

DNA 条形码技术在河北省鼠疫疫源地鼠种鉴定中的应用

闫东¹, 鲁亮², 金圣浩¹, 史献明¹, 崔耀仁¹, 刘冠纯¹, 李玉伟², 刘起勇²,
郑楠¹, 康东梅¹, 白雪薇¹, 牛艳芬¹, 陈永明¹, 周松¹, 兰晓宇¹, 李振海¹

1 河北省鼠疫防治所流行病学科, 河北 张家口 075000;

2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室

摘要: **目的** 以河北省鼠疫疫源地常见鼠为对象, 探讨 DNA 条形码技术在鼠类鉴定方面的可行性。 **方法** 2012 年在河北省鼠疫疫源地内采集鼠肝脏标本, 并保存整只鼠, 制作剥制标本, 提取基因组 DNA, 用通用引物 PCR 法扩增线粒体 CO I 基因, 并测序。将测序结果与 GenBank 中其他鼠类物种的 DNA 条形码进行 BLAST 比对, 并构建分子进化树。 **结果** 87 份样本均能通过 PCR 扩增出特异性 CO I 基因条带, 其中 85 份样本所构建的分子进化树结果与形态学鉴定结果一致, 2 份样本结果有差异, 经反复鉴定头骨及形态标本, 发现为现场鉴定错误。 **结论** DNA 条形码技术能够对鼠类进行有效的物种鉴定, 同时还可以探讨啮齿动物属、种分类单元的系统发育问题。

关键词: 鼠疫疫源地; DNA 条形码; CO I 基因

中图分类号: S443 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)01-0021-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.01.006

Application of DNA barcoding technique in identification of rodent species in natural focus of plague in Hebei province, China

YAN Dong¹, LU Liang², JIN Sheng-hao¹, SHI Xian-ming¹, CUI Yao-ren¹, LIU Guan-chun¹, LI Yu-wei²,
LIU Qi-yong², ZHENG Nan¹, KANG Dong-mei¹, BAI Xue-wei¹, NIU Yan-fen¹,
CHEN Yong-ming¹, ZHOU Song¹, LAN Xiao-yu¹, LI Zhen-hai¹

1 Institute of Plague Prevention and Control of Hebei Province, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China;

2 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Supported by the Special Research Program for Health (No. 201202021) and Hebei Provincial Medical Science Research Foundation (No. 20110267)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of DNA barcoding in identifying the rodent species based on the common rodents in the natural focus of plague in Hebei province, China. **Methods** The rodent liver specimens were collected in the natural focus of plague in Hebei in 2012; the whole rodents were conserved, and then the stuffed specimens were made; genomic DNA was extracted from the rodent liver. The mitochondrial CO I gene was amplified by consensus primer PCR and then sequenced. BLAST comparison was made between the sequencing results and the DNA bar codes of other rodent species in GenBank, and molecular evolutionary tree was constructed. **Results** In this research, specific CO I gene bands were obtained by PCR amplification in all 87 samples. Among all samples, 85 had the molecular evolutionary tree in accordance with the results of morphological identification, and 2 had different results, but the field identification was found to be incorrect by identifying the skulls and morphological specimens repeatedly. **Conclusion** DNA barcoding technique can be used to effectively identify the rodent species. At the same time, it can also be used for discussing the phylogenetic relationship of rodent genus and species classification.

Key words: Plague natural focus; DNA barcoding; CO I gene

河北省鼠疫自然疫源地位于河北省西北部冀蒙边界的康保县, 疫源面积约 1000 km², 是松辽平原达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 鼠疫自然疫源地与内蒙古高原长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*) 鼠疫自然疫源地的交错地带^[1]。植被以碱草、针茅、冷蒿、小叶锦鸡儿、羊

草为主。啮齿动物种类繁多^[2], 长爪沙鼠和达乌尔黄鼠作为主要宿主动物, 能够维持鼠疫菌在自然界中长期保存和决定动物间鼠疫的流行。其他鼠种常作为鼠疫自然疫源地的次要宿主或偶然宿主参与动物鼠疫的流行。

长期以来, 对于鼠类的鉴定一直依靠传统的形态学鉴定方法, 鉴定人员仅从检索表中所标明的种类特征进行鉴别, 没有可测量的定量指标进行鉴定。此外, 形态学鉴定还受到标本完整性、不同发育阶段以及个

基金项目: 卫生行业科研专项(201202021); 河北省医学科学研究重点课题(20110267)

