

# 基于CO I 基因的媒介蝇类快速分子鉴定研究

王颖<sup>1</sup>, 鲁闽<sup>1</sup>, 李金庆<sup>1</sup>, 刘明杰<sup>1</sup>, 岳巧云<sup>2</sup>

1 烟台出入境检验检疫局技术中心, 山东 烟台 264000; 2 中山出入境检验检疫局

**摘要:** **目的** 为解决蝇类形态学鉴定的不足, 建立基于细胞色素C氧化酶亚基 I (CO I) 基因的 DNA 条形码技术对蝇类进行分子鉴定。**方法** 选取烟台口岸常见的 16 只蝇类作为研究对象, 形态学鉴定后, 取蝇的单后足代表微量组织, 提取总 DNA。依据资料, 选取 CO I 国际通用引物 LCO1490: 5' -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3', HCO2198: 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3', 建立 PCR 体系, 完善 PCR 程序, 有效扩增蝇类的 CO I 基因。纯化 PCR 产物后进行序列测定和比对。此外, 应用 Mega 5.05 软件分别用最大似然法、邻接法、最大简约法分析系统发育, 构建系统发育树比较进化关系。**结果** 16 只蝇类 CO I 基因扩增片段长度为 690 bp, 其中 A+T 平均含量高达 68.53%。序列比对结果及系统进化关系显示, 16 只蝇类 CO I 基因的分子鉴定与形态学鉴定结果一致。**结论** 应用 DNA 条形码技术可成功扩增蝇类的 CO I 基因, 其分子鉴定与形态学鉴定结果完全一致, 尤其适用于微量组织样本的鉴定。

**关键词:** DNA 条形码; 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因; 蝇类; 分类鉴定

中图分类号: R384.2 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)05-0427-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.011

## Study on rapid molecular identification of vector flies based on CO I gene

WANG Ying<sup>1</sup>, LU Min<sup>1</sup>, LI Jin-qing<sup>1</sup>, LIU Ming-jie<sup>1</sup>, YUE Qiao-yun<sup>2</sup>

1 Yantai Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, Shandong Province, China;

2 Zhongshan Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau

Supported by the National Key Technology Support Program of China (No. 2012BAK11B05), Scientific Research Foundation of Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (No. 2012IK223) and Scientific Research Foundation of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (No. SK201116)

**Abstract: Objective** To establish a DNA barcoding technique for the molecular identification of flies based on CO I gene and to make up for the deficiency of morphological identification of flies. **Methods** Sixteen flies commonly found at Yantai Port were used as subjects in this study. After morphological identification, total DNA was extracted from the single hind foot of each fly. According to reference, the international CO I primer LCO1490: 5' -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' and HCO2198: 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' were used to set up a PCR system. Sequence of CO I was successfully amplified, followed by sequencing and aligning of purified PCR product. Phylogenetic study of CO I gene was performed using Mega 5.05 by neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), and maximum likelihood (ML) methods. **Results** The amplified CO I fragments of sixteen flies were 690 bp in size, with an average A + T content of 68.53%. The sequence alignment and phylogenetic study showed that the results of CO I gene-based identification were consistent with morphological identification. **Conclusion** The DNA barcoding technique established in this study is able to amplify CO I gene from flies and thereby identify flies with the same result as morphological identification; this technique is particularly suitable for the identification of a trace amount of samples.

