

DNA 条形码技术在麻蝇亚科鉴定中的应用

方义亮¹, 张建庆¹, 肖武¹, 高博¹, 房长天¹, 卞玘璠², 徐保海³

摘要:目的 建立麻蝇亚科种类鉴定的DNA条形码技术,以期解决麻蝇亚科雌性个体无法通过形态鉴定的问题。**方法** 通过对福建口岸截获的黑尾黑麻蝇、黄须亚麻蝇、褐须亚麻蝇、棕尾别麻蝇、酱亚麻蝇等标本进行PCR扩增和序列测定,与BOLD上下载的88条麻蝇亚科蝇种序列进行比对,计算遗传距离、构建系统进化树。**结果** 5份样本扩增获得COI的长度为658 bp,在线BLAST比对结果显示相似度99%以上,遗传距离计算结果显示种内差异0~0.0154,种间差异0.0249~0.1538,系统进化树显示麻蝇亚科同种能聚在一起,Bootstrap值为1000。**结论** DNA条形码技术可以作为麻蝇亚科蝇种鉴定在形态学鉴定之外的重要方法补充。

关键词:DNA条形码; COI; 蝇类鉴定

中图分类号:R384.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)06-0569-05

Sarcophaginae identification by DNA-barcoding

FANG Yi-liang¹, ZHANG Jian-qing¹, XIAO Wu¹, GAO Bo¹, FANG Chang-tian¹, BIAN Qi-fan², XU Bao-hai³

(1. Fujian International Travel Healthcare Center, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;

3. Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

Abstract: In this study, we aimed to establish method for identifying Sarcophaginae by DNA-barcoding and to solve the problem that Sarcophaginae female species could not be identified by morphology. We amplified and analyzed the sequences of these samples in Fujian frontier such as *Helicophaegella melanura*, *Parasarcophaga misera*, *Parasarcophaga sericea*, *Boettcherisca peregrine*, *Parasarcophaga brevicornis*, *Parasarcophaga dux*, *Parasarcophaga similis*, *Parasarcophaga albiceps*, *Parasarcophaga Pingi*, and *Seniorwhitea reciproca*. Secondly, we aligned these sequences with 88 Sarcophaginae species loaded from BOLD. Thirdly, we estimated the genetic distances and built system evolutionary tree. The result of amplification with 5 samples showed that length of the obtained COI sequences were 658 bp. And the result of alignment on BOLD line showed that index of similarity of the same species was above 99%. The result of calculation genetic distances showed that intraspecific difference was 0~0.0154 and interspecific difference was 0.0249~0.1538. Phylogenetic tree showed that the same Sarcophaginae species stayed together on value of Bootstrap 1000. It came to a conclusion that DNA-barcoding can be the important method to supplement of morphologically identifying Sarcophaginae.

Keywords: DNA-barcoding; COI; identifying flies

Supported by the Science and Technology Plan of Fujian Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P. R. C (No. FK2012-12)

麻蝇科是国境口岸医学蝇类监测的重要部分,种类繁多,全世界已知共有2500余种,在我国也有312种^[1](2003年)。麻蝇亚科系我国麻蝇科中最重要的亚科,种类也最多,与人类关系密切。麻蝇亚科

的外部共同特征有:后足基节在上部后表面有细的柔毛群,有时这些毛很少是短毛或裸;腹部底色黑,无界限分明的斑,而具黑白方块相间的斑纹,即棋盘状斑。麻蝇亚科多数种类形态比较接近,形态鉴定主要依据雄虫尾器,而雌虫鉴定比较困难,另外若截获的标本残缺不全,形态鉴定便无法进行。DNA条形码技术(DNA Barcoding)是利用目的DNA片段序列区分生物物种的一种全新方法,近几年得到了

福建检验检疫局科技计划项目基金(No. FK2012-12)

