

黄鳝大型多钩槽绦虫 *cox1* 基因的多态性研究^①

王芝英, 罗永莉

西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为阐明黄鳝大型多钩槽绦虫渝西地区分离株线粒体基因细胞色素 c 氧化酶第 I 亚基(*cox1*)的遗传变异情况, 本试验对黄鳝大型多钩槽绦虫 *cox1* 序列进行 PCR 扩增、克隆、测序及序列分析, 并与 GenBank 中已知绦虫相应基因序列进行比较分析, 结果显示渝西地区 6 个样品 *cox1* 碱基序列长度一致, 均为 444 bp. 同源分析发现渝西地区不同分离株间的同源性较高, 为 97.3%~100%, 而 6 个大型多钩槽绦虫分离株与 GenBank 中收录的其他绦虫相比, 同源性较低, 为 10.1%~12.1%. 由于大型多钩槽绦虫 *cox1* 序列种内相对保守, 种间差异较大, 故可以作为种间遗传变异研究的标记.

关键词: 黄鳝; 大型多钩槽绦虫; *cox1* 基因; PCR; 序列分析

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)03-0009-06

大型多钩槽绦虫 *Polyonchobothrium magnum* 隶属于扁形动物门 Platyhelminthes、绦虫纲 Cestoda、假叶目 Pseudophyllidea、头槽科 Bothriocephalidae^[1]. 大型多钩槽绦虫是寄生在黄鳝消化道内的主要寄生蠕虫之一, 虫体寄生于黄鳝的小肠内, 以头节附于小肠前段, 对宿主的危害主要是掠夺宿主的营养物质, 堵塞宿主的消化道和分泌毒素, 使宿主出现一些病理症状, 严重的可引起宿主死亡^[2]. 黄鳝通过吞食体内带有原尾蚴 *Proceroid larva* 的劳氏剑水蚤 *Mesocyclops leuckartii* 和透明剑水蚤 *Thermocyclops hyalinus* 而感染大型多钩槽绦虫. 以往有关大型多钩槽绦虫这种假叶目绦虫的研究多在区系分布方面, 对寄生在黄鳝等动物体内的大型多钩槽绦虫的病害状况还未有人考察. 目前在人工养殖黄鳝的地区, 由于养殖规模不断扩大, 了解这种绦虫的流行病学及分子水平的研究情况对于有效防治这种寄生蠕虫具有重要的意义.

线粒体 DNA(mtDNA)相对分子质量小、结构简单, 复制速度相对较快且没有有效的校读功能, 碱基误配率高, 加之 mtDNA 的碱基切除修复、重组修复等自我修复机制系统并不完善, 容易诱发损伤而引起疾病发生, 并可将其作为研究寄生虫种内及种间遗传变异情况的研究标记, 是鉴别寄生虫常用的分子标记之一^[3-6]. 细胞色素氧化酶基因是 mtDNA 编码多肽的基因之一, 因此可作为研究动物分子系统学和种群遗传学最常用的分子标记.

本研究通过对重庆市璧山、江津、大足、荣昌、永川、双桥地区 6 个黄鳝大型多钩槽绦虫分离株线粒体基因细胞色素 c 氧化酶第 I 亚基(*cox1*)的遗传变异情况进行研究, 为今后黄鳝大型多钩槽绦虫病研究提供一定的科学依据和理论参考.

① 收稿日期: 2014-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172313).

作者简介: 王芝英(1972-), 女, 重庆秀山人, 硕士, 高级实验师, 主要从事动物寄生虫病学研究.

1 材料与方法

1.1 虫 体

分别在渝西地区 6 个区县采集样本进行寄生虫种类鉴定. 大型多钩槽绦虫具体来源见表 1.

