

基础研究

白纹伊蚊和致倦库蚊 *Wolbachia* 16S rRNA 序列测定与分析

葛春喜, 黄炯烈, 陈观今, 潘实清, 吴瑜, 王玲

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】PCR 法扩增与测定白纹伊蚊和致倦库蚊的细胞内共生菌 *Wolbachia* 16S rRNA 序列, 分析其种系发生关系及传播方式。【方法】从单只雌蚊中提取 DNA, PCR 法扩增 16S rRNA 序列, 扩增产物进行克隆及测序。【结果】从白纹伊蚊和致倦库蚊分别扩增出 *Wolbachia* 16S rRNA 序列, 并克隆入 pGEM-T 载体, 测序证明两序列长度分别为 897 bp。【结论】成功克隆了白纹伊蚊和致倦库蚊 *Wolbachia* 16S rRNA 序列。测序和同源性分析表明, 它们之间的同源性为 99.9%, 提示 *Wolbachia* 在白纹伊蚊和致倦库蚊可能存在水平传播的方式。

关键词: 伊蚊属; 库蚊属; *Wolbachia*; 共生; 16S rRNA; 种系发生; 序列分析

中图分类号: R384.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0081-03

Identification and Analysis of *Wolbachia* 16S rRNA from *Aedes albopictus* and *Culex pipiens quinquefasciatus* GE Chun-xi, HUANG Jiong-lie, CHEN Guan-jin, PAN Shi-qing, WU Yu, WANG Ling. (Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To amplify and analyze the *Wolbachia* 16S rRNA sequences from *Aedes albopictus* and *Culex pipiens quinquefasciatus* and to analyze their phylogenetic relationship. 【Methods】DNA was extracted from single female mosquito. *Wolbachia* 16S rRNA sequence was amplified by PCR method. The amplification product was cloned and identified by sequencing. 【Results】*Wolbachia* 16S rRNA sequences were obtained from *Aedes albopictus* and *Culex pipiens quinquefasciatus*. The two sequences were cloned into pGEM-T vector. The sequencing result shows they have 897 bp in length. 【Conclusion】*Wolbachia* 16S rRNA of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens quinquefasciatus* were cloned successfully. The result of sequencing and homology analysis testifies their homology is 99.9%. It suggests that *Wolbachia* may have a possible horizontal transmission mechanism.

Key words: aedes; culex; wolbachia; symbiosis; 16S rRNA; phylogeny; sequence analysis

昆虫细胞内共生菌 *Wolbachia* 属立克次体目沃尔巴克体族, 广泛寄生于节肢动物的生殖细胞中^[1]。通过细胞质不相容 (cytoplasmic incompatibility) 现象, 导致早期胚胎死亡, 影响昆虫物种的形成及种群中的性别比例^[2]。目前, 利用 *Wolbachia* 作为害虫生物防治的载体成为国际上新的研究热点^[3]。*Wolbachia* 属的微生物总体上遵循母系遗传的方式, 在不同的寄生宿主中存在不同种, 但它们之间的差异并不能反映出其宿主的种系发生关系, 提示可能存在水平传播 (horizontal transmission) 的方式^[4]。16S rRNA 作为高度保守的生物大分子, 在分类学上具有重要意义。本研究通过克隆、鉴定白纹伊蚊和致倦库蚊 *Wolbachia* 的 16S rRNA 序列及分析其种系发生关系, 探讨其传播方式, 为进一步利用 *Wolbachia* 控制蚊虫奠定基础。

1 材料与方

1.1 虫种及来源

白纹伊蚊和致倦库蚊广州株由中山医科大学寄生虫教研室驯养传代。

1.2 单只蚊虫 DNA 样品制备^[5]

取刚羽化的白纹伊蚊和致倦库蚊雌虫各一只, 分别在含有蛋白酶 K 的 STE 溶液的匀浆器中磨碎组织, 55℃消化 30 min, 95℃灭活, 12 000×g 离心 (Hittech, 22R) 2 min, 收集上清备用。

1.3 16S rRNA 序列的 PCR 扩增

根据设计 *Escherichia Coli* 16S rRNA 1 对特异性引物^[6], 此对引物可以用来特异性诊断蚊虫生殖细胞内是否有 *Wolbachia* 的感染。上游引物序列为: 5' TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT3'; 下游引物序列为: 5' GAATAGGTA TGATTTTCATG T3'。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 5 μL, 10×dNTPs (2 mmol/L) 5 μL, DMSO 3 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 2 μL, DNA 聚合酶 2.5 U, 加 ddH₂O 至

收稿日期: 2001-10-04

基金项目: 中山医科大学“211 工程”重点学科建设基金资助项目 (98124)

作者简介: 葛春喜 (1973-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士生。

50 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 扩增 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

