

· 论 著 ·

DNA 条形码技术鉴定浙江省常见鼠形动物研究

侯娟¹, 李天奇¹, 丁春喜², 刘钦梅¹, 张蓉¹, 黄健², 王金娜¹, 吴瑜燕¹, 龚震宇¹

1.浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051; 2.嘉善县疾病预防控制中心

摘要: **目的** 利用 DNA 条形码技术鉴定浙江省常见鼠形动物。**方法** 在浙江省嘉善县、龙游县、云和县和宁海县捕获野外鼠形动物, 取鼠耳标本提取 DNA, 采用通用引物 PCR 扩增线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因测序。将测序获得序列与 GenBank 中的序列进行 Blast 序列同源性比对, 采用邻接法构建分子进化树鉴定鼠形动物, 并与传统形态学方法鉴定结果进行比较。**结果** 共扩增出 22 份 COI 标本, 其中 18 份标本构建的进化树与传统形态学鉴定结果一致; 3 份标本的鉴定结果存在差异, 臭鼯鼠 (*Suncus murinus*) 重新鉴定为大麝鼯 (*Crocidura lasiura*), 幼年黄毛鼠 (*Rattus losea*)、幼年黄胸鼠 (*Rattus tanezumi*) 重新鉴定为幼年褐家鼠 (*Rattus rattus*); 1 份形态学鉴定为幼年东方田鼠 (*Microtus fortis*) 的标本 (编号: NH-1) 在 GenBank 中同源性较低, 有待进一步鉴定。**结论** DNA 条形码技术能有效更正传统形态学鉴定可能造成的错误, 两种方法联合可提高鼠型动物鉴定的准确性。

关键词: 鼠形动物; DNA 条形码; 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因; 分类鉴定

中图分类号: R332 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 05-0437-04

Application of DNA barcoding to identification of rodents in Zhejiang Province

HOU Juan*, LI Tian-qi, DING Chun-xi, LIU Qin-mei, ZHANG Rong, HUANG Jian, WANG Jin-na, WU Yu-yan, GONG Zhen-yu

*Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To apply DNA barcoding to identifying the rodents in Zhejiang Province. **Methods** Rodents were captured from Jiashan, Longyou, Yunhe and Ninghai counties in Zhejiang Province. The DNA was extracted from ears of rodent samples, and was amplified and sequenced with mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) genes. The obtained sequences were compared with the related sequences in GenBank, and neighbour-joining evolutionary tree was constructed. Then the results by DNA barcoding and by morphological identification were compared. **Results** A total of 22 COI gene samples were amplified. The evolutionary tree constructed by 18 samples was consistent with the morphological identification results and 4 samples were different: *Suncus murinus* should be *Crocidura lasiura*, infant rats of *Rattus losea* and *Rattus tanezumi* was re-identified as *Rattus rattus*, infant rats of *Microtus fortis* (sample number: NH-1) needs further identification. **Conclusion** DNA barcoding can effectively correct the errors of morphological identification, thus combining the two methods could improve the accuracy of rodent identification.

Key words: Rodents; DNA barcoding; COI gene; Identification

浙江省地形由南至北主要以山地向平原阶梯状变化, 丰富多样的生态环境形成了鼠形动物物种的多样性^[1-2]。鼠形动物的种属鉴定一直是鼠类研究的难

点, 目前现场工作主要基于形态学鉴定, 但要求标本完整、形态特征典型且鉴定人员经验丰富, 因此对鉴定结果的准确性和物种多样性的分析具有很大影响^[3-5]。DNA 条形码技术是利用生物体内一段标准的 DNA 片段对物种进行快速准确鉴定的技术^[6-7], 目前已经广泛运用于动植物的分类鉴定: HEBERT 等^[8]对哥斯达黎加常见蝴蝶 DNA 条形码进行研究, 发现至少存在 10 个无法应用形态学区别的隐藏种;

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.05.002

基金项目: 浙江省预防医学会课题 (2017YF13); 国家科技重大专项课题 (2017ZX10303404)

