

# 中华按蚊的分子鉴定标准\*

杨飞龙, 李旭东, 闫振天, 陈斌

(重庆师范大学 生命科学学院 昆虫与分子生物学研究所, 重庆 401331)

**摘要:** 中华按蚊(*Anopheles sinensis*)是重要的传疟媒介之一,广泛分布于中国和东南亚,它的形态特征和赫坎按蚊种团(*Anopheles hyrcanus* Group)其他蚊种十分近似,建立中华按蚊的分子鉴定标准十分重要。本研究从实验室中华按蚊品系的一个个体测序了线粒体 DNA *COI* 和 *COII* 基因,以及核糖体 DNA D2、D3 和 ITS2 位点,测序片段长度分别为 658、663、551、365、556 bp。这些序列和近缘蚊种对应序列分别用最大似然法构建系统发育树,结果表明中华按蚊的序列均聚合为同一支。将测序的中华按蚊 *COII* 序列和已知蚊种的对应序列比对发现其中的保守位点分别是第 133 位点 C, 321 位点 C, 382 位点 C, 435 位点 T, 516 位点 A 和 651 位点 C, 线粒体 DNA *COI* 和 *COII* 基因序列的碱基组成具有 AT 偏向性,分别占 69.15% 和 74.96%。提交了 5 条序列到 NCBI 数据库,其中核糖体 DNA D2 位点序列是首次在中华按蚊中公开报道。

**关键词:** 中华按蚊; *COI*; *COII*; D2 位点; D3 位点; ITS2 位点; 分子鉴定标准

**中图分类号:** Q963; Q969.44<sup>+</sup>2.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2014)04-0040-05

中华按蚊(*Anopheles sinensis*)隶属于双翅目(Diptera)、蚊科(Culicidae)、按蚊属(*Anopheles*)、按蚊亚属(*Subgenus Anopheles*)、赫坎按蚊种团(*Anopheles hyrcanus* Group),是该种团中的优势蚊种,也是间日疟的重要传播媒介。中国中华按蚊的研究,是从 1828 年著名学者 Wiedemann 在广州发现赫坎按蚊中华变种(*Anopheles hyrcanus* var *sinensis*)开始的。由于该蚊种与赫坎按蚊种团的多个蚊种在形态上十分相近,它的分类学地位一直存在很大的争议。不论是早期的简单形态学区分还是通过卵甲板形态的鉴定,或是后来结合形态和生态习性(嗜血偏好性等)进行鉴定的方法,均存在一定的误差<sup>[1]</sup>。随着科学技术的发展,各种新型分类方法的出现,中华按蚊与其他相似蚊种的分类学地位逐步得到纠正和区分。在这些方法中,以 DNA 测序为基础的分子分类方法由于通过分子差异去探究不同蚊种特别是亲缘关系较近的蚊种之间的差别,精确程度较高,因而得到了广泛运用。然而由于中华按蚊分子标准的不一致,这就为该蚊种的分子分类工作带来极大的困难。

在蚊虫分子标准中,核糖体 DNA 和线粒体 DNA 运用较为广泛。核糖体 DNA 由于进化较慢,存在多个保守区域,同时由于不同区域保守性的不一致,适合不同阶元的系统研究<sup>[2]</sup>。尤其是间隔区不同的多变性,为形态学上一致性较高的近缘物种的区分提供了很好的分子标准<sup>[3]</sup>。线粒体 DNA 由于其进化较快,遵循严格的母系遗传,同时基因组较小,易于测序分析等特点,也是近年来研究物种遗传和系统发育关系中运用较多的分子标记<sup>[4]</sup>。

鉴于中华按蚊的分子分类并没有一个统一的分子鉴定标准,结合核糖体 DNA 和线粒体 DNA 的测序分析,制定一套统一的分子标准就显得尤为重要。本研究通过对核糖体 DNA D2、D3、ITS2 位点和线粒体 DNA *COI*、*COII* 基因序列的分析制定统一的分子鉴定标准,为通过分子水平上对中华按蚊的鉴定提供分子标准,达到准确鉴定中华按蚊的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

