

基于 COI 基因的柴达盆地常见寄生蚤种的 DNA 条形码分析

李海龙,何 建,赵延梅,杨汉青,马 英

摘要:目的 COI 基因对柴达木盆地部分蚤种进行分子生物学鉴定,旨在完善蚤类传统形态分类法的不足。方法 PCR 扩增 68 份蚤类标本的 COI 基因片段(约 600 bp)并进行测序和比对;用 MEGA 6 软件的 K2-P 双参数模型计算种内及种间遗传距离,以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。**结果** 共测得柴达木盆地 19 种蚤的 68 条 COI 基因序列,种内遗传距离 0.01%~2.9%,种间遗传距离 3%~15.4%,种间遗传距离显著大于种内遗传距离。**结论** NJ 树显示同一物种形成高支持率的单系,种间分支很明显,表明 COI 可以作为 DNA 条形编码基因对柴达木盆地的常见蚤类进行物种鉴定。

关键词:COI 基因;蚤;DNA 条形码技术;分子标记;物种鉴定;柴达木盆地

中图分类号:R384.3 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2018)12-1107-05

DNA barcoding based on mt DNA COI gene sequence of fleas from Qiadam Basin in Qinghai, China

LI Hai-Long, HE Jian, ZHAO Yan-Mei, YANG Han-Qing, MA Ying

(Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 811602, China)

Abstract: In order to making up the deficiency of the traditional morphological classification method, we were being to identify fleas of the molecular biology by DNA barcoding in the study. The partial fragments (about 600 bp) of the mt DNA COI gene were amplified from 68 samples of fleas by PCR, and the obtained COI gene fragments were sequenced and aligned. The intra-and inter-species genetic distances were calculated among the closely-related species with neighbor-joining (NJ) method. We got 68 COI gene sequences and calculated the genetic distance about 19 kinds of fleas that the intraspecific distance 0.01%~2.9%, interspecific distance 3%~15.4%, interspecific genetic distance was significantly greater than the intraspecific genetic distance. NJ tree showed the same species have formed a single line with high support rates and interspecific branch was clearly. The result showed COI gene appear to be accurate and efficient markers for fleas identification.

Keywords: COI gene; flea; DNA barcoding; molecular marker; species identification; Qiadam Basin

Funded by the Natural Science Foundation of China (No. 81560521), the Basic Research Project of Qinghai Province (No. 2016-ZJ-770), and the Qinghai Province Key Laboratory of Plague Prevention and Research (No. 2017-ZJ-Y22)

Corresponding author: Ma Ying, Email: mayingxn@163.com

柴达木盆地在动物地理区划上属西部荒漠亚区,其蚤类区系以古北界种类为主,不少种属为青藏高原特有,具有较高的科学价值^[1]。蚤类除因叮咬和吸血等行为对动物造成直接危害外,其传播重

大传染病的媒介效能(如鼠疫、地方性斑疹伤寒等)也奠定了蚤类的重要医学地位^[2]。

医学病媒生物的鉴定与识别,是控制疾病发生的核心步骤,也是疾病监测的基础工作。常规形态学手段要求分类人员必须掌握扎实的分类知识,同时需要保持被鉴定标本完整且典型的分类特征。目前分类学者人数急剧缩减,使分类鉴定工作面临巨大挑战,急切需要一种物种鉴定新方法产生。DNA 条形码技术的出现解决了形态鉴定的诸多困境^[3-4]。

国家自然科学基金项目(No. 81560521);青海省基础研究计划项目(No. 2016-ZJ-770)和青海省鼠疫防控与研究重点实验室(No. 2017-ZJ-Y22)联合资助

通讯作者:马 英,Email:mayingxn@163.com

作者单位:青海省地方病预防控制所,西宁 811602

在大多数动物类群中,线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(COI)已被广泛采纳为通用的标准条形码基因片段^[5-7]。鉴于上述原因,我们对柴达木盆地寄生蚤种的 COI 基因序列进行研究,以弥补传统形态分类法的不足,积累柴达木盆地寄生蚤 COI 基因部分序列的数据信息,探索建立医学媒介生物快捷鉴定的新方法,这对整个动物学分子鉴定及遗传学研究具有重要的学术意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究使用的 68 份蚤 DNA 样品,采自柴达木盆地 1 市 2 县的 68 匹蚤(样点分布如图 1)。将保存于 75% 酒精中的蚤样本用眼科镊轻轻摄出,置于解剖镜下,用手术刀片将其腹部切开,再将单匹蚤体放入 1.5 mL 离心管中备用。根据 QIA-GEN 试剂盒 DNA 提取步骤制备蚤 DNA 模板,并将模板置于 -20 °C 保存。样本来源详见表 1。