**Key words:** DNA barcoding; Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene; Fly; Classification and identification

医学媒介生物的鉴定和识别是监测与控制疾病发生的基础, 是检疫、疾病预防与控制领域的核心步骤, 经典的鉴定方法为形态学鉴定法。而国境口岸的媒介生物随交通工具和货物散播的过程中可导致形态缺失, 形态学鉴定法难以正确识别种类。为解决上述难

题, 加快口岸通关速度, 以蝇类单后足代表微量组织为研究对象, 拟建立基于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 基因的蝇类快速分子鉴定方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试剂 DNA 抽提试剂盒 (DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit, QIAGEN), 双翅目国际通用引物 [LCO1490: 5' -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3',

**基金项目:** 国家科技支撑计划课题 (2012BAK11B05); 国家质检总局科研基金 (2012IK223); 山东出入境检验检疫局科研基金 (SK201116)

**作者简介:** 王颖, 女, 硕士, 主管医师, 主要从事媒介生物学及病原体检测工作, Email: ciq\_wy@163.com

HCO2198: 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3', 生工生物工程(上海)股份有限公司合成], 分子生物学试剂购置于TaKaRa公司。

1.1.2 仪器 自动电泳仪(AE8130, ATTO)、凝胶成像系统(Molecular Imager®, BIO-RAD)、生物安全柜(SG-603, BAKER COMPANY)、冷冻高速离心机

(CT15RE, HITACHI)。

1.1.3 实验对象 待测蝇类于烟台口岸使用诱蝇笼诱捕法捕获, 依据《中国常见蝇类检索表》<sup>[1]</sup>、《中国重要医学昆虫分类与鉴别》<sup>[2]</sup>, 对捕获蝇类进行形态学鉴定, 将完成鉴定的标本装入冻存管内, 做好标记, 放入-70℃冰箱内保存待用。待测蝇类详见表1。

表1 蝇类标本信息  
Table 1 Information of fly samples

科	属	种	采集时间(年-月)	采集地点	编号
花蝇科 Anthomyiidae	花蝇属 <i>Anthomyia</i>	横带花蝇 <i>A. illocata</i>	2010-08	烟台港、东龙码头	2
	海花蝇属 <i>Fucellia</i>	黑斑海花蝇 <i>F. apicalis</i>	2010-08	烟台港、环球码头	12
蝇科 Muscidae	腐蝇属 <i>Muscina</i>	狭额腐蝇 <i>M. angustifrons</i>	2011-07	烟台港、办公区	1
	厕蝇属 <i>Fannia</i>	夏厕蝇 <i>F. canicularis</i>	2011-09	烟台港、东龙码头	5、11
	黑蝇属 <i>Ophyra</i>	古铜黑蝇 <i>O. aenescens</i>	2011-08	烟台港、西港	3
	家蝇属 <i>Musca</i>	家蝇 <i>M. domestica</i>	2012-09	烟台港、宿舍区	8
		市蝇 <i>M. sorbens</i>	2012-09	烟台港、宿舍区	14
		孕幼家蝇 <i>M. larvipara</i>	2012-09	烟台港、办公区	9、13
丽蝇科 Calliphoridae	纹蝇属 <i>Graphomya</i>	绯胫纹蝇 <i>G. rufitibia</i>	2011-09	蓬莱港	7
	绿蝇属 <i>Lucilia</i>	丝光绿蝇 <i>L. sericata</i>	2011-08	烟台港、西港	4
	阿丽蝇属 <i>Aldrichina</i>	巨尾阿丽蝇 <i>A. grahami</i>	2011-09	烟台港	15
麻蝇科 Sarcophagidae	金蝇属 <i>Chrysomya</i>	大头金蝇 <i>C. megacephala</i>	2011-05	烟台港、宿舍区	6
	别麻蝇属 <i>Boettcherisca</i>	棕尾别麻蝇 <i>B. peregrina</i>	2012-09	烟台港、东港	10
食蚜蝇科 Syrphidae	鼓额食蚜蝇属 <i>Scaeva</i>	斜斑鼓额食蚜蝇 <i>S. pyrastris</i>	2012-10	蓬莱港	16