作者简介: 闫东, 男, 主管医师, 从事鼠疫流行病学研究工作。

Email: yandong0000@126.com

人对检索表所描述特征理解的差异等诸多因素的限制,易造成人为错误,影响鉴定结果。与此同时,由于宿主动物分类鉴定等基础性研究投入少,短期内无法获得较大进展等因素,使得分类学家队伍不断缩减,使分类学的发展面临巨大的挑战,急需一种快捷方便的物种鉴定方法作为形态学鉴定方法的补充。

DNA 条形码技术是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析而对物种快速鉴定的技术^[3-4]。该技术具有操作简便,准确,高度的可重复性,使用方便,不受鉴定经验的限制等特点,对于非成熟期、形态特征

破损或缺损标本,濒危珍稀动物的无创伤鉴别以及区分近缘种和隐存种等都具备绝对优势。其中线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基(CO I)最适合于作为目标基因,用于动物分类鉴定中^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料 选取河北省鼠疫疫源地鼠疫宿主动物鼠类作为研究对象,分别取黄豆粒大小肝脏或肌肉保存于无水乙醇中,编号并同时保存整只鼠体。本研究使用的实验样本信息见表 1。

表 1 实验样本信息
Table 1 Information of experimental samples

鼠种	数量(只)	采集地	现场编号	现场鉴定结果
长爪沙鼠	36	康保牧场 照阳河镇	HBK004、HBK005、HBK008、HBK009、HBK010、HBK014、 HBK015、HBK016、HBK019、HBK101、HBK102、HBK105~ HBK110、HBK112、HBK114~HBK131	长爪沙鼠(<i>Meriones unguiculatus</i>)
子午沙鼠	4	康保牧场	HBK025、HBK026、HBK038、HBK039	子午沙鼠(<i>Meriones meridianus</i>)
达乌尔黄鼠	16	照阳河镇	HBK133、HBK135~HBK139、HBK141、HBK142、HBK161、 HBK163、HBK165、HBK167、HBK170、HBK173、HBK174、 HBK175	达乌尔黄鼠(<i>Spermophilus dauricus</i>)
黑线仓鼠	8	康保牧场	HBK003、HBK006、HBK007、HBK018、HBK027、HBK030、 HBK031、HBK032	黑线仓鼠(<i>Cricetulus barabensis</i>)
黑线毛足鼠	3	康保牧场	HBK017、HBK024、HBK033	黑线毛足鼠(<i>Phodopus sungorus</i>)
黑线毛足鼠 (经 DNA 修正)	2	康保牧场	HBK002、HBK012	小毛足鼠(<i>Phodopus roborovskii</i>)
小毛足鼠	9	康保牧场	HBK001、HBK011、HBK013、HBK020、HBK021、HBK022、 HBK023、HBK028、HBK029	小毛足鼠(<i>Phodopus roborovskii</i>)
小家鼠	5	康保牧场	HBK036、HBK040、HBK041、HBK042、HBK043	小家鼠(<i>Mus musculus</i>)
褐家鼠	1	康保牧场	HBK045	褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)
五趾跳鼠	2	康保牧场	HBK035、HBK037	五趾跳鼠(<i>Allactaga sibirica</i>)
草原鼯鼠	1	康保牧场	HBK044	草原鼯鼠(<i>Myospalax aspalax</i>)

1.2 试剂 基因组提取试剂盒购自 Qiagen 公司; dNTPs、LA Taq DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程公司;通用引物为 BatL 5310(5'-CCT ACT CRG CCA TTT TAC CTA TG -3')和 R6036R(5'-ATC TCT GGG TGT CCA AAG AAT CA -3');引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 模板 DNA 提取 使用 Qiagen 试剂盒提取肝脏或肌肉 DNA,4 ℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增与测序 PCR 反应扩增体系:10×缓冲液 2.5 μl, dNTP 0.5 μl, 引物各 0.5 μl, LA Taq DNA 聚合酶 0.15 μl, 模板 DNA 1 μl, ddH₂O 19.85 μl。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 45 s, 54 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,送测序公司进行双向测序。

