

中华按蚊和雷氏按蚊实时荧光定量 PCR 鉴定方法的建立与应用*

舒黄芳^{1**} 王可艺¹ 吴 德² 林荣幸² 卢文成² 阮彩文²
邓卓晖² 张 萌³ 宋 铁^{4***}

(1. 广东药科大学公共卫生学院, 广州 510315; 2. 广东省疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 广州 511430;
3. 广东省疾病预防控制中心传染病预防控制所, 广州 511430; 4. 广东省疾病预防控制中心, 广州 511430)

摘 要 【目的】建立中华按蚊 *Anopheles sinensis* 与雷氏按蚊 *Anopheles lesteri* 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测技术, 为 2 种疟疾按蚊的准确鉴定提供分子鉴定方法。【方法】建立 2 种按蚊的样本库, 利用形态学方法和基因测序对蚊虫样本进行鉴定; 合成并克隆阳性质粒质控品。从 NCBI 数据库上下载中华按蚊和雷氏按蚊的 rDNA-ITS2 序列, 利用 Prime 3 软件在线设计 2 种按蚊的引物和探针, 并验证该 PCR 方法的最低检测限、敏感性、特异性和可重复性。【结果】收集并鉴定 4 种 383 头蚊虫, 其中中华按蚊 159 头、雷氏按蚊 104 头、致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 60 头和白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 60 头。中华按蚊和雷氏按蚊的 qPCR 的最低检测限均为 31.50 拷贝/反应, 标准曲线线性关系相关系数 (R^2) 均为 0.99。敏感性和特异性均为 100%, 重复性试验结果显示, 中华按蚊和雷氏按蚊的组内和组间变异系数均小于 2%。【结论】本方法所建立的 TaqMan 探针 qPCR 方法灵敏度高, 特异性高, 可用于中华按蚊和雷氏按蚊的分子鉴别。

关键词 中华按蚊; 雷氏按蚊; TaqMan 探针; 实时荧光定量 PCR

Establishment of real-time PCR methods to identify *Anopheles sinensis* and *Anopheles lesteri*

SHU Huang-Fang^{1**} WANG Ke-Yi¹ WU De² LIN Rong-Xing² LU Wen-Cheng²
RUAN Cai-Wen² DENG Zhuo-Hui² ZHANG Meng³ SONG Tie^{4***}

(1. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510315, China; 2. Institute for Parasitic Disease Control and Prevention, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China;
3. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China; 4. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China)

Abstract 【Objectives】To develop a real-time PCR technique to identify *Anopheles sinensis* and *Anopheles lesteri*. 【Methods】Samples of each species were obtained and identified using both morphological methods and gene sequencing. Positive plasmid quality control products were synthesized and cloned, and the rDNA-ITS2 sequences of *A. sinensis* and *A. lesteri* were downloaded from the NCBI database. Prime 3 software was used to design primers and probes for each species online, and the minimum detection limit, sensitivity, specificity and repeatability of the PCR method were verified. 【Results】Three hundred and eighty-three mosquitoes were collected and identified to 4 species; 159 *A. sinensis*, 104 *A. lesteri*, 60 *Culex pipiens quinquefasciatus* and 60 *Aedes albopictus*. The minimum detection limit of qPCR for *A. sinensis* and *A. lesteri* was 31.5 copy/response and the linear correlation coefficient (R^2) of the standard curve was 0.99. The results of a repeatability test showed that intra and inter-group coefficients of variation for *A. sinensis* and *A. lesteri* were < 2%.

*资助项目 Supported projects: 广东省医学科学技术研究基金 (B2020140)

**第一作者 First author, E-mail: shuhuangfang36@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: fellst@vip.sina.com

收稿日期 Received: 2022-06-30; 接受日期 Accepted: 2022-11-24

[Conclusion] A TaqMan probe, real-time, fluorescent, quantitative PCR method with good sensitivity and specificity was developed to identify *A. sinensis* and *A. lesteri*.

Key words *Anopheles sinensis*; *Anopheles lesteri*; TaqMan probe; Real-time fluorescence quantitative PCR

按蚊属 *Anopheles* 蚊虫是人类最致命的动物杀手之一, 中国分布两个亚属, 即中华按蚊 *Anopheles sinensis* 和雷氏按蚊 *Anopheles lesteri* 所在的按蚊亚属 *Anopheles* 和塞蚊亚属 *Cellia*, 均是疟疾的重要传播媒介, 我国曾经受到疟疾严重威胁, 特别是广东、云南等南方省份(于潇等, 2020)。尽管我国已于 2021 年 6 月获世界卫生组织(WHO)认证为消除疟疾国家(World Health Organization, 2021), 但输入性疟疾风险持续存在(高琪, 2021), 仍需重视对疟疾媒介按蚊的监测和防控。我国主要的传疟按蚊包括中华按蚊、微小按蚊 *Anopheles minimus*、大劣按蚊 *Anopheles dirus* 和多斑按蚊 *Anopheles maculatus* 种团等 19 种(Sinka et al., 2011), 其中, 广东省在疟疾流行期间以中华按蚊、雷氏按蚊、微小按蚊、大劣按蚊为主, 目前主要以中华按蚊为主。

