应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2015, 52(4): 906–910. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2015.108

应用 PCR 技术检测中华按蚊蚊胃血血源*

朱长强[1**] 韩 坤[2] 艾乐乐[1] 墙世贵[1] 韩招久[1] 姜志宽[1] 谭伟龙[1***]

（1.南京军区疾病预防控制中心，南京 210002；2.宁夏回族自治区疾病预防控制中心，银川 750004）

摘 要 **【目的】**应用 PCR 技术检测甘肃地区中华按蚊 *Anopheles sinensis* 蚊胃血来源，研究其吸血习性。**【方法】**根据中华按蚊可能吸血对象(人、牛、猪、羊、鼠、鸡)的线粒体 DNA 细胞色素 b 序列的差异，设计种特异引物，建立聚合酶链反应（PCR）体系鉴定中华按蚊蚊胃血来源。同时，对人血、猪血、牛血、羊血、鼠血、鸡血及未吸血中华按蚊中提取的 DNA 进行检测，验证该方法的特异性；对吸饲人血后不同时间（6、12、24、36、48、60 h）的中华按蚊进行检测，测试该方法的敏感性。**【结果】** 该方法可从已知动物血样和中华按蚊提取的 DNA 中分别扩增得到 689 bp（人）、271 bp（牛）、453 bp（猪）、225 bp（羊）、485 bp（鼠）、266 bp(鸡)和 468 bp（中华按蚊）大小的特异性条带；吸人血 36 h 内的中华按蚊均能扩增出特异性条带，在吸人血后 48 h、60 h 的中华按蚊中，均未扩出特异性条带。共检测 10 只现场中华按蚊，血源来自人、牛、猪分别为 5 只、2 只、3 只，其中 1 只蚊子兼吸人血和猪血。**【结论】** 建立的 PCR 检测方法可鉴定中华按蚊蚊胃血来源，结果稳定可靠；甘肃地区中华按蚊不仅嗜吸人血，也可兼吸其他动物血。

关键词 中华按蚊，蚊胃血，PCR，吸血习性

Identification of *Anopheles sinensis* blood meals with PCR

ZHU Chang-Qiang[1**] HAN Kun[2] AI Le-Le[1] QIANG Shi-Gui[1] HAN Zhao-Jiu[1] JIANG Zhi-Kuan[1] TAN Wei-Long[1***]

(1.Central of Disease Prevention and Control of Nanjing Military Area, Nanjing 21002, China; 2.Ningxia Centers for Disease Prevention Control, Yinchuan 750004, China)

Abstract **[Objectives]** To develop a PCR method for identifying the source of *Anopheles sinensis* blood meals and determining the host preferences of *A.sinensis*. **[Methods]** Species-specific primers were designed based on the mitochondrial cytochrome b sequences of common mosquito hosts (human, cow, pig, goat, mouse and chicken) to identify the animal blood ingested by wild-caught *A. sinensis*. Meanwhile, DNA was extracted from the blood of common mosquito hosts, and from *A.sinensis* that had not ingested a blood meal, to verify the specificity of the method. DNA extracted from *A. sinensis* mosquitoes 6, 12, 24, 36, 4 h and 60 h after ingesting a blood meal was analyzed to determine the sensitivity of the method. **[Results]** Specific PCR products (689, 453, 225, 485, 266 and 468 bp) were amplified from the DNA extracted from different animal hosts. Host DNA was detectable in frozen mosquitoes for as long as 36 h after ingestion but could not be amplified 48 h and 60 h after ingestion. PCR analysis of the DNA in wild-caught specimens indicates that *A. sinensis* fed mainly on the blood of humans (50%), followed by that of pigs (30%) and cows (20%). A mixed blood meal comprised of both human and pig blood was detected in a single mosquito. **[Conclusion]** The PCR assay proved an accurate and reliable method of identifying the blood meals of wild-caught *A. sinensis*. *A. sinensis* feeds on both human and animal blood.