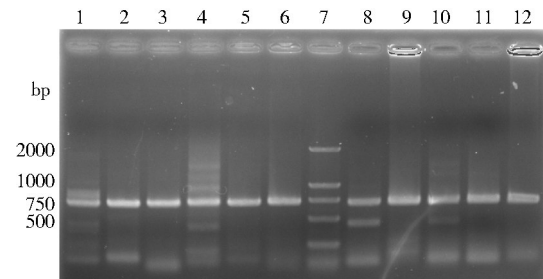
1.2 方法 取蝇的单后足用DNeasy® Blood & Tissue Kit试剂盒进行基因组DNA抽提; 建立总体积为25.0 μl的反应体系: 10×PCR buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.5 μl; 10 mmol/L each dNTP Mix 0.25 μl, 10 μmol/L LCO1490 0.5 μl, 10 μmol/L HCO2198 0.5 μl, 5 U/ml Taq DNA 聚合酶 0.5 μl, DNA模板 2.0 μl; 反应程序设定为94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共5个循环; 94℃ 30 s, 51℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共35个循环; 72℃ 10 min, 进行CO I 基因扩增。

PCR产物经琼脂糖凝胶电泳及纯化回收后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定, 序列结果于NCBI、BOLD等数据库进行比对, 报告蝇种。并应用Mega 5.05软件对蝇类CO I 序列进行系统发育分析。

## 2 结果

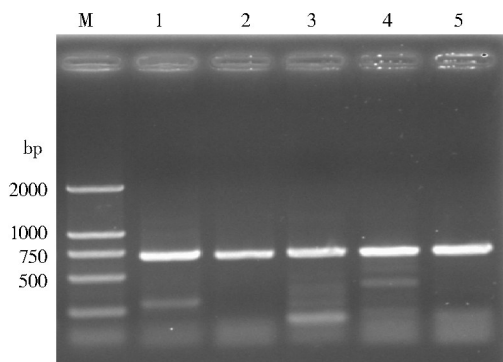
2.1 CO I 基因的PCR扩增和序列分析 实验提取蝇类基因组DNA, 针对CO I 序列进行有效扩增。由PCR扩增结果可见(图1、2), 待检蝇种在略小于750 bp下有特异性扩增条带, 大小与文献中报道的CO I 序列相似<sup>[3]</sup>。

与脊椎动物mtDNA相比, 昆虫mtDNA富含更多的A+T, C+G含量偏低<sup>[4]</sup>。16只蝇类扩增的部分CO I 片段长度为690 bp, A、T、C、G碱基平均含量见表2。



注: 1~6、8~12. 分别为1~6号和7~11号蝇类CO I 扩增片段; 7. AL2000 DNA Marker。

图1 1~11号蝇类样品CO I 片段PCR扩增结果  
Figure 1 PCR amplification of CO I fragments from flies labeled 1-11



注: M. AL2000 DNA Marker; 1~5. 分别为12~16号蝇类CO I 扩增片段。

图2 12~16号蝇类样品CO I 片段PCR扩增结果  
Figure 2 PCR amplification of CO I fragments from flies labeled 12-16

表2 蝇类CO I 片段序列特点

Table 2 The sequence characteristics of CO I fragments of flies

碱基	平均含量(%)
A	29.30
T	39.23
C	15.45
G	16.02

COI序列A:T:C:G为29.30:39.23:15.45:16.02,其中A+T含量高达68.53%,与各文献报道的含量高度相似。

将16只蝇类的CO I 序列在NCBI上进行比对,其结果与形态学鉴定结果相同,应用CO I 序列对蝇类进行分类鉴定可行。

采用k2p+gamma 模型对16条CO I 核苷酸序列进行距离计算,矩阵结果见表3。

表3 COI序列距离矩阵(k2p+gamma)

Table 3 Kimura 2-parameter distance matrix, rates assumed to follow gamma distribution with shape parameter=0.5

