

## 【实验报道】

文章编号:1000-7423(2001)-02-0103-04

# 聚合酶链反应检测蚊体内马来丝虫幼虫的实验

王莹<sup>1</sup> 戴晓冬<sup>1</sup> 田晓光<sup>1</sup> 崔昱<sup>1</sup> 李杰<sup>1</sup> 袁晓东<sup>2</sup> 孙德建<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 建立一种特异、灵敏和简捷的聚合酶链反应(PCR)检测蚊体内马来丝虫幼虫的方法。方法 在应用一种新的模板纯化处理技术(Microcon 100)基础上,采用适应于检测我国马来丝虫的两套 DNA 扩增引物(P1、P2 与 P3、P4),对实验感染马来丝虫的中华按蚊进行扩增检测。**结果** 两套引物均可检出蚊体内不同发育期幼丝虫(L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub>),其灵敏度达 1 只蚊体内 1/64 条 L<sub>1</sub> 和 200 只群体蚊中含有 1 只感染蚊(体内有 1 条 L<sub>3</sub>)的水平,而对犬恶丝虫及未感染蚊却不能扩增出特异条带。**结论** 初步建立特异、灵敏和简捷的 PCR 检测蚊体内马来丝虫幼虫的方法。

**【关键词】** 马来丝虫;蚊媒;DNA;PCR

中图分类号:R383.161

文献标识码:A

## Studies on Detecting *Brugia malayi* Larva in Mosquitoes by Polymerase Chain Reaction

WANG Ying<sup>1</sup>, DAI Xiao-dong<sup>1</sup>, TIAN Xiao-guang<sup>1</sup>, CUI Yu<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, YUAN Xiao-dong<sup>2</sup>, SUN De-jian<sup>3</sup>

(1 Department of Parasitology, Dalian Medical University, Dalian 116027; 2 Takara Biotechnology Co. Ltd., Dalian 116600; 3 Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025)

**【Abstract】 Objective** To establish a specific, sensitive and simple assay for the detection of *Brugia malayi* larva in *Anopheles sinensis*. **Methods** Using a new DNA purification technique (Microcon 100) and two pairs of oligonucleotide primers (p1, p2 and p3, p4) suitable for detecting *B. malayi* in seven areas in our country, the mosquito vectors infected by *B. malayi* were detected by polymerase chain reaction(PCR). **Results** This PCR method could amplify separately a 322-basepair(bp) and a 155 bp DNA fragment and detect as few as 1/64 of one L<sub>1</sub> in 1 mosquito, the detectable limit was nearly 4 pg DNA of filarial larvae, and it could also detect 1 infected mosquito with one L<sub>3</sub> of *B. malayi* in pools of up to 200 mosquitoes. In contrast, no such specific 322 bp or 155 bp DNA band was detected in *Diofilaria immitis* and normal mosquito. **Conclusion** This PCR technique established for supervision of mosquito vector in *B. malayi* endemic areas is specific, sensitive, and simple.

**【Key words】** *Brugia malayi*, mosquito vector, DNA, PCR

目前我国丝虫病的防治已进入了消除阶段,后期疫情的监测成为丝虫病防治工作者主要的研究课题。长期以来,均以镜检蚊体内有无幼丝虫作为丝虫病疫情及蚊媒监测的主要依据,随着现代生物学检测技术的发展及丝虫病防治研究工作的深入,传统的形态学等检测方法已不能适应在低密度及低感染率情况下检测蚊媒工作的需要。为此,需探索和建立一种特异、灵敏和简捷的蚊媒监测方法,以了解丝虫病传播强度和动态。本实验是在应用一种新的模板纯化处理技术基础上,采用适应于检测我国马来丝虫的两套 DNA 扩增引物,对实验感染马来丝虫的中华按蚊进行扩增检测,取得了满意的结果。