Key words *Anopheles sinensis*, mosquitoes blood meals, PCR, blood-sucking habit

---

* 资助项目 Supported projects：南京军区“十二五”面上课题(MS159)；全军部队疾病防控指令性计划(13BJYZ59)；江苏省科协科技服务站项目（FFZ-2013-0234）

**第一作者 First author，E-mail：zhuchangqiang10@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：njcdc@163.com

收稿日期 Received：2015-06-23，接受日期 Accepted：2015-06-30

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是我国间日疟和丝虫病的重要媒介，中华按蚊的嗜血习性与疟疾传播密切相关，中华按蚊的吸血对象决定病原储存与传播的宿主范围（邵柏等，2002）。甘肃省地处我国西北地区，四季分明，冬无严寒，夏无酷暑，中华按蚊是当地疟疾传播的主要媒介种群（翟士勇等，2006）。建国初期，甘肃省数十个县（市）均有疟疾流行，目前在甘肃南部的一些区（县）仍有原发病例散发（李凡等，2012）。因此，确定甘肃省地区中华按蚊蚊胃血来源有助于了解其可能的动物保存宿主和病原传播人群，为该地区疾病防治工作提供参考。

1　材料与方法

1.1　实验用蚊

由北京军事医学科学院媒介生物学实验室提供 3~5 日龄中华按蚊 *A. sinensis*（饲养条件：温度 24~27℃，相对湿度 65%~80%）；现场在甘肃兰州郊区村庄（35°47′18.37″N，104°09′7.50″E 2014 年 6 月）应用二氧化碳诱蚊灯在牛棚、猪圈及居民院落和居室捕获中华按蚊，并立即用乙醚麻醉处死，单只分装，管内置干燥剂，带回实验室，－20℃保存待用。

1. 2　主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒，胶回收试剂盒，PCR 相关试剂购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司；凝胶成像仪（GeLX-1520）购自上海欧翔科学仪器有限公司；PCR 仪（TC-512 型）购自英国 Techne 公司；离心机（TGL-16）购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；CO_2 诱蚊灯(市售)。

1.3　模板 DNA

1.3.1　不同血液来源血样的 DNA 提取　取人血、猪血、牛血、羊血、鼠血、鸡血各 200 μL，置 1.5 mL 离心管中，按照试剂盒说明书提取 DNA，－20℃保存备用。

1.3.2　吸血及未吸血中华按蚊 DNA 的提取　取 1 只吸人血后不同时间的饱血按蚊，置 1.5 mL 离心管，加 1×PBS 100 μL，用研磨棒将其充分研碎，按照试剂盒说明书提取，－20℃保存备用。

1.4　按蚊种群的分子鉴定

中华按蚊和嗜人按蚊在我国分布广，种群数量大，外部形态极其形似，而二者的媒介效能具有很大差异。本文研究中华按蚊的吸血习性，因此进行中华按蚊和嗜人按蚊的种群鉴定具有重要意义。根据中华按蚊和嗜人按蚊 rDNA-ITS2 序列，按照文献（Rutledge *et al.*，1996）分布设计两种蚊的共有引物（UP）和种特异性引物（PS，PA），见表 1。

1.5　中华按蚊蚊胃血鉴定方法的建立及其鉴定

PCR 引物是基于中华按蚊、鸡、鼠、猪、牛、羊及人的线粒体 DNA 细胞色素 b 序列差异而设计（表 1）。按照 DNA 试剂盒说明书提取 DNA 作为 PCR 反应的模板。PCR 反应体系为模板 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、酶 0.5 μL、10×Buffer 2 μL、dNTP 2 μL、去离子水 12.5 μL。PCR 扩增程序为 94℃ 3 min；94℃ 30 s；53℃（羊）、54℃（牛、猪）、57℃（人、鼠、鸡）、59℃（中华按蚊）30 s；72℃ 1 min；72℃ 7 min；扩增循环 35 次。扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶（含 0.5 μg/mL 溴化乙锭）电泳后紫外灯下观察、拍照。切胶回收 PCR 扩增的特异性片段，送华大基因测序公司测序；测得的特异片段序列在 GenBank 进行 Blast 比对。应用建立的蚊胃血源 PCR 鉴定方法检测现场采集的中华按蚊标本。

2　结果与分析

2.1　按蚊种特异性扩增结果

在含有 UP、PS 及 PA 3 种引物的同一反应体系中，在相同条件下扩增，在含有已知中华按蚊和嗜人按蚊模板反应中，结果分别出现 253 bp、425 bp 的单一清晰条带，与引物间预期距离一致，证明为种特异性。对来自甘肃兰州现场采集的 10 个按蚊进行了检测，结果显示均为单一 425 bp 扩增条带，因此证实现场采集的 10 个按

表 1 中华按蚊分子鉴定及蚊胃血血源鉴定的引物序列

Table 1 Primer sequences for identification of mosquito blood meals and molecular identification of *Anopheles sinensis*

