

計畫編號：DOH90-DC-1035

行政院衛生署疾病管制局九十年年度委託研究計畫

計畫名稱：台灣地區瘧疾病媒蚊-微小瘧蚊種型之調查研究

委 託 研 究 成 果 報 告

執行機構：國立陽明大學寄生蟲學研究所

研究主持人：何兆美

研究人員：馮建中，蘇俞丞，楊正大

執行期間：90年2月12日至91年2月15日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

頁 碼

封面

一、中文摘要 (1)

二、英文摘要 (2)

三、本文

(1) 前言 (4)

(2) 材料及方法 (8)

(3) 結果 (13)

(4) 討論 (15)

(5) 結論與建議 (17)

(6) 參考文獻 (18)

(7) 圖，表 (22)

共(27)頁

一、中文摘要

關鍵詞：微小瘧蚊，種型鑑別，形態特徵，核糖體非轉碼區，核甘酸序列，逢機聚合 DNA 多型性

1960 年代，微小瘧蚊(*Anopheles minimus*)的幼蟲廣泛分佈於台灣地區之鄉村或丘陵的溪流中，其成蟲因有嗜吸人血及內棲的特性使它成為台灣地區傳播人類的其孳生範圍已大幅減小。1997 林鼎翔等報告此蚊僅分布於南部及東部二十一個鄉鎮之溪流及灌溉溝渠中。1998 鄧華真等的調查報告詳細地分析微小瘧蚊幼蟲的孳生環境及其型別。他們認為台灣的微小瘧蚊有 A 及 B 二型，以 B 型為優勢種。目前東南亞地區之國家為惡性瘧及間日瘧之疫區，微小瘧蚊也是這些地區主要的病媒蚊。東南亞每年有數萬名之外籍勞工至台灣工作，台灣地區的民眾來往此地區經商旅遊亦十分頻繁，故境外移入瘧疾之可能性大增。為防範瘧疾之流行，此一病媒蚊的密度之監測及調查仍是一項很重要的工作。本計畫至花蓮、台東、屏東、台南等地區上採集，觀察其目前微小瘧蚊孳生之情況及根據成蟲、幼蟲之形態及核酸的分子標記分析型別的分佈。我們的調查結果顯示微小瘧蚊的分佈地區及密度均比 1998 年同一時間大幅減少。這可能是受到環境改變的影響。用採自滿洲的微小瘧蚊的幼蟲皮及成蟲判定為 A 型的微小瘧蚊。以聚合酶連鎖反應(PCR)複製的核糖體基因的 ITS-2 及其上，下游的部分基因片段，選殖到質體。結果得到約 450 bp 的片段。結果顯示各台南新化，屏東滿洲的微小瘧蚊與 A 型的相似性為 99.1-100%，與 C 型的相似性為 94.7-95.6%，由此判斷此兩地的微小瘧蚊均 A 型。台東的仍在鑑別中。與 1998 鄧華真等的調查報告不同之處我們希望能取得鄧博士當時的 B 型的微小瘧的標本。增殖 ITS-2 及其上，下游的部分基因及定序，與 A 型得序列比對以便確定此一分子標記在 A 型及 C 型的辨識的準確性，同時我們也用逢機聚合 DNA 多型性此種分子標記分析三個地區的微小瘧蚊，顯示它們的遺傳性狀也很接近。

二、英文摘要

Key words: *Anopheles minimus*, form identification, morphological characters of larva and adult, internal transcribed spacer-2 and flanking region, sequence alignment type identification, RAPD-PCR.

In 1960, the larvae of *Anopheles minimus* were found in the ditches, stream and rice field of entire Taiwan. The adult of this mosquito is anthrophagic, endophagic and endophilic. Therefore, it becomes the main vector for human malaria infection in Taiwan. However, this mosquito was decreased after the island-wide spray of DDT for the malaria eradication campaign. Lin *et al.* reported that this mosquito distributes only in 21 counties in southern and eastern Taiwan in 1997. Teng *et al.* (1998) analyzed the compositions in the water of the larval breeding sites located in such areas. They found that the NH_4^+ concentration is higher than that in Japan. *An. minimus* in this island seems to adapt the higher concentration of NH_4^+ of water. They also showed that the B type of *An. minimus* is dominant form in these areas. Malaria infection is an important parasitic disease in Southeastern Asia. It may cause problems in Taiwan due to thousands of the Taiwanese travelers to this areas each year. The surveillance of malaria vector is a necessary. In this study, attempt of collecting larvae and adults for *Anopheles minimus* we made at several locations in Tainan, Pingtung, Hualian and Taitung. We found that this mosquito distributed only in Pingtung and Taitung with low density. This indicates that the changes of environment such as water pollution, plant fauna decreases around the stream and abundant rain brought by big storm may create suboptimal breeding conditions for *An. minimus*. The mosquitoes collected from Pingtung were identified to be A type of *An. minimus* based on the morphological characters of adults and larvae skin. The DNA fragment containing Internal transcribed spacer-ITS-2 and the flanking region was amplified, cloning and sequenced for *An. minimus* collected from Tainan and

Pingtung. These mosquitoes were identified as A type of *An. minimus* because the similarity of nucleotide sequence is of 99-100% to that of A type. This result does not agree the report of Teng *et al.* (1998) as mentioned previously. Because the sequence of same region is not available for type B, we need some B type specimen to be used for DNA extraction and the gene amplification. This experiment will clarify the resolution power of ITS-2 and its flanking in the respect of distinguishing type A and B. The banding pattern derived from rapid amplified polymorphism DNA-PCR (RAPD-PCR) also showed that the *An. minimus* had similar genetic characters as well.