蚊虫物种的鉴定是蚊媒昆虫监测的基础工作, 目前采用的主要方法有形态学鉴定和分子鉴定。与传统形态学相比, 分子生物学鉴定技术突破了传统方法对经验的过度依赖, 并可利用蚊虫的残体进行有效的鉴定, 对形态近似种进行快速准确辨别(彭淑琼等, 2010; 钟敏等, 2014)。多年研究证明, 核糖体 DNA 第二内转录间隔区(Ribosomal DNA second internal transcribed spacer, rDNA-ITS2)片段的序列差异具有理想的赫坎按蚊种团 *Anopheles hyrcanus* group 成员隐种鉴别解析度(马雅军等, 2005; 彭恒等, 2020), 该片段在种内变异很小, 而其在种间变异很大, 可用作蚊媒种属鉴别的分子遗传学标志(江世宏等, 2008; 马婷婷等, 2011)。中华按蚊和雷氏按蚊属于赫坎按蚊种团, 在形态学上较难鉴定。基于此, 本研究针对 rDNA-ITS2 基因的 TaqMan 探针 qPCR 检测方法, 对中华按蚊和雷氏按蚊进行分子鉴定, 为快速准确鉴别 2 种按蚊提供一种新的检测手段。

1 材料与方法

1.1 蚊虫的采集与鉴定

2002 年, 将珠海横琴岛捕获的雷氏按蚊(经形态学鉴定)置于 -20℃ 条件下保存至今。库蚊和伊蚊由广东省疾病预防控制中心消杀所提供。2021 年 5-10 月, 选择广东省汕头澄海区、阳江阳春市、江门台山市和恩平市、肇庆广宁县、清远清城区等按蚊密度较高的 6 个采集点, 利用诱蚊灯法和人帐法采集按蚊, 采集环境包括牛棚和人房栖息地, 田塘型、缓流型和丛林型滋生地。每个采集点连续采集 3 日。

将采集的蚊虫置于 -20℃ 冰箱中冷冻 30 min 后取出, 置于解剖镜下对采集的按蚊进行形态学鉴定, 若翅前缘脉有 2 个白斑, 5.2 纵脉有隧白斑, 鉴定为中华按蚊; 若翅前缘脉有 2 个白斑, 5.2 纵脉没有隧白斑且腹部侧膜无 T 形暗斑, 鉴定为雷氏按蚊。

1.2 主要试剂与仪器

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 德国); TaqMan® Fast Advanced Master Mix(2×) (ThermoFisher, 美国); GoTaq® Green Master Mix (Promega, 美国)。

PCR 扩增仪 (MJ RESEARCH INC, 美国), 水平核酸电泳仪 (Takara, 日本), 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96 Touch DeepWell, 美国), 解剖显微镜 (Leica Microsystems, 瑞士)。

1.3 引物和探针的设计与合成

利用美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站, 对中华按蚊、雷氏按蚊 ITS2 基因的核苷酸序列进行同源性比较, 找出 2 种蚊虫差异较大的区域, 以中华按蚊代表株 (GenBank 登录号: MG028946.1) 和雷氏按蚊代表株 (GenBank 登

录号: AJ004941.3) 为引物和探针的代表珠序列, 在 Primer 3 web 网站设计出 2 种按蚊的引物和探针 (图 1); 中华按蚊 qPCR 上游引物 (AS-F) 为 5'-GAAGGCAGACAAGTAGAAAGGG-3'; 中华按蚊 qPCR 下游引物 (AS-R) 为 5'-AGACACC TGTTCATACCTACA-3'; 中华按蚊 qPCR 探针 (AS-P) 为 5'-ATTGAGCAGGCGCGTCCTTTG CT-3'。雷氏按蚊 qPCR 上游引物 (AL-F) 为 5'-TGGCAAACAGAAAACACTACGCA-3'; 雷氏按蚊 qPCR 下游引物 (AL-R) 为 5'-AAGTTCCGA

GATGCAAGCGA-3'; 雷氏按蚊 qPCR 探针 (AL-P) 为 5'-TGCTGGTCACACGTCACAGT CGT-3'。中华按蚊探针的 5'端以 FAM 报告荧光基团标记, 3'端以 BHQ1 淬灭基团标记; 雷氏按蚊探针的 5'端以 HEX 报告荧光基团标记, 3'端以 BHQ1 淬灭基团标记。将设计好的探针序列在 NCBI 网站上 BLAST 比对, 两者探针序列与各自蚊种 rDNA-ITS2 序列的相似性都在 100%, 特异性好。设计的引物探针委托宝生物工程(大连)有限公司合成。

种类/简称 Species/Abbrev	CTAAGAGGCAGACAAGTAGAAAGGGCTGTGTTCCCGGACGGCGGAGGAAGTATATTGAGCAGGCGCTCT-TTGCTATGTGTAGGTATGGAACAGGTGCTTCCTCTCTATTTTA
1 中华按蚊 <i>A. sinensis</i> (MG028946.1)	AS-F AS-P AS-R
2 雷氏按蚊 <i>A. lesteri</i> (AJ004941.3)	AL-F AL-P AL-R

图 1 中华按蚊与雷氏按蚊引物和探针设计的位置和序列比对图

Fig. 1 Position and sequence comparison of primers and probes designed between *Anopheles sinensis* and *Anopheles lesteri*

AS-F: 中华按蚊 qPCR 上游引物; AS-R: 中华按蚊 qPCR 下游引物反向互补序列; AS-P: 中华按蚊 qPCR 探针; AL-F: 雷氏按蚊 qPCR 上游引物; AL-R: 雷氏按蚊 qPCR 下游引物反向互补序列; AL-P: 雷氏按蚊 qPCR 探针。

AS-F: *A. sinensis* qPCR upstream primer; AS-R: *A. sinensis* qPCR downstream primer reverse complementary sequence; AS-P: *A. sinensis* qPCR probe; AL-F: *A. lesteri* qPCR upstream primer; AL-R: *A. lesteri* qPCR downstream primer reverse complementary sequence; AL-P: *A. lesteri* qPCR probe.