引物 Primer	序列(5'→ 3') Sequences (5'→ 3')	扩增长度 Amplification length (bp)
UP	Forward: CCATGACGTACACATACTTG	
PS	Reverse: GTTGTCCAGCCCGCTAACAT	425
PA	Reverse: GCTCCATCTACACACAGCGT	253
人 Human	F: CTTCCTACACATCGGGCGAG R: GTGATTGGCTTAGTGGGCGA	689
猪 Pig	F: CCT CGCAGCCGTACATCTC R: GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	453
牛 Cow	F: GCCATATACTCTCCTTGGTGACA R: GTAGGCTTGGGAATAGTACGA	271
羊 Goat	F: TTAAAGACTGAGAGCATGATA R:ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG	225
鼠 Mouse	F: ACCACTCATTCATTGACCTACCTGC R: GGTCAAGGTGGCTTTGTCTACTGAG	485
鸡 Chicken	F: GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA R: GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG	268
中华按蚊 *Anopheles sinensis*	F:GGACAAATATCATTTTGAGGAGCAACAG R:ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG	468

蚊均为中华按蚊（图 1）。

2.2 PCR 检测方法的特异性

本实验建立的 PCR 体系， 每个物种扩增的特异性条带长度分别为 689 bp（人）、485 bp（鼠）、468 bp（中华按蚊）、453 bp（猪）、271 bp（牛）、268 bp（鸡）225 bp（羊）。实验分别以上述已知动物血样及中华按蚊胃血标本进行 PCR，获得的扩增条带长度与理论预测值一致（图 2），对不同物种特异片段的序列进行 Blast 比对，显示均为目的动物的线粒体 DNA 细胞色素 b 序列，碱基无差异。

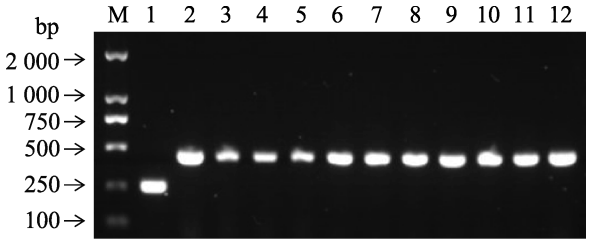

图 1 中华按蚊和嗜人按蚊 ITS2 序列扩增结果

Fig.1 PCR of molecular identification of *Anopheles sinensis* and *Anopheles anrhropophagus*

M：DNA 标志物；1：对照（嗜人按蚊）；2：对照（中华按蚊）；3~12：现场采集中华按蚊。

M:Marker；1: Control (*A. anrhropophagus*)；2:Control(*A. sinensis*)；3-12: Field-collected *A. sinensis*.

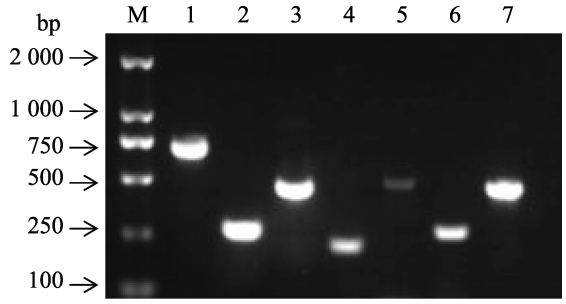

图 2 不同动物血样和中华蚊按蚊 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification result of PCR from DNA of six animals and *Anopheles sinensis*

M：DNA 标志物；1：人血；2：牛血；3：猪血；4：羊血；5：鼠血；6：鸡血；7：中华按蚊。

M: Marker；1: Human blood；2: Cow blood；3: Pig blood；4: Goat blood；5: Mouse blood；6: Chicken blood；7: *A. sinensis*.

2.3　吸人血不同时间后的按蚊蚊胃血检测结果

用 PCR 检测吸人血中华按蚊标本，吸血后 6、12、24 和 36 h 中华按蚊所提取的 DNA 均能扩增出特异性条带；吸血后 48 h 和 60 h 中华按蚊均未能扩增出特异性条带，并且重复 3 次实验结果一致（图 3）。

2.4　现场中华按蚊的 PCR 检测结果

应用 PCR 法对甘肃兰州现场采集的 10 只中华按蚊进行检测，结果显示，吸人血中华按蚊 5 只，吸猪血中华按蚊 3 只，吸牛血中华按蚊 2 只，另有 1 只为未知血液样本，并且有 1 只中华按蚊兼吸人血和猪血（图 4）。

