^[17]等用 PCR 扩增 mtDNA-COI 基因序列全长约 645~660bp,平均 G+C 含量为 29.1%,A+T 含量为 70.9%,根据 mtDNA-COI 基因序列,采用不同方法构建的多斑按蚊复合体系统进化树结果基本一致,说明该基因序列适用于多斑按蚊复合体分析系统学分析。王冬^[18]等应用线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚单位 I(mtDNA-COI)基因序列特征阐明我国大劣按蚊 A、D 群体的遗传差异和分化水平,采用 mtDNA-COI 基因中长度为 959bp 的片段进行遗传差异和群体结构分析,结果表明我国大劣按蚊 A、D 群体之间的遗传差异较小,个体间的分化水平较高。Chavshin AR^[19]等收集自伊朗南部疟疾流行的不同地区的按蚊,进行 mtDNA-COI/COII 序列分析结果表明蚊种当中没有发现遗传变异,三种蚊种以相同的序列出现说明这些已知的蚊种原本属于一个独立的分类单元。目前依赖于遗传变异的 COI 基因建立的 DNA 条码技术,已被确定为在鉴定各种无脊椎动物和脊椎动物物种的一种可靠方法^[20]。

5.2 rDNA-ITS2 在蚊虫近缘种的鉴别和系统关系分析中应用较为成功和理想的分类指标是多拷贝的核糖体 DNA(RibosomeDNA, rDNA),其主要由 18S、5.8S 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^[21]。孙恩涛^[22]等对大劣按蚊和斯氏按蚊 ITS2 基因进行 PCR 扩增,PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析(RFLP)和基因测序,测序结果表明大劣按蚊和斯氏按蚊 ITS2 序列分别为 715bp 和 466bp,且两种按蚊 ITS2 序列的 GC 含量和简单重复序列等特征存在明显差异,两者碱基差异水平为 53.5%;分子进化树显示,大劣按蚊和斯氏按蚊形成单独的支系。周水森^[23]等对我国不同地区微小按蚊提取 DNA,PCR 特异扩增 rDNA-ITS2 片段,并对其扩增产物纯化、测序及分析,结果发现 2 种不同的 ITS2 序列,分别与微小按蚊 A 和 C 同源,ITS2 序列长度及 GC 含量分别为 481 bp, 54.04% 和 483 bp, 54.23%,两者无显著性差异;但 22 个固定位点存在碱基置换和插入/缺失,序列差异为 5.8%。结果说明研究区内微小按蚊存在 A 和 C 两个不同的亲缘种。

5.3 微卫星 DNA 微卫星 DNA 是简单、高度重复的 DNA 序列,广泛分布于真核生物的基因组中,不仅存在于内含子,也存在于编码区和染色体上的其他区域(基因间隔区),每间隔约 10~50kb 即存在一个微卫星 DNA。微卫星 DNA 包括核心序列和两侧保守的侧翼序列,核心序列重复单元长 1~6bp,重复次数为 10~60 次,重复次数的差异导致微卫星 DNA 具高度多态性^[24]。由于微卫星 DNA 具有在群体中易检测、杂合度高、分布广,且按照孟德尔共显性方式遗传等优点,现已成为遗传学领域相关研究强有力的工具^[25]。王冬^[26]等对海南省大劣按蚊和云南省大劣按蚊 D 种样本扩增 10 个多态的微卫星 DNA 位点,等位基因数范围为 1~32 个,平均值为 3.60~25.20,说明并非所有微卫星位点在所有群体中均呈现多态性;群体的平均期望杂合度和观察杂合度的范围分别为 0.49~0.72 和 0.36~0.58;分级 AMOVA 计算结果显示,大劣按蚊群体内的变异占总变异的 103.29%,种内变异为负值(-3.97%),种间变异仅占总变异的 0.67%。结果表明大劣按蚊与大劣按蚊 D 种内和种间遗传差异均非常小,微卫星 DNA 的变异主要在个体间。

在运用分子标志进行蚊种鉴定时,有时候往往采用多种分子标志联合,进行有效地、可靠地鉴定。最新研究证实,一个新物种分化体(例如溪流按蚊复合体),用单一分子标志是不能够充分有效地鉴定所有地理区域内的分类单元,然而同时应用其他分子标志在蚊种鉴定时可能会提供更多可靠的信息^[27]。Surendran SN^[28]等应用 ITS2 和 COI 序列研究来自斯里兰卡

的浅色按蚊,发现两个不同分散的进化枝,表明浅色按蚊是由A和B两个不同物种基因组成的复合体。

6 结语

由于按蚊近缘种复合体、种内变异的出现,近缘种的鉴定已由传统的形态学鉴别上升到分子生物学技术层面,DNA作为遗传信息的载体,用DNA分子进行近缘种的鉴定是切实可行的鉴定方法,但在分子生物学技术应用过程中存在一些问题,例如RAPD-PCR技术由于引物短,存在重复性差、易产生假带及每个标记提供的信息量少等缺陷;RFLP技术由于所选的分子标记较短,突变率高,选择合适的内切酶则比较困难;ITS2序列长度超过1.5kb时,间隔区序列可能由于假基因的检出被放大等^[29],这些都是在应用不同分子生物学技术中存在的、亟待解决的问题。相信今后随着分子生物学的不断发展,会出现新的鉴定手段,采用各种不同技术,扬长避短,针对不同蚊种近缘种和种内变异形成一套完整、有效的鉴定体系,从而更加客观、科学地进行蚊种鉴定。

