

· 论 著 ·

COX I 基因 DNA 条形码技术在蜱类鉴别中的应用

侯海燕

(淮安市疾病预防控制中心, 江苏淮安 223001)

摘要:目的 探讨细胞色素 C 氧化酶 I 亚基(COX I)条形码在野外捕获种类鉴定中的应用。方法 对捕获的 9 个蜱类个体中 COX I 基因进行测序,利用 DNASTar 软件进行序列比对及同源性分析,利用 phlip3.6 软件选择最大似然法(ML)构建进化树。结果 在系统进化树中,标本 sh2011040702、ra2011042193 及 ra2011051168 与血蜱属分在一支,sh2011051404、sh2011051408 及 ra2011041177 与革蜱属聚集在一起,sh2011051837、sh2011041917 及 ra2011041175 与璃眼蜱属分在一支,均与形态学鉴定结果一致。结论 以 COX I 基因序列作为蜱 DNA 条形码对蜱种鉴别具有一定的可行性。

关键词:细胞色素 C 氧化酶 I 亚基; DNA 条形码; 蜱类; 鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)24-3570-02

Application of DNA barcoding technique of COX I gene in identification of ticks

Hou Haiyan

(Huai'an Municipal Center for Disease Control and Prevention, Huai'an, Jiangsu 223001, China)

Abstract: Objective To investigate the application of the cytochrome C oxidase subunit I gene(COX I) barcoding in the identification of wild-caught ticks. **Methods** The COX I gene of 9 caught tick individuals with different species was sequenced, the DNASTar software was used to conduct the sequence comparison and homology analysis. Meanwhile the phlip3.6 software was adopted to select the maximal likelihood(ML) method for constructing the evolutionary trees. **Results** In the phylogenetic trees, the samples of sh2011040702, ra2011042193 and ra2011051168 with Haemaphysalis were in a branch, sh2011051404, sh2011051408 and ra2011041177 with Dermacentor were clustered together, and sh2011051837, sh2011041917 and ra2011041175 with Hyalomma were in a branch, which were consistent with the morphological identification results. **Conclusion** Making the COX I gene sequence as tick DNA barcoding has certain feasibility for identifying the tick species.

Key words: cytochrome C oxidase subunit I gene; DNA barcoding; tick; identification

蜱是寄生在动物体表的吸血寄生虫,具有从宿主获得多种病原体的能力。对国内外蜱传播疾病的研究发现,蜱携带的病原体包括 83 种病毒(如出血热、新型布尼亚病毒、森林脑炎)、14 种细菌(如布氏杆菌)、20 种立克次体(如蜱传斑疹伤寒、Q 热)、18 种螺旋体(如莱姆病)、32 种原虫(如巴贝斯虫)、1 种支原体、1 种衣原体、1 种巴尔通体和 2 种线虫^[1-2]。对蜱进行分类鉴定是医学媒介生物调查和控制工作的基础,是检验检疫、疾病预防与控制领域的核心步骤。

2003 年,加拿大科学家 Hebert 等^[3]提出了 DNA 条码概念,利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基(COX I)这一特定基因的特定区段作为 DNA 条码。由于其操作简便快速,已经被广泛的应用于多个动物类群的鉴定与分类^[4-7]。目前,已测定出一些蜱的 mtDNA 序列^[8]。本研究通过对某地区监测所捕获的蜱,选择其中 9 个线粒体 COX I 基因序列进行比对分析,分析其种属分类,验证 COX I 基因作为蜱 DNA 条形码在蜱种鉴定中的有效性。

1 材料与方 法

1.1 标本采集 本研究分别在某地区的 6 个地点即不同生态环境下进行蜱类的采集。在采样点随机抽取 10~30 只家畜采集体外寄生蜱,以每只家畜作为 1 个采集单位,同时在采样点附近布鼠夹,从捕获的啮齿动物体表进行寄生蜱收集,将每个单位采集的蜱按单宿主装入单只大号试管中,做好记录,实验室分类鉴定。