研究用中华按蚊为本实验室从江苏无锡引进的多年在实验室饲养的 WX-LS 实验室品系。

\* 收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-04-15 网络出版时间:2014-7-3 23:03

资助项目:“两江学者”计划专项经费;美国卫生部 NIH 项目(No. R01AI095184);国家自然科学基金(No. 31071968 ;No. 31372265);重庆市科技攻关重点项目(No. CSTC2012GG-YYJSB80002)

作者简介:杨飞龙,男,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail: 249656865@qq.com;通讯作者:陈斌,E-mail: binchen@cqu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140703.2303.009.html>

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 根据 QIAGEN 试剂盒使用说明提取中华按蚊 DNA:1)将 1 头完整的中华按蚊(质量为 1.2 mg)样本放入 1.5 mL 的离心管中,并分别加入 185  $\mu$ L 的 ATL,在组织完全碾碎后,加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 20  $\mu$ L,于 56  $^{\circ}$ C 水浴 16 h。2)水浴后加入 200  $\mu$ L Buffer AL,并震荡均匀。3)加入 200  $\mu$ L 的无水乙醇。4)将组织混匀液转移到 2 mL 的 DNeasy Mini spin column 中,并用高速冷冻离心机 6 000 $\times$ g 离心 1 min。5)将 spin column 转移到新的收集管中,加入 Buffer AW1,6 000 $\times$ g 离心 1 min。6)将 spin column 转移到新的收集管中,加入 Buffer AW2,20 000 $\times$ g 离心 3 min。7)将柱子转移到 1.5 mL 的离心管中。8)加入 Buffer AE 到柱子膜上,在室温下放置 1 min,并 6 000 $\times$ g 下离心分离 1 min。9)重复第七步,然后将提取的 DNA 放于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和测序 PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L,PCR 扩增的反应体系:模板 DNA 1  $\mu$ L,正反引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,再加入 Taq Mastermix 到 25  $\mu$ L。

核糖体 D2 扩增引物<sup>[5]</sup>:CP12 (forward):5'-GTGGATCCAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAG-3',CP15 (reverse):5'-GTGAATTCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

核糖体 D3 扩增引物<sup>[6]</sup>:D3a (forward):5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3',D3b (reverse):5'-TCG-GAAGGAACCAGCTACTA-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

核糖体 ITS2 扩增引物<sup>[7]</sup>:ITS2A (forward):5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3',ITS2B (reverse):5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

线粒体 COI 扩增引物<sup>[8]</sup>:LCO1490 (forward):5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3',HC02198 (reverse):5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min;35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

线粒体 COII 扩增引物<sup>[6]</sup>:LEU:5'-TCTAATATGGCAGATTAGTGCA -3',LYS:5'-ACTTGCTTTCAGT-CATCTAATG -3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

扩增的 5 条序列经电泳检测后送往上海生物工程有限公司测序。

## 1.3 数据分析

利用 BioEdit 对多条 COII 基因序列进行比对,找出实验室中华按蚊 COII 基因序列的保守位点;在 NCBI 中获取与中华按蚊亲缘关系较近物种的 rDNA 中 D2、D3、ITS2 位点序列,mDNA 中 COI、COII 基因序列,用 MEGA5.01 通过 ML 法分别建树分析,Bootstrap 重复抽样 1 000 次检验。利用 BioEdit-Nucleotide Composition 对本实验室的中华按蚊 5 段序列的 A、C、T、G 百分比统计并上传到 NCBI,获取序列登录号。

## 2 结果与分析

### 2.1 电泳检测结果

实验室中华按蚊 DNA 提取结果,通过琼脂糖凝胶电泳(图 1)可知,DNA 大小超过了 10 000 bp。5 条中华按蚊扩增序列通过电泳检测可知,图 2 中条带 1 为 COI 基因序列,条带 2 为 COII 基因序列,条带 3 为 D2 位点序列,条带 4 为 D3 位点序列,条带 5 为 ITS2 位点序列。

