

DOI:10.13350/j.cjpb.221110

• 论著 •

海南热带臭虫分子鉴定及内共生菌 *Wolbachia* 检测^{*}芦亚君^{1,2}, 陈子杰¹, 赵秋宇¹, 解芸芸¹, 夏琪¹, 程诗¹, 赵九莹¹, 夏乾峰^{1*}

(1. 海南医学院热带医学院, 海南海口 571199; 2. 西安交通大学医学部基础医学院病原生物学与免疫学系)

【摘要】 目的 了解海南臭虫种类及内共生菌 *Wolbachia* 的感染情况, 并探讨海南臭虫 COI 基因和 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列特征及系统发育关系。方法 2019年5月采集海南臭虫92只, 提取基因组DNA, PCR扩增臭虫COI基因和 *Wolbachia* 表面蛋白基因 *wsp* 序列并测序。BLAST多序列比对确定物种; MEGA 11软件对序列进行碱基含量、保守位点、可变位点的计算和系统发育分析; SDT软件对序列两两比对, 进行聚类分析。结果 海南热带臭虫COI基因序列长度637 bp, G+C含量为37.21%, A+T含量为62.79%。与GenBank中热带臭虫COI序列比对显示, 保守位点占99.84%。从92只海南热带臭虫中, 检测出26只热带臭虫感染 *Wolbachia*, 感染率为28.26%。26条 *Wolbachia wsp* 序列长度约为610 bp, G+C含量为39%~40%, A+T含量为60%~61%, 保守位点占99.03%。系统发育关系显示海南热带臭虫 *Wolbachia* 与GenBank中其他地理株的热带臭虫 *Wolbachia* 聚为一支, 与梳毛臭虫、温带臭虫的 *Wolbachia* 系统发育关系较远。结论 热带臭虫为海南臭虫的优势虫种, 且自然感染内共生菌 *Wolbachia*, 为热带臭虫防控技术提供了理论依据。

【关键词】 热带臭虫; COI基因; *Wolbachia*; 分子鉴定; 系统发育分析

【中图分类号】 R384.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1288-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov.; 17(11):1288-1292.]

Molecular identification of *Cimex hemipterus* and detection of the endosymbiont *Wolbachia* in Hainan Province

LU Ya-jun^{1,2}, CHEN Zi-jie¹, ZHAO Qiu-yu¹, XIE Yun-yun¹, XIA Qi¹, CHENG Shi¹, ZHAO Jiu-Ying¹, XIA Qian-feng¹ (1. School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. Department of Pathogen Biology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University Health Science Center)

【Abstract】 **Objective** To understand the bedbug species and the infection of endosymbiont *Wolbachia* in Hainan Province, and to explore the sequence characteristics and phylogenetic relationship based on the cytochrome oxidase (COI) gene of bedbugs and the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gene in Hainan Province. **Methods** In May 2019, 92 bedbugs were collected in Hainan Province, genomic DNA was extracted, and the COI gene and the *Wolbachia wsp* sequences were amplified by PCR and sequenced. The multiple sequence alignment was carried out to determine the bedbug species via BLAST. The nucleotide base content, the conserved sites, and the variable sites were calculated and the phylogenetic relationship was analyzed using the MEGA 11 software. Pairwise comparisons between the sequences were performed and the cluster analysis was conducted with SDT software. **Results** The COI gene sequence of *Cimex hemipterus* in Hainan Province was 637 bp in length with a G + C content of 37.21% and an A + T content of 62.79%. Alignment with the COI sequences of *Cimex hemipterus* in GenBank revealed that the conserved sites accounted for 99.84%. The *Wolbachia* infection was detected in 26 *Cimex hemipterus* of 92 *Cimex hemipterus* in Hainan Province, with an infection rate of 28.26%. The 26 *Wolbachia wsp* sequences were about 610 bp in length, with a G + C content of 39%–40%, an A + T content of 60%–61%, and the conserved sites accounting for 99.03%. The phylogenetic relationships demonstrated that the *Wolbachia* of *Cimex hemipterus* in Hainan Province clustered into one clade with the *Wolbachia* of *Cimex hemipterus* at the other geographical location retrieved in GenBank, and had a remote phylogenetic relationship with *Wolbachia* of *Cimex lectularius* and *Cimex pilosellus*. **Conclusion** *Cimex hemipterus* was the dominant species of bedbugs in Hainan Province, and was naturally infected with the endosymbiont *Wolbachia*, which provided a theoretical basis for the prevention and control of *Cimex hemipterus*.