标本的形态学鉴定用体视显微镜观察蜱的盾板、假头、假头基形状、口下板、生殖孔、肛沟、气门等形态特征,根据蜱分类检索表进行形态学分类鉴定。

1.2 基因组 DNA 提取、聚合酶链式反应(PCR)扩增及测序

采集的蜱标本,先用 75% 乙醇清洗 1 次,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次。蜱基因组总 DNA 的提取使用 Qiagen 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit,参照试剂盒说明书提取总 DNA。以提取的蜱 DNA 为模板,按照文献中扩增 COX I 基因的方法进行扩增,扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后由金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.3 COX I 序列分析方法 利用 DNASTar 程序对序列进行排序辅以手工校正,使用 phlip3.60 软件进行序列比对并用最大似然法(ML)构建系统发生树。系统树分支的置信度均采用自展法 1 000 次重复验证。

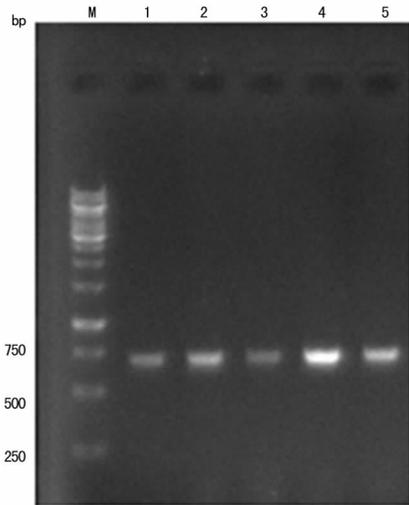
2 结 果

2.1 蜱的形态学鉴定 在某地区 6 个地点采集蜱,利用体视显微镜观察蜱的盾板、假头、假头基形状、口下板、生殖孔、肛沟、气门等形态特征,根据蜱分类检索表进行形态学分类鉴定发现,羊群体表寄生蜱为亚东璃眼蜱(编号为 sh2011051837、sh2011041917)、草原革蜱(编号为 sh2011051404、sh2011051408)及草原血蜱(编号为 sh2011040702);鼠类体表寄生蜱为草原血蜱(编号为 ra2011042193、ra2011051168)、草原革蜱(编号为 ra2011041177)及亚东璃眼蜱(编号为 ra2011041175)。

2.2 不同蜱 COX I 基因 PCR 扩增结果 琼脂糖凝胶检测结果显示,COX I 的 PCR 产物约为 650 bp 的 DNA 片段,见图 1。与预期目的片段大小一致。

2.3 蜱的核苷酸序列同源性比较 从核苷酸同源比较表中可以看出标本 sh2011051837、sh2011041917 及 ra2011041175 与 3

个已知属的核苷酸相比较,与璃眼蜱属的同源性为 86.9%~99.1%,与血蜱属的核苷酸同源性为 81.6%~84.9%,与革蜱属的核苷酸同源性为 83.2%~83.6%。标本 sh2011051837、sh2011041917 及 ra2011041175 之间的核苷酸同源性为 99.9%;标本 sh2011051404、sh2011051408 及 ra2011041177 与 3 个已知属的核苷酸相比较,与璃眼蜱属的同源性为 80.4%~83.7%,与血蜱属的核苷酸同源性为 82.1%~86.1%,与革蜱属的核苷酸同源性为 99.0%~99.7%。标本 sh2011051404、sh2011051408 及 ra2011041177 之间的核苷酸同源性为 99.7%~99.9%;标本 sh2011040702、ra2011042193 及 ra2011051168 与 3 个已知属的核苷酸相比较,与璃眼蜱属的同源性为 79.5%~83.0%,与血蜱属的核苷酸同源性为 85.2%~99.0%,与革蜱属的核苷酸同源性为 81.4%~83.1%。标本 sh2011040702、ra2011042193 及 ra2011051168 之间的核苷酸同源性为 99.9%。



M: 标志物; 1: sh2011041917; 2: sh2011040702; 3: sh2011051404; 4: ra2011041177 5: ra2011051168。