作者单位:1. 福建国际旅行卫生保健中心,福州 350001;
2. 福建医科大学公共卫生学院,福州 350001;
3. 福建省疾病预防控制中心,福州 350001
Email: anew627@163.com

快速的发展,因其能不受发育状态、性别、形态完整性影响,在昆虫鉴定方面得到广泛的应用^[2],本文通过DNA条形码技术对福建口岸常见的麻蝇亚科蝇种进行鉴定,以期在国境口岸医学媒介生物鉴定中,作为形态学鉴定之外的重要方法补充。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实物样本来源 ①黑尾黑麻蝇(*Helicophagella melanura*)②黄须亚麻蝇(*Parasarcophaga misera*)③褐须亚麻蝇(*Parasarcophaga sericea*)④

棕尾别麻蝇(*Boettcherisca peregrina*)⑤酱亚麻蝇(*Parasarcophaga dux*)均由福建口岸采集或者截获标本。

1.1.2 虚拟样本来源 虚拟样本来自 BOLD 数据库(<http://boldsystems.org/>),检索关键词 Sarcophaginae(麻蝇亚科),以引物与本研究相同为条件,经筛选共得 37 个蝇种 88 条记录,详细见表 1。

1.1.3 主要试剂和引物 昆虫基因组提取试剂盒,ExTaq,25 mmol/L MgCl₂、10×buffer、2.5 mmol/L dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物,见表 2。

表 1 BOLD 检索数据汇总表

Tab. 1 Data retrieved from BOLD summary table

序号 Number	种名 Species	BOLD 登记号 BOLD accession no.	数量 Count
1	<i>Oxysarcodexia varia</i>	AUSFF101-11, AUSFF102-11, AUSFF104-11	3
2	<i>Sarcophaga africa</i>	AUSFF146-11, AUSFF136-11, AUSFF139-11	3
3	<i>Sarcophaga alcicornis</i>	AUSFF170-11, AUSFF171-11, AUSFF174-11	3
4	<i>Sarcophaga alpha</i>	AUSFF321-11, AUSFF320-11	2
5	<i>Sarcophaga argyrostoma</i>	GBDP12440-12, GBDP12443-12, GBDP12442-12	3
6	<i>Sarcophaga aurifrons</i>	AUSFF225-11, AUSFF224-11, AUSFF222-11	3
7	<i>Sarcophaga australis</i>	AUSFF108-11, AUSFF131-11, AUSFF116-11	3
8	<i>Sarcophaga bancroftorum</i>	AUSFF150-11, AUSFF151-11	2
9	<i>Sarcophaga bidentata</i>	AUSFF327-11, AUSFF340-11, AUSFF337-11	3
10	<i>Sarcophaga bifrons</i>	AUSFF348-11	1
11	<i>Sarcophaga carnaria</i>	GBDP12444-12	1
12	<i>Sarcophaga crassipalpis</i>	AUSFF197-11, AUSFF206-11, AUSFF203-11	3
13	<i>Sarcophaga cyrtophorae</i>	AUSFF134-11, AUSFF135-11	2
14	<i>Sarcophaga dux</i>	AUSFF229-11, AUSFF228-11, AUSFF235-11	3
15	<i>Sarcophaga froggatti</i>	AUSFF366-11, AUSFF359-11, AUSFF373-11	3
16	<i>Sarcophaga hardyi</i>	AUSFF375-11	1
17	<i>Sarcophaga impatiens</i>	AUSFF387-11, AUSFF393-11, AUSFF401-11	3
18	<i>Sarcophaga iota</i>	AUSFF537-11, AUSFF529-11, AUSFF552-11	3
19	<i>Sarcophaga kappa</i>	AUSFF166-11, AUSFF156-11, AUSFF155-11	3
20	<i>Sarcophaga lehmann</i>	GBDP12450-12	1
21	<i>Sarcophaga littoralis</i>	AUSFF153-11, AUSFF152-11	2
22	<i>Sarcophaga mega filosia</i>	AUSFF074-08, AUSFF073-08	2
23	<i>Sarcophaga misera</i>	AUSFF264-11, AUSFF268-11, AUSFF250-11	3
24	<i>Sarcophaga multicolor</i>	AUSFF180-11, AUSFF177-11, AUSFF178-11	3
25	<i>Sarcophaga omikron</i>	AUSFF433-11, AUSFF426-11, AUSFF408-11	3
26	<i>Sarcophaga pagensis</i>	GBDP12451-12	1
27	<i>Sarcophaga peregrina</i>	AUSFF082-08	1
28	<i>Sarcophaga praedatrix</i>	AUSFF447-11, AUSFF481-11, AUSFF487-11	3
29	<i>Sarcophaga rosellei</i>	GBDP12452-12	1
30	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	AUSFF208-11, AUSFF207-11, AUSFF209-11	3
31	<i>Sarcophaga seniorwhitei</i>	AUSFF504-11	1
32	<i>Sarcophaga spinigera</i>	AUSFF512-11, AUSFF514-11, AUSFF508-11	3
33	<i>Sarcophaga subvicina</i>	GBDP12453-12	1
34	<i>Sarcophaga taenionota</i>	AUSFF319-11, AUSFF295-11, AUSFF313-11	3
35	<i>Sarcophaga torvida</i>	AUSFF184-11, AUSFF186-11, AUSFF183-11	3
36	<i>Sarcophaga villisterna</i>	AUSFF518-11, AUSFF516-11, AUSFF517-11	3
37	<i>Sarcophaga zeta</i>	AUSFF524-11, AUSFF525-11, AUSFF522-11	3