【Key words】 *Cimex hemipterus*; COI gene; *Wolbachia*; molecular identification; phylogenetic analysis^{**}

* **【基金项目】** 海南省重大科技计划项目(No. ZDKJ202003, ZDKJ2021036); 海南省自然科学基金项目(No. 2019RC223)。

** **【通讯作者】** 夏乾峰, E-mail: xiaqianfeng@hainmc.edu.cn

【作者简介】 芦亚君(1981-), 女, 吉林长春人, 硕士, 副教授, 主研究方向: 分子病原生物学。E-mail: luyajun@hainmc.edu.cn

臭虫是以人类及其他温血动物血液为食的体外寄生虫,隶属于昆虫纲(Insecta)半翅目(Hemiptera)臭虫科(Cimicidae)臭虫属(Cimex)。臭虫对人类健康的危害体现在通过叮咬吸血引起皮肤损伤、过敏反应及精神紧张。以人血为食的臭虫有温带臭虫(*Cimex lectularius*)和热带臭虫(*Cimex hemipterus*)2种^[1-2]。温带臭虫在全球范围内广泛分布,热带臭虫多见于热带和亚热带地区。臭虫白天常藏匿于酒店、公寓、旅馆中墙壁、床垫、家具的缝隙内;夜间活动,寻找宿主、叮咬吸血,严重危害公众健康^[3]。

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一种广泛定殖于自然界节肢动物的胞内共生菌。*Wolbachia* 也可感染臭虫,且随着臭虫的发育、吸血、蜕皮等虫期改变而发生动态变化。*Wolbachia* 与臭虫建立了专性互惠共生关系,其为臭虫提供营养合成必需的核黄素、生物素和 B 族维生素等,而臭虫则可将 *Wolbachia* 传播、扩散^[4-5]。若清除臭虫体内的 *Wolbachia*,则会导致臭虫发育迟缓或抑制生殖。

本研究对海南热带环境的臭虫进行分子鉴定和遗传信息分析,检测 *Wolbachia* 的自然感染情况,为臭虫的流行、分布及进一步应用 *Wolbachia* 作为“特洛伊木马(Trojan Horse)”^[6] 操纵臭虫生殖系统以达到有效防控的目的提供科学依据。

材料与方 法

1 仪器与试剂

高通量组织研磨器(SCIENTZ-48)购于中国宁波新芝生物科技股份有限公司;PCR 扩增仪(Biometra TONE)购于德国耶拿分析仪器股份有限公司;凝胶成像分析系统(JY04S-3E)购于北京君意电泳设备有限公司。2×Taq plus Master Mix(BL547)购于安徽 Biosharp 生物科技有限公司。50×TAE Buffer、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP1723)购于北京百泰克生物技术有限公司。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。pMDTM 19-T Vector 克隆试剂盒(6013)购于北京宝日医生物技术有限公司。超景深三维显微镜 YHX-5000 购于基恩士(中国)有限公司。

2 方 法

2.1 样本采集 臭虫样本于 2019 年 5 月采自海南省海口市(110°20'02"E,19°58'54"N)大学生宿舍内。采集后的虫体表面经 75%乙醇清洗,浸泡在 75%乙醇中备用。

