

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.05.007

重庆市荣昌区中华田园犬蜱种鉴定及序列分析

陈绍基, 李芳, 谭纯,
贾红菓, 梅四鹏, 周荣琼

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 蜱是专性吸血的外寄生节肢动物, 其种类丰富, 分布广泛, 可携带病原并有传播疾病风险, 给人和动物健康带来威胁。本试验对重庆市荣昌区中华田园犬蜱进行形态学和 16S *rDNA* 分子生物学鉴定及进化分析。形态学鉴定结果显示荣昌区中华田园犬蜱种类为长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis*。对 3 株样本的 16S *rDNA* 基因进行扩增, 测序显示其序列长度为 457~458 bp, 仅存在个别碱基差异。系统发育进化树显示 3 株样本与已经报道的 *H. longicornis* (GeneBank NO. JX051073, KJ710087, MT555304, MN956526) 位于同一个分支, 同源性高达 99.3%~99.6%; 与豪猪血蜱 *H. hystricis* (GeneBank NO. LT593116) 的遗传距离最近, 与微小牛蜱 *Boophilus microplus* (GeneBank NO. AY974242) 的遗传距离最远。

关键词: 中华田园犬; 长角血蜱; 鉴定; 序列分析

中图分类号: Q959.22

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)05-0056-06

蜱隶属节肢动物门 Arthropoda, 蛛形纲 Arachnida, 蜱螨亚纲 Acari, 寄螨总目 Parasiti-formes, 蜱目 Ixodida, 是动物体表专性吸血的寄生虫。蜱大量寄生于动物体表, 可造成宿主贫血、消瘦甚至死亡。蜱虫作为传播媒介, 将体内携带的致病病原体通过叮咬易感动物使其患病, 病原体在体内生长繁殖并且可以长期带毒, 同时扮演着传播媒介和贮藏宿主的双重角色^[1-3], 影响动物机体正常活动。目前已知与蜱类传播相关的病原微生物约 190 种, 多数疾病为人兽共患病, 如森林脑炎、莱姆病、肾综合征出血热、立克次体病^[4-6]等, 严重危害人类健康并且给畜牧业带来巨大的经济损失。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)具有独立的核外遗传密码, 结构简单、进化速率快, 较少发生重组、系母系遗传具有可溯源性的特点, 可作为标记基因使用^[7], 是目前蜱类分子生物学研究中应用最广泛的基因, 主要有 16S *rDNA*, 12S *rDNA*, *COX I* 和 *COX II* 等基因^[8]。线粒体 16S *rDNA* 基因序列由于其保守性、存在的普遍性以及基因序列本身的稳定性, 常作为蜱种间鉴定的遗传标记。本研究利用线粒体基因 16S *rDNA* 对重庆市荣昌区中华田园犬蜱进行种属鉴定及系统发育进化分析, 以期明确动物寄生蜱种类分布和预防蜱传病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本的采集

样本从重庆市荣昌区中华田园犬体表获得, 检查犬耳、颈部、腹股沟、腿根等部位, 发现蜱后用镊子夹住假头基缓慢拔出, 放入样本管内编号、记录。用 75%酒精漂洗 3 次, 再用灭菌蒸馏水冲洗 3 次后

收稿日期: 2020-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672541, 31172313)。

作者简介: 陈绍基, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究。

通信作者: 周荣琼, 教授。

70%酒精保存.

1.2 蜱形态学鉴定

参照《中国经济学昆虫志》^[9],用体式显微镜(ZSA0745B)对蜱进行形态学鉴定,主要对假头、盾板、肛侧板等部位进行测量观察.

1.3 蜱分子生物学鉴定

1.3.1 主要试剂

PCR试剂(MgCl₂、Buffer、dNTPs等)、Taq DNA聚合酶、DL 2000 DNA Marker、琼脂糖、Amp、X-gal、IPTG、重组质粒 pMD19-T(Simple) Vector 购自 TaKaRa 公司;胰蛋白胨(Tryptone)、酵母浸出粉(Yeast extract)购自 Oxiod 公司;蛋白酶 K 购自 Merk 公司;DNA 胶回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自 TransGen Biotech 公司.