1.4 蚊虫标本的处理及 DNA 提取

将单头完整蚊子放入 2 mL 带有直径 3 mm 磁珠的研磨管中, 标记后加入 100 μ L PBS 缓冲液, 混匀离心后在样品研磨珠均质器 (OMNI, 北京平利洋经贸有限公司) 上以 4 m/s 的速度研磨 30 s, 取 80 μ L 研磨液到 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μ L Buffer ATL 和 20 μ L 蛋白酶 K, 混匀后在水浴锅中 56 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 其后根据 QIAamp DNA Mini Kit 提取试剂盒说明书提取蚊虫 DNA, 最后加 200 μ L Buffer AE 洗脱, 8 000 r/min 离心 1 min, 洗脱的 DNA 收集于 1.5 mL 离心管内, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 PCR 反应及测序、系统进化分析

用于 PCR 检测的中华按蚊上游引物 (AS-F0) 为 5'-CCATGACGTACACATACTTG-3'; 下游引物 (AS-R0) 为 5'-GTTGTCCAGCCCGCTA ACAT-3' (马雅军等, 1998)。雷氏按蚊的上游引

物 (AL-F0) 为 5'-CCATGACGTACCCATACTTG AG-3'; 下游引物 (AL-R0) 为 5'-GTGGCCTCAC TCGTAAGTGAT-3'。PCR 反应体系: GoTaq[®] Green Master Mix 12.50 μ L, AS-F0 或 AL-F0 (10 μ mol/L) 为 0.50 μ L, AS-R0 或 AL-R0 (10 μ mol/L) 为 0.50 μ L, 去离子水 6.50 μ L, 模板 5 μ L, 总体积 25 μ L; 中华按蚊模板的扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 以 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min 保持; 雷氏按蚊模板的扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 以 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min 保持。

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将出现条带的 PCR 产物送北京六合华大基因科技有限公司进行正向和反向测序, 测序结果的序列在 GenBank 中 BLAST 比对, 用 SeqMan 软件拼接正向和反向序列, 再用 MEGA6.0 软件将本研究中扩增的 2 种传疟按蚊 ITS2 序列和 2 条代表株序列, 再从 GeneBank 中各下载 1 株克萊按蚊

Anopheles kleini、1 株比伦按蚊 *Anopheles belenrae*、1 株微小按蚊 *Anopheles minimus A*、1 株大劣按蚊的 *ITS2* 序列进行比对, 进一步确定分支系统学分析结果的可靠性, 使用距离法 (Neighbor Joining, NJ) 构建系统发育树。

1.6 阳性质粒质控品的制备

阳性质粒质控品由宝生物工程 (大连) 有限公司定制, 主要步骤是采用全基因合成方法将 2 种按蚊的引物和探针按照间隔穿插的形式拼接合成, 序列顺序为: AGAAGGCAGACAAGTAGA AAGGGATTGAGCAGGCGCGTCCTTTGCTTG GCAAACAGAAAACACTACGCATGTAGGTATGG AACAGGTGTCTTGCTGGTTCACCACGTCACA GTCGTTTCGCTTGCATCTCGGAACCTAT。将合成的 DNA 克隆到 pUC57 载体中制成阳性质粒质控品, 然后用限制性内切酶酶切和测序来验证插入片段的准确性。

1.7 qPCR 反应体系和反应条件建立

TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix(2×) 为 10 μL, 上游引物 AS-F 或 AL-F (10 μmol/L) 为 1 μL, 下游引物 AS-R 或 AL-R (10 μmol/L) 为 1 μL, 探针 AS-P 或 AL-P (5 μmol/L) 为 1 μL, 去离子水 2 μL, DNA 模板 5 μL, 反应体系为 20 μL。扩增条件: 50 °C 2 min, 95 °C 2 min 各 1 个循环; 95 °C 5 s, 54-64 °C 60 s 45 个循环; 在其他条件不变的情况, 以出现最高的荧光值和最小的 Ct 值为指标, 对退火温度在 54-64 °C 范围内进行优化。

1.8 检测限试验和标准曲线图的绘制以及重复性试验

利用核酸/蛋白质荧光定量仪测定质粒浓度, 根据以下公式计算拷贝数, 双链 DNA 拷贝数 (拷贝/mL) = 6.02×10^{23} (拷贝/mL) × 浓度 (g/mL) / 重组质粒长度 × 660 (重组质粒长度 = pUC57 载体的碱基数 + 目的基因扩增条带大小)。0 倍梯度稀释的阳性质粒质控品作为模板, 设立阴性对照, 以优化好的反应条件进行 2 种按蚊的单重 qPCR 扩增, 以阳性质粒质控品拷贝数

的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制标准曲线; 以 Ct 值 ≤ 36 为阈值, 分析能够检测出的最小标准质粒拷贝数。

以稀释后的阳性质粒为模板进行 3 次组内、组间重复性试验, 以评价方法的稳定性。

1.9 敏感性和特异性试验

对中华按蚊 (159 头)、雷氏按蚊 (104 头)、致倦库蚊 (60 头) 和白纹伊蚊 (60 头) 进行敏感性和特异性检测。用中华按蚊和雷氏按蚊特异引物和探针分别测试本实验提取的中华按蚊、雷氏按蚊、致倦库蚊以及白纹伊蚊的 DNA, 同时设立阳性和空白对照。

