

文章编号: 1000-7423(2011)-05-0385-04

【综述】

分子生物学技术在带绦虫鉴别中的应用

李彦, 刘航, 杨毅梅*

【摘要】 传统的带绦虫鉴别方法是根据成虫和其囊尾蚴的形态特征, 但对于形态学特征相似的虫种鉴别较为困难。分子生物学技术提供了一种从分子水平来鉴别带绦虫的方法, 使虫种鉴定结果更为客观。本文综述了 DNA 序列分析、PCR 限制性片段长度多态性技术和环介导等温扩增技术在带绦虫虫种鉴别中的应用。

【关键词】 带绦虫; 分子生物学; 鉴别

中图分类号: R383.32

文献标识码: A

Application of Molecular Biological Techniques in Taenia Identification

LI Yan, LIU Hang, YANG Yi-mei*

(Department of Parasitology, Dali University, Dali 671000, China)

【Abstract】 The traditional identification of *Taenia* spp. based on morphological features of adult and cysticercus has difficulties in identifying the morphologically similar species. The recent development of molecular techniques provides more scientific ways for distinguishing *Taenia* species. This paper summarizes the application of molecular biological techniques in the identification of *Taenia*, such as analysis of DNA sequence, PCR-RFLP and LAMP.

【Key words】 *Taenia*; Molecular biology; Identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30860252)

* Corresponding author, E-mail: yym0408@163.com

带绦虫在生物学分类上属于绦虫纲(Cestoidea)圆叶目(Cyclophyllidea)带科(Taeniidae)带属(*Taenia*)。寄生在人体的带绦虫主要为猪带绦虫(*Taenia solium*)、牛带绦虫(*Taenia saginata*)和亚洲带绦虫(*Taenia asiatica*)^[1]。带绦虫所致疾病以猪带绦虫幼虫——猪囊尾蚴所引起的脑囊尾蚴病最为严重, 可出现癫痫、头痛、记忆力减退、失语、偏瘫和精神症状, 严重时可引起颅内压增高导致呕吐、视力模糊、视神经乳头水肿、昏迷甚至猝死^[2]。而人类对牛带绦虫的六钩蚴具有自然免疫力, 亚洲带绦虫对人的危害与牛带绦虫大体相似, 主要为其成虫所致的消化道症状, 目前尚未发现其幼虫对人有致病的报道, 多数研究者认为亚洲带绦虫的囊尾蚴不能在人体寄生, 但有人提出质疑, 流行病学调查发现, 亚洲带绦虫病流行区存在大量囊尾蚴病病例。带绦虫的分类鉴定是从事带绦虫研究的前提和基础, 对有效防治带绦虫病具有重要意义。形态学鉴定是最传统的分类鉴定方法, 但随着生物种群的进化和发展, 亚洲带绦虫成虫形态上与牛带绦虫很

难区分, 幼虫不能与猪带绦虫幼虫区分。分子生物学技术的应用弥补了形态学分类的不足, 可客观的对带绦虫虫种进行鉴别。本文对常用的带绦虫虫种鉴别的分子生物学方法进行综述。

1 DNA 序列分析

DNA 序列分析技术已用于原虫、线虫、吸虫和绦虫等, 该技术已成为寄生虫常用的、成熟的检测技术。目前最常用的带绦虫分类鉴定目的基因片段是线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 和核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA)。

1.1 线粒体 DNA 基因序列分析 线粒体 DNA 易发生突变, 是寄生虫分子进化研究的理想工具。线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome C oxidase I, CO I) 是一段比较保守的基因序列, 适宜种间和种以上的分类鉴别和系统发育研究。细胞色素 b (cytochrome B, cytb) 基因序列在线粒体基因组中进化速率适中, 较短的一个片段即可包含从种下水平到属水平及纲水平的系统发育信息, 其序列相对稳定, 具有遗传稳定性, 而不同动物之间的序列差异非常大, 种内序列差异远小于种间差异。mtDNA-cytb

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30860252)