2.2 形态学观察 显微镜下观察臭虫样本形态和结构,并进行形态学记录。

2.3 基因组 DNA 提取 每只臭虫样本经无菌 ddH₂O 清洗 3 次以完全去除乙醇后,在高通量组织研

磨器中彻底研磨,碱裂解法^[7]提取基因组 DNA,-20℃保存。

2.4 臭虫分子鉴定 基于线粒体 COI 基因对臭虫进行分子鉴定,使用上游引物 LepF: 5'-ATTCAAC-CAATCATAAAGATATNGG-3'和下游引物 LepR: 5'-TAWACTTCWGGRTGTCCRAARAATCA-3'扩增 COI 基因片段^[8],预计 COI 基因片段长度约为 650 bp。

扩增 COI 基因 PCR 体系总体积为 50 μL,包括 2×Taq plus Master Mix 25 μL,上游引物 LepF(10 μmol/L)和下游引物 LepR(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件为:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 30 s,退火 42℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min,共 35 个循环;后延伸 72℃ 5 min。PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶电泳中检测,特异性 PCR 产物经纯化后送苏州金唯智生物科技有限公司进行 Sanger 测序。

1.5 Wolbachia 分子检测 基于昆虫内共生菌 *Wolbachia* 的表面蛋白基因(*Wolbachia* surface protein, wsp)基因对臭虫体内 *Wolbachia* 进行分子检测。使用上游引物 wsp-81F: 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'和下游引物 wsp-691R: 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3'扩增 wsp 基因片段^[9-10],预计 wsp 基因片段长度约为 630 bp。

扩增 wsp 基因 PCR 体系总体积为 50 μL,包括 2×Taq plus Master Mix 25 μL,上游引物 wsp-81F(10 μmol/L)和下游引物 wsp-691R(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件为:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 30 s,退火 50℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min,共 35 个循环;后延伸 72℃ 5 min。PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,特异性产物经纯化后,克隆至 T 载体上,转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,由苏州金唯智生物科技有限公司进行 Sanger 测序。

2.5 序列比对及系统发育分析 将测序获得的臭虫线粒体 COI 基因序列、内共生菌 *Wolbachia* 的 wsp 基因序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站(www.ncbi.nlm.nih.gov/)中进行 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)比对。使用 MEGA 11 软件 N-J 邻接法(Neighbor-joining),以 K2P 模型(Kimura 2-parameter model)设置 Bootstrap 值为 1000 次重复检测分支节点的置信度,分别构建臭虫线粒体 COI 基因系统发育树和内共生菌 *Wolbachia* 的 wsp 基因系统发育树。SDT(Sequence Demarcation Tool)软件对序列两两比对,

进行聚类分析^[11]。

结 果

1 臭虫形态学特征

共采集臭虫样本 92 只,依据《中国重要医学昆虫分类与鉴别》进行形态学特征鉴定该批样本均为热带臭虫(图 1)。



A 背面; B 腹面

图 1 海南热带臭虫形态特征

A dorsal view; B ventral view

Fig. 1 Morphological features of *Cimex hemipterus* in Hainan Province

2 热带臭虫分子鉴定

臭虫样本线粒体 COI 基因测序所得序列拼接后长度为 637 bp, G、A、T、C 四种碱基含量分别是 17.58%、29.51%、33.28%、19.62%。G+C 含量为 37.21%, A+T 含量为 62.79%。序列提交至 GenBank 中,登录号 OL957541。经 BLAST 比对,确定该样本为热带臭虫 *Cimex hemipterus*。与同为热带臭虫的不同地理株进行多序列比对显示(图 2),保守位点(Conserved sites, C)为 636,占 99.84%;可变位点(Variable sites, V)为 1,占 0.16%。与温带臭虫 *Cimex lectularius* (KY560443)、梳毛臭虫 *Cimex pilosellus* (MK141693) 多序列比对显示,保守位点(Conserved sites)为 479,占 75.20%;可变位点(Variable sites)为 158,占 24.80%。