2 结果与分析

2.1 蚊虫采集及形态学鉴定

2021 年 5 月, 在广东省汕头市澄海区共捕获按蚊 68 头 (编号: CHAS001-CHAS068); 2021 年 6 月, 在阳江阳春市共捕获按蚊 5 头 (编号: YCAS069-YCAS073); 2021 年 7 月, 在江门台山市共捕获按蚊 6 头 (编号: TSAS074-TSAS079); 2021 年 8 月, 在肇庆广宁县共捕获按蚊 7 头 (编号: GNAS080-GNAS086); 2021 年 9 月, 在清远市清城区共捕获按蚊 6 头 (编号: QCAS087-QCAS092); 2021 年 10 月, 在江门恩平市共捕获按蚊 67 头 (编号: EPAS093-EPAS159), 共 159 头样本。所有样本经形态学鉴定为中华按蚊。2002 年在珠海横琴岛捕获的 104 头 (编号: ZHAL001-ZHAL104) 按蚊样本经形态学鉴定为雷氏按蚊。

2.2 PCR 扩增和测序

共扩增形态学鉴定的中华按蚊 159 份和雷氏按蚊 104 份。其中 159 份中华按蚊均成功扩增出目的条带并成功测序。104 头形态学鉴定的雷氏按蚊成功扩增出 87 份, 未扩增出的 17 份样本改用中华按蚊引物扩增均成功扩增出目的条带, 全部 PCR 产物送样测序, 序列比对结果为雷氏按蚊 87 份 (编号: ZHAL001-ZHAL087), 中华按蚊 17 份 (编号: ZHAL088-ZHAL104)。

2.3 系统进化分析

为了能很好进行分子分型,本研究分别选择已知 1 株中华按蚊代表株 (GenBank 登录号: MG028946.1) 和 1 株雷氏按蚊代表株 (GenBank 登录号: AJ004941.3) 序列进行分析,序列比对发现 176 株中华按蚊序列与已知 1 株中华按蚊代表株同源性在 98.83%-100%,属于同一蚊种;87 株雷氏按蚊序列与已知 1 株雷氏按蚊代表株同源性为 98.91%-99.78%,属于同一蚊种。在本次研究中,从 7 个按蚊采集点共选择 21 个代表序列进行进化分析,同时引入赫坎按蚊种团中的其他两个成员,克莱按蚊和比伦按蚊,以及微小按蚊 A 和大劣按蚊一起进行进化分析,构建系统

发育树 (图 2)。系统发育树显示共有 3 个种团,本次研究的 14 条序列 (CHAS001、CHAS068、YCAS070、YCAS072、TSAS075、TSAS079、GNAS080、GNAS083、QCAS087、QCAS089、EPAS104、EPAS159、ZHAL090 和 ZHAL094) 与中华按蚊代表株位于同一分支,7 条序列 (ZHAL001、ZHAL010、ZHAL016、ZHAL026、ZHAL032、ZHAL036 和 ZHAL054) 与雷氏按蚊代表株位于同一分支,这两个分支与克莱按蚊序列 (DQ177501.1) 和比伦按蚊 (LC634748.1) 形成赫坎按蚊种团;微小按蚊 A (AF416783.1) 属于微小按蚊复合体;大劣按蚊 (LC333225.1) 属于大劣按蚊复合体。