作者单位: 大理学院基础医学院寄生虫教研室, 大理 671000

* 通讯作者, E-mail: yym0408@163.com

基因在细胞内拷贝数多,比线粒体 rRNA 和非编码区的基因更易于排序,分析灵敏度高,且能用一些通用引物扩增。

在进化树上,亚洲带绦虫首先与牛带绦虫聚为一支,再与猪带绦虫聚类,说明亚洲带绦虫与牛带绦虫亲缘关系最近。Bowles 等^[3]从遗传学的密码简并性研究亚洲带绦虫的分类地位时,发现亚洲带绦虫和牛带绦虫的 CO I 基因部分片段的序列差异率为 2.2%,认为支持亚种的分类更能显示它们之间的近缘关系。随后,王正容等^[4]运用该方法鉴定云南和贵州 4 地的牛带绦虫种类,发现亚洲带绦虫与牛带绦虫的 CO I 基因片段序列同源性高达 97.44%,仅有 2.56% 的差异。与猪带绦虫相比,差异为 14.42%。Yamasaki 等^[5]和 Jeon 等^[1,6]对亚洲带绦虫与传统牛带绦虫的线粒体基因进行序列分析,发现两者的 CO I 和 COB 序列的差异分别为 4.6% 和 4.1%,表明亚洲带绦虫是牛带绦虫的亚种。并认为,对 CO I 基因部分片段的分析容易产生偏倚,而对 CO I 基因全序列的分析结果更加可信。

在带绦虫生物多态性研究中,尤其是在 3 种带绦虫的分类研究中,mtDNA 序列可作为种间、种下分类的良好分子靶标。张晨昊等^[7]对采自云南楚雄、大理、怒江和贵州从江等 4 地带绦虫的 mtDNA-cytb 基因部分区段进行 PCR 扩增后,经测序比对和构建系统发育树,发现亚洲带绦虫和牛带绦虫的碱基差异为 2.5%。张辉等^[8]和罗浪等^[9]分别对采自云南香格里拉区域和云南大理白族地区的带绦虫标本进行 PCR 扩增 mtCO I 区段和 mtDNA-cytb 基因部分片段,结果显示,mtCO I 区段碱基变异为 16.96%,mtDNA-cytb 区段碱基变异为 12.38%。刘爱波等^[10]研究云南保山和普洱地区的带绦虫 mtDNA-ND I 基因片段,发现该基因的变异率为 17.12%,亚洲带绦虫与牛带绦虫同源性为 95%,猪带绦虫和亚洲带绦虫的同源性为 88%。对带绦虫 mtDNA-12S rRNA 的基因片段进行比对,结果表明该基因变异率为 10.53%,亚洲带绦虫与牛带绦虫的同源性为 98%,猪带绦虫和亚洲带绦虫的同源性为 93%^[11]。上述研究均支持亚洲带绦虫为牛带绦虫的亚种,并揭示 mt-DNA CO I 基因、mtDNA-cytb 基因、mtDNA-ND I 基因和 mtDNA-12S rRNA 基因可作为区分 3 种带绦虫的良好分子靶标。

1.2 核糖体 DNA 基因序列分析 真核生物核糖体 DNA 内转录间隔区 I (rDNA-ITS1) 和 ITS2 序列为高度变异区,其进化速度快,具有高变异性,可从中获得大量的遗传信息。研究表明,rDNA 的 ITS 区域是虫种鉴定有用的分子标志,尤其在亲缘关系较近且形态相似的虫种间具有显著差异,在种内也具个体

差异,因此,它在区分牛带绦虫和亚洲带绦虫中更具有鉴别意义,是公认的用于种及种下分类、近缘种鉴别和系统发育分析的良好靶标^[12]。rDNA 进化的一致性使种内繁殖的中层群内的变异体恒定,因而单一个体即可代表其种内繁殖种群 rDNA 基因的特征^[13-15];另外,其进化速率较快,可从不太长的序列中获得较多信息。

rDNA 序列分析不仅可作为区分 3 种带绦虫的分子靶标,还可为亚洲带绦虫的分类学地位提供更多的遗传学信息。李晓娟等^[16]和李强等^[17]分别对采自云南香格里拉带绦虫标本的 rDNA-ITS1 区段和云南洱海环湖区域的带绦虫 rDNA-ITS2 区段进行 PCR 扩增、测序,结果与 GenBank 中的亚洲带绦虫序列基本一致,同源性达 99%。González 等^[18]分别从牛肉和猪肉取出带绦虫幼虫,应用多重 PCR 技术扩增出螺旋反稳蛋白 (HDP2) 序列,成功区分出牛带绦虫和猪带绦虫。González 等^[19]还应用 PCR 扩增带绦虫成虫 HDP2 序列,亚洲带绦虫分别扩增出 1 300 bp、600 bp 和 300 bp 3 条带,牛带绦虫扩增出 1 300 bp 和 300 bp 两条带,猪带绦虫扩增出惟一的 600 bp 条带,成功对亚洲带绦虫、猪带绦虫和牛带绦虫进行了鉴别。