蝇种	狭额腐蝇	横带花蝇	古铜黑蝇	丝光绿蝇	夏厕蝇	大头金蝇	绯脰纹蝇	家蝇	孕幼家蝇	棕尾别麻蝇	夏厕蝇	黑斑海花蝇	孕幼家蝇	市蝇	巨尾阿丽蝇	斜斑鼓额食蚜蝇
1 狭额腐蝇 <i>Muscina angustifrons</i>																
2 横带花蝇 <i>Anthomyia illocata</i>	0.125															
3 古铜黑蝇 <i>Ophyra aenescens</i>	0.131	0.123														
4 丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i>	0.118	0.099	0.100													
5 夏厕蝇 <i>Fannia canicularis</i>	0.114	0.118	0.116	0.109												
6 大头金蝇 <i>Chrysomya megacephala</i>	0.929	0.929	0.929	0.892	0.918											
7 绯脰纹蝇 <i>Graphomya rufitibia</i>	0.144	0.144	0.142	0.124	0.178	0.936										
8 家蝇 <i>Musca domestica</i>	0.150	0.127	0.102	0.120	0.138	0.904	0.152									
9 孕幼家蝇 <i>Musca larvipara</i>	0.120	0.133	0.104	0.107	0.123	0.898	0.144	0.085								
10 棕尾别麻蝇 <i>Boettcherisca peregrina</i>	0.136	0.125	0.149	0.100	0.142	0.990	0.155	0.151	0.144							
11 夏厕蝇 <i>Fannia canicularis</i>	0.113	0.116	0.114	0.111	0.002	0.913	0.176	0.136	0.122	0.144						
12 黑斑海花蝇 <i>Fucellia apicalis</i>	0.127	0.124	0.109	0.099	0.135	0.942	0.142	0.135	0.133	0.150	0.133					
13 孕幼家蝇 <i>Musca larvipara</i>	0.125	0.134	0.109	0.113	0.129	0.914	0.146	0.085	0.005	0.146	0.127	0.138				
14 市蝇 <i>Musca sorbens</i>	0.120	0.133	0.104	0.107	0.123	0.904	0.144	0.078	0.006	0.144	0.122	0.133	0.006			
15 巨尾阿丽蝇 <i>Aldrichina grahami</i>	0.120	0.093	0.100	0.071	0.129	0.921	0.124	0.136	0.120	0.120	0.127	0.104	0.122	0.120		
16 斜斑鼓额食蚜蝇 <i>Scaeva pyrastris</i>	0.168	0.166	0.151	0.140	0.138	1.002	0.180	0.186	0.159	0.174	0.140	0.164	0.164	0.161	0.170	

2.2 系统发育分析

2.2.1 ML法构建蝇类系统发育树 由图3可见,同为夏厕蝇的5、11号样品CO I 基因同源性高达99%;9、13号孕幼家蝇同源性为96%;孕幼家蝇与市蝇的基因同源性为83%;但其他蝇种之间的CO I 同源性均≤50%。

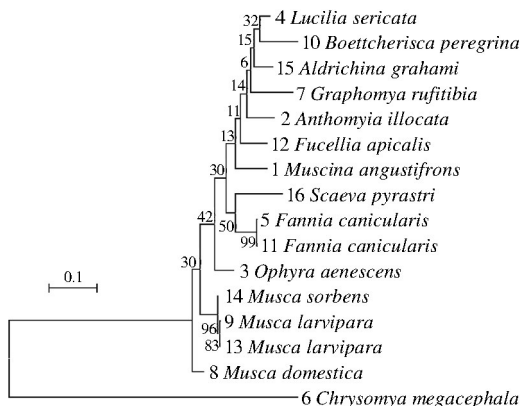


图3 应用CO I 数据通过ML法构建的蝇类严格一致树  
Figure 3 The strict consensus phylogenetic tree of CO I gene in flies constructed with ML method