三、本文

(1) 前言

微小瘧蚊(*Anopheles cellia minimus*)是台灣為主要傳播瘧疾的病媒 (3, 7, 9 10, 19, 20, 21)。其飛行距離約在 800 公尺 (6)。成蟲其活動力從黃昏開始，逐漸增高活動，半夜為活躍之高峰時間 (10)。1960 年代，微小瘧蚊(*Anopheles minimus*)的幼蟲廣泛分佈於台灣地區之鄉村或丘陵的溪流中，羽化後成蟲飛入屋內躲藏於臥室之床板、蚊帳或牆上伺機吸取人血，吸飽後停在室內消化血液及育卵。此種嗜吸人血及內棲的特性導致它成為傳播人類的瘧原蟲的病媒。在全面性防治瘧疾期間採用室內殘效噴灑 DDT 以後，蚊蟲密度明顯下降，分佈範圍也縮小到丘陵地區，由於台灣本土性瘧疾患者絕跡已二十餘年，微小瘧蚊分佈之地區又慢慢擴大，預醫所之資料顯示 1900 年台北、基隆、花蓮、台東、屏東、高雄、台南等 20 餘鄉鎮均曾發現微小瘧蚊孳生 (7)。1997 年林鼎翔等 (28)報告此蚊僅分布於南部及東部之溪流及灌溉溝渠中。1998 年鄧華真等 (32)的調查也顯示此蚊主要分佈於台南，高雄，屏東，台東及花蓮等五個縣。除台南縣以外，其他地區微小瘧蚊多限於山澗中，稻田及灌溉渠道中已不易採集到。

除了台灣以外微小瘧蚊也是廣東、海南島及東南亞等地區的主要傳瘧媒介之一。根據文獻微小瘧蚊在同一地區常有不同的類型例如雲南微小瘧蚊可分三類型

(17)，印尼之微小瘧蚊有 *An. m. minimus* 及 *An. m. flavirostris* 兩個亞種。俞淵等 (26, 27) 觀察海南島之微小瘧蚊可以分為 A 型及 B 型。二型的成蟲和幼蟲的主要形態特徵列之比較如下：

A 型微小瘧蚊

- 1 觸鬚前段 1/3 的黑環 (30/31)極少為淡黃色環，均不超過它後白環的 3 倍寬。
- 2 縱脈 4 第 1 分枝除基、末端外有 1~2 個淡色斑 (29/31)，極少一致暗色 (2/31)。
- 3 食竇甲的一個齒、前面觀，絲狀物短其末端分叉。
- 4 幼蟲頭部顏齒 (MP)數為 7 (30/32)極少為 9 (2/32)。

B 型微小瘧蚊

1. 觸鬚前段 1/3 的淡黃色環 (28/31) 極少為黑環 (3/31)，均不超過它後白環的 3 倍寬。
2. 縱脈 4 第 1 分枝除基、末端外一致暗色(31/31)。
3. 食竇甲的一個齒、前面觀，絲狀物細長，無縫緣或側棘其末端不分叉。
4. 幼蟲頭部類齒 (MP) 數為 9 (23/32) 或 11 (9/32)。

報告顯示在瘧疾根除前台灣的微小瘧蚊有嗜吸人血及內棲的特性。但海南島的某些地區例東方縣中沙地區的微小瘧蚊嗜血性上，趨吸牛血者佔 97.2%。且該區的 B 型微小瘧蚊經測定對 pp-DDT 有明顯的興奮和逃避行為 (26)。在泰國山區的矮小瘧蚊的習性亦由室內吸人血之習性轉變成向室外吸家畜血液之趨勢(5)。嗜人及嗜動物的蚊間有雜合性出現(4)。研究顯示泰國之 *An. minimus* 依形態細胞學、嗜血性及同功異構酶分為三型：標準型 (M form) 此相當於俞氏之 A 型，varuna form (V form) 此相當於俞氏之 B 型及 pampani (P 型) 亦稱 C 型：(4, 14, 15)。P 型及 M 型用 PAPD-PCR 方法亦可以區別 (16)。

不同型的 *An. minimus*，的對環境的反應亦不同，Ratanatham *et al.* (12) 觀察泰國之 *An. minimus* 認為其發生與降雨、相對溼度、溫度及風速有關，在泰國其發生的尖峰期是 9-11 月間。此地 *An. minimus* 通常喜吸動物的血，吸血的時間均在夜間，但在乾季之黃昏時刻或濕季之清晨，此蚊在室外吸人血者很多；因此增加傳播瘧疾的機會。

現在東南亞每年有數萬名之外籍勞工至台灣工作，台灣地區的民眾來往此地區經商旅遊亦十分頻繁，每年已有百餘名境外移入的病例，以後增加的可能性很大。由於微小瘧蚊仍然存在於台灣之南部及東部的某些鄉鎮。為防範瘧疾之流行，此一病媒蚊仍是應該密切注意的種類，其遺傳性之調查分析是一項很重要的工作。台灣瘧蚊分類的研究應追溯到日本佔領期間至 1964 年已有很詳細的描述者有 16 種(6,7)。但其中有一種即 *An. kochi*，以後始終未曾採到過。1949 年周欽賢增加 *An. fluritites* (2)。由此蚊的雌蚊所產下的卵，發育而成之成蟲經鑑定後仍是微小

瘧蚊，所以當時看到的可能是偶發的變異個體，因此台灣的瘧蚊種類包括瘧蚊屬 (*Anopheles*)及塞蚊屬 (*Cellia*)，主要有下列十五種：

Anopheles (Anopheles) burbumbrosus (Strickland and Chowdhury, 1927)

An. (Anopheles) bengulensis (Puri, 1930)

An. (Anopheles) gigas baileyi (Edward, 1929)

An. (Anopheles) insulaeflorum (Swellengrebel and Swellengrebel de Graff, 1920)

An. (Anopheles) lindesayi pleccau (Koidzumi, 1924)