## 材料与方法

### 1 材料

用感染马来丝虫的阳性长爪沙鼠腹腔液与正常兔血(脱纤维蛋白)混合,制成含 6~8 条微丝蚴/低倍镜视野血餐,以人胎盘膜饲血法,感染中华按蚊。于感染后 3、7 和 10 d 收集感染及未感染的蚊媒,冷冻备用;收集国内 7 个地区(安徽泾县、福建建阳、贵州独山、贵州荔波、湖北谷城、四川乐山和浙江安吉)马来丝虫成虫标本, -20℃ 冷冻;取自然感染的犬心脏内的犬恶丝虫成虫, 70% 乙醇保存备用。

### 2 方法

2.1 模板 DNA 的制备 参照伍欣星等<sup>[1]</sup>方法。常规提取马来丝虫及犬恶丝虫成虫 DNA; 丝虫蚴

作者单位:1 大连医科大学寄生虫学教研室,大连 116027;

2 宝生物工程(大连)有限公司,大连 116600; 3 中国

预防医学科学院寄生虫病研究所,上海 200025

媒DNA的常规提取：将新鲜或备用已感染和未感染马来丝虫的中华按蚊去足、翅和喙后，再按上述方法提取DNA，即粗提蚊媒DNA液。丝虫蚊媒DNA的特殊处理：①将部分蚊媒样品制成匀浆液，用李凤舞等<sup>[2]</sup>介绍的去离子水稀释法提取DNA；②将粗提DNA液用Microcon 100过滤与纯化。

丝虫幼虫DNA的提取：采用郑惠君<sup>[3]</sup>报道的沸水浴法提取离体的马来丝虫各期幼虫(L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及L<sub>3</sub>)的DNA。

## 2.2 DNA扩增

2.2.1 引物设计 第一套引物(P1和P2)是根据McReynolds等<sup>[4]</sup>报告的马来丝虫基因组11ba1序列设计，该序列目前被公认为具有布鲁丝虫属特异性。P1 5'-GCGCATAAATTCATCAGC-3'；P2 5'-GCGCAAACTTAATTACAAAAGC-3'。引物间为322 bp DNA片段。

第二套引物(P3和P4)是由计算机软件程序从第一套引物P1和P2之间DNA序列中所优选出来的。P3 5'-ATAGTTTTTCCTTCATTAGAC-3'；P4 5'-TAAAATGACAACACAATACA-3'。引物间为155 bp DNA片段。

两套引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

2.2.2 PCR反应 用上述两套引物(P1、P2与P3、P4)于2400型扩增仪中分别对各观察样本DNA进行扩增。PCR反应体系总体积为50 μl。PCR buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>等) 5 μl, 引物各50 pmol, dNTP (各2.5 mmol/L) 4 μl, 模板DNA 100 ng (对照组不加), Taq DNA聚合酶1.25 U。各反应均设一空白对照。PCR反应程序：先94℃ 5 min, 再经94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环后, 72℃ 5 min。

套式PCR(nested-PCR)扩增蚊媒DNA的两次反应条件基本同上。

2.2.3 PCR扩增产物分析 取上述扩增产物各10 μl, 置于1%琼脂糖凝胶中电泳分离, 60 V, 2 h, 电泳缓冲液为TAE。经溴化乙锭染色后, 在紫外透射仪下观察扩增条带并摄影。以DL 2000或λDNA-HindIII/EcoRI marker作为标准DNA标志物。

2.2.4 引物适应性分析 以提取的7个地区马来丝虫成虫DNA为模板, 分别用P1、P2与P3、P4作引物进行PCR扩增, 分析其扩增产物。

2.3 蚊媒DNA扩增效果的观察 分别以蚊媒粗

提DNA、经去离子水稀释的DNA及经Microcon 100纯化处理的DNA为模板进行PCR及套式PCR扩增, 分析其扩增产物。

2.4 特异性测定 以感染马来丝虫的中华按蚊为检测样本, 马来丝虫成虫、犬恶丝虫成虫及未感染马来丝虫的中华按蚊为对照样本, 分别提取上述各样本DNA, 经PCR扩增后, 分析其产物。