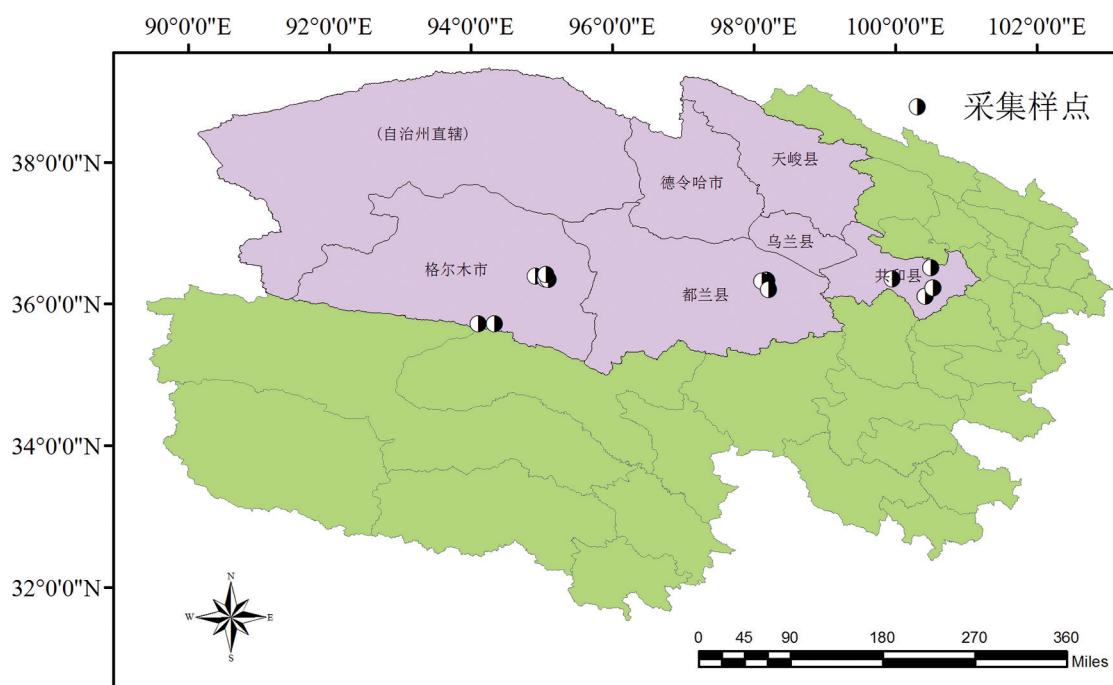


图 1 青海省部分蚤种样本采集点信息

Fig.1 Sampling location of fleas used in present study in Qinghai

表 1 实验用样本来源

Tab.1 Sources of samples in this research

科	蚤种	采集地	宿主	样本量	序列登录号
蚤科	铁氏角头蚤	格尔木	子午沙鼠、三趾跳鼠	2	MG138326-MG138327
切唇蚤科	叶状切唇蚤	格尔木	子午沙鼠	1	MG138325
栉眼蚤科	阿巴盖新蚤	都兰	长尾仓鼠	2	MG138233, MG138235
	盔状新蚤	都兰	小毛足鼠	5	MG138229-MG138232, MG138246
	类新蚤	都兰	长尾仓鼠、子午沙鼠	4	MG138222-MG138225
	五侧纤蚤邻近亚种	共和	高原鼠兔	3	MG138218, MG138236, MG138241
细蚤科	迟钝中蚤指名亚种	格尔木	三趾跳鼠	6	MG138159, MG138250-MG138254
	角尖眼蚤	都兰	五趾跳鼠	2	MG138260, MG138266
	长突眼蚤	共和	小毛足鼠	3	MG138267-MG138269
	直狭怪蚤	都兰	子午沙鼠	2	MG138270, MG138272
	细钩双蚤	都兰、共和	子午沙鼠、小毛足鼠	2	MG138333-MG138334

表 1(续)