An. (Anopheles) sinesis (Wiedemann, 1928)

An. (Cellia) annularis (Van der Wulp, 1884)

An. (Cellia) indefinitus (Ludlow, 1904)

An. (Cellia) jeyporiensis candidiensis (Koidzumi, 1924)

An. (Cellia) ludlowae (Theobald, 1903)

An. (Cellia) maculatus (Theobald, 1901)

An. (Cellia) minimus (Theobald, 1901)

An. (Cellia) splendidus (Koizzumi, 1920)

An. (Cellia) takasagoensis (Morishita, 1946)

An. (Cellia) tessellatus (Theobald, 1901)

解剖雌蚊之中腸及唾液腺，可以鑑定出野外的自然族群中那些種類是傳播瘧疾的病媒。早期工作 (1931~1946)顯示微小瘧蚊 (*An. ce. minimus*)及中華瘧蚊可能是台灣瘧疾之主要病媒蚊。但在 1947~1946 Chow. *et al.* (3)再仔細觀察中華瘧蚊的玻璃片時發現所看到的寄生蟲可能是鞭毛蟲 (crithidial flagellates)。因此想到以前所中華瘧蚊之陽性之玻片極可能是鞭毛蟲而非瘧原蟲。在實驗室測試八種瘧蚊之對惡性瘧 (*Plasmodium falciparum*)，間日瘧 (*P. vivax*)及三日瘧 (*P. malariae*)之感受性，結果顯示微小瘧蚊及中華瘧蚊對惡性瘧之感染率分別是 60%~86%及 0%~25%。對其他兩種瘧原蟲，兩種蚊蟲之感受性很接近。其他六種瘧蚊對於三種瘧原蟲之感受性雖然很高，由於在野外時很少吸血，所以不太可能成為傳播

人類瘧疾的媒介 (1)。吸血特性既然是蚊蟲之是否具有傳播人類瘧疾之主要因素。從雌蚊的中腸取到的血液用 precipitin test 測試血之來源，微小瘧蚊有 20% 吸人血，中華瘧蚊有 2% 是吸人血(9)。此外成蟲停息之處所與傳病能力亦有關係，Pletsch *et al.* (11) 調查瘧蚊白晝在住宅及牛棚內停息之處所發現住宅內 80% 為微小瘧蚊、16% 為中華瘧蚊，牛棚內停息的有 89% 是中華瘧蚊。Tseng *et al.* (23) 的報告提出微小瘧蚊最喜歡停息的場所是床鋪 (63%)，所以有 1/4 之標本是從床板採到，其他的場所有傢俱、一樓屋頂及 1 公尺以下的牆壁。

依瘧疾研究所 (TAMRI, 1962, 1963) 的報告，微小瘧蚊之季節消長因地區而異台灣北部有二個高峰期：7~8 月，及 11~12 月。台灣中部 6~7 月，10~11 月；台灣南部 2~4 月，10~11 月(20, 21)。1998 年鄧華真等(32)將全年的調查加以分析，微小瘧蚊在台南，高雄，屏東，台東及花蓮五個縣發生的高峰期均不同。台南以三月為最多，但全年均有。高雄以一月為最高，屏東以十二月為最高。台東以十月至二月份秋，冬季為多，花蓮以十一月最高，五月次之。

除了台灣以外微小瘧蚊也是廣東、海南島及東南亞等地區的主要傳瘧媒介之一。東南亞地區之國家為惡性瘧及間日瘧之疫區，微小瘧蚊也是這些地區主要的病媒蚊。東南亞每年有數萬名之外籍勞工至台灣工作，台灣地區的民眾來往此地區經商旅遊亦十分頻繁，故境外移入瘧疾之可能性大增。由於微小瘧蚊仍然存在於台灣之許多鄉鎮，為防範瘧疾之流行，此一病媒蚊的密度之監測，型別，習性及遺傳性之調查分析是一項很重要的工作。因此本計畫之目標是觀察成蟲、幼蟲之形態，以鑑定其型別，用 PCR 複製核糖體基因的 IGS，比對此片段的核甘序列，以鑑定其型別。

(3) 材料及方法

一．採集蚊蟲

1960 年代，微小瘧蚊(*An. minimus*)的幼蟲廣泛分佈於台灣地區之鄉村或丘陵的溪流中，羽化後成蟲嗜吸人血及內棲的特性導致它成為傳播人類的瘧原蟲的病媒。在全面性防治瘧疾期間採用室內殘效噴灑 DDT 以後，蚊蟲密度明顯下降，分佈範圍也縮小到丘陵地區，由於台灣本土性瘧疾患者絕跡已二十餘年，微小瘧蚊分佈之地區又慢慢擴大，預醫所之資料顯示 1900 年台北、基隆、花蓮、台東、屏東、高雄、台南等 20 餘鄉鎮均曾發現微小瘧蚊孳生 (7)。參考林鼎翔等 (28) 及鄧華真等 (32) 之報告，此蚊主要分布於南部及東部地區之溪流及灌溉溝渠中。所以我們的採集地點如下：

台南縣：新化縣，左鎮鄉

屏東縣：滿洲鄉

台東縣：東河鄉，成功鄉

花蓮縣：壽豐鄉

我們在以上地區中選擇市郊較潔淨緩緩流動的溪水，灌溉渠道及山澗以杓取水，再自杓中吸取幼蟲。採集到的幼蟲，一部分帶回實驗室，在幫浦打氣方式飼養幼蟲，待其長大，化蛹及羽化，以便形態學上鑑定型別。為保持幼蟲的組織及細胞的新鮮，每一個採集點的部分四齡幼蟲當天在旅社用溫水殺死後固定於 95% 乙二醇中帶回實驗室。

