

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.006

DNA 条形码技术在中缅树鼩隆安种群和昆明种群鉴定中的研究 *

王谷洋 曹 骥[△] 杨 春 李 瑗 李科志 陆玉秀 何 盼 范 倪 唐艳萍

(广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部 广西 南宁 530021)

摘要 目的:本研究利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(CO1)的一段保守区域作为 DNA 条形码技术的研究序列,探讨 DNA 条形码技术对中缅树鼩隆安种群和昆明种群进行分类鉴定的可行性。**方法:**对 22 只广西隆安树鼩和 21 只昆明树鼩样本的 CO1 基因进行 PCR 扩增、测序,应用 MEGA V5 软件对序列进行比对及分析其遗传距离,采用 NJ 法构建系统发育树。**结果:**中缅树鼩种群中,隆安种群、昆明种群和海南亚种的种内遗传距离为 0.00%-0.79%,种群间遗传距离为 9.71%-13.59%,中缅树鼩与普通树鼩的种间遗传距离为 20.43%-24.11%,存在条形码间隔。系统发育树显示:隆安种群、昆明种群及海南亚种分别聚为一小支,分支置信度高达 100%。**结论:**本研究结果表明 DNA 条形码技术有助于树鼩种群和亚种的分类鉴定,经 CO1 基因的测序分析证实广西隆安树鼩和昆明树鼩分属不同的种群。

关键词:CO1 基因;DNA 条形码;中缅树鼩;物种鉴定

中图分类号:Q959;Q343 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)15-2821-04

DNA Barcode Technology in Identification Study of Longan Population and Kunming Population from Tupaia Belangeri*

WANG Gu-yang, CAO Ji[△], YANG Chun, LI Yuan, LI Ke-zhi, LU Yu-xiu, HE Pan, FAN Ni, TANG Yan-ping

(Department of Experimental Research, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

ABSTRACT Objective: Based on the conservative region of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene (CO1) as a DNA barcode technology sequence, the feasibility of DNA barcode technology in identifying Longan and Kunming Population from Tupaia belangeri was explored in this study. **Methods:** CO1 gene were amplified by pcr and sequenced in 22 Guangxi Longan and 21 Kunming tree shrew samples. Sequences were aligned and genetic distance was measured by MEGA V5. The phylogenetic trees were constructed by NJ method. **Results:** The intraspecific genetic distance of Longan population, Kunming population and T.belangeri modesta from Tupaia belangeri was 0.00%-0.79%, the interspecific genetic distance between Tupaia belangeri subspecies was 9.71%-13.59%, and the interspecific genetic distance between Tupaia belangeri and Tupaia glis was 20.43%-24.11%. There is barcode gap. Phylogenetic tree showed that Longan population, Kunming population and T.belangeri modesta from Tupaia belangeri were clustered into three small branches, branches of confidence as high as 100%. **Conclusions:** The results showed that DNA barcode technology is helpful to the classification and identification of tree shrew species and subspecies. Through the CO1 gene sequencing analysis, the study confirms that Longan population and Kunming population from Tupaia belangeri are belong to different species.

Key words: COI gene; DNA Barcoding; Tupaia belangeri; Species identification

Chinese Library Classification(CLC): Q959; Q343 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2821-04

前言

树鼩(tree shrews)在外貌特征上与松鼠酷似,隶属于攀鼩目(Scandentia),目前攀鼩目包含 2 科 5 属,其中树鼩属(Tupaia)种类最丰富,分为 15 种 40 亚种^[1],在中国,中缅树鼩(Tupaia belangeri)主要分布于广西、云南及海南地区,王应祥^[2]根据中缅树鼩的体形外貌特征将我国中缅树鼩分为滇西亚种(T.belangeri chinensis)、滇南亚种(T.belangeri yunalis)、高黎贡山亚种(T.belangeri gaoligongensis)、越北亚种(T.belangeri tonquini-