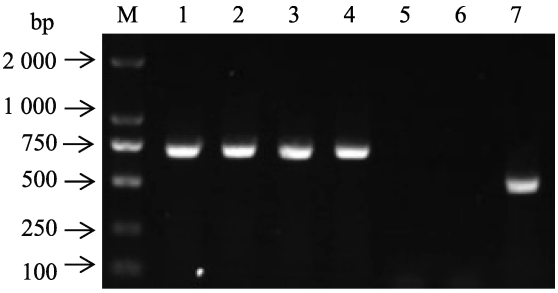

图 3　吸血后不同时间中华按蚊 PCR 检测结果

Fig. 3　Result of PCR from different post feeding time of blood meals in mosquitoes

M：DNA 标志物；1~4：吸血后 6、12、24 和 36 h；5~6：吸血后 48 h 和 60 h；7：未吸血蚊。

M: Marker；1-4: 6, 12, 24, 36 h post-feeding; 5-6: 48 h and 60 h post-feeding; 7: No blood meals in *A. sinensis*.

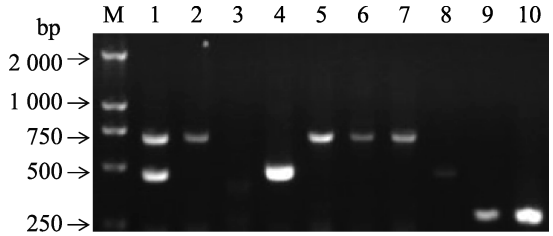

图 4　现场采集中华按蚊的扩增结果

Fig.4　Amplification result of PCR from DNA of field-collected *Anopheles sinensis*

M：DNA 标志物；1：人血、猪血；2：5~7：人血；3：未知血源标本；4，8：猪血；9~10：牛血。

M:Marker；1:Human, pig blood；2: 5-7: Human blood；3: The unknown blood sample；4, 8: Pig blood；9-10: Cow blood.

3　讨论

中华按蚊嗜吸人血、禽和畜血，是我国疟疾和丝虫病的重要传播媒介，疟原虫和丝虫病均经蚊虫吸血传播，因此，研究蚊虫的吸血习性能有效确定病原保存与传播的宿主范围。本研究结果表明，甘肃地区中华按蚊偏吸人血，同时对常见动物（猪、牛、羊）也均有不同程度的嗜吸。根据该地区中华按蚊对人、猪、牛、羊的偏吸性，可以有针对性地采取措施，有效控制疟疾的传播。该地区养殖业比较发达，动物种内种群的数量比较大，下一步，我们将根据不同的牛、羊种设计鉴别方法，了解不同牛种、羊种对中华按蚊吸血习性的影响，加强疾病防治的针对性。

本研究通过鉴定甘肃兰州地区中华按蚊胃血来源不仅可以了解蚊媒传染病可能的动物保虫宿主，也是判定其是否能传播疟疾的重要方法。传统的蚊虫胃内血源鉴定方法有环状沉淀实验、酶联免疫吸附实验和被动血凝抑制实验等（郭绍水等，2012；Massebo *et al.*，2013），但它们均有不足之处，沉淀实验的特异性较差；ELISA 检测的宿主种类有限；被动血凝抑制实验操作复杂。目前，基于分子标志的各种鉴定技术，因其具有较高可靠性、特异性和灵敏的特点而被国内外广泛应用。Rebekah（2005）基于 mtDNA-Cytb 基因，采用多重 PCR 技术鉴定了按蚊、致倦库蚊等蚊胃血来源；Chang 等（2008）运用 PCR 技术鉴定了台湾地区微小按蚊的吸血习性。帅淑芬等（2013）应用 PCR 体系鉴定现场白纹伊蚊的胃血来源，并对其吸血习性进行研究。基于 DNA 的分子鉴定方法具有良好的应用前景。本研究基于 mtDNA-Cytb 基因，设计针对人、牛、羊、猪、鼠、鸡和中华按蚊的特异性引物，采用 PCR 对上述血样进行扩增，获得的扩增条带长度与理论预测值一致，表明该方法可以特异性鉴定中华按蚊胃内人血、牛血、羊血、猪血、鼠血和鸡血。