以上研究表明,mtDNA 和 rDNA 序列分析可明确区分 3 种带绦虫,公开发表的核苷酸序列都可直接用来进行比较和分析。该方法具有提供信息直接丰富、操作简便和快速可靠等优点,可根据所测序列数据,应用分析软件,计算物种间的遗传距离、同源性和碱基突变类型等,还可根据遗传距离构建进化树,是带绦虫种、株鉴定的有力工具,尤其利于形态上相似并难以区分的带绦虫虫种鉴别。另外,多个基因片段的分析将会为亚洲带绦虫的系统演化、科属划分和物种鉴定等研究提供更多可靠的遗传学证据。

2 PCR-限制性片段长度多态性技术

PCR-限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)是通过限制性内切酶识别并切断特定的短 DNA 序列,DNA 酶切后再经电泳将酶切片段分离,形成 RFLP 图谱,可反映出酶切位点间 DNA 长度的突变,染色后即可观察各个不同大小的片段,进行遗传变异的分析。该技术不用测序即可实现对带绦虫虫种的鉴别。González 等^[20]利用 PCR-RFLP 的技术对带绦虫 HDP2 基因片段进行分析,使用小于 10 pg 的基因组 DNA 鉴别了牛带绦虫和猪带绦虫。Bowles 等^[3]通过遗传密码简并性来研究亚洲带绦虫的分类学地位,认为 PCR-RFLP 可快速准确地鉴别亚洲带绦虫。张朝云等^[21]对云贵两省三地的带绦虫 rDNA-ITS1 片段进行 PCR-

RFLP分析,认为贵州都匀株、云南大理株和台湾桃园株带绦虫均为亚洲带绦虫,而贵州从江株带绦虫是传统的牛带绦虫。杨毅梅等^[22]用 PCR-RFLP 法对云南省兰坪地区的带绦虫进行了分析,通过与猪带绦虫、牛带绦虫和都匀亚洲带绦虫的标准株比对后,认为兰坪株带绦虫 rDNA-ITS1 片段扩增产物经 Dde I 酶切后的 RFLP 图谱与都匀亚洲带绦虫一致,而与猪带绦虫和牛带绦虫有区别,提示云南省兰坪地区的带绦虫为亚洲带绦虫。Rodriguez-Hidalgo 等^[23]选择厄瓜多尔 25 例绦虫病患者,经驱虫治疗后获得绦虫,以塞内加尔的牛带绦虫标本作为参照,PCR 扩增 mtDNA-12S rRNA 片段,得到 360 bp 的产物,再以 Dde I 进行酶切后显示清晰的酶切图谱,未出现非特异性条带。与塞内加尔的牛带绦虫标本酶切图谱一致,首次证实了牛带绦虫在厄瓜多尔地区的存在。表明 PCR-RFLP 有助于区分猪带绦虫和牛带绦虫。González 等^[24]利用 PCR-RFLP 的技术对带绦虫 HDP2 基因片段进行分析,使用小于 10 pg 的基因组 DNA 鉴别了牛带绦虫和亚洲带绦虫。刘爱波等^[25]认为 PCR-RFLP 技术以其简便、快速和成本低的优点已在寄生虫分子分类、虫种和虫株鉴定等方面的研究中得到了广泛应用。

上述实验均表明 PCR-RFLP 方法简便,不需要特殊的仪器设备;灵敏度较高,结果可定量分析;无表型效应,其检测不受环境条件和发育阶段影响;可区别纯合基因型和杂合基因型;可利用的探针很多,可检测到很多遗传位点;并且对亚洲带绦虫的分类定位可提供更多的遗传信息。但其缺点是对 DNA 质量要求高、需要量大、操作复杂。

3 环介导等温扩增技术 (loop mediated isothermal amplification, LAMP)

环介导等温扩增技术是近年来迅速发展起来的一项新技术,已用于副猪嗜血杆菌、结核分枝杆菌、甲型流感病毒和单纯疱疹病毒等方面的研究。作为分子生物学的一个分支,LAMP 技术是一套 4 条特异性引物与靶基因的 6 个不同区域退火杂交,在具有链置换活性功能的 DNA 聚合酶的作用下实现等温条件下扩增 DNA 分子的核酸扩增新技术^[26]。