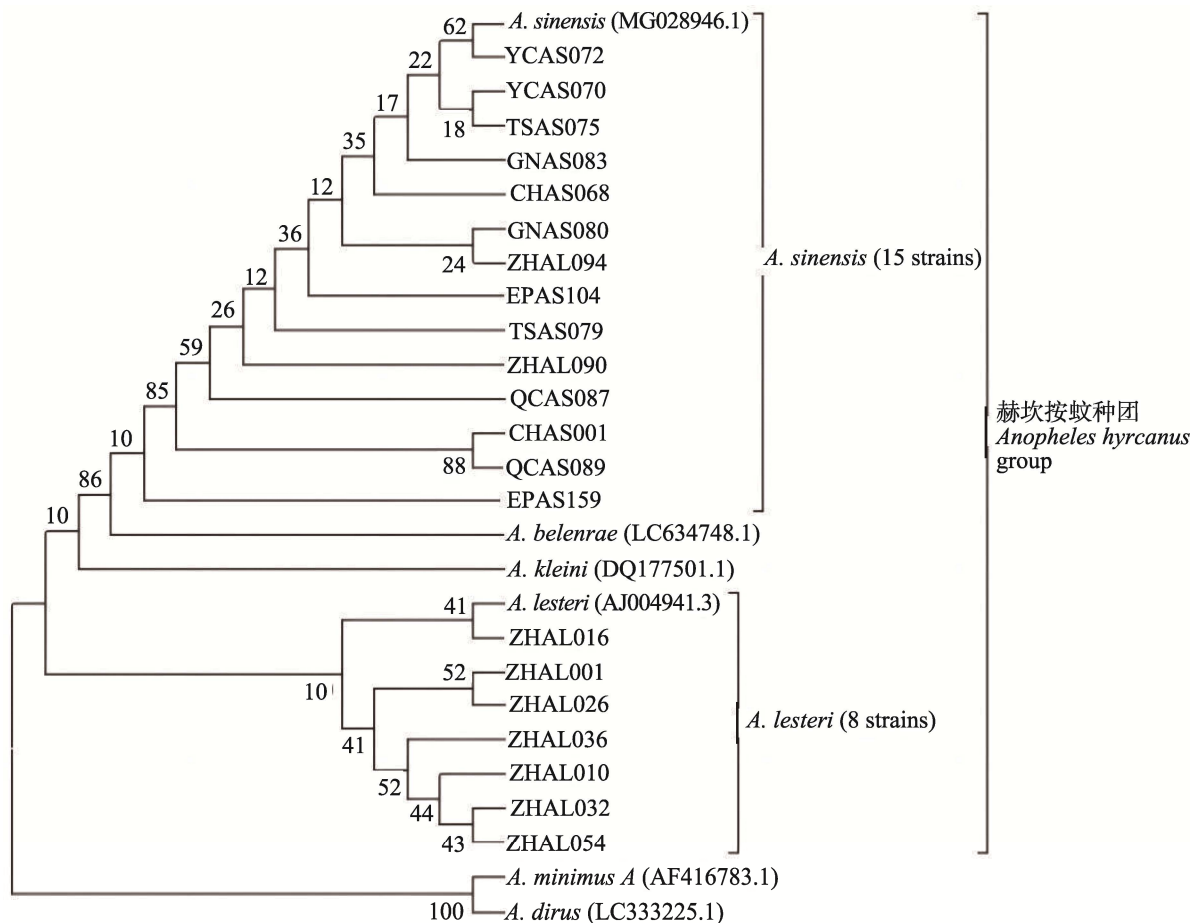


图 2 中华按蚊和雷氏按蚊 ITS2 基因的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS2 genes of *Anopheles sinensis* and *Anopheles lesteri*

CH: 澄海; YC: 阳春; TS: 台山; GN: 广宁; QC: 清城; EP: 恩平; ZH: 珠海。

图中进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验的百分比值。

CH: Chenghai; YC: Yangchun; TS: Taishan; GN: Guangning; QC: Qingcheng; EP: Enping; ZH: Zhuhai. The number of nodes in the phylogenetic tree in the figure represents the percentage value using a bootstrap analysis of 1 000 replications.

2.4 阳性质粒的制备与鉴定

将2种按蚊的引物拼接成全长279 bp的DNA核酸片段, 化学合成后克隆到 pUC57 载体, 提取阳性质粒经双酶 (*EcoR* I /*Hind* III) 酶切鉴定, 酶切结果显示在279 bp和2 630 bp附近分别出现2个目的条带, 片段大小与预期相符, 测序结果显示插入的目的片段未发现核苷酸位点突变。

2.5 qPCR 反应与条件优化

将阳性质粒进行10倍系列稀释, 以 10^{-1} 稀释度的阳性质粒作为模板进行优化2种按蚊的单重 qPCR 方法, 退火温度在54-64 °C范围内, 最后综合全部的荧光值、Ct 值以及扩增 S 曲线

是否明显, 当退火温度为59 °C时, 中华按蚊与雷氏按蚊扩增反应的效率最高。

2.6 标准曲线和检测限

利用核酸/蛋白质荧光定量仪测定的质粒浓度为10.05 ng/μL, 计算出其原始浓度为 3.15×10^9 拷贝/μL, 使用最适退火温度, 以 $3.15 \sim 3.15 \times 10^8$ 拷贝/μL 的阳性质粒质控品作为模板, 进行2种按蚊的单重 qPCR 扩增。结果显示, 2种按蚊 qPCR 的检测限均为31.50 拷贝/反应 (图3: A, C)。标准曲线见图3 (B, D), 中华按蚊和雷氏按蚊的扩增效率分别为97.10%和95.50%。2种按蚊的 C_t 值与阳性质粒质控品拷贝数的对数呈良好的线性关系, R^2 均为0.99。

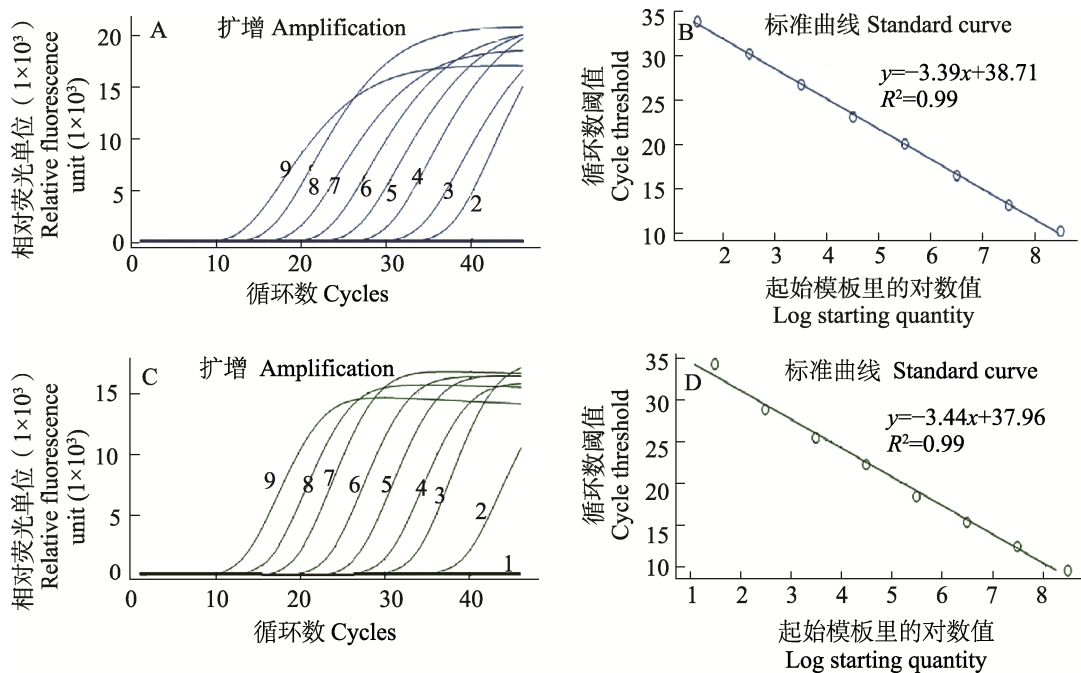


图3 不同浓度阳性质粒质控品的 qPCR 扩增曲线和标准曲线

Fig. 3 qPCR amplification curve and standard curve of different concentrations of positive plasmid quality control products