a)、瑶山亚种(T.belangeri yaoshanensis)及海南亚种(T.belangeri modesta)共 6 个亚种。树鼩具有体形小、繁殖快及饲养成本低等优点,被广泛应用于生物医学实验的多个领域^[3,4]。目前,根据树鼩毛色及头骨数据对攀鼩目动物的系统分类地位进行研究仍存在不少争议^[5],在分子生物学方面,Adkins 等^[6]通过对线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 II 基因(COII)的研究,认为树鼩与灵长类的亲缘关系较近,它们可能来源于同一祖先。而 Schmitz 等^[7]在研究中缅树鼩线粒体基因组的系统进化关系过程中,发现中缅树鼩与兔形目的亲缘关系比灵长类更近。对于研究树鼩

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81260080,81460418);广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019210);

广西科技基础条件平台建设项目(10-108-25)

作者简介:王谷洋(1990-),硕士,研究方向:肝炎树鼩模型,E-mail:1183591881@qq.com

[△] 通讯作者:曹骥(1973-),硕士生导师,研究方向:肝癌病因学,E-mail:caojicn@163.com

(收稿日期:2016-12-10 接受日期:2016-12-28)

系统分类地位的关系,根据其形态学数据与当前的分子证据尚无统一结论,因此,亟需一种新的物种鉴定体系。

近年来随着分子生物学研究的深入,加拿大分类学家 Paul Hebert 等^[8]提出 DNA 条形码技术,即以线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(CO1)的序列多样性为基础的条形码鉴别系统。目前,CO1 基因是动物 DNA 条形码技术最常用的基因片段,在动物界,该序列的种间差异可以很好地鉴别除刺细胞动物门以外的所有物种^[9],此外,CO1 序列很少出现插入和缺失,有足够变异的同时也容易被通用引物扩增,这些优点使 CO1 基因成为公认的动物界中最合适的 DNA 条形码标准基因。

本研究选取来源于广西隆安县龙虎山附近和昆明市禄劝县崇德乡的树鼩,通过 DNA 条形码技术对它们进行测序鉴别,探索条形码技术在树鼩种群鉴定上的可行性,以期在树鼩在医药研究领域的合理利用及保护遗传学方面提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究共选取中缅树鼩隆安种群 22 只,昆明种群 21 只,其中雌性各半,均随机从种群中抽取。使用一次性注射器从树鼩一侧大腿股静脉采血 0.5 mL,立即进行 EDTA 抗凝剂处理,每抽取一只树鼩静脉血需更换一支注射器。

1.2 DNA 提取

使用天根生化科技(北京)有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒(DP318-02),进行树鼩静脉血总 DNA 的提取。

1.3 PCR 扩增及测序

采用 CO1 基因通用引物序列扩增 DNA Barcoding 的目的片段,上下游引物分别是 LCO1490(5'-GGTCAACAAAT-CATAAAGATATTGG-3')和 HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGT-GACCAAAAAAT CA-3')^[10]。PCR 反应采用 Takara Ex Taq (RR902A)扩增酶,反应体系为 50 μ L。PCR 反参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;然后先处理 5 个循环,包括:94 $^{\circ}$ C 变性 40 S,45 $^{\circ}$ C 退火 40 S,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;接着为 35 个循环,包括:94 $^{\circ}$ C 变性 40 S,54 $^{\circ}$ C 退火 40 S,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测后由上海生物工程有限公司进行纯化并双向测序,测序均在 ABI-3730 测序仪上进行。

1.4 数据处理

双向测序结果返回后,利用 DNAStar V7.1 软件包中的 SeqMan 对每个样品进行正反向拼接,如果拼接过程出现正反向序列不配对情况则通过查阅荧光图谱进行校正,然后在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析,以确定所扩增的目的基因序列源自中缅树鼩种群。通过 MEGA V5 软件内置的 clustal W 程序进行序列多重比对并去掉正反向引物序列。

