

微小按蚊 A、C 的 PCR 和同工酶鉴别比较研究

郑彬¹, 汤林华¹, 马雅军², 王学忠³, 周水森¹, 施文琦¹

【摘要】 目的 比较 PCR 和同工酶两种鉴别微小按蚊 A、C 亲缘种的方法。方法 将现场采集后经形态初步鉴定为微小按蚊的样本,经 PCR 产物酶切片长度多态性分析(PCR-RFLP)与乌头按蚊和杰普尔按蚊区分,等位基因特异扩增法(PCR-ASA)进一步鉴别微小按蚊 A 和 C。再将用此方法鉴别后的微小按蚊羽化 24 h 内单只虫体样本,采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳,加以辨别区分。结果 经测序验证,PCR 方法可以简单明确地将微小按蚊 A、C 加以鉴别。几种用于鉴别的同工酶中,只有酯酶(EST)同工酶对微小按蚊 A、C 具鉴别意义。结论 对于微小按蚊 A、C 的鉴别,PCR 方法明显优于同工酶方法。

【关键词】 聚合酶链反应;同工酶;微小按蚊;鉴别

中图分类号:R384.111 文献标识码:A

Comparison of PCR and Isoenzyme Analysis in Identification of *Anopheles minimus* A and C

ZHENG Bin, TANG Lin-hua, MA Ya-jun, WANG Xue-zhong, ZHOU Shui-sen, SHI Wen-qi

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To compare the PCR and isoenzyme methods in identification of *Anopheles minimus* A and C. **Methods** Samples of *An. minimus* collected in the field were identified from *An. aconitus* and *An. jeyporiensis* by PCR-RFLP after morphological examination, then classified by PCR-ASA. The mosquitoes identified by this method were further analyzed for isoenzyme to observe the difference, which was previously used as a technique to classify *An. minimus* A and C. **Results** PCR method can differentiate *An. minimus* A and C simply and quickly. For Isoenzyme method, only EST allozyme pattern displayed difference. **Conclusion** PCR method is better than isoenzyme analysis in differentiating *An. minimus* A and C.

【Key words】 PCR; Isoenzyme; *Anopheles minimus*; Identification

微小按蚊(*Anopheles minimus*)是东南亚和我国北纬 25°以南山区及丘陵地区重要的传疟媒介。20 世纪 80 年代,俞渊等^[1]根据形态和习性差异,将我国海南微小按蚊划分为 A、B 两型(后称为 species A 和 species B)。Sucharit 等^[2]对泰国微小按蚊的 7 种同工酶进行了分析,并结合形态变异,将微小按蚊分为 A、C 两个亲缘种。Sharp 等^[3]利用核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区(ribosomal DNA second internal transcribed spacer, rDNA-ITS2)序列分析,发现微小按蚊 A、C 之间的差异为 4.8%。周水森等^[4]根据对我国云南、海南、广西、泰国等不同国家和地区微小按蚊 rDNA-ITS2 序列分析,认为我国微小按蚊也存在 A、C 两个不同的亲缘种。为比较目前分类研究中应用较多的 PCR 和同工酶分析这两种鉴别微小按蚊复合体的方法何者为优,本文进行了研究。

材料与方法

1 材料

按蚊样本分别采自现场和实验室。现场微小按蚊 2003 年 8 月采自云南省元阳县,实验室样本的原采集地为云南省临沧县。单管饲养的饱血雌蚊 F1 用于实验,微小按蚊种团的乌头按蚊(*An. aconitus*)和杰普尔按蚊(*An. jeyporiensis*),在实验中用以对照,于 2003 年 7 月采自云南省勐腊县。

2 方法

所有样本经 PCR 产物酶切片长度多态性分析(PCR-RFLP),将微小按蚊与乌头按蚊、杰普尔按蚊区分,然后经等位基因特异扩增法(PCR-ASA)进一步鉴别微小按蚊 A 和 C,并随机抽样扩增和测定核糖体 DNA 28S 第 3 结构域(核糖体 28S-D3)的序列,再次进行验证。同工酶分析的样本为羽化 24 h 内的

作者单位:1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,上海 200025;
2 第二军医大学病原生物学教研室,上海 200433;
3 云南省寄生虫病防治所,思茅665000