A. 中华按蚊的扩增曲线; C. 雷氏按蚊的扩增曲线; B. 中华按蚊的标准曲线; D. 雷氏按蚊的标准曲线。

1: 3.15 拷贝/μL; 2: 3.15×10^1 拷贝/μL; 3: 3.15×10^2 拷贝/μL; 4: 3.15×10^3 拷贝/μL;

5: 3.15×10^4 拷贝/μL; 6: 3.15×10^5 拷贝/μL; 7: 3.15×10^6 拷贝/μL;

8: 3.15×10^7 拷贝/μL; 9: 3.15×10^8 拷贝/μL。

A. Amplification curves of *A. sinensis*; C. Amplification curves of *A. lesteri*; B. Standard curve of *A. sinensis*;

D. Standard curve of *A. lesteri*; 1: 3.15 copies /μL; 2: 3.15×10^1 copies/μL; 3: 3.15×10^2 copies /μL;

4: 3.15×10^3 copies/μL; 5: 3.15×10^4 copies/μL; 6: 3.15×10^5 copies /μL; 7: 3.15×10^6 copies/μL;

8: 3.15×10^7 copies /μL; 9: 3.15×10^8 copies /μL.

2.7 重复性试验结果

对 10-1 000 拷贝/ μL 的阳性质粒质控品作 3 次重复检测, 结果如表 1 所示。中华按蚊与雷氏按蚊的组内和组间重复试验的变异系数均小于 2%, 表明试验建立的 TaqMan 探针 qPCR 方法重复性好。

2.8 敏感性和特异性试验

用建立的 2 种传疟按蚊 qPCR 方法对上述 4

种 383 头蚊虫样本进行检测, $\text{Ct} < 30$ 且曲线呈 S 型判断为阳性, $30 \leq \text{Ct} < 35$ 判断为可疑, $\text{Ct} \geq 35$ 判断为阴性。所有可疑标本需要重复实验, 检测结果可重复, 判断为阳性, 否则阴性。形态学鉴定的 383 头蚊虫中, 中华按蚊阳性 176 份, 与测序鉴定结果一致, 其它均未扩增出, 敏感性和特异性均 100%; 雷氏按蚊阳性 87 份, 与测序鉴定结果一致, 其它均未扩增出, 敏感性和特异性均 100%。

表 1 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法重复性试验结果

Table 1 Repeatability test results of TaqMan probe real-time fluorescence quantitative PCR method

按蚊种类 <i>Anopheles species</i>	模板浓度 (拷贝/ μL) Template concentration (copies/ μL)	组内变异系数		组间变异系数	
		Coefficient of variation within groups		Coefficient of variation between groups	
		平均数 $\pm$ 标准差 Mean $\pm$ standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)	平均数 $\pm$ 标准差 Mean $\pm$ standard deviation	变异系数 (%) Coefficient of variation (%)
中华按蚊 <i>A. sinensis</i>	10	33.10 $\pm$ 0.10	0.30	33.31 $\pm$ 0.17	0.52
	10 ⁰	30.30 $\pm$ 0.27	0.88	30.10 $\pm$ 0.08	0.26
	10 ⁰⁰	27.13 $\pm$ 0.02	0.06	27.24 $\pm$ 0.04	0.15
雷氏按蚊 <i>A. lesteri</i>	10	34.47 $\pm$ 0.31	0.89	33.58 $\pm$ 0.35	1.03
	10 ⁰	29.49 $\pm$ 0.27	0.90	30.36 $\pm$ 0.04	0.12
	10 ⁰⁰	26.16 $\pm$ 0.11	0.42	27.32 $\pm$ 0.15	0.53

3 讨论

按蚊种类繁多, 从形态学方面对蚊虫种属进行鉴定存在较大难度, 特别是在基础疾控中心, 缺乏相应的形态学鉴定技术人员, 造成监测到的按蚊无法通过形态学进行准确分类, 给传疟按蚊的监测带来较大影响 (俞可心等, 2022)。为了解决这一实际困难, 结合区 (县) 疾控机构分子诊断实验室的普遍建立, 在基层开展分子鉴定按蚊种属成为可能。为此, 本研究针对广东省 2 种主要传疟媒介开展了分子鉴定方法研究, 以期促进疟疾媒介监测工作的发展。

qPCR 技术具有灵敏度高、特异性好、快速准确等优点, 在水产病原微生物检测 (Zhou *et al.*, 2007; Cutrin *et al.*, 2009)、病毒检测 (王吉成等, 2020; 杨挺懿等, 2021)、细菌检测 (谢思露等, 2019)、有害生物检测 (吴霞等, 2011;

张桂芬等, 2014) 等领域被广泛应用。蚊虫鉴别除了采用传统的形态学分类技术, 还发展出了遗传杂交、同工酶、染色体、DNA 探针和基因组酶切片段多态性在内的多种技术 (蒋成山等, 1983; 李本文等, 1991; 牛玲玲等, 1992; Beebe *et al.*, 2000), 但大多数都难以在流行病学调查中推广应用。近年来, 基于物种相对保守基因 (如 16S rRNA、CO I 基因、ITS2 基因等) 建立的 DNA 条形码技术也应用到蚊虫分类鉴定中 (郭玉燕等, 2017)。按蚊属种类由于形态学特征相似、标本不完整等因素, 依据形态学鉴定的准确性常受到影响。直接进行种特异性片段扩增, 根据片段长度的差异鉴别蚊种的传统 PCR 需要通过凝胶电泳方法对扩增产物进行定性分析, 过程较为繁琐且易受到污染 (李石柱和马雅军, 2004)。而 qPCR 技术对操作者的经验要求不高, 且操作简单、速度快, 杜绝污染, 还可通过用不同浓度

