

DNA 条形码技术在陕西省鼠疫疫区宿主动物鉴定中的应用

安翠红 孙养信 陈宝宝 范锁平 霍丽霞 余建军 吕文

【摘要】 目的 探讨 DNA 条形码技术在鼠疫疫区宿主动物鉴定中的应用,并建立陕西省鼠疫疫区宿主动物 DNA 条形码数据库。方法 运用 DNA 条形码技术检测陕西省定边县鼠疫疫区 3 目 6 科 12 属 14 种 139 只宿主动物以及 7 个鼠种 8 个不同部位的 62 份残体标本线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因序列。结果 种内遗传距离 $\leq 2\%$, 种间遗传距离为 8.9% ~ 15.1%; 邻接法系统树能区分 14 个不同物种的类群; 采集的残体标本能检测到目的基因并用于鉴定; 研究中还纠正了既往定边县鼠疫疫区黄鼠命名。结论 DNA 条形码技术能弥补形态学鉴定的不足, 可用于鼠疫疫区宿主动物及残体标本的分类鉴定。

【关键词】 鼠疫疫区; DNA 条形码; 基因; 线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基; 鼠种鉴定; 残体鉴定

Identification on host animals for plague by DNA barcoding technology in Shaanxi province

An Cuihong, Sun Yangxin, Chen Baobao, Fan Suoping, Huo Lixia, She Jianjun, Lyu Wen. Department for Plague, Brucellosis and Etiologic Biological Vector Control, Shaanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China

Corresponding author: Sun Yangxin, Email: sxpco@126.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2012K16-12-03).

【Abstract】 Objective To apply the DNA barcoding technology for identification on host animal and to establish the host animal DNA bar code database on natural foci of plague in Shaanxi. **Methods** 139 host animals belonging to 3 orders, 6 families and 12 genera and 62 residues belonging to 7 species from 8 different parts of the province, were detected. DNA barcoding technology was used to analyze the DNA CO I gene sequence on the natural foci of plague in Dingbian county. **Results** The intra-specific genetic distance was less than 2% while the inter-specific distance ranged from 8.9% to 15.1%. Fourteen major clusters were apparently showed on a Neighbor-Joining tree. Residue samples could be detected regarding the objective gene. Alashan ground squirrel was previously noticed to carry 14 major clusters, which were previously mistakenly named as Citellus dauricus in Dingbian county. **Conclusion** DNA barcoding technology could overcome the shortcomings caused by the morphological identification so could be used to identify the host animal and residues in the natural focus of plague.

【Key words】 Plague area; DNA barcoding; Mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene; Species identification; Residues identification

陕西省鼠疫疫区位于该省西北部的定边县境内,处于鄂尔多斯高原荒漠草原长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)鼠疫自然疫源地的南部边缘地带,历次监测共发现啮齿动物 6 科 7 亚科 18 属 23 种,以长爪沙鼠为优势种,其他小型啮齿动物主要有子午沙鼠(*Meriones meridianus*)、黑线仓鼠(*Circetidae barabensis*)、小毛足鼠(*Phodopus roborovskii*)、三趾跳

鼠(*Dipus sagitta*)、五趾跳鼠(*Allactaga sibirica*)、小家鼠(*Mus musculus*)等。家栖鼠类有褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小家鼠等。疫源地内空间结构复杂多样,但性质稳固。目前在疫源地鼠疫宿主动物分类中仍存在分歧,如 2010 年监测中发现疑似东方田鼠(*Microtus fortis*),后经分子生物学鉴定,成为陕西省鼠疫疫源地首次发现^[1]。

DNA 条形码技术(DNA barcoding)^[2,3]是一种通过标准 DNA 片段快速、准确识别或鉴定物种的技术,目前在动物分类中最常用的基因序列是线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基(CO I)序列。该技术的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.09.016

基金项目:陕西省科学技术研究发展计划(2012K16-12-03)

作者单位:710054 西安,陕西省疾病预防控制中心鼠布生防科

通信作者:孙养信, Email: sxpco@126.com

优点在于物种鉴定无需依靠形态特征,对幼体、残体甚至生物痕迹同样能准确鉴定,发现形态上保守的“隐存种”(cryptic species)^[3]。此外该技术还能准确评估区域内物种遗传多样性^[4],并进行有效监测^[5],通过宿主动物的识别准确评估疫情性质^[6]。基于此本研究运用 DNA 条形码技术对陕西省定边县鼠疫疫区 3 目 6 科 6 亚科 12 属 14 种 139 只宿主动物及 62 份残体标本进行鉴定,建立陕西省鼠疫疫源地宿主动物 DNA 条形码数据库。