科	蚤种	采集地	宿主	样本量	序列登录号
	共和双蚤	共和	小毛足鼠	10	MG138298-MG138307
	长鬃双蚤	格尔木、共和	小毛足鼠	9	MG138286-MG138288, MG138290, MG138294-MG138297, MG138335
	直缘双蚤指名亚种	格尔木	白尾松田鼠	3	MG138273, MG138275-MG138276
角叶蚤科	哔倍蚤指名亚种	共和	高原鼠兔	2	MG138161-MG138162
	裂病蚤	格尔木	子午沙鼠	1	MG138193
	秃病蚤	格尔木、共和	小毛足鼠、子午沙鼠	6	MG138197-MG138202
	端突病蚤	格尔木	子午沙鼠	2	MG138194-MG138195
	刷状同瘴蚤	格尔木	白尾松田鼠	3	MG138203-MG138205

1.2 PCR 扩增 扩增体系: 10× buffer 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.15 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 模板 2 μL, 最后用 dd H₂O 补齐反应体系至 25 μL。扩增条件: 94 °C 预变性 4 min 后进行 40 个循环, 94 °C 变性 1 min, 其中前 10 个循环的退火温度为 55 °C, 后 30 个循环的退火温度为 50 °C, 退火时间均 30 s。72 °C 延伸 40 s。扩增时选用通用引物扩增 COI 基因片段^[8], 引物序列 L1490 (5'-GTCAACAAATCATAAAGATATTG-3') 和 H2198 (5'-AAACTTCAGGGTACCCAAAAAT-3')。将 PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 选取条带清晰样品送北京擎科生物技术有限公司进行双向测序(如图 2)。

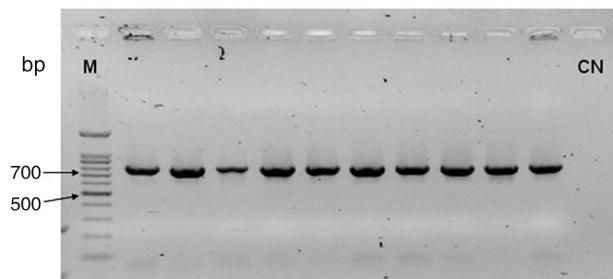


图 2 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products

1.3 DNA 序列分析 首先用 Chromos 软件观察测序峰图质量, 选取峰图质量较高的测序结果在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较, 以确保所获序列是目的序列。再用 Clustal X 软件^[9]

进行多重序列比对, 将比对结果导入 Mega 6.0 软件^[10], 基于 Kimura-2-parameter 模型^[11]进行碱基组成计算和分析、序列信息位点检测、转换数与颠换数及其比值等。

2 结 果

2.1 蚤类 COI 基因部分序列描述 共测得 3 总科 5 科 11 属 19 种蚤计 68 条 COI 序列, 另外从 Gen-Bank 中查询的蚤类同源序列经 Mega 6.0 软件进行序列组成分析, 结果显示 COI 基因序列中保守位点有 336 个, 变异位点有 261 个, 简约信息位点有 252 个, 自裔位点有 9 个。同时 A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 27.2%、39.7%、17.7%、15.4%, 其中 A+T 含量(66.9%)远高于 G+C 含量(33.1%), 与目前已测线粒体 DNA 序列中较高的 A+T 含量现象相一致。

由表 2 可以看出, COI 基因序列的碱基转换值明显高于颠换。T、C 间的转换平均数是 204, A、G 间的转换平均数是 137, TC 转换大于 AG 间的转换。转换/颠换的平均值 0.08, 转换主要发生于 A-G 之间, 颠换主要发生于 T-A 之间。第 1 位点 R 值最小, 仅 0.78, 说明第一位点的替换多是同义替换, 不会导致氨基酸的改变。

2.2 NJ 法构建系统树 运用 Mega 6.0 软件, 基于 Kimura-2-parameter 模型, 采用 NJ 邻接法构建柴达木盆地常见寄生蚤 COI 基因序列的 NJ 树(图 3), 对 NJ 树进行内部分支检验与 1 000 次 Bootstrap 检验分析, 来确定各支系的置信度。

表 2 柴达木盆地蚤类 COI 基因碱基替换数
Tab.2 Base substitutions on COI gene of fleas from Qaidam Basin

位点	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
平均	42.00	1	204	16	17	2	15	87	3	1	15	4	137	6	1	0	6
1st	0.78	69	11	15	1	10	5	3	0	14	3	57	5	1	0	4	2
2nd	2.92	48	5	2	0	5	29	0	0	1	0	57	1	0	0	2	48
3rd	1.19	88	0	0	0	0	53	0	0	0	0	23	0	0	0	0	34