2.5 敏感性测定 取感染后3、7和10 d的中华按蚊, 解剖取出L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及L<sub>3</sub>各1条, 用沸水浴法提取DNA, 经PCR扩增后, 分析其扩增产物。

取蚊体内各含有1条L<sub>1</sub>的蚊20只, 提取并纯化其DNA, 用同样纯化后的未感染中华按蚊DNA液将其依次稀释, 稀释后每个蚊媒样品分别含1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32和1/64条L<sub>1</sub>, 经PCR扩增后, 分析其扩增产物。

选取体内含有1条L<sub>3</sub>的中华按蚊1只, 分别与9、19、49、99和199只未感染蚊混合后, 提取及纯化其DNA, 经PCR扩增后, 分析其产物。

## 结果

### 1 引物适应性

以7个地区马来丝虫成虫基因组DNA为模板进行PCR扩增, 两套引物(P1、P2与P3、P4)分别扩增出322与155 bp条带, 见图1。

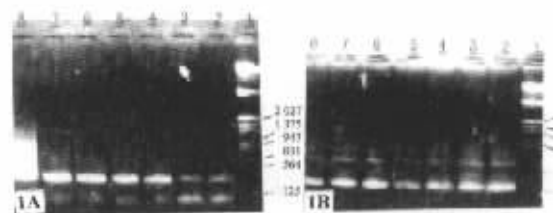


图1 引物适用性分析(A为第一套引物, B为第二套引物)  
1 DNA标志物(λDNA-HindIII/EcoRI) 2 安徽泾县地区马来丝虫 3 福建建阳地区马来丝虫 4 贵州独山地区马来丝虫 5 贵州荔波地区马来丝虫 6 湖北谷城地区马来丝虫 7 四川乐山地区马来丝虫 8 浙江安吉地区马来丝虫

Fig. 1 Applicability analysis of primers (A: P1/P2; B: P3/P4)  
Lane 1 DNA marker (λDNA-HindIII/EcoRI) Lanes 2-8 Adult *B. malayi* from Anhui (Jingxian), Fujian (Jianyang), Guizhou (Dushan), Guizhou (Libo), Hubei (Gucheng), Sichuan (Leshan), Zhejiang (Anji)

### 2 观察蚊媒DNA扩增的效果

蚊媒粗提DNA经Microcon 100过滤、纯化处理后进行PCR扩增, 具有较高的特异性(见后); 而直接用蚊媒粗提DNA或经去离子水稀释处理后的DNA为模板进行PCR扩增或套式PCR扩增,

均无特异条带出现, 见图 2。

### 3 特异性

电泳结果显示, 仅马来丝虫基因组 DNA 和感

染马来丝虫并经纯化的蚊媒 DNA 扩增出 322 与 155 bp 大小的特定片段, 犬恶丝虫、未感染的中华按蚊 DNA 及空白对照组均未见扩增片段, 见图 3。