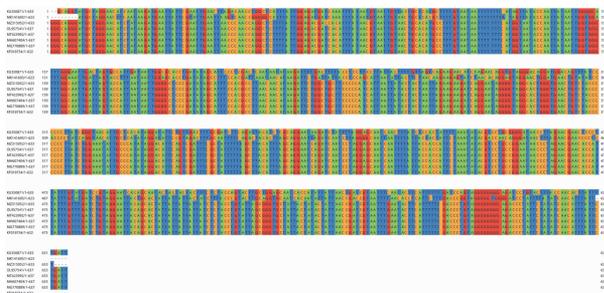


图 2 臭虫 COI 基因多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment based on the COI gene of bedbugs

SDT 双序列比对(图 3)显示海南热带臭虫 (*Cimex hemipterus*, OL957541)与 GenBank 中热带臭虫 (*Cimex hemipterus*, KF018754、MT423992、MH607404、MG770889、MZ315052)、温带臭虫 (*Cimex lectularius*, KU350871)及梳毛臭虫 (*Cimex pilosellus*, MK141693)的序列聚类特征。

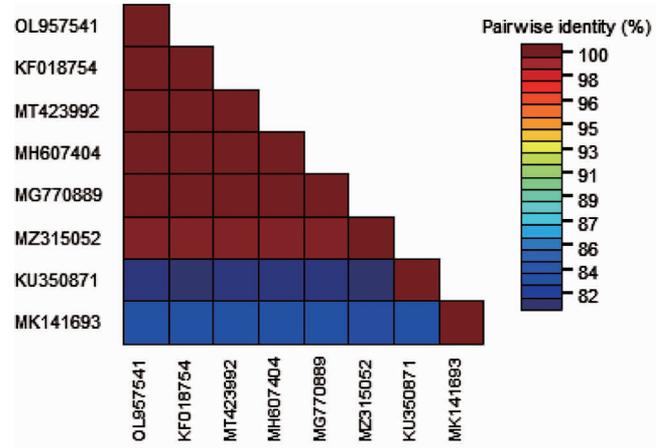


图 3 基于臭虫 COI 基因的序列划分矩阵图

Fig. 3 The sequence matrix based on the COI gene of bedbugs

以吸食人血的温带臭虫 *Cimex lectularius* (KY560443)、吸食蝙蝠血的梳毛臭虫 *Cimex pilosellus* (MK141693)为外群,构建基于 COI 序列的系统发育树(图 4),系统发育关系显示本研究中的海南热带臭虫 (*Cimex hemipterus* Hainan, OL957541)与法国热带臭虫 (*Cimex hemipterus*, MT423992; *Cimex hemipterus*, MZ315052)亲缘关系最近。

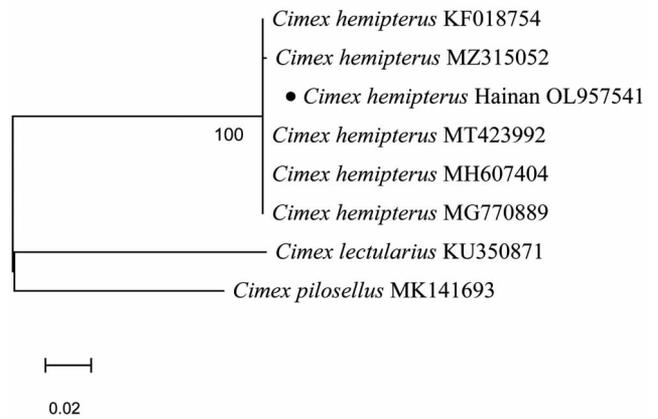


图 4 臭虫 COI 基因系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on the COI gene of bedbugs

3 共生菌 Wolbachia 系统发育分析

自 92 只热带臭虫样本中,有 26 只热带臭虫检测出 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因, *Wolbachia* 自然感染率为 28.26%。获得 26 条 *wsp* 基因序列,长度约为 616 bp, G+C 含量为 39%~40%, A+T 含量为 60%~61%,序列提交至 GenBank 中,登录号 ON262291~