作者简介: 侯娟, 硕士, 主管医师, 主要从事病媒生物监测控制工作

通信作者: 龚震宇, E-mail: zhygong@cdc.zj.cn

肖永刚等^[9]采用细胞色素C氧化酶亚基I (cytochrome C oxidase subunit I, COI) 基因鉴定菱蜡蝉科昆虫;何锴等^[10]采用COI基因研究甘肃省莲花山的小型兽类生物多样性;刘蓉蓉等^[5]采用COI基因对中国姬鼠属的种类进行系统性研究。DNA条形码技术弥补了传统分类方法的不足,提高了鼠形动物的分类鉴定水平,为其多样性研究提供了新的思路和方法^[11-15]。本研究采用COI基因对浙江省常见鼠形动物进行分类鉴定,并与形态学鉴定进行比较,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 鼠形动物标本采集自浙江省嘉兴市嘉善县、衢州市龙游县、丽水市云和县和宁波市宁海县。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 嘉善县、龙游县、云和县和宁海县采集的鼠形动物标本由各地疾病预防控制中心病媒生物专业技术人员进行形态学鉴定。

1.2.2 DNA提取 采用DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒(QIAGEN公司,德国)提取鼠耳DNA,置于4℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增及双向测序 选用引物BatL5310(5'-CCTACTCRGCCATTTTACCTATG-3')和R6036R(5'-ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA-3')扩增COI基因片段,反应体系25 μL,包括Master Mix(QIAGEN) 12.5 μL, dd H₂O 9 μL,上下游引物各1 μL, DNA模板1.5 μL。PCR反应条件为95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环, 72℃延伸3 min。采用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,送至杭州有康生物科技有限公司进行双向测序。

1.2.4 序列同源性比对 采用Chromas 2软件查看峰图并判断序列质量。将测定序列在NCBI的GenBank进行Blast序列同源性比对,确保获得序列为目标序列。通过Mega 6.0软件的Clustal W对序列进行比对,并进行适当调整,采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建分子进化树。

2 结果

2.1 传统形态学鉴定 鼠形动物标本共22份,经形态学鉴定,包括小泡巨鼠(*Leopoldamys edwardsi*) 1只、臭鼯鼠(*Suncus murinus*) 1只、东方田鼠(*Microtus fortis*) 2只、褐家鼠(*Rattus rattus*) 2只、