### 2.2 中华按蚊 COII 基因保守位点分析

从实验室 WX-LS 中华按蚊、野外采集的中华按蚊和 NCBI 下载的相关蚊种的 COII 基因比对可以看出,中华按蚊 COII 基因的保守位点有 6 个,分别是 133 位点 C、321 位点 C、382 位点 C、435 位点 T、516 位点 A 和 651 位点 C(表 1)。

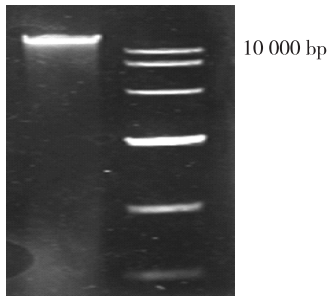


图 1 DNA 提取结果电泳图

Fig. 1 The Agarose gel electrophoresis of DNA extracted results

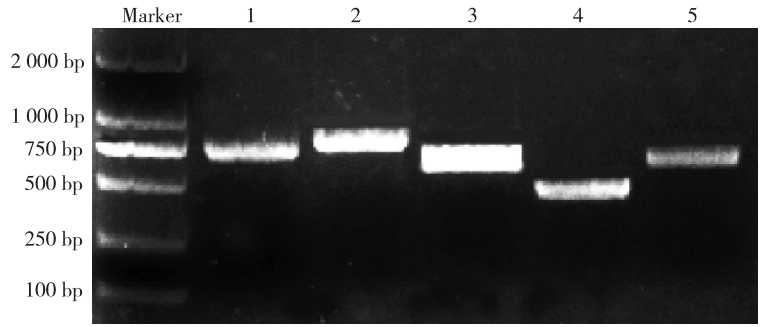


图 2 扩增 5 条序列电泳图

Fig. 2 The Agarose gel electrophoresis of amplification of 5 sequences

### 2.3 系统发育树分析

从 NCBI 获取了赫坎按蚊种团的 11 个种的 *COI* 基因序列,以微小按蚊 (*Anopheles minimus*) 为外群,基于 *COI* 基因序列的最大似然法分析,本实验室供试的中华按蚊与已经报道的中华按蚊聚为一枝,置信值达到了 99(图 3a)。以微小按蚊为外群,基于 *COII* 基因序列的最大似然法建树分析,除实验室中华按蚊 *COII* 基因序列以外,其余的 *COII* 基因序列均来自 NCBI 数据库,并且都是赫坎按蚊种团中报道的已知蚊种序列。从系统发育树可知,实验室中华按蚊仅仅和已经报道亚洲其他地区的中华按蚊聚为一枝,并且置信值为 100(图 3b)。在中国分布的赫坎按蚊种团被报道的 ITS2 位点序列有 12 种,以微小按蚊为外群,以已知序列和实验室中华按蚊序列的最大似然法

表 1 中华按蚊 *COII* 保守位点

Tab. 1 Conserved sites of *A. sinensis COII* sequences

蚊种	比对序列位点	序列登录号
	122222222233333344444445555555555557777777	
	90000000008999999455555500000088888891222222	
	9012345678990123459012345345678945678909012345	
WX_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
MD_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
ML_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
TC_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
JH_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
YUJ_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
YY_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
SJ_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
YL_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
WH_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
XS_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
JJ_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
LY_ <i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	
<i>A. sinensis</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	EU931618.1
<i>A. nigerrimus</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	AB778812.1
<i>A. nitidus</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	AB777824.1
<i>A. peditaeniatus</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	AB715145.1
<i>A. lesteri</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	AY753147.1
<i>A. pullus</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	AY444347.1
<i>A. hyrcanus</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	HQ197490.1
<i>A. crawfordi</i>	GAATCTAATAAACTATTGACTAACCTTAGGACATAAACCTAT	KF431903.1

