

文章编号:1000-7423(2001)-02-0090-03

三种蚊虫 COII 基因的克隆与序列分析

黄朝晖 王金福*

【摘要】 目的 测定和比较中华按蚊、白纹伊蚊和致倦库蚊细胞色素 C 氧化酶亚基 II(COII)基因全序列,分析 3 种蚊虫之间及与其它几种蚊虫的 COII 基因序列的同源性。方法 运用 T-A 克隆技术分别获得 3 种蚊虫的 COII 基因重组质粒,并进行 DNA 测序和结构分析。结果 3 种蚊虫 COII 基因的核苷酸序列同源性为 84.1%~87.9%,氨基酸序列的同源性为 85.1%~89.5%;C+G 含量为 23.2%~24.9%,颠换频率高于转换频率。结论 基因序列同源性比较结果显示:在 COII 分子结构,白纹伊蚊与致倦库蚊具有更近的亲缘关系。

【关键词】 中华按蚊;白纹伊蚊;致倦库蚊;COII 基因

中图分类号:R384.1

文献标识码:A

Cloning and Sequencing of Cytochrome c Oxidase II(COII) Gene of Three Species of Mosquitoes

HUANG Zhao-hui, WANG Jin-fu*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012)

【Abstract】 Objective To determine and compare the complete sequence of COII gene from *Anopheles sinensis*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* and to identify the molecular homology among these mosquitoes. **Methods** The recombinant plasmids including COII gene from the three species of mosquitoes were obtained by the T-A cloning technique, and the COII genes were sequenced and analyzed. **Results** The homology of the COII gene nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of COII among the three species of mosquitoes varied from 84.1% to 87.9% and from 85.1% to 89.5%, respectively. The C+G content of COII gene was 23.2%~24.9%, the frequency of transversion higher than that of transition. **Conclusion** *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* are closely related species at their COII molecular level according to COII gene.

【Key words】 *Anopheles sinensis*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, cytochrome c oxidase subunit II gene

* Corresponding author, E-mail: wjflu@mail.hz.zj.cn

蚊虫是危害人畜的重要医学昆虫。经过一个多世纪的研究,建立了比较完整的形态学分类系统。但由于形态学的某些局限性,难以准确地确定一些近缘种之间的进化关系。近年来,国外不少学者应用线粒体 DNA 序列分析作为一种研究昆虫系统进化关系的手段^[1],并有一些蚊虫系统进化关系研究的报道^[2,3]。

细胞色素 C 氧化酶是参与线粒体电子传递链末端氧化步骤的一种重要呼吸酶,其 3 个大亚基由线粒体 DNA(mtDNA)编码。其中氧化酶亚基 II(COII)在脊椎动物和昆虫中得到广泛研究。COII 序列具有很高的趋异性,尤其是一些双翅目和膜翅目昆虫,COII 基因序列和氨基酸序列均表现出高度的趋异性^[1]。因此在这些昆虫的进化机制及系统重建研究方面,COII 基因序列是一种非常有效的分

子标记。

本研究从采自浙江的 3 种蚊虫,中华按蚊(*Anopheles sinensis*)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)及致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)克隆了 COII 基因全片段,并进行序列测定分析,为利用 COII 基因研究我国蚊科的系统进化提供一定的依据。

材料与方法

1 蚊虫采集

中华按蚊成虫采自浙江省金华市郊罗店镇,白纹伊蚊和致倦库蚊采自杭州市古荡镇蒋村。蚊虫用 75% 乙醇浸泡, -20℃ 保存备用。

2 蚊虫 mtDNA 提取及 PCR 扩增

按 Cockburn 等^[4]方法,从每个蚊种提取约 50 只蚊虫总 DNA 直接用于 PCR 扩增。根据四斑按蚊(*An. quadrimaculatus*)COII 基因两端的 tRNA 基因序列^[5]设计引物:

作者单位:浙江大学生命科学学院,杭州 310012

* 通讯作者, E-mail: wjflu@mail.hz.zj.cn

讨 论

DNA 序列分析是鉴定生物体不同种、亚种和地理株,以及研究其系统进化关系的方法之一。COII 基因属线粒体基因,其编码的 COII 作为呼吸链的重要组分,普遍存在于原核生物和真核生物细胞的线粒体中。众多研究表明 COII 基因在双翅目昆虫进化机制和系统重建研究上是一种有效的分子标记。目前,运用 COII 基因研究蚊科昆虫系统进化的研究越来越多^[2,3]。