表 1 大型多钩槽绦虫样品来源

样品来源	样品编码	样品数量	宿主	发育阶段
重庆荣昌	<i>P. magnum</i> -RC isolate	13	黄鳝	成虫
重庆大足	<i>P. magnum</i> -DZ isolate	7	黄鳝	成虫
重庆永川	<i>P. magnum</i> -YC isolate	9	黄鳝	成虫
重庆双桥	<i>P. magnum</i> -SQ isolate	4	黄鳝	成虫
重庆璧山	<i>P. magnum</i> -BS isolate	6	黄鳝	成虫
重庆江津	<i>P. magnum</i> -JJ isolate	5	黄鳝	成虫

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 蛋白酶 K 购自 Merk 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech 公司; pMD™19-T Vector 购自 TaKaRa 公司; DH5a 购自大连宝生物公司.

1.3 虫体 DNA 的提取

取单个成虫, 用双蒸水洗净后, 剪碎, 加入 270 μ L 的 SDS 裂解液和 30 μ L 蛋白酶 K, 放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中消化 12~16 h. 将消化好的虫体悬液采用酚/氯仿法抽提大型多钩槽绦虫基因组 DNA, 于-20 $^{\circ}$ C 保存待用.

1.4 *cox1* 基因的 PCR 扩增

引用 Bowles^[7]报道的引物, 线粒体 *cox1* 的保守序列, 其核苷酸序列组成如下: 上游引物 JB3: 5'-TTTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (24 bp); 下游引物 JB4. 5: 5'-TAAAGAAAGAACATAAT-GAAAATG-3' (24 bp)由上海博亚生物技术公司进行合成. 扩增体系为 25 μ L: 10 $\times$ PCR buffer(不含 Mg²⁺)2.5 μ L、Mg²⁺ (25 mM) 4.0 μ L、dNTPs(2.5 mM) 2.0 μ L、上游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L、下游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L、模板 DNA 1.0 μ L、rTaq 酶 0.125 μ L、双蒸水 14.375 μ L. 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统观察并记录结果.

1.5 PCR 产物的克隆

采用 TransGen Biotech 公司生产的 DNA 胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物后, 进行 PCR 产物与 pMD™19-T 载体的连接, 在 0.5 mL 离心管中加入 5 μ L 的 Ligation Solution I, 1 μ L 的 pMD™19-TVec-tor, 3 μ L 的 PCR 纯化产物, 1 μ L 的 ddH₂O, 16 $^{\circ}$ C 连接 4 h. 将上述连接产物转化至 DH5a 感受态细胞, 涂布于含 Amp(100 mg/mL), X gal(20 mg/mL)和 IPTG(24 mg/mL)的 LB 琼脂平板中, 置恒温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h.

1.6 测序及序列分析

将经菌液 PCR 鉴定的阳性重组菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司测序. 将测得的序列在 NCBI 上进行 BLASTX 比对. 为了比较测序所得序列与参照序列的遗传差异, 采用 DNAS-tar 5.0 软件中的 MegAlign 程序进行相似性分析及 MEGA 4.0 软件中的 NJ 法构建系统进化树.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在约 450 bp 处可见相应条带, 与理论大小相符; 阴性对照没有条带出现(图 1)。

2.2 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

阳性克隆的重组菌液经 PCR 扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果样品约在 450 bp 处有相应条带; 阴性对照没有条带出现(图 2)。