二．形態上鑑識。

1. 如有成蟲，用針插的成蟲以解剖鏡觀察 M_{1+2} 脈上的翅斑之顏色以依俞氏所列之特徵分辨其型別。
2. 依照每一個採集點，將已固定於 95% 乙二醇中的幼蟲取出數隻幼蟲，製作幼蟲的玻璃片標本，以便觀察幼蟲頭部的顎齒的數目

三．分子標記的鑑識。

1. 製備染色體 DNA :本步驟是參考 William *et al.*(25)之方法加以配合我們有之

設備稍加修改而成。扼要說明如下：取固定的幼蟲一至二隻，在室溫下待乙二醇揮發，加入 300 μ l 之溶解液(其組成為 Tris-HCl pH 8 100 mM, NaCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%, Sucrose 17%)以玻璃製的微均質器磨碎，，再加 5 μ l proteinase K (20mg/ml)，放置於 55°C 水浴中 40 min。再加上 43 μ l 之 K-Acetate 8M pH 8，在冰上放置 30 min。在微離心機以 14000 rpm 離心 20 min.，保留上層液。再加入等體積之 phenol 於 4°C 輕搖 10 min.，再加入等量 chloroform-IAA，以 14000 rpm 離心 5 min.，取上層液。重複一次 phenol/chloroform-IAA 去除殘留之蛋白質，加入 1/10 體積之 5M K-acetate (pH 5.6)，及 2 倍體積酒精，放置 -20°C 冰箱中 1 小時將 DNA 形成沈澱後取出，以離心機用 14,000 rpm 離心 10 min.，倒棄上清液加入等體積之 70% 酒精沖洗再離心，保留下層物並於空氣中掠乾後加入 40-50 μ l 之 TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM)，取出少量(2 μ l)加水稀釋 50 倍後測 OD₂₆₀。將此染色體及胞器的 DNA 混合物保存於冰箱中(4°C) 保存備用。

2. 核糖體基因之 ITS 2 的增幅，檢查，，選殖及定序：

增殖 ITS-2 所用的引子係參考，該二條引子分別位在 5.8S rRNA 之 3' 端 及 28 S rRNA 的 5' 端。其核苷酸序列如下：

rDNA1: 5'TGT GAA CTG CAG GACACA TGA AC

rDNA2: 5'GGG GTA GTC ACA CAT TAT TTG AGG

聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 的方法主要是參考 Bortel *et al.* (2000)。在 100- μ l 反應物包括 0.2mM dNTPs、每條引子 10 pmole、4 unit Taq polymerase、1x Taq buffer、50ng Template DNA。以 PCR 反應複製 DNA 的條件如後：

94°C 變性(denature) 4 分鐘；

複製(94°C/30 秒、58°C/2 分鐘、72°C/2 分鐘) 30 次循環；

最後以 72°C 延伸 DNA 複製 10 分鐘。

使用機器機型為 OmniGene Temperature Cyclor (Hrbaid[®])。反應結束後取 4 μ l 反

應產物，以 1% agarose gel，在 100 伏特下進行電泳分析，並以 100bp 作為分子量標記，此電泳膠用 ethidium bromide 染色，在紫外光燈下觀察並照相紀錄。

純化(Elution) PCR 產物的步驟是使用 Gel Extraction System (VIOGENE，富聯生物科技)萃取與純化我們欲要之 DNA 片段。按照廠商提供的方法：先用 1% agarose gel 做電泳分析，用 ethidium bromide 染色觀察，將得到之 DNA 片段切下，加 0.5ml GEX 置於 60°C/10 分鐘將膠完全溶解，然後讓 gel extraction column 與溶出之 DNA 接合，分別以 0.5ml Wash I buffer、0.7ml Wash II buffer 去鹽，最後用 T₁₀E₁ buffer 將管柱內之 DNA 溶出然後保存於 -20°C。

接者進行連結反應 (ligation)按照廠商(BIOLABS)提供的方法：是用 pUC18-T 當作載體(Vector)，與純化後 DNA 片段進行接合反應以便轉殖細菌。將 4 μ l eluted PCR product 和 1 μ l (50ng)載體 pUC18-T vector 混勻，並加入 1 μ l T4 DNA ligase(1 unit/ μ l)，1 μ l T4 DNA ligase 10X Buffer，最後用無菌去離子水使總體積為 10 μ l，置於 4°C 反應 12~16 小時。

取上述步驟得到之連接反應產物 7 μ l，加到 100 μ l 之 competent cell (XL1-Blue)，混合均勻，置於冰上 20 分鐘，再放入 42°C 水浴槽進行熱反應處理 (heat shock)50 秒，後迅速置於冰上 3 分 30 秒，再加入 900 μ l SOC 培養液(5ml SOB/2M MgCl₂ 25 μ l/1M glucose 125l)，於 37°C 培養 1 小時 30 分後，將菌液塗抹於選擇性培養基上，選擇性培養基含有抗生素 ampicillin (100 μ g/ml)、tetracycline(12.5 μ g/ml)、Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.4 mMole) 及 5-bromo-a-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside (X-gal) (80 μ g/ml)，37°C 震盪培養 12-16 小時後，挑出含有插入基因(insert gene)的白色菌落。