在 GeneBank 检索获得海南亚种和普通树鼩的 CO1 基因序列,采用 MEGA V5 软件对本实验获得的及检索到的树鼩 CO1 序列进行比对,使用 Kimura-2-parameter 模型(K2P 模型)分析种内不同个体间的遗传距离和属内不同种个体间的遗传距离,并对核苷酸转换与颠换的饱和性进行分析;使用邻接法(NJ 法)对比对的序列构建系统发育树,为了检验每个分支节点的可靠程度,通过 MEGA V5 软件进行 1000 次重复的无参

数自检举分析(Non-parametric bootstrap analysis; BS)。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测含有 638 bp 特异片段的 PCR 粗产物(图 1),其中第 1 与第 21 泳道为 Marker,20 个中缅树鼩样品的 PCR 产物条带清晰明显且特异性高。

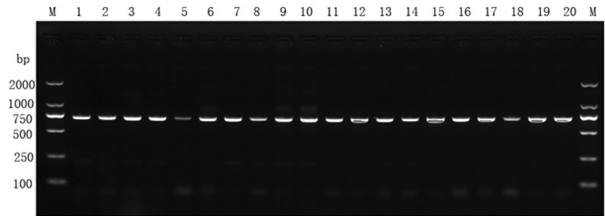


图 1 中缅树鼩 CO1 基因 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products of *Tupaia belangeri* CO1 gene

M, DNA 分子质量标记;1-10,昆明种群编号;11-20:隆安种群编号
M, DNA Marker; 1-10, Population number in Kunming; 11-20: Population number in Longan

2.2 序列组成及变异

使用 DNAStar V7.1 软件包对 43 个中缅树鼩样品的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因进行拼接,所得序列通过 Blast 比对分析,发现隆安种群和昆明种群拼接后的序列与其目的片段同源性分别为 100%和 99%。应用 MEGA V5 软件内置的 clustal W 程序对 CO1 基因序列(含 GenBank 中下载的树鼩 CO1 基因序列)进行序列多重比对并去掉正反向引物序列得到长度为 638 bp 的 CO1 基因片段,分析其碱基组成,结果显示 CO1 基因序列中没有出现碱基插入和缺失现象。在 638 个碱基位点中,保守位点 470 个,比例约为 73.7%,变异位点 168 个,比例约为 26.3%,简约信息位点 97 个,比例约为 15.2%。自裔位点 71 个,比例为 11.1%。A、T、C、G 四种碱基的平均含量分别为 25.1%、29.3%、27.1%、18.5%,其中,G 的含量最少,A+T 的平均含量为 54.4%,明显高于 C+G 的平均含量为 45.6%,中缅树鼩 CO1 基因序列核苷酸碱基构成出现了明显的 A+T 含量偏倚现象,符合脊椎动物线粒体 DNA 碱基组成的特点。

2.3 遗传距离

物种的鉴别标准是比较种内与种间遗传距离的大小,本研究使用 MEGA V5 软件基于 K2P 模型计算出 CO1 基因序列间的遗传距离,按照分类阶元进行统计分析,所研究的中缅树鼩的 3 个种群中,隆安种群的种内遗传距离在 0.00%-0.63%之间,平均种内遗传距离 0.15%;昆明种群的种内遗传距离在 0.00%-0.47%之间,平均种内遗传距离为 0.06%;海南亚种的种内遗传距离是 0.79%。

中缅树鼩各亚种间遗传距离范围在 9.71%至 13.59%之间,其中隆安种群与昆明种群间的遗传距离最小,在 9.71%-10.44%之间,平均遗传距离为 9.77%,而隆安种群与海南亚种的遗传距离最大,在 13.16%-13.59%之间,平均遗传距离为 13.30%,此外,昆明种群与海南亚种的遗传距离范围为 10.51%-11.64%,平均遗传距离为 10.83%。