的标准样品的 Ct 值来产生标准曲线, 从而对未知模板进行定量分析(蔡霞, 2005)。该技术有效地解决了传统定量只能终点检测的局限, 测得未经 PCR 信号放大之前的起始模板量, 因此具有广泛的应用前景。

在本研究中, 所有蚊虫先经形态学进行鉴别分类, 再把中华按蚊和雷氏按蚊经 PCR 扩增后进行测序鉴定, 建立用于 2 种传疟按蚊 qPCR 方法评价的样本库。在进行 PCR 扩增过程中发现, 2002 年采集的 104 头经形态学鉴定的雷氏按蚊, 只有 87 头用雷氏按蚊引物扩增出目的条带, 17 份用中华按蚊引物成功扩增出目的条带, 最后经测序分析鉴定 87 头为雷氏按蚊, 17 头为中华按蚊。造成这一差异的主要原因是中华按蚊和雷氏按蚊形态学鉴定错误所致。在随后的 qPCR 鉴定过程中, qPCR 检测结果与测序结果一致, 由此说明, 本研究中建立的 2 种 qPCR 方法较为可靠, 能够对形态学鉴定难度较大的 2 种按蚊成功进行分子鉴定, 这将为今后蚊虫鉴别提供一种新方法。

在中华按蚊和雷氏按蚊特性研究方面, 由于不能采集到足够数量的微小按蚊和大劣按蚊等传疟按蚊, 本研究选择了较为常见的库蚊和伊蚊来做特异性研究, 不能充分展示中华按蚊和雷氏按蚊实时荧光定量 PCR 鉴定方法的特性, 可在后续的研究中有待进一步研究和评价。

致谢: 感谢广东省疾病预防控制中心吴军老师和阴伟雄老师提供的蚊虫样本。

参考文献 (References)

- Beebe NW, Cooper RD, Morrison DA, Ellis JT, 2000. Subset partitioning of the ribosomal DNA small subunit and its effects on the phylogeny of the *Anopheles punctulatus* group. *Insect Molecular Biology*, 9(5): 515–520.
- Cai X, 2005. Quantitative PCR techniques and its application status. *Modern Diagnosis and Treatment*, 16(2): 112–115. [蔡霞, 2005. 定量 PCR 技术及其应用现状. 现代诊断与治疗, 16(2): 112–115.]
- Cutrin JM, Oliveira JG, Bandín I, Dopazo CP, 2009. Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Virological Methods*, 162(1/2): 155–162.
- Gao Q, 2021. Challenge and response of imported malaria for preventing malaria re-establishment. *China Tropical Medicine*, 21(1): 1–4. [高琪, 2021. 输入性疟疾对巩固消除疟疾成果防止再传播的挑战和对策. 中国热带医学, 21(1): 1–4.]
- Guo YY, Luo L, Zheng XL, 2017. Research progress on application of DNA barcoding technique in Culicidae taxonomy. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 35(1): 93–98. [郭玉燕, 罗雷, 郑学礼, 2017. DNA 条形码技术在蚊虫分类鉴定中的研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 35(1): 93–98.]
- Jiang CS, Miao JW, Pan JF, Jiang WB, 1983. Genetic analyses of eight isozymes in *Anopheles sinensis* and *A. lesteri anthropophagus* and a study on their evolutionary relationships. *Journal of Genetics and Genomics*, 10(5): 390–397. [蒋成山, 缪建吾, 潘家复, 蒋文彬, 1983. 中华按蚊和雷氏按蚊嗜人亚种八种同工酶的遗传学分析及其亲缘关系的研究. 遗传学报, 10(5): 390–397.]
- Jiang SH, Meng ZY, Chen XQ, Li GJ, 2008. Application of rDNA sequence analysis in insect systematics. *Entomotaxonomia*, 30(3): 225–238. [江世宏, 孟子辉, 陈晓琴, 李广京, 2008. 核糖体 DNA 序列分析在昆虫系统学研究中的应用. 昆虫分类学报, 30(3): 225–238.]
- Li BW, Lu HL, Yao KT, Liu D, 1991. Restriction fragment length differences of genomic repetitive DNA from five sibling species of *Anopheles hyrcanus* group. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 9(1): 10–13. [李本文, 卢惠霖, 姚开泰, 刘多, 1991. 赫坎按蚊种团内各亲缘种间基因组重复 DNA 的限制酶切长度差异. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 9(1): 10–13.]
- Li SZ, Ma YJ, 2004. Application of molecular identification technique in mosquito classification. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 32(5): 198–201. [李石柱, 马雅军, 2004. 分子鉴别技术在蚊虫分类中的应用. 国外医学(寄生虫病分册), 32(5): 198–201.]
- Ma TT, Chen G, Liu CX, 2011. Characteristics and application of ITS in Entomology. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 710–715. [马婷婷, 陈光, 刘春香, 2011. ITS 序列的特点及其在昆虫学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(3): 710–715.]
- Ma YJ, Qu FY, Xu JN, Zheng ZM, 1998. Differentiation of *Anopheles sinensis* and *Anopheles anthropophagus* using a ribosomal DNA PCR assay. *Academic Journal of Naval Medical University*, 19(3): 37–39. [马雅军, 瞿逢伊, 徐建农, 郑哲民, 1998. 用核糖体 DNA 鉴别 PCR 区分中华按蚊和嗜人按蚊. 第二军医大学学报, 19(3): 37–39.]
- Ma YJ, Yang P, Xu JN, Chen Z, Pan B, 2005. Identification

