

用 DNA 条形码技术鉴定阿拉善黄鼠 和达乌尔黄鼠

陈宝宝, 孙养信, 安翠红, 霍丽霞, 范锁平
陕西省疾病预防控制中心鼠布生防科, 西安 710054

摘要: **目的** 探索阿拉善黄鼠和达乌尔黄鼠的分类鉴定方法。**方法** 运用 DNA 条形码技术测定两地黄鼠的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因序列, 分析遗传距离, 构建系统发育 NJ 树。**结果** 11 份阿拉善黄鼠的种内遗传距离 < 2%, 4 份达乌尔黄鼠的种内遗传距离 < 1%, 两地黄鼠的遗传距离介于 8%~9% 之间, 同时, NJ 树将两地黄鼠分成 2 个独立分支。**结论** 阿拉善黄鼠为独立物种。DNA 条形码技术可用于黄鼠种类鉴定。

关键词: DNA 条形码; 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因; 鼠种鉴定; 阿拉善黄鼠; 达乌尔黄鼠

中图分类号: S443 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2014)05-0432-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.012

Identification of *Spermophilus alaschanicus* and *Spermophilus dauricus* by DNA barcoding

CHEN Bao-bao, SUN Yang-xin, AN Cui-hong, HUO Li-xia, FAN Suo-ping

Shaanxi Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Corresponding author: SUN Yang-xin, Email: sxpc@126.com

Supported by the Science and Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2012K16-12-03)

Abstract: Objective To investigate the classification and identification methods for *Spermophilus alaschanicus* and *S. dauricus*.

Methods DNA barcoding was used to determine the cytochrome c oxidase subunit I (CO I) gene sequences of *S. alaschanicus* and *S. dauricus*, analyze the genetic distance, and construct a neighbor-joining (NJ) tree. **Results** The intraspecific genetic distance of *S. alaschanicus* ($n=11$) was less than 2%, and that of *S. dauricus* ($n=4$) was less than 1%. The genetic distance between *S. alaschanicus* and *S. dauricus* ranged from 8% to 9%. Results of NJ tree showed that all the samples of the two species formed two independent groups with a high support value. **Conclusion** *Spermophilus alaschanicus* is an independent species. DNA barcoding can be used in the species identification of *Spermophilus*.

Key words: DNA barcoding; CO I gene; Identification; *Spermophilus alaschanicus*; *Spermophilus dauricus*

阿拉善黄鼠(*Spermophilus alaschanicus*)与达乌尔黄鼠(*S. dauricus*)形态特征相近,多年来国内外学者通过多种方法试图分类鉴定,有的坚持认为阿拉善黄鼠是独立种,有的将其归为达乌尔黄鼠的阿拉善亚种,长期以来形成对阿拉善黄鼠分类地位的争议^[1]。为了寻求 2 种黄鼠的鉴定方法,我们利用 DNA 条形码技术,对采自内蒙古自治区的达乌尔黄鼠和宁夏回族自治区的阿拉善黄鼠标本细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 部分序列进行测定,计算其遗传距离,构建系统发育树,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 阿拉善黄鼠采自我国阿拉善黄鼠鼠疫源地核心地区宁夏海原县海城镇,达乌尔黄鼠采自我国达乌尔黄鼠鼠疫源地核心地区内蒙古科右中旗巴彦忙哈苏木。

1.2 试剂 所有试剂购自西安沃尔森生物技术有限公司,引物合成及测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 DNA 模板的制备 现场采集样本用无水乙醇保存带回,剪取适量肝脏组织,加入 ATL 缓冲液和蛋白酶 K 后,56 °C 水浴 2~3 h,根据 DNA 提取试剂盒的提取步骤制备 DNA 模板,测定其 DNA 含量。

1.3.2 PCR 反应 PCR 反应过程中,用通用引物及鸡

基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(2012K16-12-03)