通过比较 3 种蚊虫 COII 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列,发现具有较高的同源性,前者的变动范围为 84.1%~87.9%,后者则为 85.1%~89.5%。将这 3 种蚊虫 COII 基因与四斑按蚊及埃及伊蚊 COII 基因加以比较,发现中华按蚊 COII 与四斑按蚊 COII 基因序列及氨基酸序列同源性分别高达 90.9% 和 97.8%^[5],白纹伊蚊与埃及伊蚊则分别为 87.3% 和 94.7%^[2];中华按蚊与致倦库蚊、白纹伊蚊与四斑按蚊的亲缘关系较远,COII 基因序列及氨基酸序列同源性分别为 84.1%、85.1% 和 83.3%、85.1%。这些差异与其种类的亲缘关系具有相关性,其中库蚊属与伊蚊属的亲缘关系较近;致倦库蚊台湾宜兰地理株 COII 基因^[2]与杭州地理株 COII 基因有 2 个核苷酸的差异,表明虽然这两个不同的地理株分化很小,但也有一定的变异。

线粒体基因 CG 含量偏低,在动物中是一普遍现象,目前对此尚无很好的解释。蚊虫 COII 基因 CG 含量大致为 22%~27%,在昆虫中(19.5%~33.1%)居于中间地位^[1]。3 种蚊虫 COII 基因间的碱基变异特点也与其它昆虫相一致,即颠换多为 A↔T,转换多为 C↔T。此外,这 3 种蚊虫 COII 基因序列间颠换数高于转换数,这与蚊虫及部分无翅类昆虫 COII 基因序列间颠换频率高于转换频率的结果相一致^[2,3,6]。

参 考 文 献

- [1] Liu H, Beckenbach A. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, 1: 41-52.
- [2] Ho CM, Liu YM, Wei YH, et al. Gene for cytochrome c oxidase subunit II in the mitochondrial DNA of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 1995, 32: 174-180.
- [3] Foley DH, Bryan JH, Yeates D, et al. Evolution and systematics of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, 9: 262-275.
- [4] Cockburn AF, Seawright JA. Techniques for mitochondrial and ribosomal DNA analysis of Anopheline mosquitoes. *J Am Mosq Contr Assoc*, 1988, 4: 261-265.
- [5] Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA. The mitochondria genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*, 1993, 36: 1058-1073.
- [6] 邵红光,张亚平,柯欣,等. 南极隐蚊 COII 基因序列及无翅类昆虫分子进化. *中国科学(C辑)*, 2000, 30: 330-336.

(收稿日期:2000-11-06 编辑:富秀兰)

【病例报告】

文章编号:1000-7423(2001)-02-0092-01

蝇蛆病一例

王能保 丁远均 司光元 任贤林

中图分类号:R384.21

文献标识码:D

患者男性,27 岁。主诉 4 年来常有轻微腹痛,腹泻,胃痛,恶心,呕吐等症状。粪便中有白芝麻样小虫数百条,曾在当地卫生院诊治,给服肠虫清、阿苯达唑治疗,效果不理想。1998、1999 年又出现排虫现象,续用上述药物治疗无效。2000 年 5 月再次排虫后,留取标本到我站鉴定。检查发现标本内有乳白色小虫 5 条,长 5~10 mm,活动力较强,圆柱

形,前突后钝,无足无眼,头端有两个黑色口沟,除头部外,分 13 节,腹部后侧有后气门一对,经鉴定此虫为腐蝇蝇蛆,诊断为蝇蛆病。用精制敌百虫 0.8 g/d,每周一次,连续 3 wk 后,症状消失,粪检未见排虫。

蝇蛆病是由于蝇类的幼虫寄生于人体的组织、器官引起的疾病,国内已有报道。本例患者自 1997 年以来,连续排虫达 3 年,由于患者反复感染蝇幼虫或虫卵所致。

作者单位:湖北省保康县卫生防疫站,保康 441600

(收稿日期:2000-11-06 编辑:庄兆农)