中缅树鼩与普通树鼩(*T. glis*)的种间遗传距离范围为

20.43%-24.11%, 其中, 海南亚种与普通树鼩的遗传距离最小, 平均遗传距离为 20.43%; 昆明种群与普通树鼩的遗传距离最大, 在 23.66%-24.11% 之间, 平均遗传距离为 23.71%; 隆安种群与普通树鼩的遗传距离在 23.44%-23.70% 之间, 平均遗传距离为 23.66%。中缅树鼩同一亚种不同个体间的遗传距离均明显小于亚种群间的遗传距离, 且中缅树鼩亚种群间的遗传距离小于中缅树鼩与普通树鼩种间遗传距离, 存在明显条形码间隔 (Barcoding gap)^[11] (图 2)。

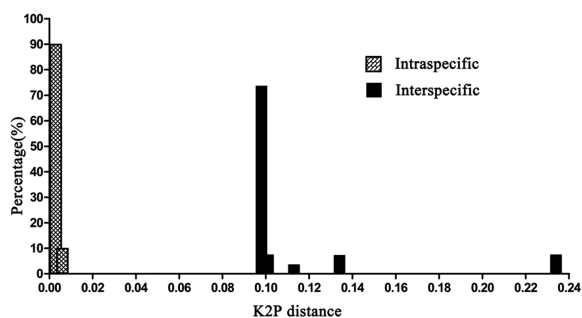


图 2 种内与种间 K2P 遗传距离的分布情况

Fig.2 The distribution of the K2P genetic distance of intraspecific and interspecific

2.4 碱基替换饱和和性分析

碱基替换饱和和性分析是指以 COI 基因序列的校正 P 距离 (转换 + 颠换) 为横坐标, 分别以序列的转换数 (Ts) 和颠换数 (Tv) 为纵坐标作散点图, 根据二者的关系分析树鼩 COI 基因的替换饱和和性 (图 3)。从散点图中可知: COI 基因序列的转换 (Ts) 和颠换 (Tv) 有着良好的线性增长关系, 二者均未呈现饱和和, 说明树鼩 COI 基因序列可靠, 可以进行建树分析。

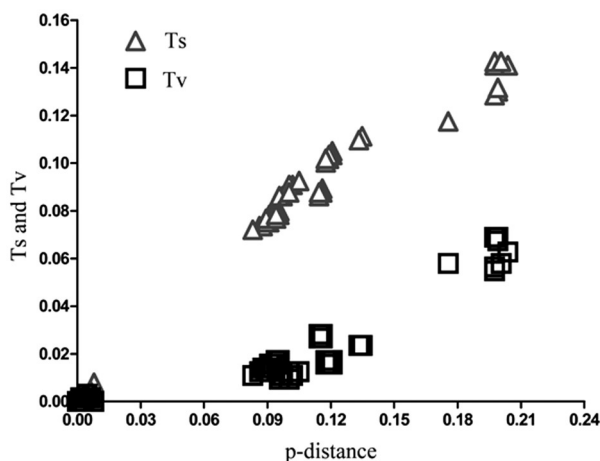


图 3 COI 基因碱基替换饱和和性分析

Fig.3 Saturation analysis of nucleotide substitutions in COI gene

2.5 系统发育树

应用 MEGA V5 软件, 采用邻接法 (NJ 法) 构建所有树鼩样本序列 (包括 GenBank 下载序列) 之间的系统发育树 (图 4), 结果显示, 中缅树鼩各亚种的个体聚集趋势明显, 其中隆安种群, 编号为 G01-G22 聚成一支, 昆明种群中缅树鼩, 编号为 K01-K21 聚为一支, 海南亚种的 2 条序列聚成一小支, 它们的分支置信度均高达 100%; 隆安种群、昆明种群及海南亚种聚成

