

中国不同地理株白纹伊蚊细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因序列比较

陈虹 陈汉彬

【摘要】 目的 比较中国不同地理株白纹伊蚊细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因序列,从分子水平探讨不同地理株对登革病毒(DV)易感性的差异。方法 用聚合酶链反应从蚊虫基因组 DNA 扩增出 CO I 基因片段并进行克隆测序,用邻接法进行分子系统发育分析。结果 各地理株白纹伊蚊 CO I 基因片段序列长度均为 415 bp,所测各株序列均无缺失。云南思茅株的碱基转换率为 1.93%,颠换率为 0.24%。贵州麻尾株和广西南宁株的转换率为 0.48%。各地理株中思茅株与麻尾株关系较近,麻尾株与南宁株关系较近,其余 11 个地理株均为同型株。结论 蚊虫对 DV 的易感性与多种因素有关,包括遗传及生态学方面(如季节气候、地理环境、人类活动等)的因素。在中国大多数白纹伊蚊为同型基因,其对 DV 的易感性尚无直接对应关系。

【关键词】 白纹伊蚊;登革病毒;地理株;细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因

Sequences analysis of cytochrome C oxidase subunit I gene in *Aedes albopictus* from different geographic strains in China CHEN Hong*, CHEN Han-bin. *General Hospital of Chinese Peoples' Armed Police Forces, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To compare the sequences of cytochrome C oxidase subunit I gene (CO I) in *Aedes albopictus* from different geographic strains in China and to discuss the differences in susceptibility among different geographic strains to dengue virus (DV). **Methods** CO I was amplified with polymerase chain reaction method and sequenced from its genomic DNA. Molecular phylogenetic trees were constructed with Neighbor-Joining method. **Results** Sequence length of CO I fragment in each geographic strains was 415 bp. The rates of shift and reverse of base pairs in Simao strain were 1.93% and 0.24% respectively. The rate of shift in Mawei and Nanning strains was 0.48%. The analyses of phylogenetic of CO I sequences showed that there was close relationship between Simao strain in Yunnan and Mawei strain in Guizhou and between Mawei strain and Nanning strain in Guangxi. **Conclusions** The susceptibility was widely related to many factors including genetic and environmental ones. CO I in *Aedes albopictus* from different geographic strains in China belonged to the same gene type. There were no direct correlations between CO I gene type in different geographic strains and susceptibility to DV.

【Key words】 *Aedes albopictus*; Dengue virus; Geographic strain; Cytochrome C oxidase subunit I gene

白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)是登革病毒(dengue virus, DV)的重要传播媒介,在我国分布广泛。在无埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的地区,白纹伊蚊是当地登革热(dengue fever, DF)流行的唯一或主要传播媒介。本课题应用聚合酶链反应(PCR)基因克隆及测序技术对我国 DF 流行地区、可疑流行地区与非流行区及不同纬度和气候型的 7 个省区以及贵州省内 8 个不同地区的白纹伊蚊 CO I 基因序列进行比较,旨在了解不同地理株的白纹伊蚊在分子水平有无差异并推测这种差异与其对 DV 的易

感性有无关联。

材料与方法

1. 蚊虫来源: 7 省区的白纹伊蚊分别为广州株、南宁株、海口株、北京株、新乡株、思茅株及贵阳株。南宁株与新乡株为幼虫标本(75%酒精保存),由广西壮族自治区寄生虫病研究所及河南新乡医学院寄生虫教研室惠赠。广州株、海口株、北京株和思茅株的蚊卵由中山医科大学寄生虫病教研室、海南省寄生虫病研究所、军事医学科学院微生物流行病学研究所和云南省思茅疟疾防治所惠赠。贵阳株系贵阳医学院生物教研室苏晓庆实验室繁殖驯化 14 年的株种。所有样本均按常规方法鉴定。贵州省内 8 个地区的白纹伊蚊分别采自遵义、贵阳、六枝、大方、凯里、镇

作者单位: 100039 北京,武警部队总医院(陈虹);贵阳医学院生物教研室(陈汉彬)

远、麻尾和荔波。所采集的幼虫在实验室饲养,待羽化后按常规方法鉴定。

2. 白纹伊蚊的饲养:不同地理株白纹伊蚊虫卵同时投入水中,力求保持蚊虫饲养密度一致。饲养条件:温度(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 相对湿度(80 ± 5)%。每日光照12 h。幼虫饲兔肝粉,成虫饲8%葡萄糖水。收集羽化后1~2天的蚊虫,置75%酒精中 -20°C 保存待用。

3. 单蚊基因组 DNA 的提取:用无菌小镊子挑出单个蚊虫放入塑料离心管中,蒸馏水反复洗3次,加入裂解液500 μl 及蛋白酶 K 6 μl (20 mg/ml),用自制玻璃小棒研磨蚊虫至看不到明显块状物。以常规酚-氯仿法提取基因组 DNA。