注:MD:中缅边境,ML:孟腊,TC:腾冲,JH:景洪,YUJ:元江,YY:元阳,SJ:双江,YL:云龙,WH:五河,XS:秀山,JJ:江津,LY:浏阳。

建树,主要分为 4 个大枝,而且实验室中华按蚊和来自韩国的中华按蚊聚为 1 枝,置信值达到 100(图 3c)。D3 位点序列在赫坎按蚊种团中报道的比较少,NCBI 已报道的有中华按蚊、赫坎按蚊 (*A. hyrcanus*)、*A. pseudopictus* (暂无中文名),以微小按蚊为外群,系统发育分析可知,实验室中华按蚊与中国其他地区的中华按蚊聚为一枝,置信值达到 100(图 3d)。D2 位点序列在赫坎按蚊种团中报道的蚊种几乎没有,NCBI 数据库也没有中华按蚊 D2 位点序列,故并没有建树分析,本次研究获取的中华按蚊 D2 位点序列是首次报道,对完善中华按蚊分子标准具有重要意义。

### 2.4 实验室中华按蚊序列组成分析

实验室中华按蚊的 5 段序列,通过 BioEdit 比对分析可知(表 2),D2 位点序列长度为 551 bp,G+C 含量与 A+T 含量大体一致;D3 位点序列长度为 365 bp,G+C 含量大于 A+T 含量;ITS2 位点序列长度为 556 bp,A+T 含量大于 C+G 含量;*COI* 基因序列长度为 658 bp,A+T 含量远大于 C+G 含量,碱基组成具有明显 AT 偏向

性;COII 基因序列长度 663 bp, A+T 含量远大于 C+G 含量,碱基组成具有明显 AT 偏向性。

### 3 讨论

为进行中华按蚊种群结构的研究,本实验室在 2010—2013 年搜集了多个地区的中华按蚊标本,并获取了大量的 COII 基因序列,这为实验室中华按蚊品系 COII 基因保守序列的研究提供了更加丰富的材料,增加了 COII 基因保守序列位点分析的准确性。同时,本研究中保守位点结果也为通过 COII 基因序列鉴定中华按蚊提供了重要依据。到目前

为止,还没有关于核糖体 DNA 中 D2、D3、ITS2 位点和线粒体 DNA 中 COI、COII 分子标准均来自于同一头中华按蚊的报道,因此这种情况使得通过分子分类研究中华按蚊带来一定困难。本次研究获得的实验室中华按蚊品系的 5 段序列均来自同一头中华按蚊,并且其中的 4 段序列和已报道的相对应的序列建树分析结果也验证了实验室中华按蚊的准确性。由于中华按蚊的核糖体 DNA 中 D2 位点序列目前还没有相关报道,没有进行系统发育验证,但本次研究获得的核糖体 DNA 中 D2 位点序列进一步完善了中华按蚊分子标准的依据,对中华按蚊分子鉴定具有重要的意义。

### 参考文献:

[1] 孙立新,吴汉霞,张荣波,等. 蚊分类鉴定研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2010,33(2):139-143.  
Sun L X, Wu H X, Zhang R B, et al. Researches on the identification of mosquitoes [J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2010, 33(2): 139-143.

[2] 江世宏,孟子焯,陈晓琴,等. 核糖体 DNA 序列分析在昆虫系统学研究中的应用[J]. 昆虫分类学报,2008,30(3):225-238.  
Jiang S H, Meng Z Y, Chen X Q, et al. Application of rDNA sequence analysis in insect systematics[J]. Entomotaxonomia, 2008, 30(3): 225-238.

[3] 宋社吾,赵彤言,蒋书楠,等. 我国尖音库蚊复合组蚊虫核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区序列测定与分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2003,10(2):74-82.