萃取質體的 DNA 使用購自 VIOGENE 之 Plasmid DNA Miniprep System (Mini-M) (富聯生物科技) 萃取質體的 DNA。按照廠商提供的方法：將篩選到的白色菌落接種在 5ml LB 培養液中(含有抗生素 ampicillin)，37°C 震盪培養 12-16 小時後，9,000 rpm 離心 5 分鐘，將菌液沈澱，倒掉上清液，加 250 μ l solution I (含有 RNase A)，vortex the pellet，再加 250 μ l solution II，溫和上下混勻，後加入 350 μ l

solution III，混勻，12,000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液吸取置於 Mini-M column，6,500 rpm 離心 1 分鐘，去掉離心液，繼續將 0.5 ml wash I buffer 加入 Mini-M column，6,500 rpm 離心 1 分鐘，去離心液，加 0.7 ml wash II buffer 於 Mini-M column，12,000 rpm 離心 1 分鐘，去離心液，12,000 rpm 離心 3 分鐘後，將 Mini-M column 移至 60°C 之 heating block 10 分鐘讓殘留之酒精揮發，最後把 Mini-M column 移至一新離心管，加入 50 μ l TE buffer 溶出質體的 DNA。保存於 -20°C。以 50 倍稀釋倍率測其 OD(Optical Density) 值以計算其 DNA 濃度。(I) 採用 Dideoxy Chain Termination Method (Sanger, 1977)。DNA 定序反應用 T7 Sequenase version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB Amersham)。按照廠商提供的方法，經過模版的雙股 DNA 的變性，與引子的練合，標記 35 S-dATP 及 DNA 合成反應，最後加入 4 μ l stop solution (95% formamide、20 mM EDTA、0.05% bromophenol blue、0.05% xylene cyanol) 混勻後，保存於 -20°C。然後用 6% polyacrylamide 序列膠片。以直立式電泳槽 (BRL[®], model S2) 跑電泳 4-6 小時。完成電泳後，以 3MM 濾紙取下膠體，覆以保鮮膜並用 80°C 真空抽乾 2 小時，以 PhosphorScreen (from Molecular Dynamics) 壓片 24 小時後進行掃描即可判讀 DNA 序列。我們亦用自動定序 (autosequencing) 校對序列的正確性。自動定序是採用 ABI Prism[™] BigDye[™] Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)，使用 GeneAmp PCR System 2400 的 PCR 機器 (Applied Biosystem) 做自動高溫循環核酸定序，並以 ABI Prism 377 Autosequencer (Applied Biosystem) 分析自動核酸定序結果。

3. 隨機增殖 DNA 帶型的多型性 (random amplified DNA polymorphism-PCR, RAPD-PCR)

我們也用了十組 10 組核苷酸隨機組成的引子，用各地區採到的微小瘧蚊為模板藉聚合酶連鎖反應合成 DNA 的片段。所用的方法及步驟如下：

在 25 μ l 的反應包括 17 ng 模板 DNA，15 pmole 引子，2.5 μ l 的 10 X Taq buffer，2.5 μ l 的 2mM dNTP，2 unit 的 super Taq。反應的條件是 94°C 變性 (denature)

4 分鐘；複製(94°C/30 秒、37°C/2 分鐘、72°C/2 分鐘) 45 次循環;最後以 72°C 延伸 DNA 複製 10 分鐘。使用機器機型為 OmniGene Temperature Cycler (Hrbaid[®])。反應結束後取 20 μ l 反應產物，以 1% agarose gel，在 50 伏特下進行電泳分析，並以 100bp 作為分子量標記，此電泳膠用 ethidium bromide 染色，在紫外光燈下觀察並照相紀錄。

四、資料分析：序列比對及分析

所得到的 ITS-2 的 DNA 序列，送進 GCG (Genetics Computer Group)，進行排列(alignment)及找尋內切酶的位點。以 BIOEDIT (Ver 5.0.9) (2001) 程式分析序列組成。所得資料用 MEGA-2 軟體 (31) 分析各地區的微小瘧蚊的 ITS-2 序列間的異同及相似程度。

所得的 RAPD-PCR 的帶型的多型性先用 AABI 程式確定 DNA 片段的長度，比較樣本間及地區間的差異的有無及大小。再用 Arlequin 2000 (35) 分析差異的顯著性。

(3) 結 果

採集過程中，我們仔細觀察目前的瘧蚊幼蟲孳生的水域所具有的特性。可歸納出下列三項：

一、水的流速較其他部分緩和，幾乎看不到水波。

二、水域上方的空間常由樹木，草叢形成遮蔭，或由數塊岩石交錯形成蔭涼的水面。

三、水域多在陽光直射時間很短的方向。所以日間的水溫一般可保持在 23°C 左右。

四、水質清澈見底，但水中仍有微量的有機質存在。

我們將以上的水域採集到的瘧蚊種類列在表二。除台東泰源溪以外，其他的溪流中我們每人均沿溪採水樣二十杓以上，但所獲瘧蚊幼蟲仍然不多。微小瘧蚊僅在屏東縣的滿洲鄉及台東縣的成功鎮的郊外的山澗中採到。兩地的數目均不多。例如在成功只採到 4 隻。屏東縣的滿洲鄉數目亦不多。其他的瘧蚊中以斑腳瘧蚊及棋斑瘧蚊較多。台東泰源溪中的斑腳瘧蚊相當高 (>50 幼蟲/杓)。在台南的新化的牛棚及牛的附近曾經掛燈，欲誘集成蟲。同時利用夜間環繞著牛的四週以捕蟲網掃捕。結果亦未採到微小瘧蚊的成蟲。

我們帶回實驗室的活著的幼蟲中，只有採自滿洲的二隻化蛹，羽化。它們的幼蟲皮及蛹皮均製成標本。成蟲的翅的中脈(即第四脈)的分支有淡色斑，幼蟲皮的齒額約為 7 個。由此初步判定滿洲的這二隻為 A 型的微小瘧蚊。其他未能羽化的幼蟲製成的幼蟲標本因頭部的厚度較厚，在顯微鏡下不易分辨齒額的數目是否多於九個。我們在滿洲鄉採集的微小瘧蚊的幼蟲不多，承鄧博士惠賜他們採集的幼蟲進行實驗，謹致由衷的謝忱。