材料与方法

1. 材料:在定边县不同地理区域现场布点,捕鼠疫宿主动物获取肝脏及残体组织(表 1)。

2. 方法:

(1)基因组 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定:使用德国 Qiagen 公司生产 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒,提取肝脏及残体组织中的总 DNA,应用 Infinite 200 酶标仪 NanoQuant 测定其 DNA 含量,通过 PCR

扩增 CO I 基因,通用引物序列见表 2^[7]。反应体系:2 × Taq Mastermix 12.5 μl,上下游引物各 1 μl,模板 2 μl,补水至 25 μl。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析,若电泳图中出现目标带即送样进行双向测序。扩增时先选用 CO I 基因通用引物,如扩增反应失败时,选用鸡尾酒引物^[8],其中 LepF1_t1、VF1_t1、VF1d_t、VF1i_t1 的比例及 LepRI_t1、VR1d_t1、VR1_t1、VR1i_t1 的比例均为 1:1:1:3,引物序列见表 2。

(2)序列分析:用 Chromos 软件观察评价测序峰图质量,如果峰图质量差,不能准确判断碱基,则重新进行扩增和测序。将测定序列在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较。运用 Mega 5.0 软件比对各基因序列的碱基组成和变异,删除序列两端不能完全对齐的碱基。基于 Kimura-2-parameter(K2P)^[9]模型计算各物种的遗传距离;采用

表 1 陕西省定边县鼠疫疫源地采集宿主动物的肝脏及残体组织分布

鼠形动物	肝脏份数	残体部位及份数								
		合计	足部	肋骨	尾巴	皮毛	毛发	耳朵	肌肉	眼球
长爪沙鼠	34	23	6	2	5	4	3	2	-	1
黑线仓鼠	23	11	3	1	2	5	-	-	-	-
子午沙鼠	16	6	3	1	2	-	-	-	-	-
小毛足鼠	4	6	2	1	-	3	-	-	-	-
三趾跳鼠	11	11	1	2	3	4	-	-	1	-
五趾跳鼠	1	2	-	-	1	-	-	-	1	-
褐家鼠	2	3	-	1	1	1	-	-	-	-
黄鼠	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
达乌尔鼠兔	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小家鼠	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
东方田鼠	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
草兔	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
长尾仓鼠	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麝鼯	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
合计	139	62	15	8	14	17	3	2	2	1

表 2 扩增 CO I 基因的 PCR 引物序列

引物类型	引物名称	引物序列 (5' ~ 3')
CO I 基因通用引物	BatL5310	CCTACTCRGCCATTTACCTATG
	R6036R	ACTTCTGGGTGTCCAAGAATCA
鸡尾酒引物(上游)VF1LFt1	LepF1_t1	TGTAACACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
	VF1_t1	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAAGACATTGG
	VF1d_t	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG
	VF1i_t1	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG
鸡尾酒引物(下游)VR1LRt1	LepRI_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA
	VR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA
	VR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAAGAATCA
	VR1i_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCIAAIAICA

邻接法构建全部 CO I 基因序列的 NJ 系统树,对 NJ 树进行内部分支检验与 1 000 次 Bootstrap 检验分析,确定各支系的置信度^[10]。

结 果

1. CO I 基因序列分析:对陕西省定边县鼠疫疫区宿主动物 3 目 6 科 6 亚科 12 属 14 种 139 只鼠样本 CO I 基因进行序列分析,序列比对结果见表 3。发现同属各种间 CO I 序列的差异度为 8.9% ~ 15.1%,种内 CO I 序列差异度 ≤ 2%。139 份样本 CO I 基因序列的遗传距离见图 1。

表 3 陕西省定边县鼠疫疫源地宿主动物样品测序比对

鼠形动物	比对结果	
	GenBank 序列号	相似度(%)
长爪沙鼠	KF425526.1	99(727/732)
黑线仓鼠	DQ390542.2	94(701/747)
黄鼠	KC193090.1	92(603/653)
子午沙鼠	JX962286.1	99(651/653)
达乌尔鼠兔	JX962236.1	99(647/651)
三趾跳鼠	JX962297.1	99(642/650)
小家鼠	EF108345.1	99(740/744)
小毛足鼠	JX962163.1	99(651/653)
褐家鼠	DQ673916.1	99(740/746)
东方田鼠	JX962286.1	99(703/706)
草兔	GU937113.1	99(696/701)
五趾跳鼠	KC193065.1	98(646/657)
长尾仓鼠	JX962141.1	100(653/653)
麝鼯	-	-