图 1 COX I 基因 PCR 扩增产物电泳图

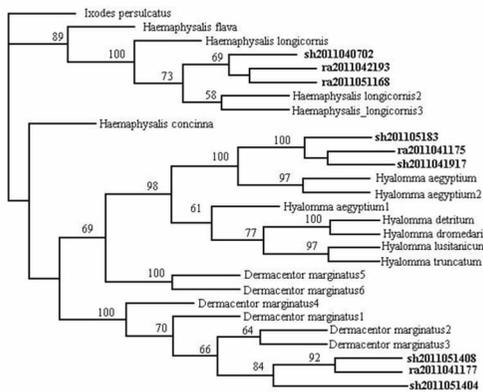


图 2 基于 ML 法的建立的蜱 COX I 基因分子化树

2.4 蜱的系统发生树的构建 基于本研究的 9 个个体线粒体 COX I 基因序列,以及从 Genebank 中所获得的已知蜱的各属(包括璃眼蜱属、革蜱属、血蜱属)序列,ML 法建系统发生树,如图 2 所示。sh2011051837、sh2011041917 及 ra2011041175 的系统发生树与璃眼蜱属的种分在一支,同时这 3 株聚集在一起,从羊群体表分离出的蜱与从鼠表分离到的蜱的进化关系较近,没有发现明显的因宿主差异导致的蜱 COX I 基因发生变异,同时与形态学鉴定结果一致为亚东璃眼蜱;sh2011051404、sh2011051408 及 ra2011041177 在系统发生树中与革蜱属聚集在一起,但与同一大支相比,这三株又独立聚集在一起,且自展

值为 100,与形态学鉴定一致,为草原革蜱;标本 sh2011040702、ra2011042193 及 ra2011051168 与血蜱属的分在一支,与形态学鉴定一致。

3 结论

本研究对某地区 3 种蜱的 9 个个体的 COX I 序列进行扩增,得到 650 bp 基因片段,经测序后进行分析,标本 sh2011051837、sh2011041917 及 ra2011041175 与 3 个已知属的核苷酸相比较,与璃眼蜱属的同源性为最高,与形态学鉴定这 3 个为亚东璃眼蜱的结论一致;标本 sh2011051404、sh2011051408 及 ra2011041177 与三个已知属的核苷酸相比较,与革蜱属的核苷酸同源性最高,与形态学鉴定这 3 个为草原革蜱的结论一致;标本 sh2011040702、ra2011042193 及 ra2011051168 与 3 个已知属的核苷酸相比较,与血蜱属的核苷酸同源性最高,与形态学鉴定这 3 个为草原血蜱的结论一致。

对于物种的鉴定,一般采用传统形态学方法,但由于个体差异、环境影响等因素常常使得形态学鉴定也具有很大的局限性^[9],尤其是形态学特征很相似,标本破坏,特定状态下(如缺乏未成熟蜱的性状描述或采集的标本为饱血蜱)。DNA 条形码技术是建立在物种相对保守的基因如 12S rDNA、16rDNA、COX I 基因、Cytb 基因、D-loop 基因等基础上的,通过获得相对保守的基因序列,可以建立每种物种便于识别的特有便签^[10-11]。近年来,蜱传疾病引起重大的公共卫生安全,引起越来越多的重视,但是对于蜱本身的关注较少,尤其是在蜱携带病原体种类的鉴定。DNA 条形码技术的引入便可以更加快速、准确地鉴定蜱,同时为依据分子标记序列鉴定物种、种群研究及系统进化分析提供了有效途径。

本研究结果表明,线粒体 COX I 基因作为 DNA 条形码用于蜱种类鉴别具有一定的可行性,利用 DNA 条形码检测技术是准确鉴定物种的趋势之一。

参考文献

- [1] 马广鹏,孙传范,赵娜,等. 中国蜱传病主要流行趋势及防控科技对策[J]. 中国农业科技导报,2011,13(2):105-109.
- [2] 江莉,龚劲聪,胡龙飞,等. DNA 条形码技术用于进口货物中肩突硬蜱的鉴定[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2014,37(1):33-36.
- [3] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(15): 313-321.
- [4] Herbert P, Ratnasingham S, De WJ. Barcoding animal Life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270(15): 96-99.
- [5] 刘勇,宋毓,李晓宇. 基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用[J]. 植物检疫, 2010, 2(2): 46-50.
- [6] 高玉时,屠云洁,童海兵,等. 6 个地方鸡种线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 924-930.
- [7] 彭居俐,王绪祺,王丁,等. 基于线粒体 CO I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲌属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 271-276.
- [8] 柳淑芳,陈亮亮,戴芳群,等. 基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.
- [9] 覃新程,田俊华,王剑波,等. 长角血蜱和微小扇头蜱的形态与分子生物学鉴定[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(6): 608-612.
- [10] 焦明超,赵大显,欧阳珊,等. DNA 条形码技术在生物分类学中的应用前景[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 886-890.
- [11] 张穗生,陈英,陈小玲. 微生物 DNA 条形码技术的研究进展[J]. 广西科学, 2015, 22(1): 27-30.