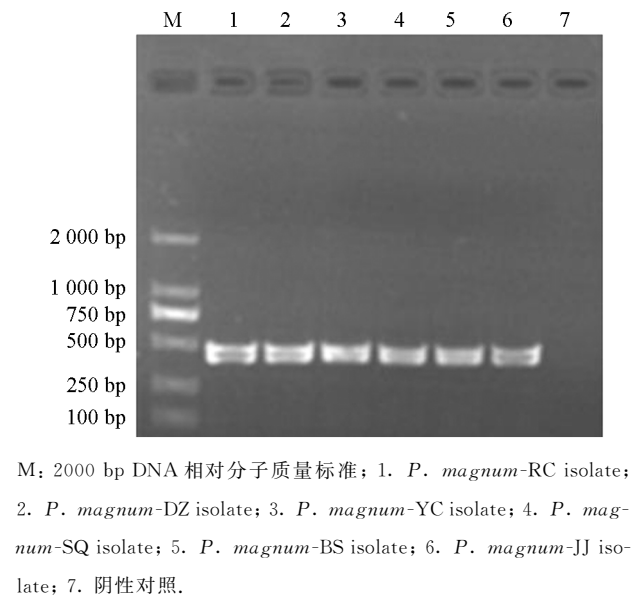


图 1 大型多钩槽绦虫 *cox1* 基因的 PCR 扩增结果

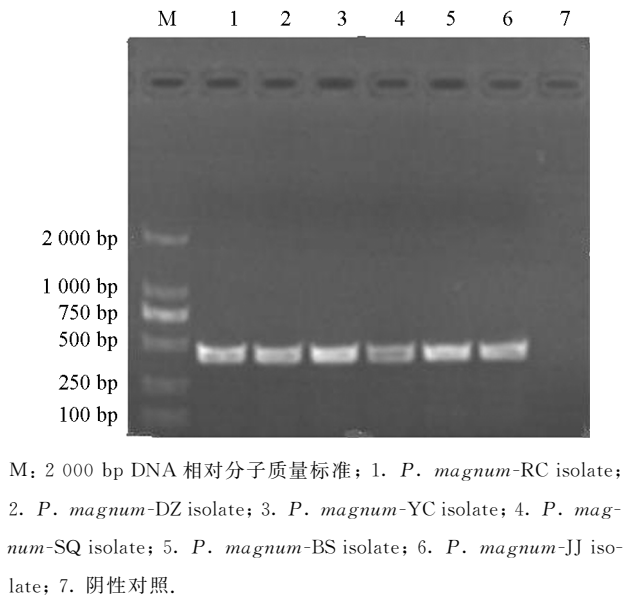


图 2 大型多钩槽绦虫重组质粒的 PCR 鉴定

2.3 测序结果及分析

将经过菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 结果显示由 JB3 和 JB4.5 为引物扩增渝西地区 6 个大型多钩槽绦虫分离株的 *cox1* 基因, 其片段大小均为 444 bp。

2.4 *cox1* 基因核苷酸序列的同源性及种系发育进化树分析

经 GenBank 检索 12 个相似序列, 与测得的 6 个样本序列的 *cox1* 序列进行同源性分析. 这些序列分别是头槽绦虫 *Bothriocephalusacheilognathi* (序列号: HM439384)、阔节裂头绦虫 *Diphyllbothriumlatum* (序列号: AY972071)、猬迭宫绦虫 *Spirometraerinaceieuropaei* (序列号: GQ999946)、细粒棘球绦虫 *Echinococcusgranulosus* (序列号: HF947565)、多头带绦虫 *Taeniamulticeps* (序列号: EF393620)、日本海裂头绦虫 *Diphyllbothriumnihonkaiense* (序列号: AB544064)、伏氏棘球绦虫 *Echinococcusvogeli* (序列号: JX315616)、多头带绦虫 *T. multiceps* (序列号: DQ309769)、侏儒绦虫 *Paranoplocephalakalelai* (序列号: AY181513)、阔节裂头绦虫 *Diphyllbothrium* sp. (序列号: AY972072)、细粒棘球绦虫 *Echinococcusgranulosus* (序列号: GU951511)、曼氏迭宫绦虫 *Spirometra* sp. (序列号: HQ699076)。

对本次所测得的 *P. magnum* 序列中 *cox1* 序列联机 BLAST, 进行同源性分析和构建树形进化图(图 3、图 4 所示). 渝西地区各分离株之间相应序列的相似性为 97.3%~100%; 与 GenBank™ 中下载的侏儒绦虫 *P. kalelai* (序列号: AY181513) 的相似性最高为 12.1%; 与多头带绦虫 *T. multiceps* (序列号: DQ309769) 相似性最低为 10.1%。

用 MEGA 4.0 的 NJ 法构建种系发育进化树显示(图 4), 6 个大型多钩槽绦虫分离株位于同一分枝, 具有高度同源性, 与 GenBank™ 中收录的同科头槽绦虫(序列号: HM439384) 所属分支相隔较近. 6 个大

型多钩槽绦虫分离株与多头带绦虫(序列号: DQ309769)、细粒棘球蚴(序列号: GU951511)、细粒棘球绦虫(序列号: HF947565)、伏氏棘球绦虫(序列号: JX315616)、侏儒绦虫(序列号: AY181513)所属分支相隔较远.