参考文献

- [1] 王冬,马雅军.按蚊分子群体遗传结构[J].国外医学寄生虫病分册,2004,31(5):226-228.
- [2] Ngo CT, Dubois G, Sinou V, et al. Diversity of *Anopheles* mosquitoes in Binh Phuoc and Dak Nong Provinces of Vietnam and their relation to disease [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7(1): 316-327.
- [3] 陈国英,黄光全,周华云,等.PCR技术在赫坎按蚊复合体近缘种鉴别中的应用[J].中国媒介生物学及控制杂志,2006,17(3):170-172.
- [4] 刘斌,陆晓林,刘忠湘.光敏生物素标记DNA探针检测海南大劣按蚊[J].第四军医大学学报,1996,17(1):79-80.
- [5] Cooper L, Cooper RD, Brukot TR. The *Anopheles punctulatus* complex: DNA probes for identifying the Australian species using isotopic, chromogenic and chemiluminescence detection system [J]. *Exp parasitol*, 1991, 73: 27.
- [6] Cockburn AF, Tarrant CA, Mitchell S. Use of DNA probe to distinguish sibling species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (contrib) [J]. *Klorida Entomol J Reports*, 1988, 71: 299.
- [7] Copel RS, Koros J, Ouko M, et al. Sensitivity of a ribosomal RNA gene probe for identification of life stages of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* (Diptera: Culicidae) using three storage methods [J]. *J Med Entomol*, 1992, 29: 361.
- [8] 卢钟山,田祯干,许庆华.嗜人按蚊不同地理株基因组RAPD分析[J].口岸卫生控制,2001,6(1):17-21.
- [9] 金玉明,王善青,王赛梅,等.用RAPD技术分析中国嗜人按蚊种型[J].中国寄生虫病防治杂志,2002,15(6):328-330.
- [10] 王学忠,李菊升,王丕玉,等.用随机扩增多态DNA(RAPD)区分不同地株微小按蚊[J].中国媒介生物学及控制杂志,2000,11(4):257-260.
- [11] Ballinger-Crabtree ME, Black WC 4th, Miller BR. Use of genetic polymorphisms detected by the random - amplified polymorphic and polymerase Chain reaction (RAPD - PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, 47(6): 893- 901.
- [12] 高琪,R.D.Cooper,周华云,等.用PCR-RFLP技术鉴别嗜人按蚊和中华按蚊的研究[J].中国人兽共患病杂志,2002,18(6):39-42.
- [13] Cienfuegos AV, Rosero DA, Naranjo N, et al. Evaluation of a PCR-RFLP- ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia [J]. *Acta Trop*, 2011, 118(2): 128-135.
- [14] 周华云,高琪,顾政诚,等.PCR-RFLP技术用于鉴别赫坎按蚊复合体近缘种按蚊的研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2004,16(5):367-370.
- [15] 徐岁,周华云,唐建霞,等.PCR-RFLP单酶切法鉴别赫坎按蚊复合体的研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2012,24(4):435-439.
- [16] Beard CB, Hamm DM, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects [J]. *Insect Mol Biol*, 1993, 2(2): 103-124.
- [17] 武松,黄芳,周水森,等.我国多斑按蚊复合体mtDNA-COI基因序列特征与系统发育学研究[J].中国病原生物学杂志,2013,8(2):158-172.
- [18] 王冬,马雅军,周红宁.应用mtDNA-COI基因序列研究我国大劣按蚊A、D群体的遗传差异[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2007,25(5):368-375.
- [19] Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, et al. Molecular characterization, biological forms and sporozoite rate of *Anopheles stephensi* in southern Iran [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4(1): 47-51.
- [20] Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, et al. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors [J]. *Parasites & Vectors*, 2012, 5: 44-55.
- [21] 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.
- [22] 孙恩涛,张锡林,秦志辉.大劣按蚊和斯氏按蚊核糖体基因内转录第二间隔区序列分析[J].中国人兽共患病学报,2007,23(5):445-452.
- [23] 周水森,汤林华,顾政诚,等.不同地区微小按蚊rDNA-ITS2序列差异[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,20(1):29-31.
- [24] 樊勇,马雅军.中华按蚊多态微卫星DNA位点的筛选和特征研究[J].第四军医大学学报,2008,29(17):1537-1539.
- [25] 马雅军,樊勇,吴静.雷氏按蚊多态微卫星DNA位点的筛选和特征[J].寄生虫与医学昆虫学报,2008,15(3):150-153.
- [26] 王冬,马雅军,周红宁.应用微卫星DNA标志研究我国大劣按蚊群体的遗传差异[J].中国媒介生物学及控制杂志,2010,21(2):98-101.
- [27] Naddaf SR, Razavi MR, Bahramali G. Molecular variation and distribution of *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) complex in Iran [J]. *Korean J Parasitol*, 2010, 48(3): 231-236.
- [28] Surendran SN, Sarma DK, Jude PJ, et al. Molecular characterization and identification of members of the *Anopheles subpictus* complex in Sri Lanka [J]. *Malaria Journal*, 2013, 12: 304.
- [29] Paredes-Esquivel CC, Townson H. Functional constraints and evolutionary dynamics of the repeats in the rDNA internal transcribed spacer 2 of members of the *Anopheles barbirostris* group [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7: 106-113.

收稿日期:2014-08-14 编辑:谢永慧