微小按蚊雌蚊。

2.1 分子鉴别 单蚊基因组 DNA 提取采用蛋白酶 K 法^[4]。

2.1.1 PCR-RFLP 鉴别微小按蚊与乌头按蚊、杰普尔按蚊 PCR 扩增 ITS2 序列, 所用引物 ITS2A: (TGTGAACTGCAGGACACAT); ITS2B: TATGCTTAAA TTCAGGGGT^[5]。反应液中含 DNA 模板 5 μ l, 1 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 5 mmol/L KCl, 0.01% Triton-X100, 1.6 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 引物各 400 nmol/L, 1 U Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司产品)。95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 在热循环仪 (PE 480) 中循环 35 次。取 10 μ l PCR 产物为模板, 加入无菌去离子水 5.5 μ l, 10 \times Buffer B 2 μ l, 牛血清白蛋白 (BSA) 2 μ l, 内切酶 *MspI* 5 U, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2~3 h 后, 取 5 μ l 酶切产物, 加样于 2% 琼脂糖凝胶 [含 5 μ g/ml 溴化乙锭 (EB)] 电泳 30 min, 紫外灯下观察, 拍照。

2.1.2 PCR-ASA 鉴别微小按蚊 A、C 经 PCR-RFLP 方法证实为微小按蚊的样本以 PCR-ASA 方法进一步鉴别。引物为 D3 基因的通用引物 D3a: GAC-CCGTCTTGAAACACGGA, D3b: TCGGAAGGAACCAGC TACTA, 微小按蚊 A 和 C 的种特异引物 mA: GAAAC-CCACAGGCGA, mC: ACACTCGATTTGTCTGT^[6]。反应体系中含 DNA 模板 5 μ l, 1 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 5 mmol/L KCl, 0.01% Triton-X100, 1.6 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 4 种引物各 300 nmol/L, 1 U Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司产品)。95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 47 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 在热循环仪 (PE 480) 中循环 35 次。取 10 μ l PCR 产物, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 5 μ g/ml EB) 电泳, 紫外灯下观察, 拍照。

2.1.3 28S-D3 序列的测定、分析 对经以上方法鉴定的微小按蚊 A、C, 按照随机抽样的原则各抽取 5 个样品进行 PCR 扩增核糖体 28S-D3 序列, 所用引物 D3A: (GACCCGTCTTGAAACACGGA); D3b: (TCG-GAAGGAACCAGCTACTA)^[7]。反应液中含 DNA 模板 2 μ l, 1 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 5 mmol/L KCl, 0.01% Triton-X100, 1.6 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 引物各 400 nmol/L, 1 U Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司产品)。95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 在热循环仪中循环 35 次。PCR 产物直接送上海申能博彩生物制品有限公司纯化、测序 (ABI PRISM 377 DNA Sequencer), 结果与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 中基因库 (GenBank) 比对, 其序列与微小按蚊 A、C 的核糖体 28S-D3 序列完全一致。

2.2 同工酶鉴别

2.2.1 蚊虫匀浆的制备 取单只微小按蚊, 加入预冷的 30 μ l 缓冲液和 30 μ l 50% 蔗糖, 匀浆缓冲液配方参照文献^[7]。充分研磨, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 410 \times g 15 min, 取上清液加入凝胶加样槽中。

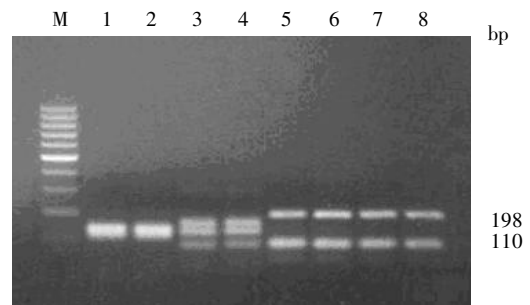
2.2.2 电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 根据 Davis 方法制备 7.5% 分离胶 (pH 8.9) 和 2.5% 浓缩胶 (pH 6.7), Tris-甘氨酸缓冲系统^[8]。电泳时的电压为: 浓缩胶 180 V, 分离胶 270 V, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内进行, 电泳时间 90 min。

2.2.3 染色 电泳结束后, 将凝胶剥离至染色液, 不同酶的染色液配方参照文献^[8-10], 37 $^{\circ}$ C 水浴染色, 待呈现染色条带后, 用 7% 醋酸脱色, 漂洗, 扫描后干胶保存。

结 果

1 PCR 鉴别

PCR-RFLP 方法鉴别微小按蚊、乌头按蚊和杰普尔按蚊的 ITS2 产物酶切后电泳图谱可见, 杰普尔按蚊和乌头按蚊与微小按蚊的酶切图谱完全不同 (图 1)。据此可将二者与微小按蚊明显区分。所有形态鉴别的微小按蚊 136 只, 与 PCR-RFLP 鉴别结果一致。