注:-为无信息

2. 宿主动物 NJ 系统树构建:陕西省定边县鼠疫疫源地 3 目 6 科 6 亚科 12 属 14 种 139 只宿主动物分为 14 个不同的类群(图 2)。

3. 黄鼠 CO I 基因序列鉴定:在 CO I 基因序列

分析时,发现陕西省定边县黄鼠与宁夏地区黄鼠样品的相似度 > 98%,而与内蒙古地区黄鼠样品的相似度仅为 92% ~ 93%;运用 Mega 5.0 软件基于 Kimura-2-parameter (K2P)^[9]模型计算各样本的遗传距离,显示定边黄鼠与宁夏阿拉善黄鼠遗传距离 ≤ 1.8%,与内蒙古达乌尔黄鼠遗传距离为 8% ~ 9%。从 Mega 5.0 软件构建的黄鼠 NJ 系统树可见(图 3),采自宁夏、陕西定边、内蒙古地区的黄鼠样本形成 2 个高支持度的单一分支,陕西定边黄鼠样本与内蒙古达乌尔黄鼠样本分成 2 个独立分支,但与宁夏阿拉善黄鼠样本聚为一类。

讨 论

2002 年 Tautz 等^[11]将 DNA 序列用于生物分类。随后,加拿大动物学家 Hebert 等^[2]在鸟类研究中正式提出 DNA 条形码的概念,并对脊椎动物和无脊椎动物共 11 门 13 320 个物种的 CO I 基因序列比较分析,发现可以利用该基因一段长 648 bp 的片段的 DNA 碱基序列差异,进行物种的分类识别。除腔肠动物外,98%的物种种内的差异为 0 ~ 2%;种间差异平均为 11.3%。对于大部分动物群体而言,均可利用 CO I 基因序列作为识别条形码^[3]。

本研究对陕西省定边县鼠疫疫区 3 目 6 科 6 亚科 12 属 14 种 139 只宿主动物以及 7 个鼠种 8 个不同部位的 62 份残体标本 CO I 基因进行序列分析,发现种内遗传距离为 0 ~ 2%,种间遗传距离为 8.9% ~ 15.1%,种间遗传距离显著大于种内遗传距离;14 种宿主动物 NJ 系统树可区分 14 个不同的类群;采集的残体标本除剪断的毛发外,均能检测到目的基因。不仅肝脏,其他一些部位也可作为分类标本,准确识别宿主动物。

