

# 滇西南地区埃及伊蚊种群微卫星 标记筛选研究

刘蓬勃, 孙琬琬, 王君, 刘起勇, 宋秀平, 郭玉红, 鲁亮

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

**摘要:** **目的** 研究滇西南地区埃及伊蚊种群遗传学特征, 针对该地区的埃及伊蚊种群筛选新的微卫星位点。 **方法** 从美国国立生物技术信息中心 GenBank 数据库中下载埃及伊蚊全基因组数据, 利用 Tandem Repeats Finder 软件查找全基因组中的微卫星位点, 选择重复单位为 2~4 bp 且重复次数 < 30 的微卫星位点, 对其侧链进行 BLAST 比对, 选择在基因组中单拷贝的位点设计引物, 再对引物进行 BLAST 比对, 选择扩增产物为单拷贝的引物进行相关筛选。 **结果** 从 17 个全基因组中共获得 80 条微卫星序列, 并成功设计出 11 对多态性引物, 核心序列包括 5 对 2 碱基重复, 5 对 3 碱基重复以及 1 对 4 碱基重复, 共有 98 个等位基因, 平均每对引物有 9 个等位基因, 观察杂合度平均值为  $(0.394 \pm 0.026)$ 。 **结论** 设计引物可稳定地扩增出目标条带, 且多态性较高, 可以用于埃及伊蚊的种群遗传学研究。

**关键词:** 埃及伊蚊; 微卫星; 引物

**中图分类号:** R384.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8280(2018)02-0130-04

**DOI:** 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.02.004

## Isolation of microsatellite markers in *Aedes aegypti* population from southwest Yunnan

LIU Peng-bo, SUN Wan-wan, WANG Jun, LIU Qi-yong, SONG Xiu-ping, GUO Yu-hong, LU Liang

State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: LU Liang, Email: luliang@icdc.cn

Supported by the National Key Research and Development Plan (No. 2016YFC1200503, 2016YFC1200802)

**Abstract: Objective** To obtain useful microsatellite loci of *Aedes aegypti* from the southwest areas of Yunnan province. **Methods** The *Ae. aegypti* genome was downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI). The repeats with a period size of 2-4 bp and a copy number less than 30 were chosen using Tandem Repeats Finder software. Primers were designed with those microsatellites of unique flanking, and BLAST was utilized for these primer sequences to confirm amplicons also single copy. **Results** A total of 80 microsatellite loci were obtained from 17 whole genomes and 11 pairs of primer were designed successfully with 98 alleles. There are 9 alleles per pair of primers on average. The average value of observation heterozygosity is  $(0.394 \pm 0.026)$ . **Conclusion** The acquired primers can amplify bands stably and these amplicons are polymorphic, being fit for the research of population genetics of *Ae. aegypti*.

**Key words:** *Aedes aegypti*; Microsatellite; Primer

埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 属双翅目 (Diptera) 蚊科 (Culicidae) 伊蚊属 (*Aedes*) 覆蚊亚属 (*Stegomyia*) A 组, 起源于非洲, 主要分布于热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>, 在 15—17 世纪通过贸易和航运入侵到其他洲。货船甲板上的盛水容器为埃及伊蚊的繁殖提供了条件, 使其在 19 世纪扩增到东南亚国家<sup>[2-3]</sup>。埃及伊蚊是登革热传播的主要媒介之一, 同时也是城市型

黄热病、基孔肯雅热和裂谷热的传播媒介, 每年超过 100 个国家 25 亿人处于这些传染病暴发风险中<sup>[4]</sup>。近年来, 登革热发病率呈明显上升趋势, 人们对埃及伊蚊的关注更加密切。

我国埃及伊蚊原主要分布于 22° N 以南地区。云南省位于我国西南边陲, 国境线长, 口岸较多, 与缅甸、老挝、越南等登革热高发的东南亚国家接壤,

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2016YFC1200503, 2016YFC1200802)

**作者简介:** 刘蓬勃, 男, 在读硕士, 从事埃及伊蚊种群研究, Email: liupbccc@sina.com

**通信作者:** 鲁亮, Email: luliang@icdc.cn

**网络出版时间:** 2018-02-09 10:47 **网络出版地址:** [http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n\\_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=](http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=)