		同源性百分率																			
异质性百分率		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
	1		83.1	80.0	80.4	78.8	80.2	78.2	75.7	81.1	81.3	77.3	77.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	1	
	2	19.1		91.2	93.2	79.0	79.8	77.5	75.4	85.2	85.4	78.2	78.2	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	2	
	3	23.3	9.3		99.7	76.2	76.3	75.2	74.1	83.6	83.8	74.6	74.6	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	3	
	4	22.8	7.1	0.3		76.5	76.3	75.3	74.5	84.4	84.6	74.3	74.3	11.4	11.4	11.4	11.4	11.4	11.4	4	
	5	25.0	24.7	28.6	28.2		100.0	90.4	86.2	79.3	79.0	81.1	81.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	5	
	6	23.0	23.6	28.6	28.5	0.0		90.0	84.8	80.4	80.2	81.8	81.8	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	6	
	7	25.8	26.8	30.1	30.0	10.3	10.8		83.7	79.6	79.4	82.4	82.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	7	
	8	29.4	29.8	31.7	31.2	15.3	17.1	18.4		74.4	74.2	80.2	80.5	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	8	
	9	21.8	16.6	18.6	17.6	24.3	22.7	23.8	31.3		99.8	78.2	78.4	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	9	
	10	21.5	16.3	18.3	17.2	24.7	23.0	24.2	31.7	0.2		78.4	78.7	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10	
	11	27.1	25.8	31.0	31.5	21.8	20.9	20.1	23.0	25.8	25.5		99.8	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	11	
	12	26.8	25.8	31.0	31.5	21.8	20.9	19.8	22.7	25.5	25.2	0.2		10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	12	
	13	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		100.0	98.7	98.7	100.0	99.3	13	
	14	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0		98.7	98.7	100.0	99.3	14	
	15	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.4	1.4		97.3	98.7	98.0	15	
	16	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.4	1.4	2.7		98.7	98.0	16	
	17	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	1.4	1.4		99.3	17	
	18	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.7	0.7	2.0	2.0	0.7		18	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

Percentidentify 表示两序列同源性的百分率; Divergence 表示两序列异质性的百分率.

1: *B. acheilognathi*-HM439384; 2: *D. latum plerocercoid*-AY972071; 3: *D. nihonkaiense*-AB544064; 4: *D. sp.*-AY972072; 5: *E. granulosus*-GU951511; 6: *E. granulosus*-HF947565; 7: *E. vogeli*-JX315616; 8: *P. kalelai*-AY181513; 9: *S. erinacei*europaei-GQ999946; 10: *S. sp.*-HQ699076; 11: *T. multiceps*-DQ309769; 12: *T. multiceps*-EF393620; 13: *P. magnum*-BS isolate; 14: *P. magnum*-DZ isolate; 15: *P. magnum*-JJ isolate; 16: *P. magnum*-RC isolate; 17: *P. magnum*-SQ isolate; 18: *P. magnum*-YC isolate.