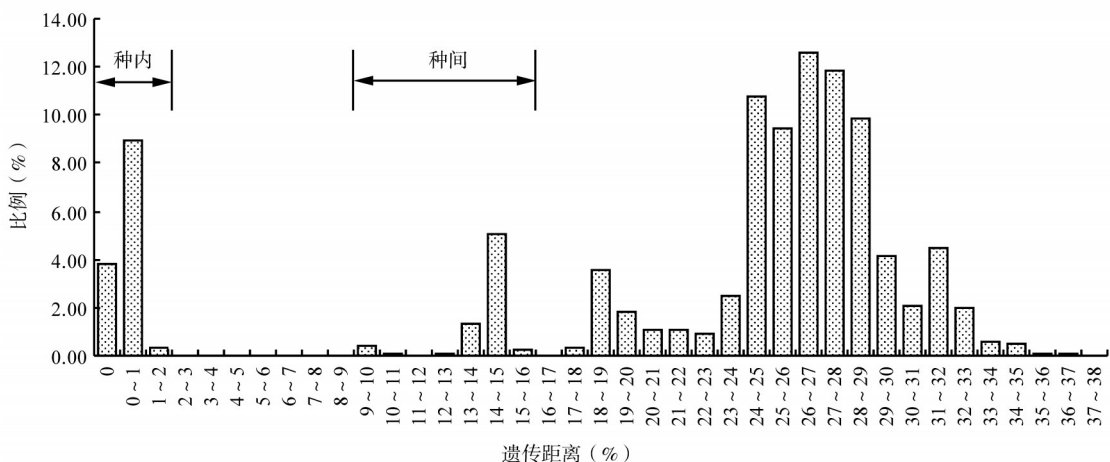


图 1 陕西省定边县鼠疫疫源地 139 份鼠形动物样本的遗传距离

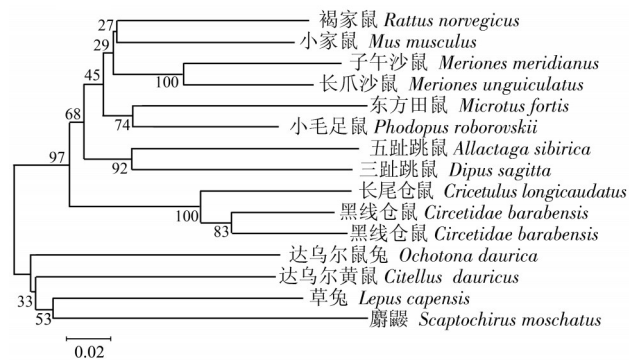


图 2 陕西省定边县鼠疫源地鼠形动物 NJ 系统树

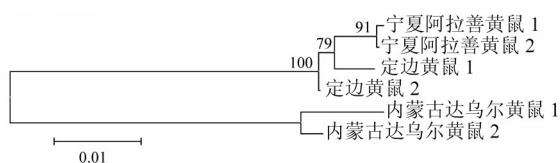


图 3 陕西定边黄鼠与宁夏阿拉善黄鼠、内蒙古达乌尔黄鼠的 NJ 聚类图

形态学分析是鉴定啮齿动物常用的基本方法。由于宁夏阿拉善黄鼠与内蒙古达乌尔黄鼠在形态学方面有较多相似,采用常规形态学方法难以区分鉴定。本研究经序列比对发现,陕西定边黄鼠与宁夏阿拉善黄鼠样品相似度 >98%,而与内蒙古达乌尔黄鼠样品的相似度仅为 92%~93%,因此将陕西省鼠疫疫区多年命名的达乌尔黄鼠更名为阿拉善黄鼠。

NJ 系统树分析显示所有个体形成 14 个高分化度的单一分支,但在黑线仓鼠物种分支内出现小支系,分支间个体的遗传距离为 8.9%~10.2%,本研究发现种间遗传距离为 8.9%~15.1%,说明黑线仓鼠可能存在隐存种,但还有待进一步论证。

Hebert 等^[2,3]曾分析 GenBank 中同属物种的 CO I 序列数据,发现同属不同种间 CO I 序列的平均差异度为 11.3%,种内差异度 <2%,且绝大部分 <1%。马英等^[12]在利用 DNA 条形码技术分析青海省海东地区小型兽类鉴定时发现,种内遗传距离 ≤3%,种间遗传距离为 5%~10%,说明 DNA 条形码数据积累的物种判断阈值可能会对物种多样性造成一定的误判,为此还应寻找更多的能够进行分类的基因片段。DNA 条形码技术可克服形态学鉴定的不足,用于鼠疫疫区宿主动物及残体标本的分类鉴定,

但现阶段由于数据库中缺乏足够的序列信息,故还需与经典分类结合使用。

参 考 文 献

- [1] An CH, Chen BB, Fan SP, et al. Identification of newly-recorded *Microtus fortis* species in the plaque foci of Shaanxi province [J]. Chin J Vector Biol Control, 2012, 23(4): 306-309. (in Chinese) 安翠红, 陈宝宝, 范锁平, 等. 陕西鼠疫自然疫源地新纪录鼠种的鉴定 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(4): 306-309.
- [2] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): 312.
- [3] Hebert PD, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270 Suppl 1: S96-99.
- [4] Smith MA, Fisher BL, Hebert PD. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1825-1834.
- [5] Hajibabaei M, Singer GA, Clare EL, et al. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring [J]. BMC Biol, 2007, 5: 24.
- [6] Alcaide M, Rico C, Ruiz S, et al. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals [J]. PLoS One, 2009, 4: e7092.
- [7] Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, et al. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7: 717-729.
- [8] Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7: 544-548.
- [9] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. J Mol Evol, 1980, 16(2): 111-120.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [11] Tautz D, Aretander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy [J]. Nature, 2002, 418: 479.
- [12] Ma Y, Li HL, Lu L. Application for identification of small mammals by DNA barcoding in Haidong area, Qinghai province, China [J]. Biodivers Sci, 2012, 20(2): 193-198. (in Chinese) 马英, 李海龙, 鲁亮. DNA 条形码技术在青海海东地区小型兽类鉴定中的应用 [J]. 生物多样性, 2012, 20(2): 193-198.

(收稿日期: 2014-02-21)

(本文编辑: 张林东)