因數次採集所得到的幼蟲數量不多，為有效地利用有限的實驗材料乃決定將採用先純化其核酸以便找尋核酸的分子標記。即用純化的核酸當作模版，以我們設計的引子在體外以聚合酶連鎖反應 (PCR)複製的核糖體基因的 ITS-2 片段，選殖到質體。結果得到約 450 bp 的片段。其基本的序列如圖一。與基因庫已有的

的 A 與 C 兩型比對。各地點的微小瘧蚊的 ITS-2 及其上，下游的序列比對的結果，核苷酸不同的數目列於表二。各地點的微小瘧蚊與 A 型及 C 型的微小瘧蚊 ITS-2 的序列的相似性分別列於表三。結果顯示各地點的微小瘧蚊與 A 型的相似性為 99.1-100%，與 C 型的相似性為 94.7-95.6%，由此判斷台南及屏東兩地的微小瘧蚊均 A 型。台東成功的微小瘧蚊經鑑定後也是 A 型。

我們將屏東九棚及長樂，台東的微小瘧蚊的 DNA 用十組核苷酸隨機組合的引子也作了隨機複製 DNA (random amplified DNA polymorphisms, RAPD-PCR) 的多型性的實驗，結果如表五。此結果顯示這幾個地區的微小瘧蚊的遺傳特性很接近。

(4) 討 論

從我們的採集的資料來看，台灣的微小瘧蚊幼蟲分佈的地區仍在快速地縮小中。

根據我們的觀察，可能有下列三項原因：

- 一、 鄉村都市化及水質的污染- 台灣原來有微小瘧蚊幼蟲分佈的鄉村的生活方式與都市居民已非常相似。加上網穿梭於群山之間公路，形成便捷的交通網，吸引大批的遊客。因此一般的家庭及旅客產生的洗滌用水大量流入溪中。提高水中的含氮的化合物及有機的清潔劑的濃度。尤其是後者對微小瘧蚊幼蟲的生存可能十分不利。此外溪流上游兩岸常有各型的廢棄物放置，溪中有時有動物屍體，造成水源的污染及優氧化。溪流兩岸有大面積的果樹摘栽植，肥料及殺蟲劑的使用也可能影響水質。
- 二、 水文的變化-公路的修築改變了溪流的分佈，兩岸的植被，本年颱風帶來的豪雨使溪水的流速加大，也可能減少微小瘧蚊幼蟲的密度。
- 三、 吸血源減少，使微小瘧蚊的成蟲的生殖潛能下降 - 台灣的微小瘧蚊原來是嗜吸人血的。由於住宅防護設備的改善及人們在戶外活動減少，現在的微小瘧蚊可能逐漸成為嗜吸牛血的種類。由於農村的機械化，養牛人家所剩極少，使微小瘧蚊的成蟲不易尋找到血源，而影響其生殖。

微小瘧蚊的幼蟲對生長條件的要求很高，是一種很難在實驗室內繼代飼養的種類。我們自野外帶回活的幼蟲，飼養時生長遲滯，易感染，不易化蛹及羽化。由於缺乏幼蟲皮及成蟲，因此造成以型態上鑑定型別的困難。

使用核酸分子的標記可解決以上的困難。一隻幼蟲所得之核酸即可供複製 PCR 所需的模版的材料。我們用此一技術複製出 ITS-2 及其上，下游的部分基因。由此一片段的核苷酸序列辨識出台南新化及屏東滿洲及台東等地區的微小瘧蚊的幼蟲是 A 型。與用形態特徵的結果相吻合。根據鄧華真等(1998) 的報告，此台南及屏東二個地區的微小瘧蚊 A 型與 B 型均有；且以 B 型為優勢種，在這兩個地區的比例分別為 47/54 及 24/41 (32)。由於基因庫內目前無 B 型此一片段的序列。對於這一結果，我們有二項假設：

一、A 型與 B 型的 ITS-2 及其上，下游的部分基因的序列的相似性大於 99%，所以不能鑑別兩型間之差別。必須尋找其他的分子標記。

二、經過二年的環境的變遷及選汰，自然族群中 A 型的微小瘧蚊已取代 B 型成為這兩個地區的優勢種。

為求證這上的假說，只有用已確定是 B 型的微小瘧的標本。增殖 ITS-2 及其上，下游的部分基因及定序。才有資料與 A 型得序列比對。此外，由我們的結果來看，台南，屏東及台東等三個地區的微小瘧蚊的遺傳性狀也很接近，可以佐證由 ITS-2 的序列分析所得的結論。

(5) 結論及建議

由於我們的結果與鄧華真等的報告不同，而且 B 型微小瘧蚊的這段基因的序列尚無資料，我們希望能取得鄧博士當時的 B 型的微小瘧的標本。萃取其核酸，增殖 ITS-2 及其上，下游的部分基因及定序。再與 A 型得序列比對。此外，我們採集的印象微小瘧蚊已成為稀少的蚊種，在它尚未絕種前建立其基因庫是十分重要的。

(6) 參考文獻

- 1 · Anazawa , K. 1931. Observation on the natural infection of the various Formosan anopheles with reference to the critical value of each species from the malaria epidemiological point of view. J. Med Asso. Formosa 319: 1027-1049.
- 2 · Chow C. Y. 1949. The anopheline mosquitoes of Taiwan (Formosa), China, Quart J. Taiwan Museum 2: 1-9.
- 3 · Chow, C. Y. R. B. Watson and T. L. Chang. 1945. Natural infection of *Anopheles* mosquitoes with malaria parasites in Formosa. Ind. J. Mal. 4: 295-300.
4. Green, C. A., R. F. Gass, M. L. Leonald and V. Baimai. 1990. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. Med. Vent Entomol. 4: 25-34.
5. Harrison, B. A. 1980. Medical Entomology studies-XIII. The *Myzomyia* series of *Anopheles (Cellio)* in Thailand, with emphasis on intra-interspecific variations: (Diptera, Culicidae) Cont. Am. Entomol. Inst. 17: 193.
6. Lien , J. C. The ecology of the mosquitoes of Taiwan province and their control. In "The seminar on Ecology and control of insects" Academic Sinica May 15-16, 1978, pp37-69.
7. Lien, J. C. 1991. Anopheline mosquito and malaria parasites in Taiwan. Kaohsiung Med. Sci. 7: 207-223.1
8. Manguin, S. , R. C. Wilkerson, J. E. Conn, Y. Rubio, J. A. Danoff-Burg, D. R. Roberts. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphological markers. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 60: 364-376.
9. Morishita, K. and T. Katagai. 1933. Studies on blood feeding of Fromosan