2.2.2 NJ法构建蝇类系统发育树 与ML系统发育树类似,NJ法构建的蝇类严格一致树,2只夏厕蝇(5、11号)的同源性为97%,孕幼家蝇(9、13号)的同源性为88%,其他蝇种间的同源性<56%(图4)。

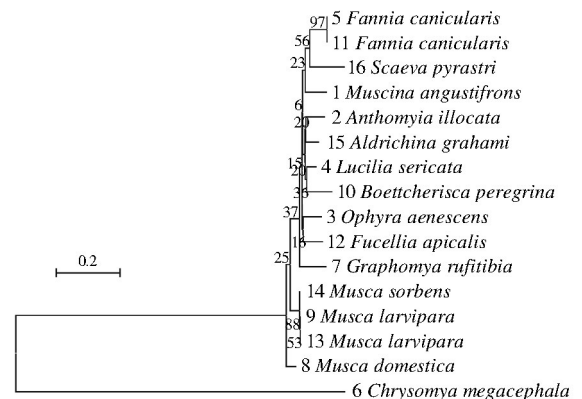


图4 应用CO I 数据通过NJ法构建的蝇类严格一致树  
Figure 4 The strict consensus phylogenetic tree of CO I gene in flies constructed with NJ method

2.2.3 MP法构建蝇类系统发育树 MP法构建的系统发育树与NJ树高度一致(图4、5)。



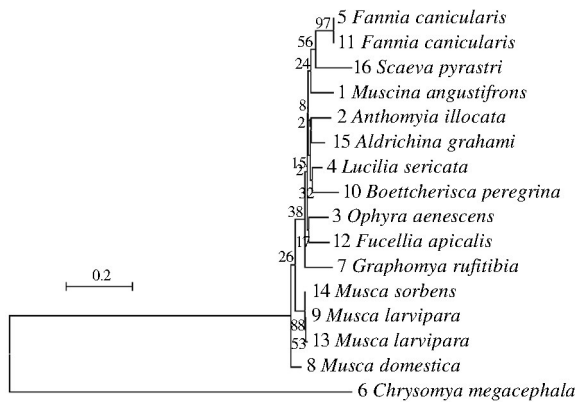


图5 应用CO I 数据通过MP法构建的蝇类严格一致树  
Figure 5 The strict consensus phylogenetic tree of CO I gene in flies constructed with MP method

综上所述,在应用CO I 序列对蝇种进行分类鉴定时,CO I 序列种内差异多在5%以内,而种间差异多在15%以外,种内差异远小于种间差异<sup>[5]</sup>。显然,CO I 序列可理想地将同种蝇类划分在一起。

### 3 讨论

形态学鉴定是最为直观的分类方法,它借助分类工作者的专业知识和记载形态学特征的论著直接得出结论。但目前对蝇类进行形态学分类存在局限,如:蝇类个体差异;蝇类存在隐存分类单元<sup>[6-7]</sup>,形态学鉴定方法受蝇类发育阶段的限制<sup>[8]</sup>,分类工作者经验是否丰富,蝇类形态是否完整等。

线粒体基因的变异速度大约是核基因变异速度的10倍。相比核基因,线粒体基因更合适于较低阶元的系统发育关系的建立,每个物种都有唯一的CO I 核苷酸序列,种内的遗传差异很小,而种间差异又足够大用以区分物种<sup>[8-9]</sup>。CO I 基因长度为648 bp(5'末端开始的58~705位)的片段区域被认为是DNA条形码编码理想区域。每种生物都具有独一无二的DNA条形码区域,该区域的碱基排序有 $4^{648}$ 种可能。因此对 $4^{648}$ 的识别完全可以用于对目前已知的1000万种生物的鉴定<sup>[3]</sup>。并且,CO I 基因本身存在很少的插入和缺失,同时拥有蛋白质编码基因的共同特征——密码子第3位碱基可以自由变异<sup>[2]</sup>,足以包括所有的物种,而且种间差异远超过种内差异<sup>[10]</sup>。目前,CO I 基因已用于多种动物及植物的分类研究,动物分类研究较植物更为成功,可成功对鱼类、鸟类、昆虫等进行分类<sup>[11-13]</sup>。研究显示,CO I 对研究亲缘关系不是很远的昆虫系统发育是十分适合的。