表 2 引物

Tab. 2 Primer in this study

引物名称 Primer	引物序列-5'-3' Sequence	引用文献 Cited reference
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	[3]
HCO2198	TAAACTTCAGGGTACCAAAAAATCA	

1.2 方法

1.2.1 形态鉴定 麻蝇亚科雄性蝇通过拉出尾器并固定,结合其他体表特征,参见相关书籍检索表^[1]进行形态鉴定。

1.2.2 蝇虫基因组提取 取蝇虫单只蝇足清洗后,通过昆虫基因组提取试剂盒进行蝇虫基因组提取。

1.2.3 PCR 扩增与产物电泳 扩增体系 25 μL, 其中 Taq 酶 0.125 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 10 × ExTaq Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 上下引物各 0.5 μL, 双蒸水 15.875 μL, DNA 模版 1.5 μL, 并按以下条件进行反应: 94 °C 3 min 预变性; 94 °C 30 s 变性, 50 °C 30 s 退火, 72 °C 45 s 延伸, 35 个循环; 72 °C 5 min 后延伸。

扩增后的产物加样置于电泳槽直流电压 130 V, 30 min 进行电泳。电泳后置于凝胶成像系统拍照。

1.2.4 序列测定 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司纯化, 并用四色荧光标记双脱氧链终止法测序(AB 公司 DNA 测序仪 3730 生工生物工程公司(上海)有限公司), 测序的引物为

PCR 扩增引物, 正反链双向测序以保证序列的准确性。

1.2.5 序列分析 1) 用 CodonCode 软件查看测序获得的序列, 去除低质量的末端序列与引物序列, 并进行序列组装, 将组装完成的序列保存为.fasta 格式。2) 在 NCBI(美国国立生物技术信息中心 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行在线 BLAST 对比。3) 将上述所获得的 8 组序列片段进行对比(ClustalW), 之后进行遗传距离计算并构建 NJ 树(Neighbor-joining Tree), 参数选择为 Kimura 双参数距离(K2P)模式, Bootstrap 值为 1 000。

2 结果

2.1 蝇种基因组提取及测序结果 本次实验共提取出 8 个蝇种的 DNA。片段核苷酸长度在 750 bp 左右, 经过分析软件去除杂带和引物后, 剩下的核苷酸片段长度为 658 bp。