PCR 鉴定蚊胃血血源的成功率与蚊胃血消化情况密切相关。Oshaghi 等（2006）用 PCR 检测蚊胃中的人血，检测时限不超过吸血后 36 h。

刘耀宝等（2009）建立的按蚊胃内人血源 PCR 检测技术能稳定地检出吸血后 24 h 内中华按蚊胃中的人血源 DNA，吸血 40 h 后不能进行人血的鉴定。杨曼尼和马雅军（2008）用多重 PCR 检测吸人血白纹伊蚊标本，结果显示，吸血后 48 h 内 PCR 检测均阳性，48 h 后检测无扩增条带。可见检测的成功率与胃血消化时间密切相关。本实验结果显示，蚊吸血后 36 h 内均可成功检测，48 h 之后则无法检测，与已有研究结果有一致性。因此，本实验建立的 PCR 技术可用于对吸血后 36 h 以内的中华按蚊现场样本胃血血源的检测。

参考文献 (References)

Massebo F, Balkew M, Gebre-Michael T, Lindtjørn B, 2013. Blood meal origins and insecticide susceptibility of *Anopheles arabiensis* from Chano in South-West Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 6(2): 44.

Guo SS, Zhou SS, Huang F, Zheng X, Wu S，Zhou HY, ZhuoMa YJ, 2012. Investigation on blood-sucking habit of *Anopheles* (Diptera:Culicidae) using multiplex polymerase chain reaction in malaria-endemic area of Chayu County, Tibet. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis*., 30（2）: 122–126. [郭绍水，周水森，黄芳, 郑香，武松，周华云，卓玛央金, 2012. 应用多重 PCR 法分析西藏察隅疟疾流行区按蚊吸血习性. 中国寄生虫学与寄生虫病志, 30(2): 122–126.]

Li F, Yang JK, Chen SB, Feng Y, 2012. Current maliria prevalence and control strategy in Gansu Province. *China Tropical Medicine*, 12(10): 1261–1262.[李凡，杨俊克，陈生邦，冯宇. 甘肃省疟疾流行现状和防治措施. 中国热带医学, 12(10): 1261–1262.]

Liu YB, Cao J, Zhou HY, Li JL, Zhu GD, Wang WM, Guo YP, Zhu HW, Gao Q, 2009. Assay of human blood index of Anopheline mosquito by polymerase chain reaction. *Chin. J. Vector. Biol. & Control*, 20(2): 108–110. [刘耀宝，曹俊，周华云, 李菊林，朱国鼎，王伟明，顾亚萍，朱韩武，高琪, 2009. 用 PCR 技术测定按蚊人血指数的研究.中国媒介生物学及控制杂志, 20(2): 108–110.]

Chang MC, Teng HJ, Chen CF, Chen YC, Jeng CR, 2008. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal*, 7(6): 105.

Oshaghi MA, Chavshin AR, Hassan V, Fatemeh Y, Fatemeh M, Nahid N, 2006. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Exp. Parasitol*., 112(4): 232–236.

Rebekah JK, Douglas EN, 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *Am. J. Trop. Med*., 73(2): 336–342.

Rutledge CR, Cornel AJ, Meek CL, 1996. Validation of ribosomal DNA 2 polymerase chain reaction species diagnostic assay for the common malaria mosquitoe (Diptera:Culicidae) sibling species complex. *J. Med. Entomol*., 33(6): 952.

Shao B, Huang JL, Zhang YL, 2002. Advances in research of mosquitoes. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 25(3): 183–185.[邵柏, 黄佳礼, 张岳林, 2002. 蚊虫研究进展. 中国国境卫生检疫杂志, 25 (3) : 183–185.]

Shuang SF, Li YJ, Cai SW, Duan JH, Chen XG, 2013. Application of PCR method in the study of blood-sucking habit of *Aedes albopictus*. *J. Trop. Med*., 13(5): 582–584. [帅淑芬，李奕基，蔡松武，段金花，陈晓光. 应用 PCR 技术研究白纹伊蚊的吸血习性. 热带医学杂志, 13(5): 582–584.]

Yan MN, Ma YJ, 2008. Identification of mosquito blood meals using multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Pathogen Biology*, 3(11): 815–817. [杨曼尼, 马雅军, 2008. 应用多重 PCR 法鉴定蚊胃血血源的研究. 中国病原生物学杂志, 3(11): 815–817.]

Zhai SY, Huang G, Dong JQ, 2006. The fauna of blood-sucking dipterous in China. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 13(3): 178–184. [翟士勇，黄钢，董建臻.我国重要吸血双翅目昆虫区系的研究进展. 寄生虫与医学昆虫学报, 13(3): 178–184.]