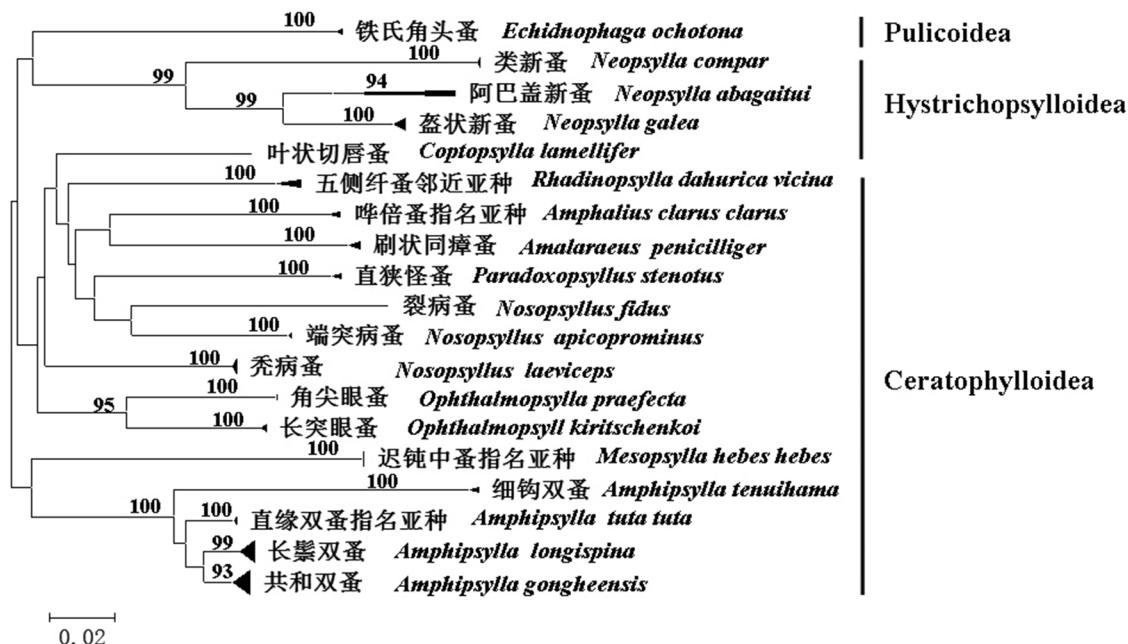


图 3 基于 Kimura-2-parameter 模型构建蚤类 NJ 系统树
Fig.3 A neighbor-joining phylogenetic tree of fleas based on Kimura 2-parameter model

3 讨 论

3.1 遗传距离差异 柴达木盆地 19 种蚤的 COI 序列其平均遗传距离为 16.1%，种内遗传距离 0.01%~2.9%，种间遗传距离 3%~15.4%，种间遗传距离显著大于种内遗传距离。种属间遗传距离如图 4 所示。

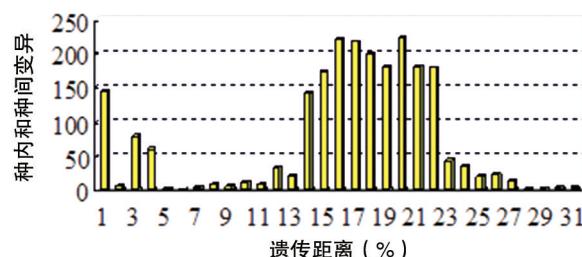


图 4 柴达木盆地蚤类 COI 基因部分序列遗传距离差异分析

Fig.4 Analysis of genetic distance on partial COI gene sequence of fleas from Qaidam Basin

3.2 形态结果的修订 本研究中我们挑选了形态特征比较明显的非透明蚤标本做分子实验，即便这样，在分析和比对本研究的蚤类 COI 基因部分序列时，我们也发现一些种类的形态鉴别可能存在误定问题，尤其是雌蚤的鉴定结果。例如编号 Z138 的双蚤雌蚤（符合双蚤属属征：仅有胸栉，腹节背板有副鬃列，眼鬃位于眼的上方、触角窝的前缘，眼的前方有可见的幕骨拱，后足第 5 跗节 4 对侧蹠鬃、1 对蹠鬃），且第 7 腹板后缘较平，初鉴为原双蚤指名亚种；编号 Z147、Z148 的雌蚤在镜检时也符合双蚤属的属征，但第 7 腹板后缘具浅凹，下段不外斜，初步鉴定为方指双蚤。这 3 匹雌蚤均采自格尔木白尾松田鼠体表，因该地区未采到相应雄蚤，先暂以形态鉴定命名。在后续工作中发现这 3 匹蚤和 GeneBank 登录号为 MG138278、MG138279 的直缘双蚤指名亚种的雄蚤聚为一支，且置信度为 99%。根据蚤类形态鉴别以雄性为主，雌性为辅的特性，所以我们在