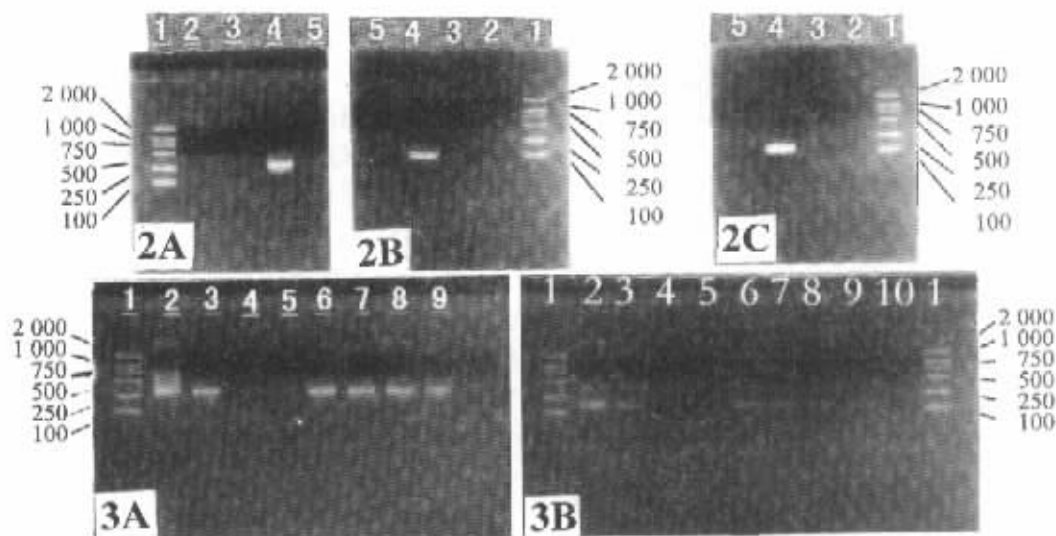


图 2 不同方法处理的马来丝虫蚊媒 DNA 扩增效果 (A 为第一套引物, B 为第二套引物, C 为两套引物) 1 DNA 标志物 (DL 2000) 2 常规挑取的蚊媒 DNA 3 去离子水提取的蚊媒 DNA 4 经 Microcon 100 超滤纯化的蚊媒 DNA 5 平行对照 图 3 PCR 检测蚊体内马来丝虫幼虫的特异性 (A 为第一套引物, B 为第二套引物) 1 DNA 标志物 (DL 2000) 2 马来丝虫 3 6-9 感染马来丝虫的中华按蚊 4 犬恶丝虫 5 正常中华按蚊 10 平行对照

Fig. 2 Amplification of *B. malayi*-infected mosquito DNA by different methods (A: P1, P2; B: P3, P4; C: P1-P4) Lane 1 DNA marker (DL 2000) Lane 2 Mosquito DNA extracted by routine method Lane 3 Mosquito DNA extracted by deionized water Lane 4 Mosquito DNA extracted by Microcon 100 Lane 5 Parallel control Fig. 3 Specificity of the detection of *B. Malayi*-infected mosquito by PCR (A: P1, P2; B: P3, P4) Lane 1 DNA marker (DL 2000) Lane 2 *Brugia malayi* Lanes 3, 6-9 *Brugia malayi*-infected *Anopheles sinensis* Lane 4 *Dhlofiluria immitis* Lane 5 Normal *Anopheles sinensis* Lane 10 Parallel standard

### 4 敏感性

以马来丝虫的 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub> 各 1 条 DNA 为模板扩增后, 3 个样本均可见 322 与 155 bp 条带, 而空白对照无条带出现, 见图 4; 对稀释后并经纯化的感染蚊 DNA 扩增, 结果显示, 当 1 只蚊虫样本中含有 1/64 条 L<sub>1</sub> 的 DNA 时, 仍可见清晰可辨的条带, 见图 5; 对感染蚊与不同数量未感染蚊相混合后提取并纯化的 DNA 进行扩增, 结果显示, 在对 200 只蚊中含有 1 只感染蚊 (体内有 1 条 L<sub>3</sub>) 的群体进行检测时仍可出现明显的扩增条带, 见图 6。

## 讨 论

迄今为止, 我国丝虫蚊媒监测工作仍采用传统的大量捕捉蚊虫, 或在流行区捕捉丝虫感染者蚊帐内饱血蚊, 逐个解剖, 显微镜下检查与鉴定的方法<sup>[5,6]</sup>。此种方法虽可得到有价值的蚊媒丝虫感染资料, 但因工作量大, 费时耗力, 且所用蚊媒标本