4. CO I 基因片段的扩增:在 GenBank 中查询双翅目昆虫的 CO I 基因序列,根据白纹伊蚊、埃及伊蚊、库蚊(*Culex tarsalis*)、按蚊(*Anopheles culicifacies*)以及其他双翅目昆虫果蝇、蚋及鳞翅目昆虫中蛾、蝴蝶 CO I 序列的保守区设计引物,用于 CO I 区段的扩增。扩增产物预期大小为415 bp。引物序列分别为5'-CGA GCT TAT TTT ACG TCT GC-3' 和5'-AAC GTC GAG GTA TTC CGG CT-3'。25 μl 的反应体系包括:单蚊 DNA 总量的1/30~1/10, 2 U Taq DNA 聚合酶,5'端和3'端引物各0.2 mmol/L, 0.2 mmol/L dNTPs。在 Perkin-Elmer 9600 型 PCR 仪上进行扩增反应,反应参数:开始为95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min的预变性,接着30次循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min的延伸。

5. CO I 基因片段的克隆及测序:PCR的产物以1%的琼脂糖凝胶电泳分离,得到目的条带(约415 bp),切下后用深圳晶美生物工程有限公司的 Cleanmix 50 胶回收试剂盒纯化此 DNA 片段。纯化得到的目的 DNA 片段连接于 pGEM-T 载体 (Promoga) 上转化入大肠埃希菌 DH5 α 菌株的感受态细胞中。克隆培养后检测所得阳性克隆,经双酶切及 PCR 鉴定后,将含目的基因的克隆在上海博联生物技术有限公司进行测序。

6. 系统发育分析:测得的白纹伊蚊各地理株 CO I 基因片段序列用 DNA tools 5.1 软件包中的 Clustal W 程序进行序列同源性对齐排列,用 Phylip 软件包构建系统树。所用统计学方法为基于 Kimura 的双参数模型的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ)。

结 果

1. PCR 扩增的电泳结果:实验用7省区及贵州省8地区不同地理株的白纹伊蚊单只蚊虫提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果显示在 PCR 标志物500 bp与400 bp间有一特异的扩增条带,大小与预期相符。

2. 重组质粒的酶切鉴定结果:经酶切的质粒进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳,显示酶切产物为2条特异性条带,1条分子量3.0 kb左右,大小与空质粒 pGEM 相同,为载体质粒 DNA。另1条分子量在500 bp与400 bp之间,与 PCR 产物大小相同,表明重组质粒含有目的基因片段。

3. 重组质粒的 PCR 鉴定结果:重组质粒 PCR 产物进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 PCR 标志物500 bp与400 bp之间有一较特异的 DNA 条带,大小与预期相符。

4. PCR 产物测序结果及序列分析:白纹伊蚊各地理株 CO I 基因片段序列长度均为415 bp,所测各株序列均无缺失。思茅株的碱基转换率为1.93% (7/415),颠换率为0.24% (1/415)。麻尾株和南宁株的转换率为0.48% (2/415)。所测各株 CO I 基因序列已登录 GenBank,序列号为 AY100666~AY100671 及 AY101847~AY101854。

5. 用 NJ 法构建的系统发育树:根据系统发育分析,思茅株与麻尾株先聚类,麻尾株又与南宁株聚类,其余11株聚成一类(图1)。

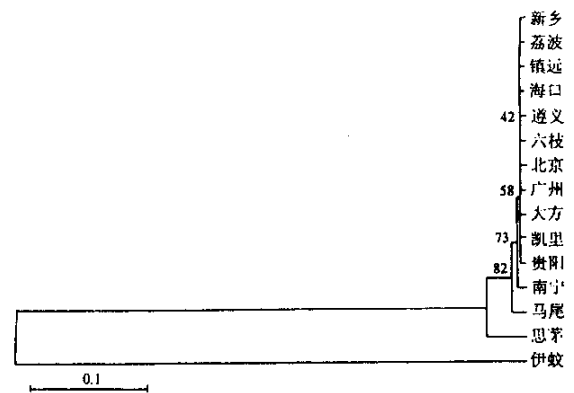


图1 根据不同地理株白纹伊蚊 CO I 基因片段序列数据构建的系统发育图(NJ法)