1.3.2 DNA 的提取

取出单只蜱置于新的 1.5 mL Eppendorf 管中,用灭菌眼科剪将蜱组织剪碎,加入 270 μ L SDS 裂解液(包括 60 μ L 500 mmol/L NaCl 溶液,30 μ L 100 mmol/L Tris-Cl(pH=8.0),30 μ L 10% SDS,150 μ L 50 mmol/L EDTA(pH=8.0))和 30 μ L 50 μ g/ μ L 蛋白酶 K,充分混匀,隔夜 55 $^{\circ}$ C 水浴 12~24 h,其间多次振荡混匀离心管使组织裂解充分后采用酚/氯仿法抽提样本 DNA. 提取出的 DNA 样品于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用.

1.3.3 PCR 扩增

根据文献[10]提供的线粒体保守引物 16S *rDNA* 进行扩增,预期目的片段约 460 bp. 其核苷酸序列如下:

上游引物 16S-F: 5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'(29 bp)

下游引物 16S-R: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3'(22 bp)

由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成,使用时加灭菌超纯水稀释,浓度为 10 μ mol/L,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用. PCR 反应体系为 25.0 μ L,其中 3.0 μ L Mg²⁺(25 mmol/L),2.0 μ L dNTPs(2.5 μ mol/L),2.5 μ L 10 \times PCR buffer(不含 Mg²⁺),0.25 μ L 上游引物 16S-F(10 μ mol/L),0.25 μ L 下游引物 16S-R(10 μ mol/L),2.0 μ L 模板 DNA,0.125 μ L rTaq 酶(5 U/ μ L),灭菌双蒸水 14.875 μ L. 反应在 PCR 仪 BIO RAD S1000 上进行,反应参数为预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火温度 57 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s,循环反应 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,同时设置阴性对照组. PCR 产物经 10 g/L TAE 琼脂糖凝胶电泳后成像系统显示记录分析结果.

1.3.4 PCR 产物的克隆及测序分析

DNA 胶回收试剂盒切胶纯化 PCR 产物. 将回收的 PCR 产物与 pMD19-T(simple)Vector 载体 16 $^{\circ}$ C PCR 扩增仪连接 1 h. 连接后将上述连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Amp,X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板中,置恒温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12~14 h.

挑取阳性克隆菌液送重庆擎科兴业生物技术有限公司测序. 将测序结果与国际 NCBI 数据库 Blast 核酸比对,同时基于 16S *rDNA* 序列下载了双棘血蜱 *H. bispinosa* (GeneBank NO. KY825195)、豪猪血蜱 *H. hystricis* (GeneBank NO. LT593116)、嗜群血蜱 *H. concinna* (GeneBank NO. KP866207)、日本血蜱 *H. japonica* (GeneBank NO. AB819176)、青海血蜱 *H. qinghaiensis* (GeneBank NO. MF629896)、波斯锐缘蜱 *Argas persicus* (GeneBank NO. GU451248)、龟形花蜱 *Amblyomma testudinarium* (GeneBank NO. KC170737)、微小牛蜱 *Boophilus microplus* (GeneBank NO. AY974242)、鸡蜱刺螨 *Dermanyssus gallinae* (GeneBank NO. LC029798)、草原革蜱 *Dermacentor nuttalli* (GeneBank NO. MK032591)、残缘璃眼蜱 *Hyalomma detritum* (GeneBank NO. KP210065)、全沟硬蜱 *Ixodes persulcatus* (GeneBank NO. MF095807)、柏氏禽刺螨 *Ornithonyssus bacoti* (GeneBank NO. AM921905)、血红扇头蜱 *Rhipicephalus sanguineus* (GeneBank NO. JX997393),用 MEGA 4.0 构建种系发育进化树,明确该蜱与其他蜱种的亲缘关系(图 1).

