

黑龙江及吉林省边境口岸与境外全沟硬蜱线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因序列的比较研究

马菲雅¹, 梅琳¹, 张雅芬², 王慧煜¹, 刘佳佳¹, 韩雪清¹

1 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018

摘要: **目的** 利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因对我国黑龙江省绥芬河、吉林省延边口岸全沟硬蜱的 COI 基因序列和国外全沟硬蜱 COI 序列进行分析对比研究, 为了解蜱媒病及其防控奠定基础。**方法** 2013 年 6 月至 2016 年 8 月从黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸共采集全沟硬蜱 106 只, 选取 31 只样本提取基因组 DNA, 采用 PCR 方法从蜱基因组中扩增 COI 基因进行同源性分析, 然后构建系统发生树, 并对 2 个地理种群的全沟硬蜱进行遗传距离分析。**结果** 我国黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸的全沟硬蜱 COI 基因序列与俄罗斯多个地区同源性为 99%~100%, 与哈萨克斯坦边境口岸阿尔泰地区的全沟硬蜱 COI 序列同源性也达到 99%~100%; 绥芬河口岸和延边口岸全沟硬蜱的遗传距离 ≤ 0.003 。**结论** 我国绥芬河口岸和延边口岸的全沟硬蜱与周边邻近国家的全沟硬蜱 COI 基因序列高度一致, 可能存在极高的基因交流或迁移。

关键词: 种群遗传; 同源性; 遗传距离; 系统发生分析

中图分类号: R384.4 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)01-0047-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.01.010

A comparative analysis of the sequence of cytochrome C oxidase subunit I gene in *Ixodes persulcatus* from Heilongjiang and Jilin ports and foreign countries

MA Fei-ya¹, MEI Lin¹, ZHANG Ya-fen², WANG Hui-yu¹, LIU Jia-jia¹, HAN Xue-qing¹

1 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2 China Jiliang University, College of Life and Sciences

Corresponding author: HAN Xue-qing, Email: xqhancai@163.com

Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0501803)

Abstract: Objective To investigate the difference in the sequence of cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene in *Ixodes persulcatus* from the Heilongjiang Suifenhe and Jilin Yanbian ports in China and foreign countries, and to provide a basis for the prevention and control of tick-borne diseases. **Methods** From June 2013 to August 2016, a total of 106 *I. persulcatus* ticks were captured at Heilongjiang Suifenhe and Jilin Yanbian ports, among which 31 were selected to extract genomic DNA. PCR was used for the amplification of the COI gene, and then a homology analysis was performed, a phylogenetic tree was established, and a genetic distance analysis was performed for two geographical populations of *I. persulcatus*. **Results** The sequence of the COI gene in *I. persulcatus* from Heilongjiang Suifenhe and Jilin Yanbian ports had a homology of 99%–100% with the sequence of the COI gene in *I. persulcatus* from Russia and the Altai region in the border of Kazakhstan. The genetic distance of *I. persulcatus* from Suifenhe and Yanbian ports was ≤ 0.003 . **Conclusion** The sequence of the COI gene in *I. persulcatus* from Suifenhe and Yanbian ports in China is highly consistent with that from neighboring countries. There may exist a high level of gene exchange or migration.

Key words: Population genetics; Homology; Genetic distance; Phylogenetic analysis

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划(2017YFD0501803)

作者简介: 马菲雅, 女, 硕士, 从事分子生物学研究, Email: mfyosophia@126.com; 梅琳, 女, 副研究员, 从事病原生物学及防控研究,