作者简介:陈宝宝,女,硕士,微生物检验技师,主要从事鼠疫、布鲁氏菌病及病媒生物实验研究,Email: cb92118019@163.com

通讯作者:孙养信,Email: sxpc@126.com

尾酒引物扩增(引物序列见表 1)时,只有个别样品出现条带但不清晰,经反复摸索,最终选用 2 次鸡尾酒引物 PCR 扩增的方法,将第 1 次鸡尾酒引物扩增的产物为模板,进行二次 PCR,25 μl PCR 反应体系包括:2×Taq Mastermix 12.5 μl,上下游引物各 1 μl,模板 2 μl。扩增条件: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。2 次 PCR 反应体系及扩增条件相同。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条带即送样进行双向测序,测序引物为 F: TCA ACA ATC ACA AAG ATA TTG G;R: TCT GGG TGT CCA AAG AAT CA。如果实验中样品出现非特异性条带,则重新进行 PCR 扩增。

表 1 扩增 CO I 基因的 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences used to amplify CO I gene

引物名称	引物序列(5'~3')	引物间比例
BatL5310	CCTACTCRGCCATTTTACCTATG	1
R6036R	ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA	1
VF1LFt1		
LepF1_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	1
VF1_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAGACATTGG	1
VF1d_t	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	1
VF1i_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG	3
VR1LRt1		
LepRI_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	1
VR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA	1
VR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	1
VR1i_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCIAAIAICA	3

1.3.3 DNA 序列分析 首先用 Chromos 软件观察测序峰图质量,如果峰图质量很差如双峰等不能准确判断碱基,则重新进行扩增和测序。运用 Mega 5.0 软件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) (Kimura, 1980) 模型计算各物种的遗传距离;采用邻接法构建全部 CO I 基因序列的 NJ 系统树,对 NJ 树进行内部分支检验与 1000 次 Bootstrap 检验分析,来确定各支系的置信度。

2 结果

2.1 目的基因的获得 选用鸡尾酒引物 2 次 PCR 扩增的方法,11 份阿拉善黄鼠、4 份达乌尔黄鼠样本全部获得 CO I 基因序列片段(序列长度约 680~750 bp)。

2.2 CO I 基因序列分析 通过对两地黄鼠获得的 CO I 基因序列进行分析,相似度仅为 92%~93%。运用 Mega 5.0 软件基于 Kimura-2-parameter (K2P) (Kimura, 1980) 模型计算各样本的遗传距离,结果显示(图 1),11 份阿拉善黄鼠的种内遗传距离 < 2%,4 份达乌尔黄鼠的种内遗传距离 < 1%,两地黄鼠的遗传距离介于 8%~9% 之间。

2.3 构建系统发育树 应用 Mega 5.0 软件构建的 NJ 系统树见图 2,从图中可以看出,两地黄鼠样本分成 2 个独立分支,支持阿拉善黄鼠为独立种。

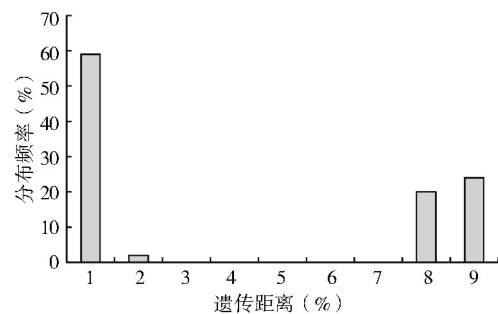


图 1 两地黄鼠样本 CO I 基因部分序列遗传距离差异分析
Figure 1 Analysis of genetic distance based on partial CO I gene sequences of *S. alaschanicus* and *S. dauricus* samples

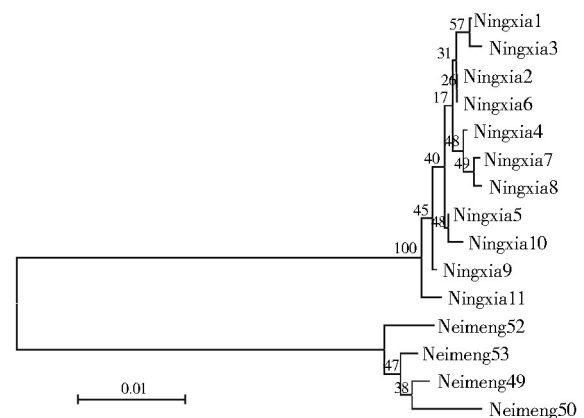


图 2 两地黄鼠样本的 NJ 系统树
Figure 2 An NJ phylogenetic tree of *S. alaschanicus* and *S. dauricus* samples