1.3.3 形态学鉴定^[6] 制作剥制标本,观察外部和头骨形态,并测量相关数据,通过检索表鉴定。

2 结果

2.1 CO I 基因扩增 87 份样本利用通用引物全部成

功扩增出 700~800 bp 的片段,与目标片段(CO I 基因片段)的长度相符,经过双向测序进一步确认。

2.2 同源性比对 将测序获得的序列与 GenBank 中其他鼠类物种的 DNA 条形码进行 BLAST 比对,采集的子午沙鼠 CO I 序列与已知子午沙鼠(KC193081)同源性为 98%;采集的黑线毛足鼠 CO I 序列与已知黑线毛足鼠(JF444392)同源性为 97%;采集的五趾跳鼠 CO I 序列与已知五趾跳鼠(JF499181)同源性为 98%;采集的小家鼠 CO I 序列与已知小家鼠(AB444046)同源性为 97%;采集的达乌尔黄鼠 CO I 序列与已知达乌尔黄鼠(KC193086)同源性为 99%,采集的黑线仓鼠 CO I 序列与灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)(DQ390542,线粒体全基因组)同源性为 98%,与 EF568687(灰仓鼠)同源性为 90%;采集的长爪沙鼠与 KC193081(子午沙鼠)同源性最高为 88%;采集的小毛足鼠与 JF444392(黑线毛足鼠)同源性最高为 87%;采集的草原鼯鼠与 JF444253[东北鼯鼠(*Myospalax psilurus*)]同源性最高为 93%。

2.3 样本的分子进化树 利用 Mega 5.0 软件分析不同个体间的遗传距离,各鼠种内遗传距离分别为长爪沙鼠 0~0.005%,子午沙鼠 0~0.009%,达乌尔黄鼠

0~0.002%, 黑线仓鼠 0~0.005%, 黑线毛足鼠 0~0.020%, 小毛足鼠 0~0.004%, 小家鼠 0~0.004%。同时应用邻接法 (Neighbor-jointing, NJ) 构建分子进化树, 自检值设为 1000 次 (图 1)。

3 讨论

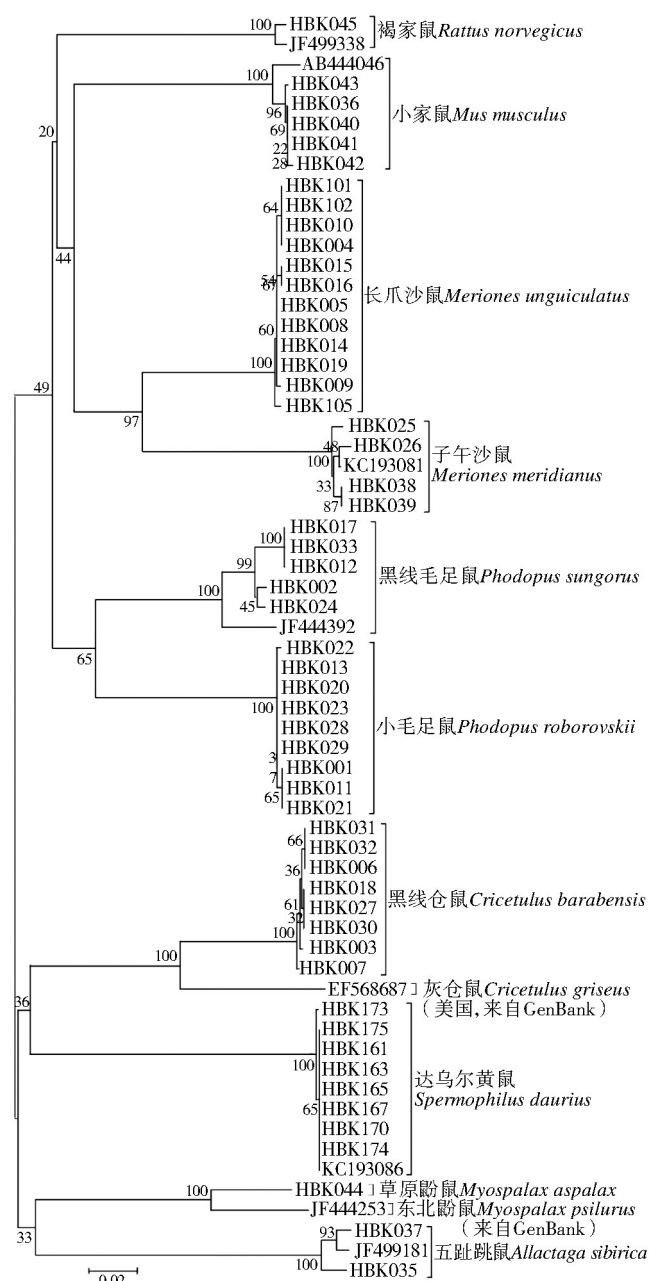
根据构建的分子进化树与形态鉴定对比, 87 份样本中所构建的分子进化树结果, 其中 85 份与形态学鉴定结果一致, 2 份样本结果有差异。HBK002、HBK012 用传统形态学鉴定为小毛足鼠, 而分子进化树中, 与黑线毛足鼠聚集在一个分支。提示形态学鉴定可能有误, 经反复比对形态标本、头骨, 鉴定为黑线毛足鼠亚成体, 更正形态学鉴定。从进化树可见, 同一种鼠能够聚集到一个分支, 不同的种也能完全按分支分开, 同一属的鼠种均能聚集在一个分支里, 这也充分说明 DNA 条形码 CO I 基因能够用于鼠类的分类鉴定, 特别是在材料不完整和未成年鼠种鉴定中有绝对优势。但在进化树中分科时分支相对混乱, 置信度也较低, 进化关系不明朗, 仍存在不足。