ON262316。来源于26只海南热带臭虫的 *Wolbachia* wsp 基因多序列比对显示(图5),保守位点(C)为610,占99.03%;可变位点(V)为6,占0.97%。与不同地理株热带臭虫的 *Wolbachia* wsp 多序列比对显示,保守位点(C)为609,占98.86%;可变位点(V)为7,占1.14%。与温带臭虫的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex lectularius*, AP013028)、梳毛臭虫的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex pipistrelli*, MF687881)wsp 基因多序列比对显示,保守位点(C)为583,占94.64%;可变位点(V)为33,占5.36%。与埃及伊蚊的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Aedes aegypti*, CP072672)wsp 基因多序列比对显示,保守位点(C)占74.34%;可变位点(V)占21.46%。

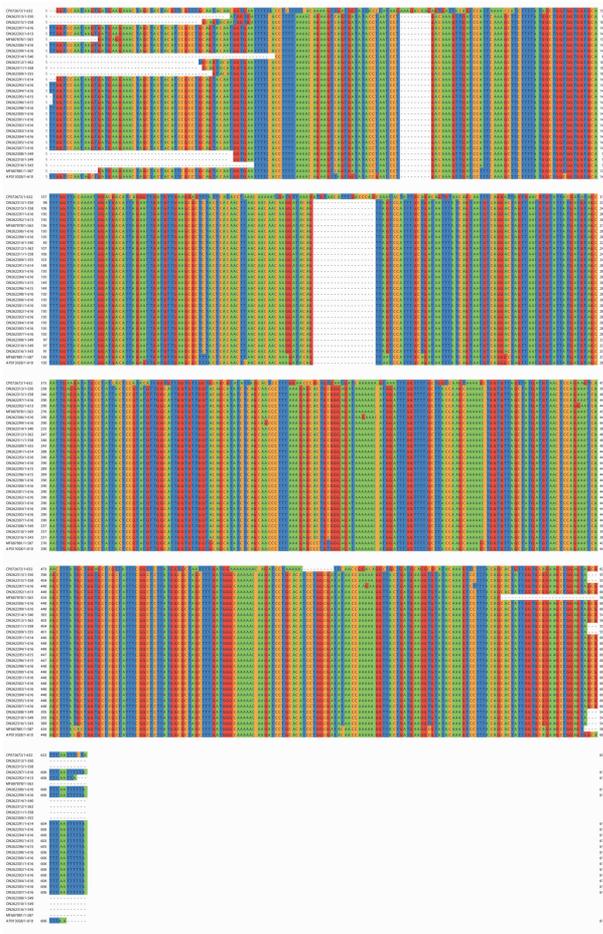


图5 内共生菌 *Wolbachia* wsp 基因多序列比对
Fig. 5 Multiple sequence alignment based on the wsp gene of the endosymbiont *Wolbachia*

SDT 双序列比对(图6)显示海南热带臭虫检测到 *Wolbachia* 的 (*Wolbachia* of *Cimex hemipterus* Hainan, ON262291~ON262316)与 GenBank 中热带臭虫的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex hemipterus*, MF687878)、温带臭虫的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex lectularius*, AP013028)、梳毛臭虫的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex pipistrelli*,

MF687881)及埃及伊蚊的 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Aedes aegypti*, CP072672)的序列聚类特征。