M: 100 bp 标志物, 1, 2: 杰普尔按蚊, 3, 4: 乌头按蚊, 5~8: 微小按蚊。

M: 100 bp Marker, 1, 2: *An. jeyporiensis*, 3, 4: *An. aconitus*, 5~8: *An. minimus*。

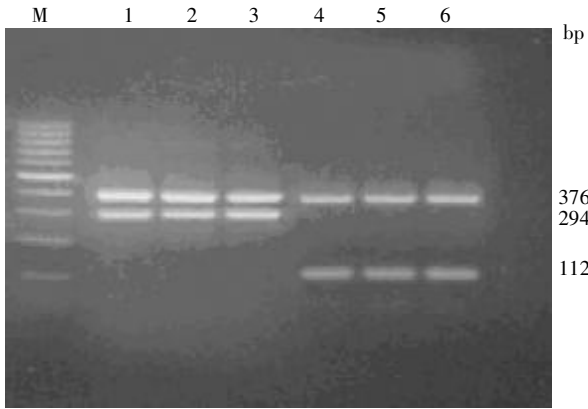
图 1 PCR-RFLP 鉴别微小按蚊与乌头按蚊、杰普尔按蚊

Fig.1 PCR-RFLP identification of *An. minimus*, *An. aconitus* and *An. jeyporiensis*

将 PCR-RFLP 区分的微小按蚊 A、C 经 PCR-ASA 扩增, 结果显示为 2 种条带类型 (图 2), 经比对, 具特异条带 294 bp 者为微小按蚊 A, 112 bp 条带者为微小按蚊 C。经 PCR-ASA 鉴别的微小按蚊 A 为 60 只, 均来自云南省临沧县实验室品系; 微小按蚊 C 为 76 只, 均来自云南省元阳县现场采集。

2 同工酶鉴别

随机选择分子鉴别为微小按蚊 A 和 C 各 20 只



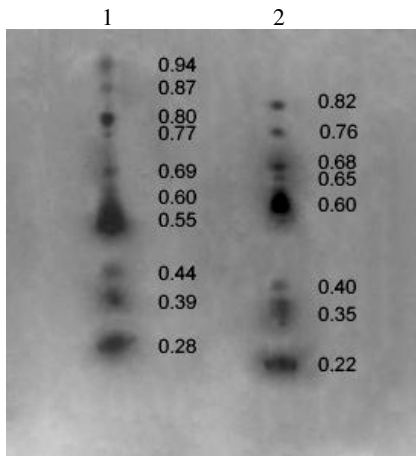
M: 100 bp 标志物, 1-3: 微小按蚊 A, 4-6: 微小按蚊 C。
M: 100 bp Marker, 1-3: *An. minimus* A, 4-6: *An. minimus* C.

图 2 PCR-ASA 鉴别微小按蚊 A 和 C

Fig.2 PCR-ASA identification of *An. minimus* A and *An. minimus* C

进行同工酶实验,观察结果。

2.1 酯酶 (EST) 微小按蚊 A 共出现 10 条酶带,其中 3 条带:Rm 0.80、0.60 和 0.55 染色较深,说明其活性较强。微小按蚊 C 共出现 8 条酶带,其中亦有 3 条;Rm 0.82、0.76 和 0.60 染色较深,余为淡染,活性较弱,较难辨认(图 3)。



1: 微小按蚊 A, 2: 微小按蚊 C。

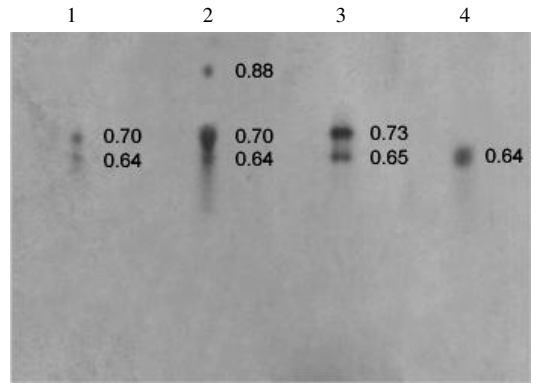
1: *An. minimus* A, 2: *An. minimus* C.