Email: meilin200808@sina.com

通信作者: 韩雪清, Email: xqhancai@163.com

马菲雅、梅琳同为第一作者

网络出版时间: 2018-12-06 20:43 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

目前世界上蜱类有 3 科 18 属 897 种。其中中国已描述有效定名蜱类有 2 科 10 属 119 种,我国已记录的硬蜱科约 100 种,软蜱科 10 种^[1]。全沟硬蜱 (*Ixodes persulcatus*) 是典型的森林蜱种,是一种专性吸血、可长期存活的三宿主寄生动物。它作为硬蜱科的主要种类,在全球分布广泛,范围横跨欧亚大陆。20 世纪 90 年代以前,全沟硬蜱在我国黑龙江、吉林、辽宁、甘肃、山西省、新疆维吾尔自治区(新疆)、西藏自治区(西藏)均有分布,随着气候变暖、人类活动等原因,蜱种群分布面积扩大,蜱传病原体增多^[2]。它可以携带多种病原体并且传染给人和动物,造成多种病毒病和细菌病的发生^[3]。目前,我国已经被证实由全沟硬蜱传播的疾病有森林脑炎、莱姆病、人埃立克次体病^[4-6]。近几年的研究表明,全沟硬蜱的种群分布范围更有扩大的趋势^[7]。

在传播病原体的过程中,蜱类的生物学特性在蜱媒病的流行特征中起决定性作用,近年来遗传多样性研究越来越受到关注。然而目前我国对边境口岸地区的全沟硬蜱缺乏分子特征的研究,用分子生物学方法对我国边境口岸的全沟硬蜱基因进行溯源和对比分析非常重要。因此,基于全沟硬蜱的自然地理分布,研究我国以及其他国家全沟硬蜱的系统发育关系及遗传结构,有利于了解全沟硬蜱在我国的遗传特点和发展趋势,从而对蜱传播的人、畜共患病的防控提供理论基础和依据。本研究依据细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因分析了我国黑龙江、吉林省边境口岸全沟硬蜱的同源性及种群遗传距离,并且与国外已报道的全沟硬蜱 CO I 基因序列进行对比分析,从生物系统发育的角度分析其发展趋势及可能性。

1 材料与方法

1.1 实验材料 自 2013 年 6 月至 2016 年 8 月在黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸采集全沟硬蜱 106 只,采集的蜱放入采集管内带回实验室,随后选取 31 只进行 CO I 基因序列扩增并将相关序列登记在 GenBank 中。具体采集及序列号信息见表 1。

表 1 实验用蜱采集信息

Table 1 Information on the collection of experimental samples

采集地点	样品数量 (只)	测定数量 (条)	GenBank 登录号
黑龙江省绥芬河市	70	17	MH135792(SFH 1)
			MH135796(SFH 3)
			MH135797(SFH 4)
			MH135799(SFH 5)
			MH135800(SFH 6)
			MH135794(JL 1)
吉林省延边市	36	14	MH135798(JL 3)

1.2 主要仪器设备 Bio-Rad 核酸电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像分析仪,美国伯乐公司生产;ABI Veriti96 PCR 仪,美国 ABI 公司生产;Christ Mill-Q 纯水系统,德国 Christ 公司生产。

1.3 基因扩增及测序 样品置于 1.5 ml 离心管中,使用 DNA 快速提取试剂盒(美国 Omega 公司)并按照说明书提取基因总 DNA,于 -20 °C 保存样品备用。PCR CO I 正向引物:5' -GGA ACA ATA TAT TTA ATT TTT GG-3' 和 CO I 反向引物:5' -ATC TAT CCC TAC TGT AAA TAT ATG-3'。以提取的 DNA 为模板,扩增 CO I 基因片段。扩增体系共 20 μ l: 正、反向引物各 0.8 μ l, Tap PCR Master Mix 10 μ l, ddH₂O 8 μ l, DNA 0.4 μ l。PCR 反应条件:预变性 96 °C 10 min,变性 96 °C 30 s,退火 56 °C 30 s,延伸 68 °C 1 min,延伸 72 °C 10 min。扩增产物经过纯化后由北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.4 数据分析 用 CLC Genomics Workbench 软件对格式进行转换并对序列方向进行修正,然后在美国国立生物技术信息中心(NCBI)进行 BLAST 同源性对比并选择相应的参考株。用 MEGA 6.0 软件采用 Maximum-Likelihood (ML) 法构建系统发育进化树,进行 1 000 次自举检验。通过 MEGA 6.0 软件计算地理种群间的遗传距离,并且分析和计算序列的保守位点、变异位点、简约信息位点以及碱基组成。