必需新鲜, 检测效果不同程度地受检测人员工作经验及专业水平的影响, 易造成漏检或误检, 极大地影响丝虫病防治后期疫情监测的效果, 因此有必要

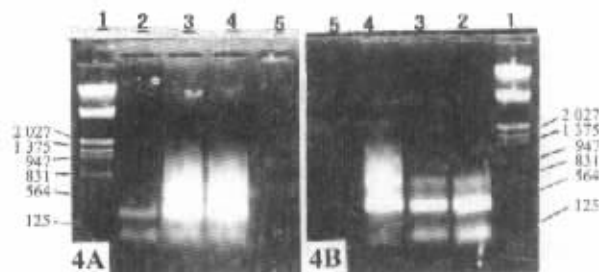


图 4 PCR 检测从蚊体内分离的马来丝虫幼虫的敏感性 (A 为第一套引物, B 为第二套引物) 1 DNA 标志物 (ADNA-Hind III/EcoRI) 2 马来丝虫 I 期幼虫 (L<sub>1</sub>) 3 马来丝虫 III 期幼虫 (L<sub>3</sub>) 4 马来丝虫 III 期幼虫 (L<sub>3</sub>) 5 平行对照

Fig. 4 Sensitivity of the detection of *Brugia malayi* larva separated from mosquito by PCR (A: P1, P2; B: P3, P4) Lane 1 DNA marker (ADNA Hind III/EcoRI) Lane 2 1st-stage larva of *B. Malayi* (L<sub>1</sub>) Lane 5 Parallel control

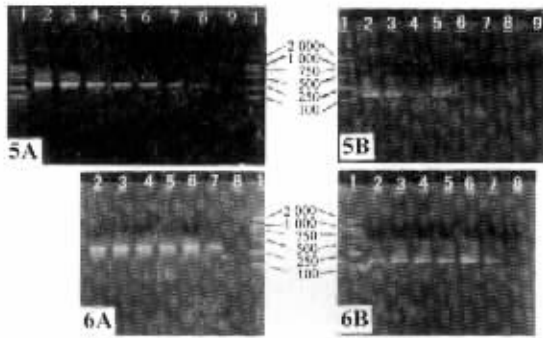


图5 PCR检测蚊体内马来丝虫的敏感性(A为第一套引物, B为第二套引物) 1 DNA标志物(DL 2000) 2~8 DNA稀释度分别相当于1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64条L<sub>3</sub>, 9平行对照 图6 PCR检测蚊体内马来丝虫的敏感性(A为第一套引物, B为第二套引物) 1 DNA标志物 PCR标志物, DL 2000 2~7 相当于1, 10, 20, 50, 100, 200只蚊中含有1只感染蚊 8 平行对照

Fig. 5 Sensitivity of detection of *Brugia malayi*-infected mosquito by PCR (A: P1, P2; B: P3, P4) Lane 1 DNA marker (DL2 000) Lanes 2-8 Corresponding to 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 of L<sub>3</sub>'s DNA Lane 9 Parallel control Fig. 6 Sensitivity of detection of *Brugia malayi*-infected mosquito by PCR (A: P1, P2; B: P3, P4) Lane 1 DNA marker (Lane 1 DNA marker, DL 2000) Lanes 2-7 About 1, 10, 20, 50, 100, 200 mosquito including 1 infected Lane 8 Parallel standard