- anophelines. (Fist Report) Investigation of blood in the stomach by precipitin tests. J. Med. Assoc. Formosa 32: 593
10. Omori, N. 1942. Observations on the nocturnal activities of the anopheline mosquitoes in Formosa I. Preliminary report, Acta Nipponica Medicinæ Tropicalis 4: 59-67.
 11. Pletsch D. J. P. T. Tseng and H. H. Chen. 1956. Day-time resting places of *Anopheles* in houses and stables of rural Taiwan, China. J. Med. Assoc. Formosa 55: 621-627.
 12. Ratanatham, S. , E.S. Upatham, C. Prasittisuk, W. Rojanasunan, N. Therasilp, A. Tremongkil and V. Viyanant. 1988. Bionomics of *Anopheles minimus* and its role in malaria transmission in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 19: 283-289.
 13. Sucharit, S and W. Choochote. 1982. Hybridization of *Anopheles minimus* and *Anopheles aconitus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. J. Med. Entomol. 19: 290-292.
 14. Sucharit, S., N. Komalmisra, S. Leemingsawat, W, Surthin, K. Deesin, T. Vutikes. 1985. Studies on *Anopheles minimus* population genetics in its role as a vector of malaria in Thailand. Seamic: 157.
 15. Sucharit, S., N. Komalmisra, S. Leemingsawat, C. Apiwathnasorn and S. Thongrungrat. 1988. Population genetic studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand Southeast Asian J. Trop. Med. Pub Hlth. 19: 717-723.
 16. Sucharit, S. and N. Komalamisra. 1997. Differentiation of *Anopheles minmus* species compex by RAPD-PCR technique. J. Med. Asso. Thailand 80: 598-602.
 17. Sawabe K. M. , Y. Takagi, T. Tsuda, X. Jin-Jiang, O. Chi-Ping, J. L. Zhong and L. Xin-Fu. 1996. Genetic differentiation among three populations of *Anopheles*

- minimus* of Guangxi and Yunan provinces in The Republic of China. Southeast. Asian J. Trop. Med. Pub. Hlt. 27: 818-827.
18. Steiner. W. W. M. and D. J. Joslyn 1979. Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. Mosq. News 39: 35.
 19. TAMRI 1957. TAMRI (Taiwan Provincial Malaria Research Insitute): Monthly reports for December 1956, April, September, October and December 1957.
 20. TAMRI 1962. Plan of operations for malaria eradication in China (Taiwan): 1-129, 1962.
 21. TAMRI 1963 TAMRI: Annexes to the plan of operation for malaria eradication in China (Taiwan): 1-259, 1963.
 22. Tseng, P. T. and H. C. Hsieh. 1954. Natural infection of *Anopheles* with malaria parasites in southern Taiwan (Formosa): A report on recent dissection. J. Med. Asso. Formosa 53: 568-573.
 23. Tseng, P. T., C. C. Chen and. D.J. Pletsch 1956. Day time resting place of *Anopheles minimus* in rural houses of Taiwan (Fomosa), China. J. Med. Assoc. Fromosa 55: 628.
 24. Von Bortel W., H. D. Trung, N. D. Manh, P. Roelants, P. Verle and M. Coosemans 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnan and their behavioral divergence.
 25. Willium, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak J. A. Rafalski and S. Tingey. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
 26. Yu Y and M. Li. 1984. Notes on the two forms of *Anopheles (Cellio) minimus* Theobald 1901 in Hainan Island. J. Parasit. Parasitic Dis. 2: 95.
 27. Yu Y and X. Peng. 1985. Studies on the patterns of nonspecific esterase

- isozymes of *Anopheles minimus* Theobald, (Diptera, Culicidae). Abstract of Annual Report 1985, Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, p20.
28. 林鼎翔，鐘兆麟，呂良振，曾丑 1997. 台灣地區矮小瘧蚊 (*Anopheles minimus*) 之分布。 第九屆病媒防治技術研討會論文集：185-195.
29. Ayala, F. J. J. R. Powell, M. L. Tracy, C. A. Mourao and S. Perez-Salas. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willsotoni* group IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willsotoni*. Genetics 70: 113.
30. Tsukamoto, M. 1984. Technical notes on acrylamide gel electrophoresis used for comparing isozymes of mosquito larva. J. Uoen. 6: 193
31. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
32. Teng, H. H., Y. Li. Wu, S. J. Wang and C. Lin. 1998. Effect of Environmental factors on abundance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) larvae and their seasonal fluctuation in Taiwan. Environmental Entomol. 27: 324-328.
33. Van Bortel, W., H. D. Trung, P. Roelants, R.E. Harbach, T. Backejau and M. Coosemans. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s. l. beyond distinguishing the members of the species complex. Insect Mol. Biol. 9: 335-340.
34. Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva, Switzerland.