1.4 PCR 产物的克隆检定

将 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收, 回收产物与 pGEM-T 载体在 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 2 μ L 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 然后将转化的菌液均匀涂布于含 IPTG 与 X-gal 的 LBA 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 经蓝/白斑初步筛选阳性克隆。以碱裂解法少量提取重组质粒, 以重组质粒为模板, 分别作 PCR 检定。同时, 将重组质粒以 *Eco*RI 作酶切检测。将筛选到的阳性克隆送大连宝生物公司, 以 T7 和 SP6 通用引物, 用 ABI 自动测序仪进行序列测定。

1.5 序列分析

测序结果经 PCGENE 软件分析并与 GenBank 中相关序列进行同源性分析。将序列登录在互联网网站 (<http://rdp.cme.msu.edu>), 由 RDP-II 软件进行分析, 并根据 RDP 数据库中的相关数据绘制种系发生树。

2 结果

2.1 16S rRNA 序列的 PCR 扩增

利用合成的引物分别从 1 只雌蚊的 DNA 中扩增出 *Wolbachia* 16S rRNA 序列, 琼脂糖电泳表明目的核酸片段长约 900 bp, 与理论设计大小相符 (图 1)。

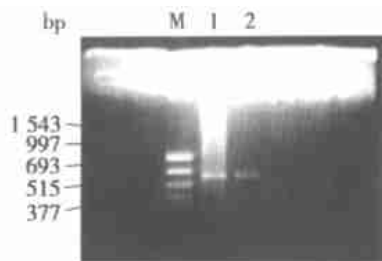


图 1 PCR 扩增 16S rRNA 的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Amplification of 16S rRNA (10 g/L agarose gel electrophoresis)

M: PCR marker; Lane 1: Amplified product of 16S rRNA from *Culex pipiens quinquefasciatus*; Lane 2: Amplified product of 16S rRNA from *Aedes albopictus*

2.2 16S rRNA 序列重组质粒的检定

筛选的重组质粒, 经 *Eco*RI 酶切, 分别被切出 350 bp 与 550 bp 的插入片段; 以重组质粒为模板

的分别做 PCR 检定, 均扩增出与设计大小相符的基因片段 (图 2)。因此证明所获得重组质粒成功的插入了目的基因。

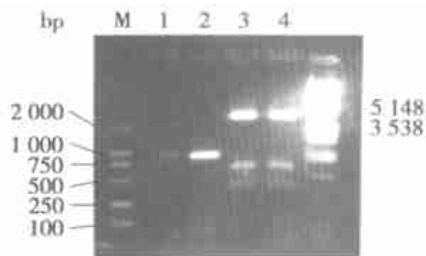


图 2 重组质粒的 PCR 和酶切检定

Fig 2 PCR and Restriction analysis of recombinant plasmid (10 g/L agarose gel electrophoresis)

M: marker; Lane 1, 3: PCR and restriction analysis recombinant plasmid from *Culex pipiens quinquefasciatus*; Lane 2, 4: PCR and restriction analysis recombinant plasmid from *Aedes albopictus*

2.3 16S rRNA 序列测定与分析

重组质粒自动测序的结果表明, 插入序列均为 897 bp。经与 GenBank 中相关序列的同源性分析, 证明获得的序列为 *Wolbachia* 16S rRNA 序列。来源于致倦库蚊的 *Wolbachia* 16S rRNA 序列与 1992 年报道的库蚊 *Wolbachia* 16S rRNA 序列 (GenBank 登录号: X61768) 完全相符⁹; 本实验获得的白纹伊蚊和致倦库蚊 *Wolbachia* 16S rRNA 序列仅相差 1 个碱基, 同源性为 99.9%。通过 RDP-II 软件绘制的种系发生树 (图 3)。

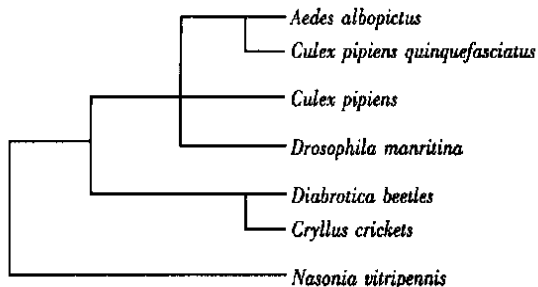


图 3 致倦库蚊、白纹伊蚊与相关昆虫 *Wolbachia* 种系发生树

Fig 3 Dendrogram of *Wolbachia* from *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* and related insects

3 讨论

自从 1924 年于尖音库蚊的生殖细胞内发现 *Wolbachia* 以来, 迄今为止, 节肢动物中有 16% 的物种感染 *Wolbachia*, 其遍布于昆虫纲各个主要的目 甲壳纲及螨类⁷。寄生于不同节肢动物宿主的