2.2 在线 BLAST 结果 见表 3。其结果表明实验样品与 GenBank 已知序列相似度较高(>99%), 与形态鉴定结果相符合。③号样本与 BLAST 比对结果不一致, 但实为同种异名^[4]。

表 3 不同蝇种在线 BLAST 比对结果

Tab. 3 Result of BLAST online of different flies

形态学鉴定结果 Result of Sarcophaginae identification	在线 BLAST 对比结果 Result of BLAST online	GenBank 序号 Accession no.	相似度 Identity
黑尾黑麻蝇(<i>Helicophagella melanura</i>)	<i>Sarcophaga melanura</i>	JX861418.1	99%
黄须亚麻蝇(<i>Parasarcophaga misera</i>)	<i>Sarcophaga misera</i>	KF724927.1	99%
褐须亚麻蝇(<i>Parasarcophaga sericea</i>)	<i>Sarcophaga taenionota</i>	KF562107.1	100%
棕尾别麻蝇(<i>Boettcherisca peregrina</i>)	<i>Sarcophaga peregrina</i>	AF259509.1	99%
酱亚麻蝇(<i>Parasarcophaga dux</i>)	<i>Sarcophaga dux</i>	EF405937.1	99%

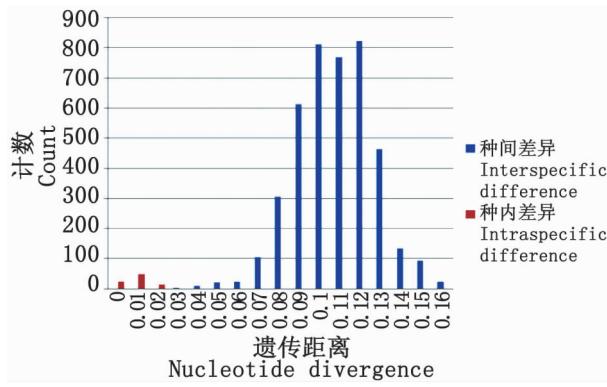
2.3 序列分析与遗传距离 本研究中麻蝇亚科蝇种共计 39 种 92 个体的碱基平均组成为: A = 29.61%, T = 36.89%, C = 17.30%, G = 16.20%, A + T = 66.5%, 具有明显的 A + T 倾向性。

经过计算麻蝇亚科 92 个不同个体的不同蝇种的遗传距离获得麻蝇亚科不同蝇种种间差异 0.0 249~0.1 538, 种内差异 0~0.0 154 (<2%) (如图 1 所示), 种间差异和种内差异没有交叉, 表明

COI(658 bp)序列能较好地对麻蝇亚科的不同种类进行鉴别, 种内差异小于 2% 即可判断为同一种。

2.4 系统进化树构建 如图 2 所示, 麻蝇亚科中同一种能够较好地归为一类, 同时 Bootstrap 值都在 99 以上。本实验中的实物标本黄须亚麻蝇同 AUSFF264-11, AUSFF268-11, AUSFF250-11 聚一类, Bootstrap 值为 100; 褐须亚麻蝇同 AUSFF319-11, AUSFF295-11, AUSFF313-11 聚一类, Bootstrap

值为 100; 棕尾别麻蝇同 AUSFF082-08 聚一类, Bootstrap 值为 100; 酱亚麻蝇同 AUSFF229-11, AUSFF228-11, AUSFF235-11 聚一类, Bootstrap 值为 100, 以上鉴定结果都同形态鉴定相符合。