(7) 圖，表

表一、幼蟲採集地點及其環境

地點	孳生源			時間
	類型	植被	土質	
台南縣新化	灌溉溝渠	水稻	泥土	三月
	大溪流	竹林	沙土	三月
台南縣左鎮	小溪流	竹林	沙土	三月
	溝渠	竹林	沙土	三月
台北縣三芝鄉	灌溉溝渠	茭白筍	泥土	五月
屏東縣滿洲鄉 九棚	大溪流	灌木	沙土	五月
花蓮縣壽豐鄉 月眉村	小溪流	灌木，高粱	沙土，岩石	十一月
	大溪流	無	沙土，岩石內生水 藻類	十一月
	大溪流	灌木，柚木	沙土，岩石	十一月
台東縣成功鎮	小溪流	灌木	沙土，岩石	十一月
台東縣東河鄉 北源村	小溪流	灌木，竹	泥土	十一月
台東縣東河鄉 泰源村	大溪流	灌木，狗尾草	沙土，岩石	十一月

表二、五個縣所採集到的瘧蚊的種類

瘧蚊種類	分佈地點
林氏瘧蚊 <i>An. lindesayi</i>	花蓮縣（壽豐）
斑腳瘧蚊 <i>An. maculatus</i>	台南縣（新化，左鎮），花蓮縣（壽豐）， 台東縣（成功，北源，泰源）
微小瘧蚊 <i>An. minimus</i>	屏東縣（滿洲），台東縣（成功）
中華瘧蚊 <i>An. sinensis</i>	台北縣（三芝）
棋斑瘧蚊 <i>An. tesellatus</i>	台南縣（新化，左鎮），台東縣（成功， 北源，

表三、微小瘧蚊的 ITS 序列與基因庫 A 型與 C 型核苷酸序列的差異

	滿洲 長樂 -1	滿洲 長樂 -2	滿洲 長樂 -3	滿洲 九棚 -1	滿洲 九棚 -2	台東 成功 -1	台東 成功 -2	台東 成功 -3	台南 新化 -1	微小 瘧蚊 -A	微小 瘧蚊 -C
滿洲長樂-1											
滿洲長樂-2	6										
滿洲長樂-3	4	4									
滿洲九棚-1	3	3	1								
滿洲九棚-2	7	5	5	4							
台東成功-1	6	4	4	3	5						
台東成功-2	4	4	2	1	5	4					
台東成功-3	6	4	4	3	5	0	4				
台南新化-1	3	3	1	0	4	3	1	3			
微小瘧蚊-A	4	2	2	1	3	5	5	5	5	1	
微小瘧蚊-C	24	20	22	21	23	22	22	22	21	20	

表四、微小瘧蚊的 ITS 序列與基因庫 A 型與 C 型核苷酸序列的相似性 (百分比)

	滿洲 長樂 -1	滿洲 長樂 -2	滿洲 長樂 -3	滿洲 九棚 -1	滿洲 九棚 -2	台東 成功 -1	台東 成功 -2	台東 成功 -3	台南 新化 -1	微小 瘧蚊 -A	微小 瘧蚊 -C
滿洲長樂-1	100.0										
滿洲長樂-2	99.1	100.0									
滿洲長樂-3	99.1	99.1	100.0								
滿洲九棚-1	99.3	99.3	99.8	100.0							
滿洲九棚-2	98.4	98.9	98.9	99.1	100.0						
台東成功-1	98.7	99.1	99.1	99.3	98.8	100.0					
台東成功-2	99.1	99.1	99.5	99.7	99.8	99.1	100.0				
台東成功-3	98.7	99.1	99.1	99.3	99.8	100.0	99.1	100.0			
台南新化-1	99.3	99.3	99.8	100.0	99.1	99.3	99.8	99.3	100.0		
微小瘧蚊-A	99.1	99.6	99.6	99.8	99.3	98.9	98.9	98.9	99.8	100.0	
微小瘧蚊-C	94.7	95.6	95.1	95.5	94.9	95.1	95.1	95.1	95.3	95.3	100.0

表五、 屏東長樂，九棚，及台東成功的微小瘧蚊逢機聚合 DNA 多型性
(RAPD-PCR)的帶型

DNA 片段 的大小	地 區		
	屏東長樂	屏東九棚	台東成功
2500 bp	+	-	+
1800 bp	+	+	+
1600 bp	+	+	+
1400 bp	+	+	+
1200 bp	+	+	+
1100 bp	+	-	+
900 bp	+	-	+
700 bp	+	+	+
500 bp	+	-	+

```

      .       .       .       .       .
GGGGTAGTCACACATTATTTGAGGCCTACTTATGAAGTAAGTTTTCTCATGCCACAGGGG
>      primer rDNA2      < >----- 5.8 S rRNA----- <

      .       .       .       .       .
CCCACCGTATGGGTCGTCACGCGTTACACGACTCGGCCGGATGATTGTAACCCCTGAA

      .       .       .       .       .
CCTGGTCGACAAGCCTGGTGTTAGTAGGCTGCCGGGTATCTCAGGTCGTCCATAGCCGA

      .       .       .       .       .
AGTTGACCCGTGCGACTTGACGATGCACCCCCAAATTGTACAGTGACACTGTACTGCCT

      .       .       .       .       .
TACCTTTTCAGCGCCCAAGGTCCCGGTAGGAGACGGGCCCTGCACGCAATGATGCACAG

      .       .       .       .       .
TGCGCTCACGTGTTCAATCAGCAACATCAGAAGGCGGGCTGCTCGCCATGATGCCGTCCG

      .       .       .       .       .
TACACGGGCGCCATGTAGTTAGAGTTGTGTGTAACAAGGATTTGGTAGGCACTCAAGAAT

      .       .       .       .       .
GTGTACATCGGTCGGGTTTAAACGTCCGATGCGCCATATGCGTTCAACGTGTCGGTGTTG
>----- 28 S rRNA
>

      .       .       .       .       .
ATGTGTCCTGCAGTTCACA
      Primer rDNA1      <
      ----- <

```

圖一、 *An.minimus* 之核糖體的 ITS-2 及其上，下游的基因代表性的核苷酸序列。