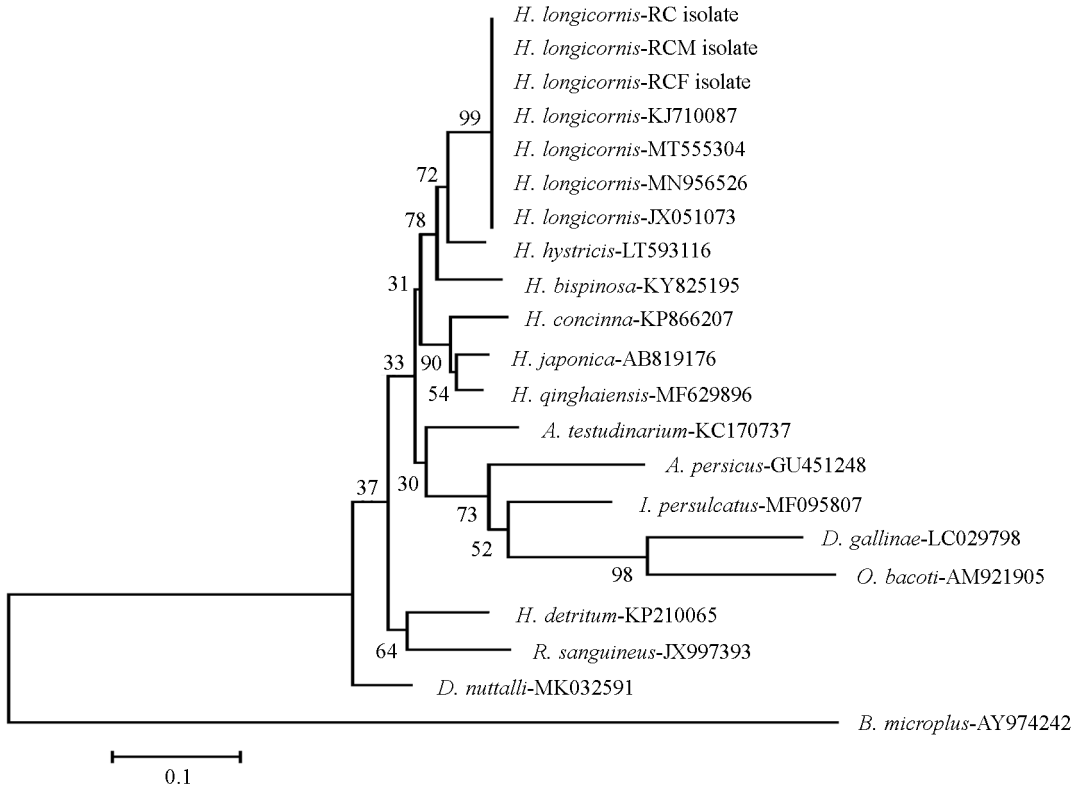


图 1 基于 16S *rDNA* 序列构建的 *H. longicornis* 系统发育分析

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

在体式显微镜下可明显观察到其形态特征：躯体背部有坚硬盾板，边缘呈均匀的弧状，躯体尾部皮纹清楚，缘垛明显，共有 11 个(图 2a)。躯体腹面足四对，生殖孔位于腹前部正中、II-III 基节间，II-IV 基节内距明显超过体后缘，粗细均匀中等，基节 I 呈锥形，内距发达，后缘不分叉(图 2b)。假头背面，须肢宽短，外缘向外侧中度突出，呈角状，第 II 节背面有三角形短刺，腹面有锥形的长刺，假头基呈矩形(图 2c)。气门板位于第 IV 基节后部，呈 D 字隆起，左右对称(图 2d)，经形态学初步鉴定为长角血蜱。选取样本 3 株进行后续试验(表 1)。

表 1 本试验所用长角血蜱样本

样本编码	发育阶段	宿主
<i>H. longicornis</i> -RC isolate	成虫	犬
<i>H. longicornis</i> -RCF isolate	成虫	犬
<i>H. longicornis</i> -RCM isolate	成虫	犬

2.2 分子生物学鉴定

2.2.1 PCR 扩增产物结果

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示，3 株样本在约 460 bp 处可见明显条带，与预期片段大小相符，阴性对照没有出现条带(图 3)。

2.2.2 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

阳性克隆的重组质粒菌液 PCR 扩增后经琼脂糖凝胶电泳显示，3 株样本重组质粒菌液扩增出约 460 bp 的 16S *rDNA* 条带，与预期片段大小相符，阴性对照没有出现条带(图 4)。