2 结果

2.1 序列特征分析 共采集全沟硬蜱 106 只,样品采集信息见表 1。蜱样本 CO I 基因 PCR 产物获得的序列共计 31 条,基因序列碱基长为 630 bp。全沟硬蜱的 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 29.4%、37.9%、18.3% 和 14.4%, A+T 碱基含量为 67.3%,保守位点为 468 个,变异位点为 162 个,简约信息位点为 68 个。

2.2 同源性分析 通过与 GenBank 中已登录的邻近国家(包括俄罗斯的新西伯利亚、阿尔泰、乌拉尔、托木斯克地区以及哈萨克斯坦的阿尔泰边境地区)全沟硬蜱的 CO I 基因序列进行对比,发现我国黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸全沟硬蜱 CO I 基因序列与俄罗斯的阿尔泰株 KC688405、新西伯利亚株 KC688395 以及乌拉尔株 KC688370 的同源性均为 100%;与托木斯克株 JX288764 的同源性为 99%。与哈萨克斯坦阿尔泰边境地区的参考株 KC688406 和 KC688364 株相比,同源性分别为 99% 和 100%。此外,与国内其他省份分离的全沟硬蜱 CO I 序列对比分析结果见图 1,与 HM193868 内蒙古株、HM193867 北京株同源性均为 100%,与

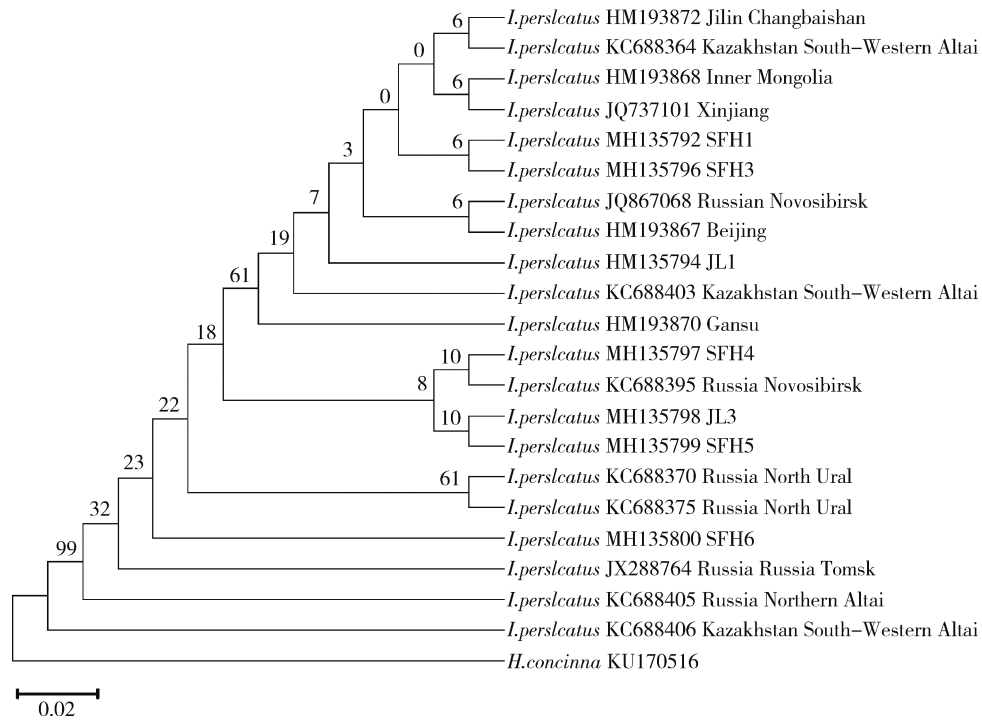


图1 基于CO I 基因的ML系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree inferred by the ML method based on the CO I gene

JQ737101 新疆株同源性为 99%，与 HM193870 甘肃株同源性为 97%。

2.3 遗传距离分析 除构建系统发育树分析同源性之外，还对绥芬河及延边口岸 2 个地理种群全沟硬蜱的 CO I 基因序列进行了遗传距离分析。根据 Kimura 双参数模型(K2-P 模型)得出各种内的遗传距离(表 2)。通过对全沟硬蜱 CO I 基因遗传距离