图 3 微小按蚊 EST 同工酶谱及模式图

Fig.3 Allozyme pattern of *An. minimus* A and *An. minimus* C

2.2 碱性磷酸酶(AKP) AKP 的酶谱中可见,微小按蚊 A 为 2 条酶带,Rm0.70 和 0.64,少数出现第 3 条酶带(5/20),其 Rm 为 0.88。微小按蚊 C 亦为 2 条酶带;Rm0.73 和 0.65,有个别标本(1/20)仅出现 1 条酶带,其 Rm 为 0.64(图 4)。

2.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 微小按蚊 A 和 C 的酶带相同,均为 3 条相距很近的深染带,难以辨认。



1,2: 微小按蚊 A, 3,4: 微小按蚊 C。

1,2: *An. minimus* A, 3,4: *An. minimus* C.

图 4 微小按蚊 AKP 同工酶谱及模式图

Fig.4 Allozyme figure of *An. minimus* A and *An. minimus* C

讨 论

微小按蚊与乌头按蚊、杰普尔按蚊等形态特征近似,且往往同域分布,容易混淆,但它们在疟疾传播中的作用却不同。微小按蚊又是一个复合体,其形态变异主要反映在成蚊的翅斑上,泰国和越南研究者根据具有分脉前白斑即可鉴别为微小按蚊 C 的标准对现场蚊进行分类,发现其差错率分别为 37%^[11]和 33%^[12]的错判率。Sucharit 等^[2]对泰国微小按蚊的 7 种同工酶进行了分析,除醛氧化酶和苹果酸脱氢酶外,酯酶、亮氨酸氨基肽酶、乳酸脱氢酶、苹果酸酶、黄嘌呤脱氢酶等均具酶谱的多态性,结合其前缘脉具分脉前白斑和膊白斑的变异,认为 Putoei 地区的微小按蚊有别于其他地区,定义为微小按蚊 C。但其酯酶和乳酸脱氢酶同工酶的多态性与微小按蚊 A、C 的对应关系与本文结果略有不同。俞渊等^[1]根据形态和习性差异,将我国海南微小按蚊划分为 A、B 型,并证实两者酯酶同工酶酶谱存在差异,其差异小于地理株之间的差异^[13],难以判定。但目前国内所进行的该项研究^[8-10]仅仅停留在对地理株的区分上。在媒介研究中,应用分子生物学技术研究发现,核糖体 rDNA-ITS2 序列和 28S-D3 序列成为公认的较为理想的分子鉴别指标,Sharp 等^[3]对泰国经过同工酶鉴定的微小按蚊 A、C 的 rDNA-ITS2 序列进行比较,发现了固定位点的碱基差异。周水森等^[4]通过同样方法发现我国的微小按蚊亦存在亲缘种。Chen 等^[14]通过核糖体 28S-D3 序列分析,认为俞渊等定义的微小按蚊 B 实为微小按蚊 A 的形态学变异。VanBortel 等^[5]、周水森等^[6]和 Sharp 等^[15]相继建立了以此为基础的 PCR-RFLP 和 PCR-ASA 方法以鉴别微小按蚊复合体以及与之形态相似的乌头按蚊和杰普尔按蚊。本文以此方法对微小按蚊进行鉴别并经核糖体 28S-

D3 等位基因的抽样测序检验,结果完全一致,说明此方法结果可靠。本研究在分子鉴别基础上,观察微小按蚊的同工酶中是否存在固定的,可用于亲缘种鉴别的差异。结果表明,只有 EST 同工酶存在固定差异,可用于亲缘种的区分,而 AKP 同工酶和 LDH 同工酶出现了亲缘种内部的多态性,故难以用于亲缘种的鉴别。且相对于 PCR 方法,同工酶方法对样品的要求较高,有特殊的生长时段要求,结果的判读也较为复杂,并受标本新鲜程度的限制。由此可见,PCR 方法是更为简便、可靠的用于微小按蚊 A、C 鉴别的方法。

参 考 文 献

- [1] 俞渊,李明馨.海南岛微小按蚊 *Anopheles (Cellia) minimus* Theobald, 1901 类型的研究[J].寄生虫学与寄生虫病杂志,1984,2:95.
- [2] Sucharit S, Komalamisra N, Leemingsawar LE, et al. Population-genetics studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand [J]. Med Vet Entomol, 1990, 4:25-34.
- [3] Sharp RC, Harbach RE, Butlin RK. Molecular variation and phylogeny of members of the minimus group of *Anopheles* Subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae)[J]. System Entomol, 2000,25:263-272.
- [4] 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,2002,20:29-31.
- [5] Van Bortel W, Trung HD, Roelant P, et al. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex[J]. Insect Molecular Biology. 2000,