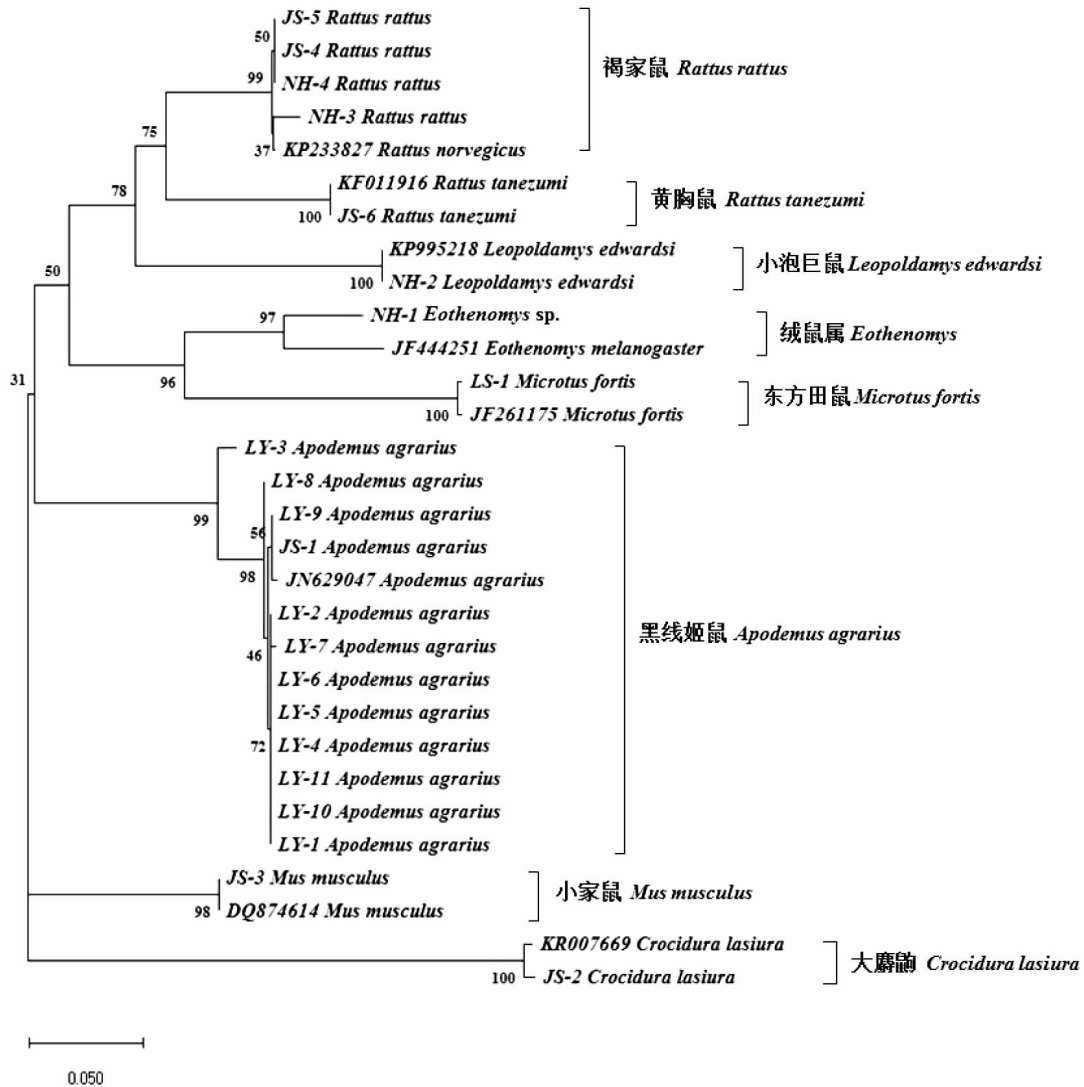
黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*) 12只、黄毛鼠(*Rattus losea*) 1只、黄胸鼠(*Rattus tanezumi*) 2只和小家鼠(*Mus musculus*) 1只,见表1。

表1 鼠形动物标本采集记录和鉴定结果

标本编号	采集地点	鼠龄	形态学鉴定结果	分子鉴定结果
JS-1	嘉善县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
JS-2	嘉善县	成年	臭鼯鼠	大麝鼯
JS-3	嘉善县	成年	小家鼠	小家鼠
JS-4	嘉善县	成年	褐家鼠	褐家鼠
JS-5	嘉善县	幼年	褐家鼠	褐家鼠
JS-6	嘉善县	幼年	黄胸鼠	黄胸鼠
LS-1	云和县	成年	东方田鼠	东方田鼠
LY-1	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-2	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-3	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-4	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-5	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-6	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-7	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-8	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-9	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-10	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
LY-11	龙游县	成年	黑线姬鼠	黑线姬鼠
NH-1	宁海县	幼年	东方田鼠	待鉴定种
NH-2	宁海县	成年	小泡巨鼠	小泡巨鼠
NH-3	宁海县	幼年	黄毛鼠	褐家鼠
NH-4	宁海县	幼年	黄胸鼠	褐家鼠

2.2 同源性比对分析 共扩增COI标本22份。黑线姬鼠COI序列与已知黑线姬鼠(JN629047)同源性为99%;小家鼠COI序列与已知小家鼠(DQ874614)同源性为99%;褐家鼠COI序列与已知褐家鼠(KP233827)同源性为98%;黄胸鼠COI序列与已知黄胸鼠(KF011916)同源性为98%;东方田鼠COI序列与已知东方田鼠(JF261175)同源性为98%;小泡巨鼠COI序列与已知小泡巨鼠(KP995218)同源性为100%;采自宁海县的1份标本(标本编号:NH-1)在GenBank中同源性较低,有待进一步鉴定。