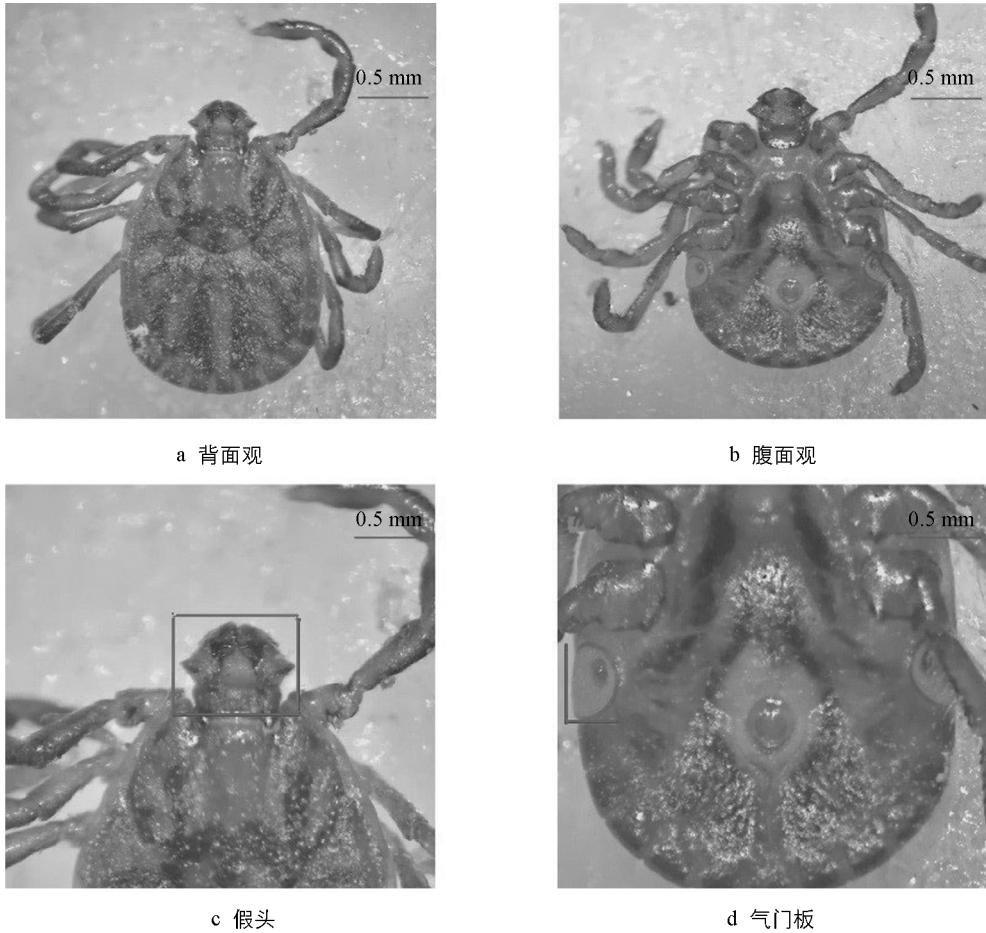
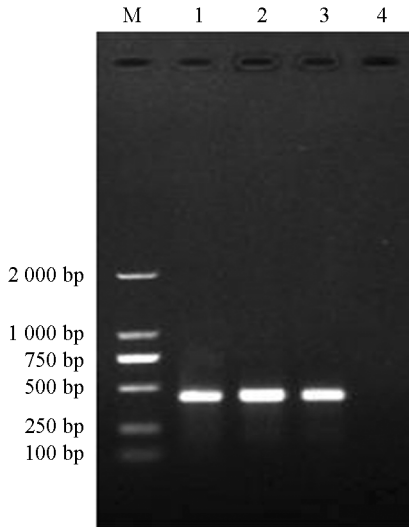
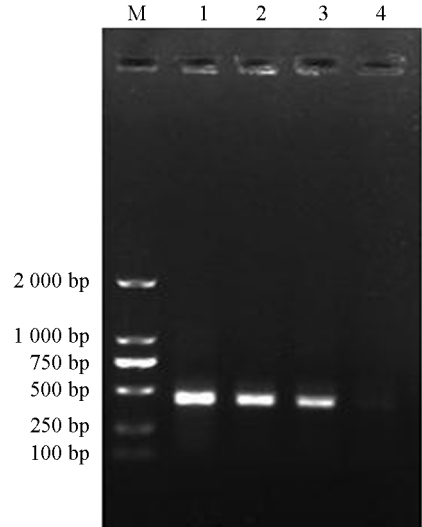


图 2 长角血蜱的形态特征



M. DNA 相对分子质量标准; 1. *H. longicornis*-RC 16S PCR; 2. *H. longicornis*-RCF 16S PCR; 3. *H. longicornis*-RCM 16S PCR; 4. 阴性对照.

图 3 长角血蜱 16S rDNA 的 PCR 扩增结果



M. DNA 相对分子质量标准; 1. *H. longicornis*-RC 重组菌液 PCR; 2. *H. longicornis*-RCF 重组菌液 PCR; 3. *H. longicornis*-RCM 重组菌液 PCR; 4. 阴性对照.