图 3 大型多钩槽绦虫与其他 12 种绦虫 *cox1* 序列的同源性分析

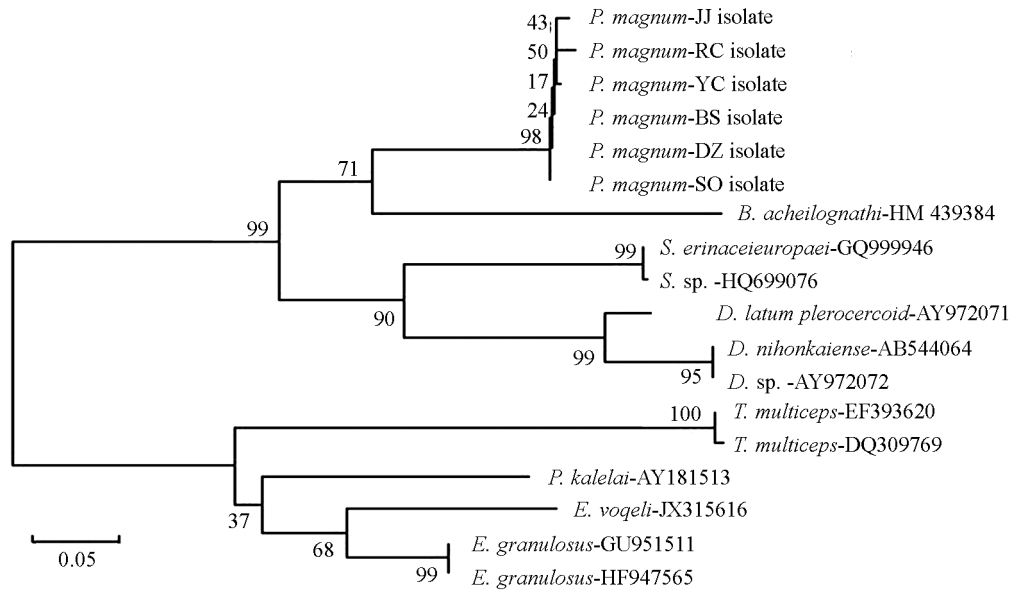


图 4 基于 *cox1* 基因序列以传统邻接法 (NJ) 所构建系统的进化树

3 讨 论

根据 DNASTAR 5.0 软件的多序列比对程序, 对黄鳝大型多钩槽绦虫 *cox1* 序列进行同源性分析, 结果显示, 黄鳝大型多钩槽绦虫渝西地区分离株有较高的相似性, 核苷酸序列的同源性在 97.3%~100% 之间。6 个大型多钩槽绦虫分离株位于同一分支, 具有高度同源性, 与 GenBank 中收录的同科头槽绦虫(序列号: HM439384) 所属分支相隔较近。由于大型多钩槽绦虫 *cox1* 序列种内相对保守, 又存在一定的种间差异, 可以作为种间遗传变异研究的标记。

由于地理、自然等生态环境因素的长期影响, 种株之间存在不同程度的遗传分化, 然而这些变化或许不能被形态学鉴定等传统方法所区分。形态学鉴定是寄生虫学研究中最传统的分类鉴定方法, 但随着生物种群的不断进化和发展, 这种方法越来越显出它的局限性, 特别是对那些相似种或近缘种来说, 很难从形态上进行区分。随着分子生物学研究的发展, DNA 技术可精确地测量生物自然种群的遗传变异程度, 是目前进行物种遗传变异、分类和分子种系发生等研究的主要手段之一。在动物遗传关系分析中, 尤其是对较低的分类阶元, 如同属的种间及种内水平的谱系关系的确定, 应用线粒体 DNA 作为分子标记进行分析, 是目前最常应用的方法。在寄生虫的分类鉴定和群体遗传变异方面, 很多学者研究认为 *cox1* 基因序列是理想的遗传标记。例如, Nakao 等^[8] 分析了多房棘球绦虫和猪带绦虫的线粒体基因, 发现它们之间存在一定的差别, 提出了可用线粒体基因分析它们之间的分类关系并进行鉴别诊断。Gasser 等^[9] 对来自世界不同地区的带科绦虫中的 9 个成员(猪带绦虫、泡状带绦虫、羊带绦虫、牛带绦虫、豆状绦虫、多头绦虫、连续带绦虫、巨颈绦虫、亚洲带绦虫) 的 *cox1* 部分基因进行克隆, 并建立了进化树, 认为该基因可以成功地用于鉴别各种带科绦虫。赵光辉等^[10] 利用 RT-PCR 技术对猪囊尾蚴河南分离株 *cox1* 序列进行种系发育关系的研究, 认为猪囊尾蚴 *cox1* 基因可以用于带科绦虫病和囊尾蚴病的 PCR 鉴别诊断。此外, 一些学者对犬弓首蛔虫 *Toxocara canis*、片形吸虫 *Fasciola*、日本血吸虫 *Schistosoma japonicum*^[11-13] 的 *cox1* 基因序列进行研究, 结果都证明 *cox1* 基因序列是理想的遗传标记。