- 9:335-340.
- [6] 周水森,汤林华,夏明仪,等.核糖体 28S-D3 等位基因特异扩增鉴别微小按蚊亲缘种 A 和 C[J].中国媒介生物学及控制杂志,2003,14:408-410.
- [7] Litvaitis MK, Nunn G, Thomas WK, et al. A molecular approach for the identification of meiofaunal turbellarians (Platyhelminthes, Turbellaria)[J]. Marine Biology. 1994,120: 437-442
- [8] 王学忠,李菊升,王丕玉.微小按蚊种团酯酶同工酶比较研究[J].实用寄生虫病杂志,2000,8:9-10
- [9] 石焕焕,何登贤.广西三地微小按蚊乳酸脱氢酶和酯酶同工酶比较研究[J].广西医科大学学报,1994,11:258-261
- [10] 田春林,石焕焕,何登贤.桂、琼、滇三地微小按蚊苹果酸脱氢酶和碱性磷酸酶同工酶谱比较研究[J].广西医科大学学报,2001,18:161-162
- [11] Green CA, Gass RF, Munstermann LE, et al. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. Med Veter Entomol[J]. 1990, 4 : 25-34.
- [12] Van Bortel W, Trung HD, Manh ND, et al. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. Trop Med Int Health[J]. 1999, 4 :257-265
- [13] 蒋成山,刘祖洞,俞渊,等.微小按蚊非特异性酯酶同工酶的研究[J].昆虫学报,1987,30:229-230
- [14] Chen B, Harbach RE, Butlin RK. Molecular and morphological studies on the *Anopheles minimus* group of mosquitoes in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status. Med Veter Entomol[J]. 2002, 16: 253-265
- [15] Sharpe RG, Hims MM, Harbach RE, et al. PCR-based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele-specific amplification and single-strand conformation polymorphism. Med Vet Entomol[J]. 1999, 13: 265-273.

(收稿日期:2004-10-11 编辑:伯韦)

文章编号:1000-7423(2005)-02-0081-01

【病例报告】

泌尿系感染铁线虫一例报告

杨增茹,包东武,梁晓燕

中图分类号:R532.5 文献标识码:D

患者,女,12岁,南阳市宛城区王庄村人。2002年10月8日晚随尿排出褐色活虫一条。次日上午将虫体装入玻璃瓶内送我室检查。肉眼观察虫体黄褐色,长约150mm,直径约1.5mm,似生锈的铁丝。将该虫放入盛自来水的玻璃皿中,可见虫体活动。室温下存活7d。取皿中沉淀物检查,未见虫卵。固定后低倍镜观察,虫体淡黄色,体壁粗糙,有褐色不规则斑块,表面有小网眼状结构,并间杂以结节状突起,突起上附着有不规划的白色鳞状物。虫体不分节,前端钝圆,顶部中央略凹陷,未见明显口器,尾部稍弯曲。鉴定为铁线虫。

铁线虫又名发形蛇,为铁线虫纲蠕虫的总称。本虫生活于沼泽、池塘、溪流、沟渠等水中,偶可感染人。感染途径可能是因接触水或饮用水时感染性幼虫(稚虫)进入人体。大多数虫体随粪便排出体外,少数经尿道排出^[1]。

铁线虫寄生泌尿系较为罕见,在人体内寄生时间最长10年以上,最短3个月^[2]。患者以女性为多,均有泌尿道刺激症状,如下腹痛、尿频、尿急、尿痛、血尿、放射性腰痛及会阴和阴道炎等^[1]。本例患者居住处有一小溪,夏季常去河中洗澡。近2~3年来消瘦、精神萎靡、夜晚烦躁难眠。自排出虫体后,患者上述症状消失。提示医生在临床上对有尿路刺激症而久治不愈的患者,在排除其他疾病的情况下,应考虑铁线虫寄生的可能。

参 考 文 献

- [1] 赵慰先,主编.人体寄生虫学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1994.967-969
- [2] 王卫民,陈广玉,朱谦,等.泌尿系长期寄生铁线虫一例报告[J].中国寄生虫病防治杂志,2001,14:19.

(收稿日期:2005-01-01 编辑:伯韦)

作者单位:南阳医学高等专科学校寄生虫学教研室,南阳473058