2.3 分子进化树分析 分子进化树显示,各鼠种均可以形成独立的分支。褐家鼠与黄胸鼠聚为一支,并与小泡巨鼠聚为一组;编号NH-1的标本与黑腹绒鼠聚为一支,并与东方田鼠聚为一组;黑线姬鼠、小家鼠和大麝鼯(*Crocidura lasiura*)分别各为一支。采用DNA条形码技术,臭鼯鼠重新鉴定为大麝鼯;幼年东方田鼠(标本编号:NH-1)还需进一步鉴定;幼年黄毛鼠(标本编号:NH-3)、幼年黄胸鼠(标本编号:NH-4)均重新鉴定为幼年褐家鼠。其他鼠种同源性比对结果与形态学鉴定结果一致。见图1。



注：KP233827 (褐家鼠)、KF011916 (黄胸鼠)、KP995218 (小泡巨鼠)、JF444251 (黑腹绒鼠)、JF261175 (东方田鼠)、JN629047 (黑线姬鼠)、DQ874614 (小家鼠)、KR007669 (大麝鼯) 为 GenBank 中的已知鼠种；其余编号为采集的标本；各分支上的数字分别表示该分支的支持率 (bootstrap support value)。

图1 浙江省常见鼠形动物 COI 基因序列 NJ 法分子进化树

3 讨论

鼠形动物的分子鉴定多采用其肝或脾 [3-5]，需要进行解剖，但鼠形动物可能携带病原体，容易增加操作人员暴露于病原体的风险。因此本研究取鼠形动物的耳朵进行研究，以减少此类风险，保护工作人员。

分子进化树结果显示，共4个标本的分子鉴定结果与形态学鉴定结果有差异，原鉴定为臭鼯鼯的标本重新鉴定为大麝鼯；原鉴定为幼年东方田鼠的标本 (标本编号：NH-1) 还需进一步鉴定；原鉴定为幼年黄毛鼠 (标本编号：NH-3)、幼年黄胸鼠 (标本编号：NH-4) 的标本重新鉴定均为幼年褐家鼠。但总体而言，浙江省常见鼠形动物的分子鉴定与形态学鉴

定结果一致性较好。每一种鼠形动物在进化树中均能够聚集到同一个分支，同属的种类也能够聚为一支，充分说明 COI 基因能够运用于鼠形动物的分类鉴定。目前现场工作通常根据形态对鼠形动物进行分类鉴定，而幼年与成年鼠型动物的形态特征差异较大、形态特征受环境影响和具有高相似度的隐种等因素给形态学分类鉴定带来诸多问题 [3-5]。DNA 条形码技术能够有效更正形态学鉴定可能带来的错误，与形态学鉴定能够相互验证和补充 [16-17]。

在鼠形动物及相关疾病监测过程中，分类鉴定是最基础和最关键的一环，如果分类鉴定有误，会出现错误的监测结论。本研究中宁海县采集的3只幼年鼠形动物由基层工作人员进行鉴定，但经分子鉴定发现

原鉴定结果错误。这提示应加强基层鼠形动物分类鉴定培训，同时在培训基层工作人员时，应加强幼年鼠形动物的分类鉴定培训内容。

目前，DNA条形码已用于植物、啮齿类和昆虫的物种鉴定、遗传变异和生物进化等方面的研究^[8-9,16,18]，但仍存在一些不足之处：首先，Cytb基因仍是哺乳动物DNA条形码最为常用的基因，因此大量鼠形动物种类的COI和16S基因尚未录入数据库中，许多物种无法通过Blast序列准确鉴定物种，如标本编号为NH-1的个体在数据库中并没有比对出具有高同源性的种^[10]；其次，GenBank中部分基因序列并没有经过形态学分类专家的鉴定，其序列所提交的物种名并不准确^[19]。总之，DNA条形码技术尚未成熟，需要进一步加强研究，完善鼠形动物DNA条形码数据库，为鼠形动物以及鼠传疾病的研究提供帮助^[3,5,13,17]。

本研究涉及的浙江省鼠形动物品种和标本数量较少，有待扩大试验鼠形动物种类范围和数量，挑选多种线粒体基因和核基因，以确保试验结果的可靠性，验证利用DNA条形码进行鼠形动物分子生物学鉴定的可行性。