一大支, 共同组成中缅树鼩的一部分。普通树鼩单独聚在 NJ 树的外支, 与中缅树鼩组成树鼩属不同物种的一部分。

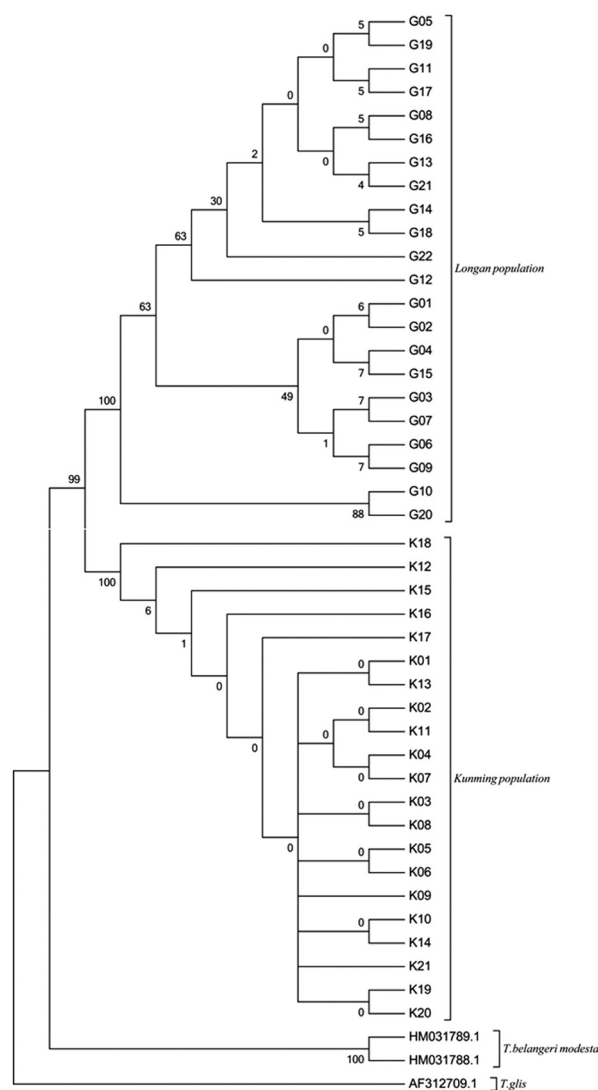


图 4 邻接法 (NJ 法) 系统发育树

Fig.4 Adjacency method (NJ method) phylogenetic tree

3 讨论

现代商品零售业中使用的条形码技术明显缩短了信息识别时间、提高了信息识别的效率和精确度。类似地, Hebert^[8]首次提出在生物分类学上可以利用商业条形码的技术原理实现物种的高效识别, 即根据对一个统一的目标基因 DNA 序列的分析来完成物种鉴定的过程。DNA 序列包含了 A、T、C、G 4 种碱基, 由于蛋白编码基因存在密码子的简并性, 因此, 一段 DNA 序列只需 45 个碱基, 就可以获得约 10 亿种不同的编码方式。以现代分子生物学技术的发展趋势来看, 可以通过分析一段拥有几百个碱基的基因的序列信息来完成 DNA 条形码技术的编码工作, 理论上可以识别地球上现存的所有物种^[12]。而本研究涉及的树鼩 COI 基因包含了 638 个碱基, 证实了它可以作为树鼩 DNA 条形码标准基因的可行性。

理想的 DNA 条形码标记需要同时满足以下条件^[13]: (1) 选择的 DNA 条形码标记要求有适当的变异速率, 同一物种的不同个体之间的序列差异要明显小于不同种间的序列差异, 即具

有条形码间隔^[1]; (2) 不同种群使用统一标准的条形码标记位点; (3) 选择的标记位点中包含足够的系统发育信息; (4) 该 DNA 标记具有用于设计通用引物的序列保守区域, 可以对生物样本进行稳定的 PCR 扩增; (5) DNA 序列具有适宜的长度, 以保证 PCR 扩增质量及后续的测序检测。由于核内基因过于保守, 而线粒体 12S 和 16S 基因存在较多的插入和缺失现象, Hebert 等^[8]最终选定了 COI 基因做为 DNA 条形码的标准基因, 目前许多研究表明 COI 基因是许多鱼类^[14]、昆虫^[15]和鸟类^[16]等动物分类与鉴别的理想 DNA 条形码标记。本研究中的 22 只广西隆安树鼩和 21 只昆明树鼩样本采用 COI 基因通用引物进行 PCR 扩增, 获得长度为 638 bp 的 COI 基因片段, 树鼩 COI 基因包含了足够的种属遗传信息, 理论上完全可以应用于树鼩的种群鉴定。