图 4 长角血蜱重组质粒的 PCR 鉴定

2.3 测序结果及种系发育进化树分析

对 PCR 鉴定为阳性的重组菌液测序, 结果显示 3 株样本获得的 PCR 产物序列长度基本一致, 为 457~458 bp, 仅 RC 株有一个碱基的差异(163 bp 处缺少碱基 A). 经 NCBI 网站 Blast 比对, 本研究获得的蜱

16S *rDNA* 序列与 *H. longicornis* (GeneBank NO. JX051073, KJ710087, MT555304, MN956526) 进行分析, 结果显示其同源性达 99.3%~99.6%。将本次研究测序所得的 3 株 *H. longicornis* 序列与下载的 18 株序列应用程序 MegAlign 4.0 中的 NJ 构建种系发育进化树(图 1), 显示 3 株 *H. longicornis* 重庆市荣昌区分离株与 GeneBank 登记的 *H. longicornis* (GeneBank NO. JX051073, KJ710087, MT555304, MN956526) 位于同一个分支上, 表明其均为同一个物种。本研究获得的蜱 16S *rDNA* 序列与 GeneBank 上收录的豪猪血蜱 *H. hystricis* (GeneBank NO. LT593116) 的遗传距离最近, 与微小牛蜱 *B. microplus* (GeneBank NO. AY974242) 的遗传距离最远。

3 结 语

长角血蜱在分类上属于硬蜱科 Ixodidae, 血蜱属 *Haemaphysalis*, 已在我国多个省区发现该蜱, 是最为常见的蜱种之一。由于蜱不仅在动物体表叮咬吸血使得宿主失血较多出现贫血消瘦症状, 经久不愈影响生产性能, 而且由于叮咬降低动物表皮商品质量, 给畜牧养殖产业造成巨大的经济损失。长角血蜱更是多种重要疾病的传播媒介, 可将多种疾病如 Q 热、莱姆病、某些巴贝斯虫病等传给人类, 对人类健康构成较大的威胁, 并且不断有新发的蜱传病原被检测出, 如近年来研究证实长角血蜱可作为发热伴血小板减少综合征病毒(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)的中间宿主^[10], 能引起机体发热伴血小板减少(Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)。

蜱在全球分布范围广, 目前全世界记载蜱种有 3 科共 899 种^[11], 我国已记录蜱有 9 属 124 种^[12], 种类繁多, 外观形态上有许多相似物种, 并且由于其表型可塑性、地区遗传多样性和生长环境不同, 同一物种不同个体间也有差异, 常易导致鉴定错误。仅凭形态学特征对蜱进行物种鉴定要求研究者具备丰富的专业知识储备, 这种鉴定具有一定的难度。因此, 借用分子生物学技术准确鉴定蜱的方法普遍被人们所接受。

动物线粒体 DNA(mtDNA)以高拷贝数目存在于线粒体内, 主要有 16S *rDNA*, 12S *rDNA*, *COX I* 和 *COX II* 等基因, 目前已被广泛应用于蜱类系统发育、种群遗传变异与分化以及形态学上难以区分的近缘种的鉴别等。16S *rDNA* 是动物线粒体内较为保守的基因, 具有进化速率缓慢, 以替换为主的特点, 可以很方便地使用通用引物或者保守引物进行 PCR 扩增^[13-14]。研究证实 16S *rDNA* 能作为 *H. longicornis* 分类鉴定和群体遗传研究的分子标记, Lv 等^[15]利用 16S *rDNA* 分子标记对湖北省铃头血蜱和褐黄血蜱进行种属鉴定; 刘琴等^[16]基于 16S *rDNA* 序列探讨了长角血蜱、褐黄血蜱及铃头血蜱的系统发育进化关系。本试验以 *H. longicornis* 为对象开展研究, 测序结果显示 3 株 *H. longicornis* 的 16S *rDNA* 序列基本一致, 仅 RC 株位于 163 bp 处有碱基差异; 种系发育进化分析显示 3 株样本与 GeneBank 上收录的 *H. hystricis* 遗传距离最近, 在分类上 *H. longicornis* 与 *H. hystricis* 同归于血蜱属, 证实了 16S *rDNA* 是 *H. longicornis* 进行种间鉴定的遗传标记。本文对重庆市荣昌区媒介蜱进行研究报道, 为后续该蜱类鉴定、遗传分析及蜱传病防治等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] MOHAN K V K, LEIBY D A. Emerging Tick-Borne Diseases and Blood Safety: Summary of a Public Workshop [J]. *Transfusion*, 2020, 60(7): 1624-1632.
- [2] FOTSO FOTSO A, MEDIANNIKOV O, PADMANABHAN R, et al. Genome Sequence of *Borrelia Crociduræ* Strain 03-02, a Clinical Isolate from Senegal [J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01150-14.
- [3] LIU Q, HE B, HUANG S Y, et al. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, an Emerging Tick-Borne Zoonosis [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(8): 763-772.
- [4] SWEI A, RUSSELL B J, NACCACHE S N, et al. The Genome Sequence of Lone Star Virus, a Highly Divergent Bunyavirus Found in the *Amblyomma Americanum* Tick [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62083. DOI: 10.1371/journal.pone.0062083.
- [5] MOURYA D T, YADAV P D, BASU A, et al. Malsoor Virus, a Novel Bat Phlebovirus, is Closely Related to Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus and Heartland Virus [J]. *J Virol*, 2014, 88(6): 3605-3609.
- [6] WANG J, SELLECK P, YU M, et al. Novel Phlebovirus with Zoonotic Potential Isolated from Ticks, Australia [J].

- Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(6): 1040-1043.
- [7] 黄汉成,王芝英,林洁,等. 黄鱧胃瘤线虫线粒体 *cox1* 基因的多态性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(5): 7-12.
- [8] CHEN Z, YANG X J, BU F J, et al. Morphological, Biological and Molecular Characteristics of Bisexual and Parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis* [J]. Veterinary Parasitology, 2012, 189(2/4): 344-352.
- [9] 邓国藩,姜在阶. 中国经济昆虫志. 第三十九册. 蜱螨亚纲·硬蜱科 [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [10] ZHUANG L, SUN Y, CUI X M, et al. Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus by *Haemaphysalis longicornis* Ticks, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(5): 868-871.
- [11] HORAK I G, CAMICAS J L, KEIRANS J E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a World List of Valid Tick Names [J]. Experimental & Applied Acarology, 2002, 28(1/4): 27-54.
- [12] CHEN Z, YANG X J, BU F J, et al. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of China [J]. Experimental and Applied Acarology, 2010, 51(4): 393-404.
- [13] GENG J J, ZHENG A H, ZOU Z, et al. The Complete Mitochondrial Genome and Phylogenetic Analysis of *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Acari: Ixodidae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2017, 2(2): 856-857.
- [14] CAI X Q, LIU G H, SONG H Q, et al. Sequences and Gene Organization of the Mitochondrial Genomes of the Liver Flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) [J]. Parasitology Research, 2012, 110(1): 235-243.
- [15] LV J, WU S Q, ZHANG Y N, et al. Assessment of Four DNA Fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for Species Identification of the Ixodida (Acari: Ixodida) [J]. Parasites & Vectors, 2014, 7: 93.
- [16] 刘琴,张仪,方圆,等. 基于 16S rDNA 和 COI 基因的 3 种血蜱分子生物学鉴定 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2015, 42(3): 146-151.

Identification and Sequence Analysis of Tick Species of Chinese Rural Dogs in Rongchang District of Chongqing

CHEN Shao-ji, LI Fang, TAN Chun,
JIA Hong-guo, MEI Si-peng, ZHOU Rong-qiong

School of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Ticks are specialized blood-sucking ectoparasitic arthropods which are rich in species and widely distributed. They can carry pathogens and have the risk of spreading diseases, posing a threat to human and animal health. In this experiment, the Chinese rural dog ticks in Rongchang District of Chongqing were identified with morphological and 16S *rDNA* molecular biological methods, and their evolution was analyzed. The morphological identification showed that the tick species of Chinese rural dog in this area was *Haemaphysalis longicornis*. Then the 16S *rDNA* genes of three samples were amplified, and sequencing revealed that their sequence length was 457-458 bp, with differences in only a few bases. The phylogenetic evolutionary tree showed that the three samples were located in the same branch as those already reported for *H. longicornis* (No. JX051073, KJ710087, MT555304 and MN956526), with 99.3% to 99.6% homology; they were close to *H. hystricis* (No. LT593116) with the smallest genetic distance and far apart from *Boophilus microplus* (No. AY974242) with the greatest genetic distance.

Key words: Chinese rural dog; *Haemaphysalis longicornis*; identification; sequence analysis