3 讨论

关于阿拉善黄鼠的分类和鉴定一直存在争议,国内许多专家采用多种方法进行鉴定。郑涛和王香亭^[2]从形态特征和生态学进行分析,因他们在形态上有明显差异,坚持阿拉善黄鼠为独立种。赵天飙等^[3]通过黄鼠骨骼形态的模糊聚类分析认为阿拉善黄鼠为达乌尔黄鼠的阿拉善亚种;秦长育和李克昌^[4]对宁夏黄鼠与吉林达乌尔黄鼠进行形态学和生态学比较,也认为宁夏黄鼠为达乌尔黄鼠的阿拉善亚种。付和平等^[5]对阿拉善黄鼠模式产地——内蒙古南部典型荒漠区的样本做了研究,发现不仅其形态特征与达乌尔黄鼠有显著不同,而且其染色体数也是 $2n=38$, 确认阿拉善黄鼠为独立种;而研究中样本染色体数为 $2n=36$ 的种群都是达乌尔黄鼠。

形态学和生态学方法是鉴定啮齿动物的常用基本方法,但由于阿拉善黄鼠和达乌尔黄鼠在形态学和生态学方面有较多相似和交叉之处,常用的鉴定手段难以区分。染色体核型分析法是目前区分 2 种黄鼠的有力依据,但近年来我国也有人(马继霞等, 1985;晁玉庆等, 1994;郑涛等, 1988)研究分析发现内蒙古各地与甘肃省黄鼠的染色体数均为 $2n=36$, 认为他们都是达乌尔黄鼠^[1], 说明该法用于 2 种黄鼠的鉴定还存在不确定性。

DNA 条形码是利用短的标准 DNA 序列来鉴定物种的一种行之有效的方法,因其片段小且易于获得而被广泛应用于多个物种的种类鉴定工作中。线粒体 DNA 以母系遗传为主,基因重组率低,进化速率快,是进行遗传进化和种群分类研究的良好材料。目前,动物界物种鉴定普遍选用线粒体 CO I 基因作为条形码^[6-8]。Hebert 等^[9]对 GenBank 中同一个属的物种 CO I 序列数据进行研究,结果表明种内的 CO I 序列差异程度 $<2\%$, 绝大部分 $<1\%$ 。马英等^[10]对青海省

海东地区小型兽类 110 只样本的 CO I 基因进行序列分析,发现种内遗传距离 $\leq 3\%$, 种间遗传距离为 $5\% \sim 10\%$, 属间遗传距离为 $12\% \sim 19\%$, 科间遗传距离 $> 20\%$ 。本研究中,两地黄鼠的遗传距离介于 $8\% \sim 9\%$ 之间,由此说明所测定的两地黄鼠为不同种,阿拉善黄鼠为独立种。DNA 条形码技术用于 2 种黄鼠的鉴别,相对操作简便,结果稳定可靠,不失为目前 2 种黄鼠分类鉴定的简便方法。

本研究建立了 2 种黄鼠的 DNA 条形码数据,为今后 2 种黄鼠分类鉴定提供了基础依据。

参考文献

- [1] 郑智民,姜志宽,陈安国. 啮齿动物学 [M]. 2 版. 上海:上海交通大学出版社, 2012:35-142.
- [2] 郑涛,王香亭. 甘肃及其附近地区黄鼠分类位置的研究[J]. 兰州大学学报:自然科学版, 1988, 25(2):124-128.
- [3] 赵天飙,李新民,段全红,等. 4 种黄鼠骨骼形态的模糊聚类分析[J]. 内蒙古地方病防治研究, 1994, 19(2):67-68.
- [4] 秦长育,李克昌. 宁夏啮齿动物与防制[M]. 银川:宁夏人民出版社, 2003:99-103.
- [5] 付和平,武晓东,张福顺,等. 阿拉善黄鼠模式产地标本染色体核型[J]. 动物学杂志, 2009, 44(6):31-35.
- [6] 常子丽,刘芳,王建军,等. DNA 条形码鉴别内蒙古地区啮齿动物[J]. 生物技术通报, 2013(8): 94-97.
- [7] 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.
- [8] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. Nature, 2005, 435(7038):17.
- [9] Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard 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] 马英,李海龙,鲁亮,等. 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:2014-04-25