的分析可以看出，黑龙江省绥芬河口岸的几株全沟硬蜱 CO I 序列遗传距离均 ≤ 0.003。黑龙江省绥芬河株与吉林省延边株的遗传距离也均 ≤ 0.003，而延边株 MH135794 和 MH135798 的遗传距离仅为 0.002。由此可见，黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸全沟硬蜱地理种群间遗传距离相差较小。

表2 基于CO I 的全沟硬蜱遗传距离分析(K2-P模型)

Table 2 A genetic distance analysis of Ixodes persulcatus based on the CO I gene (K2-P pattern)

GenBank ID号	MH135792	MH135796	MH135797	MH135799	MH135800	MH135794	MH135798
MH135792(SFH 1)							
MH135796(SFH 3)	0.000						
MH135797(SFH 4)	0.002	0.002					
MH135799(SFH 5)	0.002	0.002	0.000				
MH135800(SFH 6)	0.003	0.003	0.002	0.002			
MH135794(JL 1)	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003		
MH135798(JL 3)	0.002	0.002	0.000	0.000	0.002	0.002	

3 讨论

黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸是我国北部重要的边境口岸，与哈萨克斯坦、俄罗斯、韩国、蒙古等国家在地理上较邻近，因此，分析邻近国家边境口岸和我国边境口岸全沟硬蜱的分子特征非常重要。

俄罗斯边境的乌拉尔地区位于俄罗斯欧洲部分与亚洲连接处，而阿尔泰地区与哈萨克斯坦、中国、俄罗斯 3 国相接壤。由分析结果可以看出，黑龙江省绥芬河口岸和吉林省延边口岸地区的 CO I 基因序列与俄罗斯多个地区(新西伯利亚、阿尔泰、乌拉

尔、托木斯克)同源性高达 99%~100%，而与哈萨克斯坦阿尔泰边境地区的全沟硬蜱 CO I 序列也极高，表明中国与这 2 个国家的全沟硬蜱基因交流非常频繁，很有可能通过中国的内蒙古和新疆等地与国内其他地区的全沟硬蜱进行基因交流和种群迁移。而此次在绥芬河和延边口岸采集到的全沟硬蜱与上述国家全沟硬蜱 CO I 基因同源性极高的原因可能有：(1)近几年我国北部边境口岸进出口贸易不断扩大，尤其是国外大量动物皮毛的进口，使其携带的包括全沟硬蜱在内的各种媒介生物随着交通工具的运输传入我国境内。(2)我国新 (下转第 55 页)

- [11] Huang Y, Guo Q, Sun XL, et al. *Culex pipiens pallens* cuticular protein *CPLCG5* participates in pyrethroid resistance by forming a rigid matrix[J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1): 6. DOI: 10.1186/s13071-017-2567-9.
- [12] Vannini L, Reed TW, Willis JH. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species [J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7: 24. DOI: 10.1186/1756-3305-7-24.
- [13] Zhou D, Duan BY, Sun Y, et al. Preliminary characterization of putative structural cuticular proteins in the malaria vector *Anopheles sinensis* [J]. *Pest Manag Sci*, 2017, 73(12): 2519-2528. DOI: 10.1002/ps.4649.
- [14] Liang Y, Gao XW. The cuticle protein gene *MPCP4* of *Myzus persicae* (homoptera: aphididae) plays a critical role in Cucumber mosaic virus acquisition [J]. *J Econ Entomol*, 2017, 110(3): 848-853. DOI: 10.1093/jee/tox025.
- [15] 谭文彬, 王霄, 袁常秀, 等. 3 种品系白纹伊蚊 IRE-BP1 基因表达差异的比较 [J]. 国外医学医学地理分册, 2012, 33(4): 230-232. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8883.2012.04.003.
- [16] 谭文彬, 王霄, 袁常秀, 等. IRE-BP1 基因在 3 种淡色库蚊体内表达量的比较分析 [J]. 中国热带医学, 2012, 12(4): 421-422, 426. DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2012.04.015.
- [17] 陆靖, 史琦琪, 程鹏, 等. 淡色库蚊抗性种群和敏感品系中铁蛋白基因表达量的分析 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2018, 29(2): 134-137, 142. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.02.005.
- [18] Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins [J]. *Ann Rev Biochem*, 1980, 49: 357-393. DOI: 10.1146/annurev.bi.49.070180.002041.
- [19] Tong WH, Rouault TA. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(3): 199-210. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.003.
- [20] Li KT, Tong WH, Hughes RM, et al. Roles of the mammalian cytosolic cysteine desulfurase, ISCS, and scaffold protein, ISCU, in iron-sulfur cluster assembly [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(18): 12344-12351. DOI: 10.1074/jbc.M600582200.
- [21] Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 1992, 12(5): 417-427. DOI: 10.1016/0891-5849(92)90091-T.
- [22] Thomson AM, Rogers JT, Leedman PJ. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(10): 1139-1152. DOI: 10.1016/S1357-2725(99)00080-1.