DNA 条形码技术在哺乳动物分类研究中的应用是近几年的热点, Yang C^[17]使用 DNA 条形码技术鉴定陕西麝香鹿物种是 *M. berezovskii* 而非之前形态学方法认为的 *M. moschiferus*。此外, 在保护濒危野生动物方面, Bitanyi^[18]利用 DNA 条形码技术有效鉴别了坦桑尼亚羚羊物种。目前, 树鼩做为一类新型且富有前景的实验动物受到人们的广泛关注, 部分学者通过线粒体基因序列数据来探讨树鼩系统进化分类地位的问题, 贾婷等^[19]对昆明禄劝地区 30 只中缅树鼩细胞色素 b (Cyt b) 基因进行遗传分析, 认为中缅树鼩是一个独立的分类单位而非普通树鼩的亚种, 攀鼩目与皮翼目 (Dermoptera) 存在很强的亲缘关系, 但未对中缅树鼩的亚种群做进一步的分类。本研究采集云南昆明和广西隆安两地的中缅树鼩, 针对 COI 基因分析其遗传距离, 证明了它们存在较大的遗传差异, 二者归属于不同的地理种群。

本研究对 43 只中缅树鼩的 COI 基因序列进行扩增并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物条带清晰且特异性高, 片段大小与预期相一致, 表明可以使用 COI 通用引物在树鼩种群中扩增出目的片段。同时在 GeneBank 检索获得海南亚种和普通树鼩的 COI 基因序列, 采用 MEGA V5 软件对树鼩 COI 基因序列进行分析, 结果其碱基组成中的 A+T 平均含量 (54.4%) 明显高于 C+G 的平均含量 (45.6%), 中缅树鼩 COI 序列核苷酸碱基构成出现了明显的 A+T 含量偏倚现象, 符合脊椎动物线粒体 DNA 碱基组成的特点。DNA 条形码有效鉴别物种的理论基础是种内、种间遗传距离存在条形码间隔^[11,20]。本研究应用 Kimura-2-parameter 模型计算所研究的中缅树鼩 3 个种群间的遗传距离在 9.71%-13.59% 之间, 而它们与普通树鼩之间的遗传距离范围为 20.43%-24.11%, 结果表明中缅树鼩 3 个种群与普通树鼩间存在条形码间隔^[11], 证明基于 COI 基因的 DNA 条形码技术可以有效鉴别中缅树鼩与普通树鼩。通过构建 NJ 系统发育树, 发现中缅树鼩隆安种群、昆明种群与海南亚种聚成一大支, 与普通树鼩构成树鼩属中的不同物种, 进一步证实了中缅树鼩与普通树鼩分属不同的物种。

此外, 本研究中缅树鼩的 3 个种群的种内遗传距离范围为 0.00%-0.79%, 明显小于中缅树鼩各种群之间的遗传距离, 结果与 Aliabadian 等^[21]提出的 DNA 条形码要求一致, 即当种内遗传距离与种间遗传距离的范围没有交集时才可有效鉴别物种。从 NJ 系统发育树中显示, 隆安种群、昆明种群及海南亚种分别

聚成一小支, 它们的分支置信度均高达 100%, 共同组成中缅树鼩的一部分, 结果表明基于 COI 基因的 DNA 条形码技术可以准确鉴别中缅树鼩的 3 个种群。