分子结果分析时结合现场鉴定结果、宿主和地区分布等综合考量,将这 3 匹雌蚤复鉴为直缘双蚤指名亚种。

实际工作应用中,一些雌蚤种一级的分类特征差异很小,我们在形态分类时只能鉴定到属,无法鉴定到种。若想细分,最好在同地区再次补点进行样本采集,以期获得该属雄蚤,看能否和雌蚤进行配对鉴定。如果雄蚤特征不匹配或现场补样条件不允许,可通过分子试验的 COI 基因数据在 GeneBank 基因库中比对后,再综合分子聚类结果和现场样本采集信息进行准确分类鉴定。

鉴于形态常规分类存在鉴定错判的可能,今后蚤类鉴定应以外部形态鉴定为主,结合分子鉴定结果,可更好地发现和纠正传统形态学鉴定中的错误,从而准确鉴别物种。

3.3 系统树的构建和存在的问题 构建的系统树显示所有个体形成 19 个高支持度的单一分支,提示蚤种类应该有 19 种,这和蚤凭证标本复核结果大致一致,说明 DNA 条形码技术可用于蚤类的鉴定。

形态鉴别结果为秃病蚤田鼠亚种和秃病蚤指名亚种的 COI 基因序列在 NJ 树中却聚为一个分支,置信度 100%,考虑亚种在形态鉴别中的很多问题和歧义等实际问题,笔者认为把这一分支直接定为种的阶元-秃病蚤,而不再往下细分更为合理些。

NJ 树中长鬃双蚤和共和双蚤分支蚤种鉴定出现问题最多,暂时把这两个双蚤分支归为疑似长鬃双蚤、疑似共和双蚤类群。我们再三复核这两个分支的凭证标本,最后分析出现的问题原因大致有二,一是双蚤属雌蚤形态鉴定只能凭第 7 复板后缘凹陷的深浅及广度,差别细微,主观性较强,极易造成误鉴或只能粗略鉴定到属。二是雄蚤形态复鉴无误,但分子结果却和形态结果不相一致的问题。例如,1 匹雄蚤形态鉴定为长鬃双蚤,复检透明标本后我们认为形态鉴别无误,但它却和共和双蚤聚为一支。关于这些形态极其相似、地理分布相近的蚤种分类,建议今后在形态分类基础上开展多基因分子标记,尤其是线粒体基因和核基因联合标记研究,以便精准分析种群遗传多样性和系统进化发育。

综上所述,尽管 DNA 条形码鉴定技术前景非常乐观,但目前分子鉴定技术的正确做法还是应以

传统分类法为基础,保证分类物种为纯种且鉴别正确,在此基础上测定的 COI 基因序列才能作为该物种的 DNA 条形编码。并尽可能留存凭证标本,以供其他学者对形态数据和基因数据进行相关研究时做一参比。

参考文献:

- [1] 蔡理芸, 詹心如, 吴文贞, 等. 青海的蚤类区系[J]. 高原生物学集刊, 1987, 7(1): 87-107.
- [2] Dunnet GM, Mardon DK. Siphonaptera [M]. Lawrence JF, Nielsen ES, Spradberry JP, et al. The Insects of Australia: a Textbook for Students and Research Workers. Melbourne: Melbourne University Press, 1991: 125-140.
- [3] Hebert PDN, Penton EH, Bums JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Pans, 2004, 101 (41): 14812-14817. DOI: 10.1073/pnas.0406166101
- [4] Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. P Roy Soc B-Biol Sci, 2003, 270: S96-S99. DOI: 10.1098/rstb.2003.0025
- [5] Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. Identification of bird s through DNA barcodes[J]. Plos Biol, 2004b, 2: 1657-1663. DOI: 10.1371/journal.pbio.00203212
- [6] Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos T Roy Soc B, 2005, 360, 1847-1857. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716
- [7] Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: the barcode of life data system [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7, 355-364, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- [8] Simmons NB. Order Chiroptera [M]. Wilson DE, Reeder DM. Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005: 315-525.
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acid Res, 1997, 24: 4876-4882. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876
- [10] Tmaura K, Stecher G, Peterson D, et al. Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis (version 6.0) [J]. Molec Biol Evol, 2013, 30: 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- [11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16, 111-120. DOI: 10.1007/BF01731581

收稿日期:2017-12-21 编辑:张智芳