- of *Anopheles lesteri* in China (Diptera: Culicidae): Morphologic characters, chromosome karyotype and molecular markers. *Entomotaxonomia*, 27(3): 199–208. [马雅军, 杨频, 徐建农, 陈哲, 潘波, 2005. 应用形态、染色体和分子特征研究我国雷氏按蚊的分类鉴别(双翅目: 蚊科). 昆虫分类学报, 27(3): 199–208.]
- Niu LL, Yuan Z, Cai GY, Molcolm CA, 1992. Classification of *Anopheles sinensis* and *Anopheles anthropophagus* using DNA probes. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 10(4): 267–270. [牛玲玲, 袁征, 蔡国英, Molcolm CA, 1992. DNA 探针用于中华按蚊和嗜人按蚊的分类研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 10(4): 267–270.]
- Peng H, Chen HM, Chen HY, Wang Y, Li XY, Li JX, Yang ZZ, Ma YJ, 2020. Molecular identification of *Anopheles hyrcanus* group and faunal distribution of *An. Sinensis* (Diptera: Culicidae) in China. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 38(1): 58–66. [彭恒, 陈翰明, 陈辉莹, 王琰, 李翔宇, 李基旭, 杨振洲, 马雅军, 2020. 我国赫坎按蚊种群的分子鉴别及中华按蚊的区系分布研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 38(1): 58–66.]
- Peng SQ, Liu CX, Zhao CZ, Xu YQ, 2010. Application of molecular biology techniques in mosquito classification. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 33(3): 207–213. [彭淑琼, 刘春晓, 赵纯中, 徐云庆, 2010. 分子生物学技术在蚊虫分类中的应用. 中国国境卫生检疫杂志, 33(3): 207–213.]
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Elyazar IR, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI, 2011. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites & Vectors*, 4: 89.
- Wang JC, Li J, Ding TB, Chu D, 2020. Development and application of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for rapid detection of *Tomato chlorosis virus*. *Acta Entomologica Sinica*, 63(2): 159–165. [王吉成, 李洁, 丁天波, 褚栋, 2020. 番茄褪绿病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 快速检测方法的建立与应用. 昆虫学报, 63(2): 159–165.]
- World Health Organization, 2021. From 30 million cases to zero: China is certified malaria-free by WHO. (2021-06-30) [2021-08-01]. <https://www.who.int/news/item/30-06-2021-from-30-million-cases-to-zero-china-is-certified-malaria-free-by-who>, 2021.
- Wu X, Zhang GF, Wan FH, 2011. TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for identification of *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 497–503. [吴霞, 张桂芬, 万方浩, 2011. TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术的西花蓟马快速检测. 应用昆虫学报, 48(3): 497–503.]
- Xie SL, Xiang Y, Yang CG, 2019. Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR for rapid detection of bacteria antibiotic susceptibility and resistance phenotype. *Modern Preventive Medicine*, 46(9): 1684–1688. [谢思露, 向瑶, 杨朝国, 2019. 实时荧光定量 PCR 快速检测细菌对抗生素敏感性与耐药性表型的方法建立. 现代预防医学, 46(9): 1684–1688.]
- Yang TY, Yang J, Huang XM, Han KK, Zhao DM, Zhang LJ, Liu YZ, Li Y, Zhang XF, Liu QT, 2021. Development and application of a qPCR assay for detection of *Duck-origin goose parvovirus*. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211104.002>. [杨挺懿, 杨婧, 黄欣梅, 韩凯凯, 赵冬敏, 章丽娇, 刘宇卓, 李银, 张小飞, 刘青涛, 2021. 实时荧光定量 PCR 检测鸭源鹅细小病毒方法的建立与应用. 中国动物传染病学报, <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211104.002>.]
- Yu KX, Hu QQ, Yao YA, Zhang SS, Xu AC, Ge J, Guan F, 2022. Research progress on wildlife identification technology. *Bulletin of Science and Technology*, 38(2): 1–10, 18. [俞可心, 胡情情, 姚逸安, 章书声, 徐爱春, 葛建, 管峰, 2022. 野生动物鉴定技术研究进展. 科技通报, 38(2): 1–10, 18.]
- Yu X, Ma ED, Zhang DD, Zhang CL, Liu WH, Wang BZ, 2020. Trend analysis of malaria incidence from 1950 to 2015. *Journal of Tropical Medicine*, 20(4): 478–483. [于潇, 马恩达, 张丹丹, 张晨琳, 刘文慧, 王保珍, 2020. 1950–2015 年全国疟疾流行趋势分析. 热带医学杂志, 20(4): 478–483.]
- Zhang GF, Lu ZC, Wan FH, 2014. Techniques for quantitative evaluation of predatory insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 299–301. [张桂芬, 吕志创, 万方浩, 2014. 捕食性天敌昆虫控害作用定量评价方法. 应用昆虫学报, 51(1): 299–301.]
- Zhong M, Lin YX, Wang Y, 2014. Progress of the application of molecular biological techniques in identification of sibling *anopheline* species. *China Tropical Medicine*, 14(12): 1529–1532. [钟敏, 蔺应学, 王英, 2014. 分子生物学技术在按蚊近缘种鉴定的应用进展. 中国热带医学, 14(12): 1529–1532.]
- Zhou S, Hou Z, Li N, Qin Q, 2007. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1897–1906.