本研究结果表明: 通过 COI 基因的测序分析证实了广西隆安树鼩与昆明树鼩分属中缅树鼩的不同种群, 基于 COI 基因的 DNA 条形码技术有助于树鼩种群的分类鉴定, 为探讨树鼩系统进化分类地位的提供了有效的分子证据, 同时也为生物医药研究提供新型实验动物奠定了一定的理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Helgen KM. Order scandentia// Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference[M]. 3rd ed. Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005: 104-109
- [2] 王应祥. 中国树鼩的分类研究[J]. 动物学研究, 1987, 8(3): 213-230
Wang Ying-xiang. The classification of Chinese tree shrews [J]. Zoological Research, 1987, 8(3): 213-230
- [3] 角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 等. 树鼩资源的开发利用与标准化研究 -- 我国实验动物资源建设发展战略探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(7): 73-78
Jiao Jian-lin, Liu Ru-wen, Chen Li-ling, et al. The Development and Use of Tree Shrew Resource and Its Standards Research-the Strategic Discussion for Laboratory Animal Resource Development in China [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2009, 19(7): 73-78
- [4] 彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 等. 树鼩生物学[J]. 昆明: 云南科技出版社, 1991
Peng Yan-zhang, Ye Zhi-zhang, Zou Ru-jing, et al. Biology of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Yunnan Science and Technology Press, Kunming, China, 1991
- [5] Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. Intraordinal phylogenetics of treeshrews (Mammalia: Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene [J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 35 (3): 656-673
- [6] Adkins RM, Honeycutt RL. Molecular phylogeny of the superorder Archonta[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(22): 10317-10321
- [7] Schmitz J, Ohme M, Zischler H. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders[J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(9): 1334-1343
- [8] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321
- [9] Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99
- [10] Ståhl G, Savolainen E. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2008, 46(1): 82-87
- [11] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. Identification of Birds through DNA Barcodes[J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): 1657-1663
- [12] 肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向 -- DNA 条形码[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852-855
Xiao Jin-hua, Xiao Hui, Huang Da-wei. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy [J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50 (5): 852-855

(下转第 2842 页)