受孟加拉高压气流影响形成的高原季风气候,具有典型的热带和亚热带气候特征,适合蚊虫的大量孳生繁衍<sup>[5]</sup>。自2002年首次在瑞丽市姐告口岸捕获埃及伊蚊幼虫以来,相继在芒市、勐腊、勐海、景洪、盈江、陇川和耿马等县(市)发现埃及伊蚊,说明其在云南省的入侵和扩散日益严峻。2008年以前云南省无登革热本地病例,之后登革热病例数增加,分布范围扩大,尤其是2013—2014年在西双版纳傣族自治州景洪市、勐腊县和德宏傣族景颇族自治州(德宏州)瑞丽市暴发的4起因输入性病例引起的本地感染登革热疫情,共报告病例1 849例,其中本地病例1 579例。从近年来登革热暴发的流行情况看,在疫情区域监测到较高密度的埃及伊蚊且分布区与本地登革热流行区一致,在流行特征上具有家庭聚集性特点,说明近年来埃及伊蚊已成为云南省登革热流行的主要媒介,医学重要性尤其显著<sup>[1]</sup>。

现代分子生物学技术在种群生态学研究提供了许多客观性较好的中性遗传标记,微卫星序列位于核基因的非编码区,呈现双亲遗传,与线粒体基因比较,其可提供更丰富的遗传信息,且微卫星标记具有高度多态性,在群体中变异范围大、杂合度高、分布广、重组率低<sup>[6-7]</sup>。自2001年其首次分离自埃及伊蚊体内后,已被广泛应用于埃及伊蚊的种群遗传研究。通过对埃及伊蚊微卫星信息进行研究,可以了解其种群结构、基因流模式及入侵新区域的定居和扩展过程,有助于控制虫媒传染病的传播<sup>[8-9]</sup>。前期研究利用文献报道的用于研究其他地区埃及伊蚊种群结构的9对引物(包括特立尼达的BbH08、BbA10<sup>[10]</sup>,越南的38/38、34/72、C2A8、T3A7、AED19<sup>[11]</sup>,泰国的AG5、AC1<sup>[12]</sup>),对滇西南地区埃及伊蚊种群遗传结构进行分析发现,上述9个位点的引物仅AG5位点可扩增出合格的核酸序列,其他位点的引物因不能扩增出目标条带或扩增的条带不具有多态性而无法作为微卫星标记用于研究该地区埃及伊蚊的种群结构。故本研究旨在筛选可以体现滇西南地区埃及伊蚊种群遗传结构的微卫星标记引物。

1 材料与方法

1.1 样本来源 2016年9月采集自云南省勐海县打洛口岸、勐腊县、德宏州瑞丽市、陇川县拉影村和临沧市耿马县,9个种群共319个样本,见表1。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 利用磁珠法对采集到的埃及伊蚊成蚊及幼虫进行DNA提取,利用分光光度计测定其浓度和纯度,置4℃保存。

1.2.2 微卫星序列的获取 从美国国立生物技术

表1 实验所用样本信息

组别	采集地点	位置	样本数(个)
种群1	瑞丽市	勐卯路	47
种群2	瑞丽市	南门	35
种群3	瑞丽市	瑞金路	32
种群4	瑞丽市	姐岗路	47
种群5	陇川县	拉影村	32
种群6	勐腊县	老百货公司	28
种群7	勐腊县	旧工厂	27
种群8	勐海县	打洛口岸	47
种群9	临沧市	耿马县	24

信息中心 GenBank 下载埃及伊蚊全基因组序列,共17条(NW\_001811573、NW\_001811474、NW\_001811585、NW\_001811640、NW\_001811662、NW\_001811282、NW\_001811446、NW\_001811505、NW\_001811564、NW\_001811703、NW\_001811438、NW\_001811473、NW\_001811525、NW\_001811558、NW\_001809819、NW\_001837458和NW\_001837337)。选取1段目标序列如(AC)<sub>10</sub>,利用Tandem Repeats Finder软件查找全基因组中的微卫星序列,设置参数:Alignmengt Parameters [ match, mismatch, indel ] = 2, 7, 7; Mininum Alignment Score To Report Repeat = 40; Maxinum Period Size = 4; 选择重复单位为2~4 bp且重复数<30的微卫星序列保存,以3个碱基的重复序列为主。选取400~600 bp的微卫星侧翼序列进行BLAST比对,舍弃非单拷贝的微卫星位点。

1.2.3 引物的设计和筛选 将微卫星序列转换为FASTA格式后用引物在线设计软件Batch Primer 3 (<http://batchprimer3.bioinformatics.ucdavis.edu/>)设计引物,扩增产物长度设定在100~400 bp之间。将得到的引物进行BLAST比对,选取在基因组中单拷贝的引物序列送至北京天一辉远生物科技有限公司合成。初步摸索引物的PCR扩增条件,确定最合适退火温度(T<sub>m</sub>),选取不同地区最大样本量<sup>[13]</sup>的埃及伊蚊扩增相应微卫星片段,利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测多态性。将扩增产物具有多态性的引物进一步合成荧光引物,用于种群遗传学研究。