寻找一种快速、灵敏和特异的蚊媒监测方法。

PCR技术以其敏感性高、特异性强、操作简便及快速等优点而被广泛应用于基础和应用的各个领域。日前许多学者致力于将此技术用于丝虫病及丝虫蚊媒的检测中,对人体血液、尿液及痰内丝虫的检测已有成功报道<sup>[7-11]</sup>,但在蚊媒监测的研究中,由于蚊体内有影响DNA扩增的抑制物存在,应用PCR方法对蚊媒监测的报告较少。本实验根据马来丝虫基因组HhaI序列<sup>[4]</sup>设计合成了两套引物(P1、P2和P3、P4)。鉴于该序列为国外的马来丝虫基因研究结果,故我们对所设计引物适应性进行了检测,结果显示,本实验设计的两套引物均适于我国不同地区马来丝虫的检测,分别扩增出322和155 bp特异片段,且引物具有较高的特异性,可检出马来丝虫成虫及经纯化处理后的中华按蚊体内各期幼丝虫,而对未感染蚊及同样由蚊传播的犬恶丝虫均不能扩增出特异条带;对感染蚊媒的检测其灵敏度可达1只蚊体内含1/64条L<sub>3</sub>水平。按1条微丝蚴的DNA量约为250 pg计算<sup>[12]</sup>,本实验检测的下限应相当于4 pg幼丝虫DNA。群体蚊敏感性检测可达到200只群体蚊中检测出1只含有1条L<sub>3</sub>感染蚊水平。

应用PCR扩增进行检测蚊媒体内幼丝虫时,

处理蚊体内DNA扩增抑制物是关键因素之一。本实验先用蚊媒粗提DNA及用去离子水稀释的蚊媒DNA为模板,进行PCR扩增及套式PCR扩增均未获得特异条带,而从蚊体中分离出幼丝虫后再以任一引物扩增,均可见条带,表明蚊媒粗提物中确有抑制DNA扩增的物质存在。去离子水稀释法亦不能扩增出特异条带。其他报道<sup>[8,12,13]</sup>的采用Sephadex G-50过滤及探针杂交等去除抑制物的方法,不仅材料昂贵,而且易损失本已微量的样品DNA,故难以推广。本实验首次采用Microcon 100纯化蚊媒粗提DNA,以此纯化的蚊媒DNA为模板进行PCR,即可检测出幼丝虫的特异性条带。经反复摸索,本检测体系具有较好的重复性,且较其他技术(如探针等)具有敏感性高、操作简单和易掌握等优点,为监测马来丝虫蚊媒体内幼丝虫工作提供了一种新的检测手段,有较好的应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] 伍欣星,聂广. 医学分子生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 1995: 118-122.
- [2] 李凤舞,牛春,叶炳辉,等. 套式PCR检测蚊体内疟原虫的敏感性与特异性. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 164-167.
- [3] 郑惠君,陶增厚,程文芳,等. DNA探针聚合酶链反应免疫荧光技术鉴定蚊体内班氏丝虫幼虫. 贵州医药, 1992, 16: 68-70.
- [4] McReynolds LA, De Simone SM, Williams SA. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 797-801.
- [5] 丝虫传播阈值研究协作小组. 丝虫病传播阈值的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12: 1-6.
- [6] 魏银松,张富南,饶志秀,等. 马来丝虫防治后期的流行趋势观察. 中国寄生虫病防治杂志, 1990, 3: 105-107.
- [7] Nicolas L, Luquinal P, Lardoux F, et al. A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90: 136-139.
- [8] Vythilingam I, Boer L, Wu N. Detection of *Brugia malayi* in mosquitoes by the polymerase chain reaction. J Am Mosq Control Assoc, 1998, 14: 243-247.
- [9] 刘云光,孙德建,薛海筹. PCR及ELISA-PCR法检测蚊体内马来丝虫幼虫. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 275-278.
- [10] Fischer P, Liu X, Lizotte-Waniewski M, et al. Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. Parasitol Res, 1999, 85: 176-183.
- [11] Abbasi I, Hamburger J, Githure J, et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in patients' sputum by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90: 531-532.
- [12] 张龙兴,王捷. DNA探针和PCR技术检测媒介中丝虫讲习班概况. 国外医学寄生虫病分册, 1994, 5: 193-196.
- [13] Dissanayake S, Min X, Plessens WF. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a nonradioactive probe. Mol Biochem Parasitol, 1991, 45: 49-56.

(收稿日期: 2000-08-07 编辑: 李雅卿)