讨 论

1. 不同地理株白纹伊蚊的进化关系:在系统发

育树上关系较近的思茅株、麻尾株和南宁株白纹伊蚊其地理位置在纬度和距离上接近(思茅和南宁同在北纬22.8°左右,麻尾的纬度稍高,在北纬25.3°左右)。但荔波和广州分别在北纬22.8°和22.9°左右,与思茅和南宁纬度极其接近,尤其是荔波在地理位置与麻尾相当接近,但在遗传距离上却与上述3地理株关系较远,其原因尚不清楚,可能与环境和其他因素有关。叶炳辉等^[1]对天然分界间隔的徐州、宜兴、福州和海口4个地理株的中华按蚊的5种同功酶及糖、脂和蛋白质进行了比较研究,同功酶间无差异,仅见纯蛋白间的差异,且与地理距离有关,因而提出不同地理区域的种群间已有分化,这种分化似与地理分布的距离有关。李本文等^[2]进一步从基因分子水平,采用限制性片段长度多态性方法,对上海、广西和郑州3地理株中华按蚊,江苏和广西2地理株嗜人按蚊的基因组DNA进行了研究,证实了中华按蚊、嗜人按蚊地理株间的差异和种群分化。陈虹、陈汉彬^[3,4]对北京株和海口株白纹伊蚊的氨基酸及北京、贵阳和海口株白纹伊蚊的总蛋白进行了比较,发现所测定的17种氨基酸中,有8种存在量上的显著差异,海口株与北京株及贵阳株的总蛋白间差异有显著性($P < 0.01$)。但本研究中北京、海口和贵阳3地理株的CO I基因片段序列在系统发育树上聚成一类,提示它们的基因型相同。这种基因型相同,但在生理、生化上有差异的现象,是否因不同地理株各自的生态条件不一样,而导致蚊虫体内的某些生理、生化方面的变化,但这种不同生态条件的选择作用在未达到一定程度及未经过相当长时间的淘汰,还未能引起遗传变异。思茅、麻尾和南宁株与其他11株在DNA序列上的差异是否为种群分化或隐种,还需深入研究。

2. 不同地理株白纹伊蚊基因型与其对DV易感性的关系:Gubler, Rosen^[5]和Gubler等^[6]对世界上13个不同地理株的白纹伊蚊和埃及伊蚊经口感染DV的易感性进行了研究,证明不同地理株两种伊蚊对DV易感性存在差异。Tardieux等^[7]对18个地理株埃及伊蚊的研究发现其易感性相差8倍之多(5.5%~43%)。在同一个城市中不同地方的埃及伊蚊之间均存在着这种显著差异。张升、何桂铭^[8]也比较了我国9个不同地理株的白纹伊蚊对DV I型、II型和IV型经口感染的易感性,同样也存在差

异。这种差异与蚊虫的生活环境(如季节气候、地理环境、人类活动等)密切相关。Marie等^[9]通过对法国3个地区埃及伊蚊经口感染DV II易感性变化的研究,认为杀虫剂(如有机磷、拟除虫菊酯)的广泛使用可导致蚊虫在同一地域的分布不均,从而使蚊虫的易感性发生改变。本研究中,思茅地区虽不是DF流行区,但为疟疾流行区,在当地杀虫剂的使用是防疟的一个重要措施,这是否会引入该地区其他蚊种的基因改变,是一个值得深入研究的课题。

综上所述,白纹伊蚊对DV的易感性是一个相当复杂的问题,受诸多因素影响,其中包括遗传方面及生态方面(如季节气候、地理环境、人类活动等)的因素。本研究结果提示,在我国大多数白纹伊蚊为同型基因,对DV的易感性尚无直接对应关系。DF在一个地区的流行,除了媒介之外,尚有传染源的介入。

参 考 文 献

- 1 叶炳辉,沈士弼,赵慰先,等. 不同地理株中华按蚊同功酶和糖、脂、蛋白质的比较研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1985, 3: 161-164.
- 2 李本文,卢惠霖,姚开泰,等. 中华按蚊和嗜人按蚊不同地理株基因DNA的限制酶切长度差异(RFLDs). 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8: 174-176.
- 3 陈虹,陈汉彬. 海南株和北京株白纹伊蚊水解氨基酸的比较. 贵州医药, 2002, 26: 227-229.
- 4 陈虹,陈汉彬. 三地理株白纹伊蚊与致倦库蚊贵州株蛋白质的比较分析. 贵阳医学院学报, 2002, 27: 136-137.
- 5 Gubler DJ, Rosen L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, 1976, 25: 318-325.
- 6 Gubler DJ, Nalin S, Tan R, et al. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geogaphic strain of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 1979, 28: 1045-1052.
- 7 Tardieux I, Poupel O, Lapchin L, et al. Variation among strains of *Aedes aegypti* in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 43: 308-313.
- 8 张升,何桂铭. 我国不同地理株白纹伊蚊对登革病毒的易感性. 中华流行病学杂志, 1989, 10: 348-351.
- 9 Marie VF, Laurence M, Francois R, et al. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60: 292-299.

(收稿日期 2002-08-20)

(本文编辑:尹廉)