Wolbachia 亲源关系可以根据其 16S rRNA 序列判定。根据研究表明 16S rRNA 在不同 *Wolbachia* 种间的差异为 1%~2%，推论其除垂直的母系传播外尚存在水平传播的方式^[9]。但由于缺乏足够实验证据，其具体的水平传播方式有待证明。

本实验从白纹伊蚊和致倦库蚊中获得的 16S rRNA 序列同已知库蚊来源的 *Wolbachia pipientis* 同源性达 98.2%，说明获得的序列来源于同一 *Wolbachia* 属。获得序列之间 897 个碱基中仅相差 1 个。如排除 PCR 错配与测序误差的可能，此两序列很可能来源于同一种的 *Wolbachia*。其变异性远低于已知来源于伊蚊与库蚊 *Wolbachia* 的变异性 (1.7%)^[9]，提示 *Wolbachia* 在我室驯养的白纹伊蚊和致倦库蚊间可能存在水平传播的方式。Werren 等^[4] 曾经观察到 *Wolbachia* 在寄生类黄蜂 (*Nasonia giraulti*) 和其寄生宿主丽蝇 (*Protophthora spp.*) 之间水平传播，推断捕食及生存竞争关系是潜在的水平交换途径。本实验的虫株长期共同驯养，其生长及繁衍处于相同的生存空间，拥有相同的食物来源，*Wolbachia* 很可能通过其密切接触的某一环节发生水平交换，并通过细胞质不相容现象在种群中固定下来。虽然我室的蚊种经过十余年的驯养，其遗传背景相对简单，但要证明此两蚊种中 *Wolbachia* 相同尚须选择更多的样本实

验来证明。而且 16S RNA 序列比较保守，其进化速度相对较慢，通过对快速进化的基因如：*wsp* 的比较和分析，可以更准确地阐明蚊种间 *Wolbachia* 种系发生关系。这些都有待于进一步的实验来证实。

参考文献:

- [1] Weisburg W G, Dobson M E, Samuel J M, et al. Phylogenetic diversity of *Rickettsiae* [J]. J Bacteriol 1989, 171 (9): 4202.
- [2] Clancy D J, Hoffmann A A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity [J]. Trends Ecol Syst, 1996, 11 (1): 145.
- [3] Durvasula R V, Gumbs A, Beard C B et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (7): 3274.
- [4] Werren J H, Zhang W, Guo L R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods [J]. Proc R Soc London Ser, 1995, 251 (1): 55.
- [5] Crampton J M, Beard C B, Louse C. The molecular biology of insect disease vectors [M]. London: Chapman Hall Ltd, 1997. 560~566.
- [6] O'Neil S L, Giordano R, Karr T L, et al. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility insects [J], Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(5): 2699.
- [7] Werren J H. Biology of *Wolbachia* [J]. Annu Rev Entomol 1997, 42: 587.

(编辑 张敏瑞)

·简讯·

第二届全国生存质量学术会议纪要

由中华医学会广东分会、香港医院管理局、中山大学公共卫生学院和深圳市宝安区人民医院联合举办的第二届全国生存质量学术会议于 2002 年 1 月 10 日至 13 日在广东省深圳市宝安区召开。来自荷兰、英国、美国、澳大利亚、新加坡、香港特别行政区及全国各地共 369 名代表参加了会议。其中香港特别行政区的代表有 231 名。大会还邀请了美国、英国、荷兰和新加坡等国家的专家学者，到会作专题讲座和学术交流。

本届大会的主要议题是“生存质量的概念、测量及应用”。会议讨论了生存质量概念的内涵与外延、生存质量与中国传统文化及中医的关系、生存质量测量表的研制、量表的跨文化研究，以及生存质量在临床医学、康复医学和公共卫生领域的应用。

会议期间，中山大学公共卫生学院方积乾教授作了题为“中国大陆生存质量的研究现状”的演讲。同时，大会组委会还安排了一天的会前专题研讨班，其主题是“生存质量影响因素的深入理解”、“生存质量的测量与研究设计”、“生存质量测量的临床意义”和“生存质量研究中若干统计和计量心理学问题”，研讨班为同行之间的广泛交流、相互学习提供了很好的机会。

在 4 天安排紧凑的会议中，共有近 60 位来自不同研究领域的专家、学者向与会代表介绍了自己的研究工作，与两年前的第一届会议比较，研究领域的深度与广度均有长足的进步，有力地推进了生存质量研究在中国的发展。

本次大会是推动我国生存质量理论研究与应用研究的发展史上的又一次重要会议，标志着中国生存质量的研究正逐步进入一个崭新阶段。我们相信通过大家的努力，中国生存质量研究一定会不断深入，结出丰硕的成果，我们期待着两年之后重逢在第三届全国生存质量学术会议上。

(郝元涛, 朱淑明, 张晋晰)