入境交通工具、货物中携带的媒介生物在运输途中不易保持形态的完整性。如出现解剖结构的缺失,将对形态学鉴定结果产生巨大影响,不同专家鉴定结

果之间有可能出现差异。本研究结果显示,以单只蝇的微量组织作为实验材料可有效扩增CO I 基因,是解剖结构缺失情况下进行分类鉴定的理想工具,准确性高<sup>[12]</sup>。传统的形态学鉴定对媒介生物形态的完整性要求高,非成虫期的高度相似性和有些特征在不同的发育时期不够稳定更增加了形态学鉴定的难度,不能保证其鉴定的准确性,有学者成功地将DNA条形码技术应用到媒介生物的非成虫期物种鉴定上<sup>[14-15]</sup>,如卵、幼虫、成虫的样本,不再需要长达数周的培养,再对成虫进行鉴定,大大缩短了检测周期。

本研究应用DNA条形码技术,建立了CO I 序列扩增程序,序列比对结果显示形态学鉴定结果与CO I 序列比对结果一致。而且,CO I 序列种内差异多在5%以内,而种间差异多在15%以外,种内差异明显小于种间差异。

应用DNA条形码技术进行分类鉴定的关键环节之一,即要对扩增到的序列提交到数据库进行比对。NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)GenBank数据库囊括的序列种类广泛,将需要比对的序列输入后能提供较多的类似序列。但也由于内容的广泛,导致某一领域的专业性,如CO I 序列高度类似的情况下,检索得到的蝇种却不一致。数据库中信息的正确有效性直接影响到比对结果是否准确。生命的DNA条形码数据库(BOLD, <http://barcodinglife.org/>)是权威的条形码数据库之一,是由加拿大Guelph大学构架和维护的,供研究人员下载、管理和分析DNA条形码数据,数据库不仅包括序列信息,还有完整的物种描述、标本图片、地理分布信息等<sup>[16-17]</sup>。基于BOLD以及相应的检测方法和技术,生命条形码联盟(CBOL, the Consortium for the Barcode of Life)成立,截止到2012年8月,BOLD共收录179万余条严格通过审核的序列信息,囊括了12余万物种,为全球物种鉴定工作提供了有力的数据支持。但相对于自然界庞大的物种群来说,由于数据库成立时间较短,加之从事条形码工作的科技工作者比较局限,数据库的内容还没有足够丰富以进行比对,数据库收录的物种CO I 序列仍相对较少。例如,BOLD数据库中关于家蝇科黑蝇属的条形码信息仅有5条(斑蹠黑蝇1条,厚环黑蝇3条, *Ophyra albuquerquei* 1条),仅记载黑蝇属3个蝇种,不足以用于比对工作,建立一个数据可靠,内容丰富的数据库是条形码工作的一个关键环节。因此,条形码数据库需要更多、更为严谨的条形码数据为分类鉴定学者提供比对依据。这就对分子鉴定工作者提出新的要求,即积极提供实验室科学、精准的实验结果,丰富数据库数据。