Agathe 等^[27]运用 LAMP 技术对带绦虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 (clp) 和 CO I 基因进行了分析,可对带绦虫种类进行快速、敏感和特异性的鉴别。随后,又运用 LAMP 技术和多重 PCR 技术检测带绦虫病患者的粪便标本,结果证实,LAMP 技术没有假阳性,敏感性高达 88.4%,而多重 PCR 敏感性仅有 37.2%^[28]。因此 Agathe 等^[27]认为 LAMP 技术在带绦虫分子诊断中

有很高的应用价值。但目前未见国内 LAMP 技术在带绦虫分类方面的应用。该技术敏感性高,特异性好,无需特殊的昂贵仪器,并且可很快观察结果,故可在基层做推广应用,该技术的关键是引物设计,引物设计不合理会降低其敏感性和特异性。

4 展望

由于卫生与饮食习惯、家畜饲养方式以及环境卫生状况的影响,囊尾蚴病分布广泛且呈地方性流行的特点。随着免疫学技术如免疫荧光抗体、斑点杂交技术和胶体金等免疫学检测技术的应用以及分子生物学技术的不断成熟和发展,在传统形态学检测方法的基础上,多种不同诊断技术的综合应用以进一步提高检测灵敏度和特异性将是今后相关研究的一个重要发展方向。以这些技术为基础的研究开发各种快速诊断试剂盒是寄生虫病诊断的发展方向,且可以在流行地区使用试剂盒进行大规模普查和快速诊断,对带绦虫病实施早发现、早治疗。同时,随着分子生物学的发展以及对带绦虫的深入研究,将会为亚洲带绦虫的种属划分提供更多的分子依据。

参 考 文 献

- [1] Jeon HK, Lee KH, Kim KH, et al. Complete sequence and structure of the mitochondrial genome of the human tapeworm, *Taenia asiatica*[J]. *Exp Parasitol*, 2005, 130(6): 717-726.
- [2] Li YL. *Human Parasitology* [M]. 7th ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2009: 134-135. (in Chinese)
(李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 134-135.)
- [3] Bowles J, McManus DP. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 50(1): 33-34.
- [4] Wang ZR, Bao HE. Identification of *Taenia saginata* by mtCO I in four areas of Yunnan and Guizhou Provinces [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2003, 21 (1): 20-23. (in Chinese)
(王正蓉, 包怀恩. 用 mtCO I 技术测定云南及贵州四地区的牛带绦虫 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21 (1): 20-23.)
- [5] Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, et al. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2): 548-553.
- [6] Jeon HK, Dom KS. *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: genetic divergence estimated from their mitochondrial genomes [J]. *Exp Parasitol*, 2006, 113(1): 58-61.
- [7] Zhang CH, Yang YM. Study on biologic polymorphism with molecular genetic markers of *Taenia* cestodes in three western regions of Yunnan [J]. *Chin J Pathogen Biol*, 2009, 4 (4): 283-286. (in Chinese)
(张晨昊, 杨毅梅. 云南两部三地带绦虫生物多态性分子遗传学标记的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(4): 283-286.)
- [8] Zhang H, Ma SG, Yang YM. Analysis and identification of tapeworms in Shangri-La county of Yunnan Province by molecular biology [J]. *J Dali Univ*, 2009, 8(10): 27-29. (in Chinese)
(张辉, 马顺高, 杨毅梅. 云南香格里拉地区带绦虫分子鉴定分析[J]. 大理学院学报, 2009, 8(10): 27-29.)