志谢 感谢嘉善县疾病预防控制中心、龙游县疾病预防控制中心、丽水市疾病预防控制中心和宁海县疾病预防控制中心的病媒生物工作人员在采样过程中提供的帮助

参考文献

- [1] 何月, 樊高峰, 张小伟, 等. 浙江省植被 NDVI 动态及其对气候的响应 [J]. 生态学报, 2012, 32 (14): 4352-4362.
- [2] 汤永康, 傅桂明, 黄良, 等. 浙江省 2003 年鼠类种群分布监测 [J]. 预防医学, 2004, 16 (12): 50.
- [3] 闫东, 鲁亮, 金圣浩, 等. DNA 条形码技术在河北省鼠疫疫源地鼠种鉴定中的应用 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25 (1): 21-23.
- [4] 王安东, 尹小平, 田延河, 等. DNA 条形码技术在中国 - 哈萨克斯坦边境阿拉山口地区鼠类鉴定中的应用 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2016, 27 (5): 459-462.
- [5] 刘蓉蓉, 葛德燕, 鲁亮, 等. 中国姬鼠属种类的 DNA 条形码鉴定及其分布 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 28 (2):

97-103.

- [6] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [7] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, WAARD J R D. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270 (S1): 96-99.
- [8] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101 (41): 14812-14817.
- [9] 肖永刚, 陈祥盛. 基于线粒体 COI 基因的 17 种菱蜡蝉亚科昆虫 DNA 条形码研究 (半翅目: 蜡蝉总科: 菱蜡蝉科) [J]. 山地农业生物学报, 2014, 33 (2): 44-50.
- [10] 何锴, 王文智, 李权, 等. DNA 条形码技术在小型兽类鉴定中的探索: 以甘肃莲花山为例 [J]. 生物多样性, 2013, 21 (2): 197-205.
- [11] 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.
- [12] 岳巧云, 邱德义, 胡佳, 等. DNA 条形码 - 医学媒介生物快速准确鉴定的利器 [J]. 检验检疫学刊, 2013 (5): 60-63.
- [13] 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): 94-98.
- [14] 马英, 李海龙, 李超, 等. 基于 DNA 条形码技术鉴定青海柴达木盆地小型兽类 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29 (12): 1186-1190.
- [15] 陈宝宝, 孙养信, 安翠红, 等. 用 DNA 条形码技术鉴定阿拉善黄鼠和达乌尔黄鼠 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25 (5): 432-434.
- [16] 陈炼, 吴琳, 王启菲, 等. DNA 条形码及其在生物多样性研究中的应用 [J]. 四川动物, 2016, 35 (6): 942-949.
- [17] 刘润吉, 张荣波, 郭天宇, 等. DNA 条形码技术在贵州茂兰鼠类鉴定中的应用 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2014 (1): 59-62.
- [18] 刘勇, 宋毓, 李晓宇. 基于线粒体 COI 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, 24 (2): 46-50.
- [19] SHEN Y Y, XIAO C, MURPHY R W. Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e57125.

收稿日期: 2018-12-19 修回日期: 2019-02-19 本文编辑: 陆璟璇

(上接第 436 页)

(4): 354-358.

- [16] 姚莘莘, 朱函坪, 徐芳, 等. 浙江省汉坦病毒基因分子进化分析 [J]. 病毒学报, 2010, 26 (6): 465-470.
- [17] 马超锋, 余鹏博, 吴瑞, 等. 携带汉坦病毒宿主动物分布特征研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31 (1): 26-29.
- [18] 翁景清, 谢荣辉, 卢亦愚, 等. 浙江东方田鼠分离汉坦病毒株 S 基因的克隆和序列分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25 (10): 833-836.

- [19] 杨其松, 张天琛, 刘晓青, 等. 汉坦病毒及其与宿主基因相互作用研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2018, 22 (7): 751-754.
- [20] LIU J, LIU D Y, CHEN W, et al. Genetic analysis of hantaviruses and their rodent hosts in central-south China [J]. Virus Res, 2012, 163 (2): 439-447.
- [21] 范胜涛, 高晓龙, 李元果, 等. 吉林省汉坦病毒宿主动物携带病毒的遗传进化分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (4): 467-471, 475.

收稿日期: 2019-01-29 修回日期: 2019-02-25 本文编辑: 徐文璐