- cal analysis of 5 cases [J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2015,35(6): 653-655
- [6] He Zi-ping, Chen Qiong-ju, Ouyang Si-qi. Efficacy and Safety Analysis of Medical Sodium Hyaluronate Adhesion Prevention of Thyroid Incision[J]. Guide of China Medical, 2013(21): 68-68
- [7] Alkhamesi N A, Schlachta C M. The role of aerosolized intraperitoneal heparin and hyaluronic acid in the prevention of postoperative abdominal adhesions[J]. Surgical Endoscopy, 2013, 27(12): 4663-4669
- [8] Cheng Xue-yuan, The mechanism and research progress of postoperative intestinal adhesion [J]. Journal of North Pharmacy, 2014, (12): 101-102
- [9] Stanislaw P, Stawicki MD, FACSa, et al. Results of a prospective, randomized, controlled study of the use of carboxymethylcellulose sodium hyaluronate adhesion barrier in trauma open abdomens [J]. Surgery, 2014, (2): 419-430
- [10] Montalvo-Javé, Eduardo Esteban1 et al. Histological Analysis of Intra-Abdominal Adhesions Treated with Sodium Hyaluronate and Carboxymethylcellulose Gel [J]. Journal of Investigative Surgery, 2016, (29): 80-87
- [11] Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation[J]. ClinOrthopRelat Res, 1971, 80: 25-32
- [12] Kim, DeokYeol, Namgoong, et al. Optimal Viscosity and Particle Shape of Hyaluronic Acid Filler as a Scaffold for Human Fibroblasts [J]. Journal of Craniofacial Surgery, 2015, 26(5): 1534-1538
- [13] Li L, Wang N, Jin X, et al. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention[J]. Biomaterials, 2014, 35(12): 3903-3917
- [14] Yang M, Rao Y Y, Jiang X H, et al. Efficacy and Safety of Hyaluronic Acid in Preventing Postoperative Abdominopelvic Adhesions Meta-Analysis [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48 (17): 1489-1492
- [15] FanHua, LiJian. In 90 cases of medical using sodium hyaluronate in the preventing the adhesion after thyroid surgery [J]. Public Medical Forum Magazine, 2015, (7): 871-872
- [16] 喻祖胜. 医用透明质酸钠在甲状腺手术中的应用 [J]. 浙江临床医学, 2014, (2): 222-223
- Yu Zu-sheng. Application of sodium hyaluronate in the operation of thyroid gland[J]. Zhejiang clinical medicine, 2014, (2): 222-223
- [17] Lu Wen-li, Pan Zhi-qiang, Fang Zhao-qin et al. Anatomy of the thyroid and parathyroid glands in mice[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2009, 29(5): 310-312
- [18] Kunio Kawanishi, Masayuki Yamato. Peritoneal cell sheets composed of mesothelial cells and fibroblasts prevent intra-abdominal adhesion formation in a rat model[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2016(10): 855-866
- [19] Yoo Seung Chung; Kyu Eun Lee; Hoon Yub Kim, et al. Anti-adhesive Effect and Safety of Sodium Hyaluronate and Sodium Carboxymethyl Cellulose Solution in Thyroid Surgery [J]. Asian Journal of Surgery, 2010, (01): 25-30
- [20] Ren Wei-hua. Effect of sodium hyaluronate on prevention of postoperative adhesion of thyroid gland [J]. Shanxi Medical Journal, 2013, (18): 1026-1027
- [21] Dong Sik Bae, Jung-Woo Woo1, Se Hyun Paek, et al. Antiadhesive effect and safety of sodium hyaluronate-carboxymethyl cellulose membrane in thyroid surgery [J]. Annals of Surgical Treatment and Research, 2013, (5): 199-204
- [22] 何金霞, 张俊德, 李虹义, 等. 新型微波天线热凝大鼠骨骼肌的变化[J]. 中国组织工程与临床康复, 2008,12(9): 1753-1756
- He Jin-xia, Zhang Jun-de, Li Hong-yi, et al. Rat skeletal muscle alterations after coagulation with novel microwave antenna[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research. 2008, 12 (9): 1753-1756

(上接第 2824 页)

- [13] 李超伦, 王敏晓, 程方平, 等. DNA 条形码及其在海洋浮游动物生态学中的应用[J]. 生物多样性, 2011, 19(6): 805-814
- Li Chao-lun, Wang Min-xiao, Cheng Fang-ping, et al. DNA barcoding and its application to marine zooplankton ecology[J]. Biodiversity Science, 2011, 19(6): 805-814
- [14] Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1847-1857
- [15] Lin X, Stur E, Ekrem T. Exploring Genetic Divergence in a Species-Rich Insect Genus Using 2790 DNA Barcodes[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138993
- [16] Gonçalves PF, Oliveira-Marques AR, Matsumoto TE, et al. DNA Barcoding Identifies Illegal Parrot Trade[J]. J Hered, 2015, 106(Suppl 1): 560-564
- [17] Yang C, Xiao Z, Zou Y, et al. DNA barcoding revises a misidentification on musk deer[J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(4): 605-612
- [18] Bitanyi S, Bjørnstad G, Ernest EM, et al. Species identification of Tanzanian antelopes using DNA barcoding [J]. Mol Ecol Resour, 2011, 11(3): 442-449
- [19] 贾婷, 杨晓密, 李宗瀚, 等. 基于细胞色素 b 基因探讨昆明禄劝地区树鼩的分类意义[J]. 动物学杂志, 2008, 43(4): 26-33
- Jia Ting, Yang Xiao-mi, Li Zong-han, et al. Classified Significance of Tupaia belangeri from Luquan District, Kunming Based on Cyt b Gene Sequences[J]. Chinese Journal of Zoology, 2008, 43(4): 26-33
- [20] Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. PLoS Biol, 2005, 3(12): 2229-2238
- [21] Aliabadian M, Kaboli M, Nijman V, et al. Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species[J]. PLoS One, 2009, 4(1): 1-8