2 结果

2.1 微卫星序列和多态性引物结果 从17个埃及伊蚊全基因组中获得80条微卫星序列,其中侧链为单拷贝的39条,设计引物为单拷贝的22条,可稳定扩增引物的17对,其中11对具有多态性,引物相关信息见表2。经检测筛选,11对引物均可以扩增出稳定的预期目标条带,多态性较高,可用于遗传多样性、种群结构和基因流等研究。

表 2 埃及伊蚊种群 11 个微卫星位点引物相关信息  
Table 2 Characteristics of 11 microsatellite loci of *Aedes aegypti*

标号	重复序列	引物(5'~3')	退火温度(T <sub>m</sub> ,℃)	等位基因数(个)	产物大小(bp)
AC10	AC	F:CAATTATGATCCGTGGTGT R:GCGAAGAATGGTGGTCTA	49	8	185
1209	AC	F:GCAATCTGCTCGTCGTTA R:GGCTATATCTGATCTGCTGAT	54	12	174
AG3	AG	F:GACTAAGCAGGACGACAG R:AAGCAGGTTGATGAGATTCT	52	8	323
TTC5	TTC	F:ACATTTGTTTTGCTATTGTGG R:AAGAACATTATGCTAAAAAGCAG	55	7	154
AAG6	AAG	F:AGGATCTTTTCGTAAGAAGCA R:GGAATTGTTCTCTACATGCTG	55	12	150
AAT1	AAT	F:AAGGAACACTAGTTCGGTAGG R:GAGCTGTTCAAGAACAAGT	55	9	155
TTGT	TTGT	F:TGTTTGAGCTGAAAACTCAT R:GTCAAATCGGAGGTAGTGAAT	55	14	127
AC1	AC	F:GAGTATATCGGCCTCCAATAC R:CATACAGGTACACGCTAGGAT	55	7	146
CGA	CGA	F:TGCAGTTCTACAACCTCTTTT R:TTACCAGTTGAAGTTGATTGC	55	6	156
GAT	GAT	F:CGTATCGTGTACGCTATCTC R:GTAGGCAAAACGATCACAGT	55	4	154
TC	TC	F:TTTCATCTTTCACTCATTCAC R:CAAGTGCCCTATAGTGTGTTGT	55	11	165

2.2 微卫星位点的基本信息 由表 3 可以看出,等位基因数(Na)最高的是瑞丽市勐卯路种群(种群 1),为(5.727±0.675)个,最低的为勐腊县旧工厂(种群 7)和老百货公司种群(种群 6),分别为(3.727±0.574)和(3.727±0.648)个。9 个种群的观察杂合度(Ho)平均值为(0.394±0.026),其中,陇川县拉影村种群(种群 5)最高,勐腊县旧工厂种群(种群 7)最低。期望杂合度(He)最高的是临沧市耿马县种群(种群 9),为(0.587±0.051),最

低的是勐腊县旧工厂种群(种群 7),为(0.434±0.086),各种群的期望杂合度均大于观察杂合度。9 个种群的香农信息指数(I)平均值为(0.975±0.049),其中最高的是临沧市耿马县种群(种群 9),最低的是勐腊县老百货公司种群(种群 6),表明耿马县种群的遗传多样性最高,老百货公司种群遗传多样性最低。综合各指标,勐腊县 2 个种群的多样性较低,而临沧市耿马县种群的遗传多样性最高。

表 3 滇西南地区埃及伊蚊种群微卫星位点相关信息  
Table 3 Loci information of each population in southwest Yunnan

组别	样本量(个)	等位基因数(个)	有效等位基因数(个)	香农信息指数	观察杂合度	期望杂合度	无偏期望杂合度
种群 1	46.545±0.207	5.727±0.675	2.543±0.331	1.048±0.152	0.396±0.084	0.519±0.071	0.525±0.072
种群 2	35.000±0.000	4.364±0.544	2.565±0.364	0.984±0.156	0.429±0.086	0.510±0.076	0.518±0.077
种群 3	32.000±0.000	4.364±0.527	2.377±0.319	0.931±0.146	0.369±0.083	0.486±0.074	0.494±0.075
种群 4	46.727±0.141	4.818±0.736	2.226±0.289	0.874±0.147	0.447±0.096	0.459±0.075	0.464±0.076
种群 5	31.818±0.122	5.000±0.522	2.736±0.312	1.094±0.127	0.483±0.079	0.572±0.059	0.581±0.060
种群 6	27.909±0.091	3.727±0.648	2.230±0.364	0.815±0.161	0.333±0.073	0.436±0.079	0.444±0.080
种群 7	27.000±0.000	3.727±0.574	2.375±0.444	0.824±0.178	0.320±0.074	0.434±0.086	0.443±0.088
种群 8	46.455±0.207	4.727±0.428	2.658±0.315	1.039±0.132	0.440±0.065	0.552±0.066	0.558±0.066
种群 9	22.091±0.563	5.455±0.652	2.930±0.428	1.169±0.137	0.333±0.060	0.587±0.051	0.601±0.052
平均值	35.061±0.895	4.657±0.202	2.516±0.116	0.975±0.049	0.394±0.026	0.506±0.023	0.514±0.024