DNA 条形码具有操作简便, 快速, 准确, 具有高度的可重复性; 使用方便, 不受鉴定经验的限制等优势。不仅是传统形态学鉴定方法的强有力补充, 而且它采用数字化形式, 使样本鉴定过程能够实现自动化和标准化^[7], 突破了对经验的过度依赖, 并可利用少许动物残片对动物种类进行快速有效的鉴定。它将对自然疫源性疾病的防治、保护生物学、生物多样性研究的发展起到积极作用。

目前, DNA 条形码已应用于灵长类、啮齿类、禽类、鱼类、昆虫类、肠道细菌属、寄生虫、食肉动物、人类等^[5,8-12]。但该项技术发展时间较短, 许多种类的 DNA 条形码尚未出现在相关数据库中。因此, 加强 DNA 条形码技术的研究, 完善 DNA 条形码数据库, 为以后的科研和工作提供帮助, 还需要世界各地的科研工作者共同努力。

参考文献

- [1] 李玉贵, 孔祥骊, 李振海, 等. 河北省康保鼠疫自然疫源地动物流行病学调查分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1992, 3(2): 95-98.
- [2] 刘满福, 刘合智, 张彩虹. 河北省鼠疫自然疫源地内啮齿动物种类及其分布的调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002, 13(4): 260-262
- [3] Witt JDS, Therloff DL, Hebert PDN. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation [J]. Mol Ecol, 2006, 15 (10) : 3073-3082.
- [4] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Royal Soci London, Series B, Bio Sci, 2003, 270 Suppl 1: S96-99.
- [5] 马英. DNA 条形码技术在青海省小型兽类及寄生蚤鉴定中的应用研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010.
- [6] 郑智民, 姜志宽, 陈安国. 啮齿动物学[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2008: 57-74.
- [7] 程佳月, 王丽华, 彭克美, 等. 国际生命条形码计划: DNA Barcoding[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(8): 49-53.
- [8] 孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的亚东蛙 DNA



注: KC193081(子午沙鼠, 中国内蒙古)、AB444046(小家鼠, 日本)、JF499338(褐家鼠, 俄罗斯)、JF444392(黑线毛足鼠, 加拿大)、JF499181(五趾跳鼠, 俄罗斯)、JF444253(东北鼯鼠, 中国)、KC193086(达乌尔黄鼠, 中国内蒙古)、EF568687(灰仓鼠, 美国)为 GenBank 中所获得的已知鼠种。其余编号为河北省鼠疫疫源地内采集的样本。由于篇幅原因, 长爪沙鼠和达乌尔黄鼠只选择有代表性的一部分构建分子进化树。

图 1 基于 CO I 序列构建的邻接树
Figure 1 Neighbor-jointing tree based on CO I gene sequences

- [9] 陈春生, 张晓龙, 张雪莲, 等. 基于 CO I 基因序列的 DNA 条形码在中尼边境鼠类物种鉴定中的应用[J]. 西南国防医药, 2012, 22(1): 22-24.
- [10] 马英, 鲁亮. DNA 条形码技术研究新进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(3): 275-280.
- [11] Nolan DV, Dallas JF, Mordue Luntz AJ. Molecular taxonomy and population structure of a *Culicoides* midge vector [J]. Vet Ital, 2004, 40(3): 352-359.
- [12] 吴薇. DNA 条形码技术在医学媒介生物鉴定中的应用前景展望[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33(1): 22-24.