参考文献:

- [1] 潘炯华, 张剑英, 黎振昌, 等. 鱼类寄生虫学 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 方建平. 大型多钩槽绦虫与隐藏新棘虫种间关系研究 [J]. 生态学报, 2000, 20(4): 615-619.
- [3] HU M, GASSER R B, ABS EL-OSTA Y G, et al. Structure and Organization of the Mitochondrial genome of the Canine Heartworm, *Dirofilaria immitis* [J]. Parasitology, 2003, 127(1): 37-51.
- [4] HU M, CHILTON N B, GASSER R B. The Mitochondrial Genomes of the Human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea) [J]. Int J Parasitol, 2002, 32(2): 145-158.
- [5] HU M, CHILTON N B, GASSER R B. The Mitochondrial Genomes of Parasitic Nematodes of Socio-Economic Importance: Recent Progress, and Implications for Population Genetics and Systematic [J]. Advances in Parasitology, 2004, 56: 133-212.
- [6] 曹玲芳, 李怡芳, 何蓉蓉, 等. 细胞色素 c 氧化酶对衰老调控作用的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(6): 751-777.
- [7] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic Variants within the Genus *Echinococcus* identified by Mitochondrial DNA Sequencing [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54(2): 165-174.
- [8] NAKAO M, OKAMOTO M, SAKAO Y, et al. A Phylogenetic Hypothesis for the Distribution of Two Genotypes of the Pig Tapeworm *Taenia solium* worldwide [J]. Parasitology, 2002, 124(6): 657-662.
- [9] GASSER R B, ZHU X, WOODS W. Genotyping *Taenia* tapeworms by Single-Strand Conformation Polymorphism of Mitochondrial DNA [J]. Electrophoresis, 1999, 20(14): 2834-2837.
- [10] 赵光辉, 张改平, 宁长申, 等. 基于 *cox1* 基因对猪囊尾蚴河南分离株种系发育关系的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2008,

39(1): 72–78.

- [11] LI M W, LIN R Q, WU X Y, et al. Electrophoretic Analysis of Sequence Variability in Three Mitochondrial DNA Regions Forascaridoid Parasites of Human and Animal Health Significance [J]. Electrophoresis, 2008, 29(13): 2912–2917.
- [12] 董世娟, 黄维义, 林瑞庆, 等. 我国片形吸虫(*Fasciola*)线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因(*cox1*)部分序列的多态性 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 378–381.
- [13] 刘 伟, 戴荣四, 林瑞庆, 等. 湖南省日本血吸虫线粒体 *cox1* 基因部分序列多态性的研究 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(10): 939–941.

Polymorphism of the Mitochondrial *cox1* Gene of *Polyonchobothrium magnum* Isolated from *Monopterus albus*

WANG Zhi-ying, LUO Yong-li

Department of Veterinary Medicine, Southwest University(Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To investigate the genetic variation of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene among *Polyonchobothrium magnum* (*cox1*) isolates which were collected from *Monopterus albus* in Western Chongqing area, *cox1* genes from these strains were amplified using PCR amplification, cloned and sequenced, respectively. The homology analysis of these sequences were performed using BLAST and MegAlign programs of the software DNASTar version 5.0 by comparing them with the corresponding sequences of nematodes available in GenBankTM. The results showed that all the six *cox1* sequences of *P. magnum* samples were of the same length — 444 bp. It was found *P. magnum* isolates from *Monopterus albus* in Western Chongqing area had high homology among themselves (97.3%~100%), while the similarity between *P. magnum* and the other tapeworms were low, ranging from 10.1% to 12.1%. Since there is no significant variation in *cox1* sequences within *P. magnum*, while inter-specific difference is obvious, it is concluded that *cox1* sequences can be used as genetic markers for population genetic studies of *P. magnum*. The result of this study provides a scientific basis and theoretical reference on the molecular level and epidemiology survey of *P. magnum*.

Key words: *Monopterus albus*; *Polyonchobothrium magnum*; subunit 1 (*cox1*); PCR; sequence analysis

责任编辑 夏 娟