注:表内数据为平均值±标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )

### 3 讨论

利用其他地区埃及伊蚊种群的微卫星引物研究滇西南种群的扩增失败率较高,主要因埃及伊蚊微卫星位点的侧翼序列不够保守且特异性较差<sup>[14-15]</sup>,适用于某种群的微卫星位点并不通用于其他种群,具体情况视种群亲缘关系而定。南美洲的特立尼达种群与中国云南地区种群关系较远,导致2对引物无法扩增出目标条带;而越南和缅甸种群与中国云南埃及伊蚊亲缘关系较近,部分引物可以扩增出目标条带,但多态性较差。

传统获取微卫星位点的方法是先构建微卫星富集文库,继而用探针杂交获得目的片段,比较复杂且昂贵并需要较长时间,该方法工作量大,假阳性率高,冗余序列和不能设计引物的无效克隆占一定比例<sup>[16]</sup>。磁珠富集法虽极大地提高了克隆阳性率,并成为大规模筛选微卫星位点的常用方法,但仍存在周期过长、成本过高等缺点。本研究所用方法可系统、高效地从埃及伊蚊全基因组序列中找到合格的微卫星序列,缩短了获取微卫星序列引物的时间,且极大地降低了成本。

与哺乳动物不同,微卫星类型以2个核苷酸碱基(A和C)含量最高,在埃及伊蚊基因组中,3对碱基重复的微卫星序列较多且多态性也较高<sup>[16]</sup>。本研究得到的11对引物中,3对碱基重复的微卫星位点有5个,多态性均值达到7.6,可以满足后期种群遗传学的研究需要。

### 参考文献

- [1] 石清明,赵彤言. 云南省登革热媒介埃及伊蚊入侵扩散现状[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2016, 23(3): 175-182.
- [2] Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next[J]. Microbes Infect, 2010, 12(4): 272-279.
- [3] Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, et al. Global genetic diversity of *Aedes aegypti* [J]. Mol Ecol, 2016, 25 (21): 5377-5395.
- [4] Faucon F, Gaude T, Dusfour I, et al. In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: an integrated next-generation sequencing approach [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(4): e0005526.
- [5] 王丕玉,周红宁,吴超,等. 云南省登革热媒介埃及伊蚊的分布调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006, 17(6): 507-508.
- [6] 郭颂,鲁亮,马怀雷,等. 黄胸鼠微卫星分子标记的筛选[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(3): 198-201.
- [7] 方义亮,张山鹰,谢汉国. 登革热媒介伊蚊种群多样性研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(5): 469-472.
- [8] Huber K, Mousson L, Rodhain F, et al. Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses [J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 61(6): 1001-1003.
- [9] Bataille A, Horsburgh GJ, Dawson DA, et al. Microsatellite markers characterized in the mosquito *Aedes taeniorhynchus* (Diptera, Culicidae), a disease vector and major pest on the American coast and the Galápagos Islands [J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(5): 971-975.
- [10] Chambers EW, Meece JK, McGowan JA, et al. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* [J]. J Hered, 2007, 98(3): 202-210.
- [11] Huber K, Mousson L, Rodhain F, et al. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses [J]. Mol Ecol Resour, 2001, 1(4): 219-222.
- [12] Slotman MA, Kelly NB, Harrington LC, et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever [J]. Mol Ecol Resour, 2007, 7(1): 168-171.
- [13] 闫路娜,张德兴. 种群微卫星DNA分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响[J]. 动物学报, 2004, 50(2): 279-290.
- [14] Lovin DD, Washington KO, deBruyn B, et al. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 590.
- [15] Hickner PV, deBruyn B, Lovin DD, et al. Genome-based microsatellite development in the *Culex pipiens* complex and comparative microsatellite frequency with *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* [J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13062.
- [16] 孙波,鲍毅新,赵庆洋,等. 微卫星位点获取方法的研究进展[J]. 生态学杂志, 2009, 28(10): 2130-2137.

收稿日期: 2018-01-05