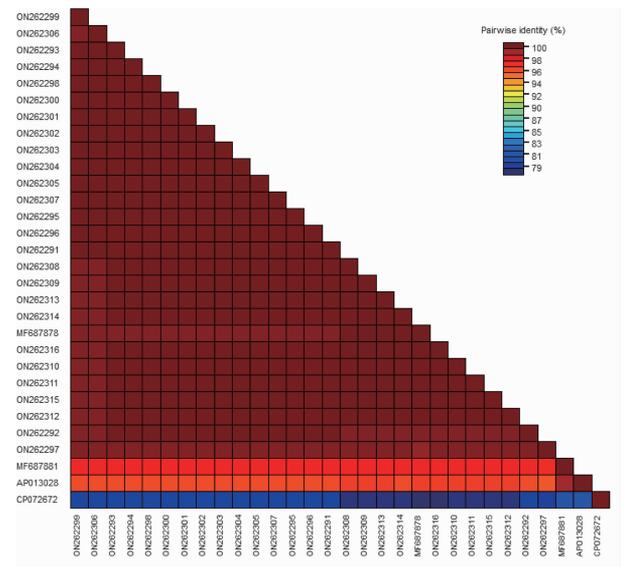


图6 基于内共生菌 *Wolbachia* wsp 基因的序列划矩阵图
Fig. 6 The sequence matrix based on the wsp gene of the endosymbiont *Wolbachia*

以埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (CP072672)的 *Wolbachia* 作为外群,系统发育树显示,海南热带臭虫内共生菌 *Wolbachia* 的26条wsp序列与GenBank中热带臭虫 *Wolbachia* (*Wolbachia* of *Cimex hemipterus*, MF687878)序列聚为一支,与梳毛臭虫 *Cimex pipistrelli* (MF687881)和温带臭虫 *Cimex lectularius* (AP013028)的 *Wolbachia* 系统发育关系较远(图7)。 *Wolbachia* 在92只热带臭虫样本中的自然感染率为28.26%。

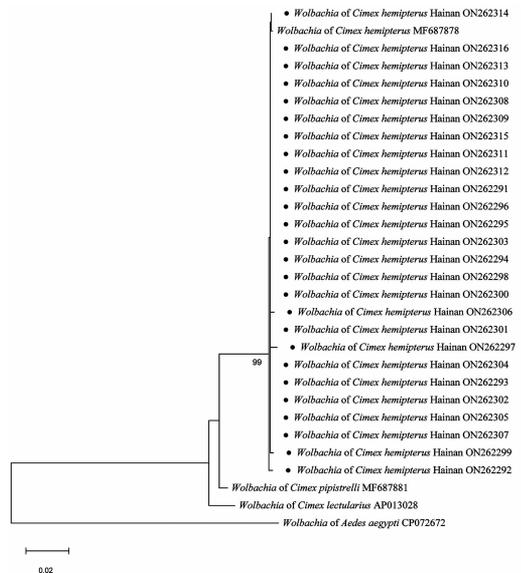


图7 内共生菌 *Wolbachia* wsp 基因系统发育树
Fig. 7 The phylogenetic tree based on the wsp gene of the endosymbiont *Wolbachia*

讨 论

人口增加、贸易往来及城市化发展等因素促使臭虫的侵袭卷土重来。尤其在人口密集而又狭小的区域、拥挤的城市、破旧的住房内,臭虫引起的负担更加严重。臭虫携带的病原体可达40余种,但尚未有确凿的临床病例证实臭虫作为媒介生物将这些病原体传播给人类^[12-14]。臭虫重要的医学意义在于叮咬吸血导致的皮疹、荨麻疹、睡眠不安、精神紧张及恐慌等。

本文采集到的海南臭虫均为热带臭虫(*Cimex hemipterus*),应用COI基因作为DNA条形码标记可对热带臭虫进行分子鉴定,能快速、有效地识别臭虫,并进行遗传信息的分析。海南热带臭虫线粒体COI基因序列与其他地理株的热带臭虫的COI序列保守位点高达99.84%,与温带臭虫、梳毛臭虫的COI序列比对,保守位点为75.20%,具有明显的物种分歧。内共生菌*Wolbachia*在92只热带臭虫中的自然感染率为28.26%,*Wolbachia* wsp基因序列保守位点为占99.03%,与不同地理株热带臭虫的*Wolbachia* wsp序列比对,保守位点占98.86%;与温带臭虫的*Wolbachia*、梳毛臭虫的*Wolbachia* wsp序列比对,保守位点占94.64%;与埃及伊蚊的*Wolbachia* wsp序列比对,保守位点占74.34%。不同物种的*Wolbachia*的序列分歧度不同,物种亲缘关系越远,序列分歧度越大。