- 陆宝麟,吴厚永.中国重要医学昆虫分类与鉴别[M].郑州:河南科学技术出版社,2003:418.
- [2]Fang YL, Gao B, Wang YP, et al. Application of DNA barcoding in mosquito identification[J]. Chin J Zoonoses, 2013, 29(10): 1011-1015. DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.10.015 (in Chinese)
- 方义亮,高博,王宇平,等.DNA条形码在媒介蚊类鉴定中的应用[J].中国人兽共患病学报,2013,29(10):1011-1015.
- [3]Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(5): 294-299.
- [4]Wang D. A systematic research of sarcophagidae from China (Diptera: Muscidae)[D]. Shenyang: College of Chemistry and Life, Science, Shenyang Normal University, 2013. (in Chinese)
- 王迪.中国麻蝇科分类和地理分布研究[D].沈阳:沈阳师范大学化学与生命科学学院,2013.
- [5]Herbert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218
- [6]Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes[J]. Med Vet Entomol, 2006, 20(4): 413-424. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x
- [7]Zhang YM, Wu PJ, Wang G, et al. The primary study on DNA barcoding of important Flea in China[C]//The third international forum for Sustainable Management of Disease Vectors Vol. Hangzhou: CPMA, China CDC, 2010: 216-217. (in Chinese)
- 张映梅,吴培进,王刚,等.我国重要蚤类DNA条形码初步研究[C]//第三届媒介生物可持续控制国际论坛论文集.杭州:中华预防医学会,中国疾病预防控制中心,2010:216-217.
- [8]Sun Y, Xu RM, Wang KK. Identification of ticks through DNA barcoding techniques [C]//The third international forum for Sustainable Management of Disease Vectors Vol. Hangzhou: CPMA, China CDC, 2010: 227. (in Chinese)
- 孙毅,许荣满,王可可.中国蜱科重要种类DNA条形码鉴定技术研究[C]//第三届媒介生物可持续控制国际论坛论文集.杭州:中华预防医学会,中国疾病预防控制中心,2010:227.

收稿日期:2014-08-19;修回日期:2014-12-24

(上接第568页)

参考文献:

- [1]Ji YL, Wang YQ, Identification and sequence analysis of the 5' UTR-VP4-VP2 region of coxsackievirus A4 isolated from patients with hand foot and mouth disease[J]. Chin Prev Med, 2012, 13(9): 675-678. (in Chinese)
- 吉彦莉,王永全.手足口病患儿柯萨奇病毒A4的鉴定及其5' UTR-VP4-VP2区序列分析[J].中国预防医学杂志,2012,13(9):675-678.
- [2]Yang F, Zhang T, Hu Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009[J]. Viral J, 2011, 8(508): 1-4.
- [3]Wu Y, Yeo A, Phoon MC, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus71 and coxsackievirus A strains[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(12): e1076-1081.
- [4]Liu JF, Zhang Y, Li H, et al. Genetic characterization of VP4-VP2 of two Coxsackievirus A4 isolated from patient with hand, foot and mouth disease[J]. Chin J Vaccine Immunizat, 2009, 15(4): 345-349. (in Chinese)
- 刘建锋,张勇,李慧,等.从手足口病病例分离的两株柯萨奇病毒A组4型毒株的VP4~VP2区基因特征分析[J].中国疫苗和免疫,2009,15(4):345-349.
- [5]Oberste MS, Penaranda S, Maher K, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 6): 1597-1607.
- [6]Chu PY, Lu PL, Tsai YL, et al. Spatiotemporal phylogenetic analysis and molecular characterization of coxsackievirus A4[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(6): 1426-1435.
- [7]Zhen RN, Zhang Y, Xie HP, et al. Sequence analysis of coxsackievirus A4 and coxsackievirus A10 in Guangzhou city, 2010-2012 [J]. Chin J Prev Med, 2014, 48(6): 445-450. (in Chinese)
- 甄若楠,张颖,谢华萍,等.2010—2012年广州市柯萨奇病毒A4、A10型VPI基因特征分析[J].中华预防医学杂志,2014,48(6): 445-450.

收稿日期:2014-10-11;修回日期:2015-03-15