收稿日期: 2018-09-03 (编辑: 陈秀丽)

(上接第 49 页)

疆及内蒙古等地有多处湿地自然保护区, 成为候鸟迁徙路线(南亚路线、印巴路线、北非路线)的枢纽位置, 是鸟类迁徙的主要驿站^[8], 从而为全沟硬蜱迁移到我国东北地区提供极其便利的条件。(3) 近年来我国北部地区呈现春季气温长期偏高(平均气温升高 0~1℃)^[9], 降雨量增多的趋势, 这为全沟硬蜱的生存和繁殖提供了良好条件。然而其他一些邻近国家的全沟硬蜱 CO I 序列在 NCBI 中可查信息极少, 所以还需足够的数据以供更深入的分析。

全沟硬蜱能传播森林脑炎、莱姆病、西伯利亚蜱传斑疹伤寒等疾病。目前在俄罗斯全国范围内, 莱姆病是最主要的蜱传疾病; 在阿尔泰地区的蜱类中, 近期已发现未被充分研究的立克次体等病原体^[10], 预示着我国边境口岸地区全沟硬蜱可能携带森林脑炎病毒、立克次体、螺旋体或一些新型病原体, 尤其是在蜱活动高峰期的 5—6 月可能会对动物或居民造成感染, 必须做好严格的防控措施以防疾病的暴发。

参考文献

- [1] 杨晓军, 陈泽, 刘敬泽. 蜱类系统学研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2007, 50(9): 941-949. DOI: 10.3321/j.issn: 0454-6296.2007.09.012.
- [2] De La Fuente J, Estrada-Peña A. Ticks and tick-borne pathogens

on the rise [J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2012, 3(3): 115-116. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.03.001.

- [3] Korenberg EI, Shcherbakov SV, Bannova GG, et al. The infectiousness of *Ixodes persulcatus* ticks with the causative agents of Lyme disease and tick-borne encephalitis simultaneously [J]. *Parazitologiya*, 1990, 24(2): 102-105.
- [4] 许士奇. 全沟硬蜱种群生态及蜱传病原体研究 [D]. 石家庄: 河北师范大学, 2015.
- [5] 马宏宇. 东北地区蜱携带新型病毒的发现及鉴定 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [6] 潘玉平, 杨吉飞, 牛庆丽, 等. 黑龙江省全沟硬蜱携带伯氏疏螺旋体广义种和斑点热群立克次体的研究 [J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(1): 31-37. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2017.01.005.
- [7] 秦少青. 全沟硬蜱及相关疾病 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(10): 15-16. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-6027.2010.10.008.
- [8] Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds [J]. *J Wildl Dis*, 2004, 40(4): 639-659. DOI: 10.7589/0090-3558-40.4.639.
- [9] 董李丽, 李清泉, 丁一汇. 全球变暖背景下我国春季气温的时空变化特征 [J]. *气象*, 2015, 41(10): 1177-1189. DOI: 10.7519/j.issn.1000-0526.2015.10.001.
- [10] Dedkov VG, Simonova EG, Beshlebova OV, et al. The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia [J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2017, 8(5): 787-794. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.06.004.

收稿日期: 2018-08-25 (编辑: 陈秀丽)