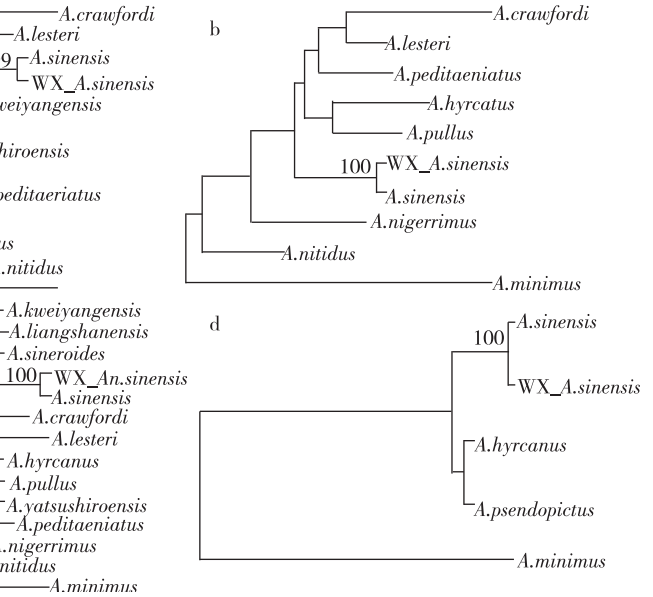


图 3 基于 COI(a)、COII(b)、ITS2(c)和 D3(d)最大似然法系统发育分析  
Fig. 3 ML tree of *A. sinensis* COI(a), COII(b), ITS2(c) and D3(d) sequences

表 2 中华按蚊序列组成分析

Tab. 2 Composition of *A. sinensis* sequence

序列名	A/%	T/%	C/%	G/%	(G+C)/%	(A+T)/%	序列长度/bp
D2	25.59	21.42	23.05	29.95	52.99	47.01	551
D3	26.58	16.99	26.03	30.41	56.44	43.56	365
ITS2	29.86	25.36	19.60	25.18	44.78	55.22	556
COI	30.40	38.75	15.20	15.65	30.85	69.15	658
COII	35.60	39.37	12.82	12.22	25.04	74.96	663

Song S W, Zhao T Y, Jiang S N, et al. The sequencing and sequences analyses of rDNA-ITS2 of *Culex pipiens* complex in China[J]. Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica, 2003, 10(2): 74-82.

[4] 熊庆,刘作易,喻子牛. 线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 西南农业学报,2002,15(3):111-115.  
Xiong Q, Liu Z Y, Yu Z N. Progresses in studies and application of mitochondrial DNA[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2002, 15(3): 111-115.

[5] Krzywinski J, Wilkerson R C, Besansky N J. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in *Anopheles* (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(3): 479-87.

- [6] Chen B, Butlin R K, Harbach R E. Molecular phylogenetics of the Oriental members of the Myzomyia Series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences[J]. Systematic Entomology, 2003, 28(1): 57-69.
- [7] Beebe N M, Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis[J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53(5): 478-481.
- [8] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.

## Animal Sciences

### The Molecular Identification Markers of *Anopheles sinensis*

YANG Feilong, LI Xudong, YAN Zhentian, CHEN Bin

(Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences,  
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** *Anopheles sinensis* is one of most important malaria vector species and widely distributed in China and southeastern Asia. It is quite difficult to distinguish it from other species in *Anopheles hyrcanus* Group in morphology; therefore, it is necessary to establish the molecular identification standard through setting up a set of molecular markers. In the present study, we sequenced the mtDNA *COI* and *COII* genes, and rDNA D2, D3 and ITS2 loci using an individual of *Anopheles sinensis* laboratory strain. The sequence lengths obtained for the five loci are 658, 663, 551, 365 and 556 bp, respectively. The comparison of the sequenced *COII* with corresponding sequences of other mosquito species identified six conserved nucleotide loci, and they are C at nucleotide, C at 321, C at 382, T at 435, A at 516 and C at 651. The *COI* and *COII* sequences showed AT usage bias with AT accounting up 69.15% and 74.96%, respectively. The sequenced five sequences were submitted to NCBI with access numbers, and the rDNA D2 sequence was the first report for the species.

**Key words:** *Anopheles sinensis*; *COI*; *COII*; D2 loci; D3 loci; ITS2 loci; molecular identification standards

(责任编辑 方 兴)