臭虫引起的公共卫生健康问题不容忽视。应用*Wolbachia*对有害昆虫的防制是建立低毒、高效的生物防控措施的发展趋势,而内共生菌*Wolbachia*在臭虫营养、生理、生殖中的调控作用研究甚少。本研究明确了海南臭虫的种群构成,优势虫种为热带臭虫,并存在着自然感染内共生菌*Wolbachia*的现象,物种亲缘关系越远,*Wolbachia*序列分歧度越大,这为热带臭虫的进一步研究及探讨*Wolbachia*对臭虫的防控技术提供了有价值依据。

【参考文献】

- [1] Gounder P, Ralph N, Maroko A, et al. Bedbug complaints among public housing residents-New York City, 2010-2011[J]. J Urban Health, 2014, 91(6):1076-1086.
- [2] Peres G, Yugar LBT, Haddad V Jr. Breakfast, lunch, and dinner: a

hallmark of flea and bedbug bites[J]. An Bras Dermatol, 2018, 93(5):759-760.

- [3] Fung EHC, Chiu SW, Lam HM, et al. The impact of bedbug (*Cimex* spp.) bites on self-rated health and average hours of sleep per day: a cross-sectional study among hong kong bedbug victims [J]. Insects, 2021, 12(11):1027.
- [4] Dery M, Arriola K, Lee CY, et al. Ontogenesis of aldehyde pheromones in two synanthropic bed bug species (heteroptera: cimicidae)[J]. Insects, 2020, 11(11):759.
- [5] Ondej Balv n, Roth S, Talbot B, et al. Co-speciation in bedbug *Wolbachia* parallel the pattern in nematode hosts[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):8797.
- [6] Fisher ML, Watson DW, Osborne JA, et al. Growth kinetics of endosymbiont *Wolbachia* in the common bed bug, *Cimex lectularius*[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):11444.
- [7] Mustafa MS, Rastogi V, Gupta RK, et al. *Wolbachia*, the selfish trojan horse in dengue control[J]. Med J Armed Forces India, 2016, 72(4):373-376.
- [8] Hidalgo NP, Mart nez-Torres D, Collantes-Alegre JM, et al. A new species of rhopalosiphum (hemiptera, aphididae) on chusquea tomentosa (poaceae, bambusoideae) from Costa Rica [J]. Zookeys, 2012(166):59-73.
- [9] Braig HR, Zhou W, Dobson SL, et al. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*[J]. J Bacteriol, 1998, 180(9):2373-2378.
- [10] Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(4):968-971.
- [11] Sara S, Shah N, Muhammad M, et al. Characterization, phylogeny and recombination analysis of *Pedilanthus* leaf curl virus-Petunia isolate and its associated betasatellite[J]. Virol J, 2018, 15(1):134.
- [12] Weeks E, Logan J G, Birkett M A, et al. Electrophysiologically and behaviourally active semiochemicals identified from bed bug refuge substrate[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):4590.
- [13] Mona, Sharififard, Ismael, et al. Chemical composition and repellency of *origanum vulgare* essential oil against *cimex lectularius* under laboratory conditions[J]. J Arthropod Borne Dis, 2018, 12(4):387-397.
- [14] Minoru M, Takahiro H, Masahiko T, et al. Suppression of Bedbug's reproduction by RNAi Interference of vitellogenin[J]. Plos One, 2016, 11(4):e0153984.

【收稿日期】 2022-05-25 【修回日期】 2022-08-15