## 参考文献

- [1] 范滋德. 中国常见蝇类检索表[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1992:30-825.
- [2] 陆宝麟, 吴厚永. 中国重要医学昆虫分类与鉴别[M]. 2版. 郑州: 河南科学技术出版社, 2003:375-442.
- [3] Frezal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8 (5): 727-736.
- [4] Navajas M, Fournier D, Lagnel J, et al. Mitochondrial CO I sequences in mites: evidence for variations in base composition[J]. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(4):281-285.
- [5] 肖金花, 肖辉, 黄大卫. 生物分类学的新动向: DNA 条形码[J]. *动物学报*, 2004, 50(5):852-855.
- [6] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [7] Smith MA, Wood DM, Janzen DH, et al. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera: Tachinidae) are not all generalists [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12):4967-4972.
- [8] Ball SL, Hebert PDN. Biological identification of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. *J N Am Benthol Soc*, 2005, 24 (3):508-524.
- [9] Herbert PD, Ratnasingham S, de Warrd JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270 Suppl 1:S96-99.
- [10] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. *Trends Ecol Evol*, 2003, 18(2):70-74.
- [11] Smith PJ, McVeagh SM, Steinke D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products [J]. *J Fish Biol*, 2008, 72 (2):464-471.
- [12] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, et al. Identification of birds through DNA Barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10):e312.
- [13] Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies[J]. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(3):153-165.
- [14] 师永霞, 相大鹏, 李祖海, 等. 广东国境口岸不同蚊种 CO I 序列分析和分子鉴定方法[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2008, 31(2): 103-107.
- [15] 岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 等. 应用 DNA 条形码技术鉴定未知双翅目蝇[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2011, 34(5):343-347.
- [16] 莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景[J]. *四川动物*, 2008, 27(2):303-306.
- [17] Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(4): 544-548.

收稿日期:2014-05-15

(上接第426页)

样本均为基因 I 型 JEV, 由于未进行病毒的细胞培养及 E 基因序列的测定, 进一步的实验对于揭示 2009 年山西省 JEV 基因分型非常必要。近几年来, 全国多省包括东北<sup>[8]</sup>、华北<sup>[9]</sup>、华东<sup>[10-12]</sup>、华中<sup>[13]</sup>、西南<sup>[14]</sup>已在蚊虫中分离到基因 I 型 JEV, 山西省蚊虫中单独分离到基因 I 型 JEV 尚属首次, 仅限核酸水平检测, 能以细胞培养的方式分离到基因 I 型 JEV 是需要努力的方向。

志谢 太原师范大学张猛和李敏老师在核酸序列比对中给予指导和帮助, 特此志谢

## 参考文献

- [1] 高国顺, 高生华, 赵俊英, 等. 爱国卫生运动在蚊虫综合治理中的作用[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(5):489-491.
- [2] 代培芳, 赵俊英, 刘美德, 等. 蚊虫密度的气象影响因素分析[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2011, 22(6):547-549.
- [3] 代培芳, 赵俊英, 孔祥盛, 等. 山西省部分地区流行性乙型脑炎媒介蚊虫调查[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2010, 21(1): 51-53.
- [4] 方美玉, 林立辉, 刘建伟. 虫媒传染病[M]. 北京: 军事医学科学院, 2005:127-146.
- [5] 孙玉杰, 张海林. 中国流行性乙型脑炎病毒基因型及分布[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):436-439.
- [6] Wang LH, Fu SH, Wang HY, et al. Japanese encephalitis outbreak, Yuncheng, China, 2006 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (7): 1123-1124.
- [7] Zhang JS, Zhao QM, Guo XF, et al. Isolation and genetic characteristics of human genotype I Japanese encephalitis virus, China, 2009[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e16418.
- [8] 曹玉玺, 付士红, 张稷博, 等. 辽宁省部分地区 2008 年虫媒病毒分离鉴定[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(2):93-97.
- [9] 吴彤宇, 李力, 秦娜, 等. 天津市首次从淡色库蚊检测出基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23 (4):301-302, 323.
- [10] 贾慧丽, 李铭华, 付士红, 等. 2010 年安徽省蚊虫标本分离到基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):395-397.
- [11] 王环宇, 付士红, 何英, 等. 两种基因型流行性乙型脑炎在上海市共同流行[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5): 398-401.
- [12] 李铭华, 付士红, 姜红月, 等. 江西省流行性乙型脑炎病毒的分离与鉴定[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):388-390, 394.
- [13] 王环宇, 郝宗宇, 付士红, 等. 河南省唐河县分离到基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(2): 83-86.
- [14] 李铭华, 付士红, 冯云, 等. 贵州省不同地区 2008 年虫媒病毒调查[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):417-420.

收稿日期:2014-06-18