- [9] Luo L, Yang YM. Sequencing and analysis on mtDNA Cytb of *Taenia cestodes* in Bai population (Dali) of Yunnan Province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2010, 26(5): 425-428. (in Chinese) (罗浪, 杨毅梅. 云南大理白族带绦虫 mtDNA-Cytb 序列测定及分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(5): 425-428.)
- [10] Liu AB, Yang YM. Sequence analysis on mtDNA-ND1 fragment of *Taenia cestodes* from Baoshan, Puer of Yunnan Province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2011, 27(4): 340-342. (in Chinese) (刘爱波, 杨毅梅. 云南保山、普洱带绦虫 mtDNA-ND1 基因序列测定及分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(4): 340-342.)
- [11] Liu AB, Yang YM. Sequence analysis on mtDNA-rRNA fragment of *Taenia cestodes* from Baoshan, Puer of Yunnan Province [J]. *Chin J Infect Dis*, 2011, 29(4): 236-238. (in Chinese) (刘爱波, 杨毅梅. 云南保山和普洱地区带绦虫线粒体 DNA 基因编码核糖体 RNA 小亚基基因序列分析 [J]. 中华传染病杂志 2011, 29(4): 236-238.)
- [12] Liu J, Li YL. Analysis of DNA sequence of trematode species [J]. *Foreign Med Sci Parasit Dis*, 2004, 31(3): 108-111. (in Chinese) (刘娟, 李雍龙. DNA 序列分析在吸虫种株基因差异研究方面的应用 [J]. 国外医学 (寄生虫病分册), 2004, 31(3): 108-111.)
- [13] Jeon HK, Kim KH, Eom KS, et al. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Taenia saginata*; comparison with *T. solium* and *T. asiatica*[J]. *Parasitol Int*, 2007, 56(3): 24-36.
- [14] Powell W, Moorgante M, McDevitt R, et al. Polymorphic simple sequence repeat region in chloroplast genome: applications to the population genetics of pines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7759-7763.
- [15] Yu DJ, Deng ZP, Kang L, et al. Application of sequencing and analysis in entomology [J]. *Plant Quarantine*, 2003, 3(17): 156-159. (in Chinese) (余道坚, 邓中平, 康林, 等. 昆虫分子标记基因和序列及应用 [J]. 检验检疫, 2003, 3(17): 156-159.)
- [16] Li XJ, Yang YM. Detection and analysis on the sequence of internal transcribed space-1 in ribosomal DNA of *Taenia cestodes* from Xiangelila of Yunnan Province[J]. *Chin J Zoonoses*, 2008, 24(10): 923-925. (in Chinese) (李晓娟, 杨毅梅. 云南香格里拉的带绦虫 rDNA ITS-1 序列测定及分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 923-925.)
- [17] Li Q, Yang YM. Sequencing and analysis on rDNA-ITS2 of *Taenia cestodes* around Erhai Lake of Dali, China[J]. *J Fourth Milit Med Univ*, 2009, 30(4): 295-297. (in Chinese) (李强, 杨毅梅. 云南洱海环湖带绦虫 rDNA-ITS2 序列测定及分析[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(4): 295-297.)
- [18] González LM, Villalobos N, Montero E, et al. Differential molecular identification of taeniid spp. and *Sarcocystis* spp. cysts isolated from infected pigs and cattle [J]. *Vet Parasitol*, 2006, 142(1-2): 95-101.
- [19] González LM, Begona B, Elizabeth F, et al. Characterization of the *Taenia* spp HDP2 sequence and development of a novel PCR-based assay for discrimination of *Taenia saginata* from *Taenia asiatica*[J]. *Parasit Vectors*, 2010, 6 (11): 51.
- [20] González LM, Estrella M, Edda S, et al. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infections; from DNA probes to polymerase chain reaction [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 96(Suppl 1): 243-250.
- [21] Zhang CY, Bao HE, Yang M. Molecular identification of *Taenia* in three regions of Yunnan and Guizhou Provinces-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the first internaltranscribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA [J]. *Chin J Parasit Dis Control*, 2005, 18(5): 330-332. (in Chinese) (张朝云, 包怀恩, 杨明. 云贵两省三地带绦虫的分子鉴定—核糖体 DNA 第一内转录间隔区(ITS1)限制性酶切片段长度多态性(RFLP)分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(5): 330-332.)
- [22] Yang YM, Xi LL. PCR-RELP analysis of rDNA-ITS from tapeworms in Lanning, Yunnan Province, China [J]. *Chin J Pathogen Biol*, 2008, 3(9): 683-684. (in Chinese) (杨毅梅, 奚琳琳. 兰坪地区带绦虫 rDNA-ITS PCR-RFLP 分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(9): 683-684.)
- [23] Rodriguez-Hidalgo R, Geysen D, Benitez- Ortiz W, et al. Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment [J]. *Parasitology*, 2002, 88 (5): 1007-1011.
- [24] González LM, Estrella M, Nimit M, et al. Different diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica* taeniasis through PCR [J]. *Diagn Micr Infect Dis*, 2004, 49(3): 183-188.
- [25] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucl Acid Res*, 2000, 28 (12): E63.
- [26] Liu AB, Yang YM. Application of PCR-RFLP technique on the classification and identification of parasites [J]. *Int J Med Parasit Dis*, 2010, 37(2): 98-100. (in Chinese) (刘爱波, 杨毅梅. PCR-RFLP 技术在寄生虫分了鉴定中的应用 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2010, 37(2): 98-100.)
- [27] Agathe N, Yasuhito S, Minoru N, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47 (1): 168-174.
- [28] Agathe N, Yasuhito S, Tiaoying L, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(9): 3350-3352.

(收稿日期: 2011-04-11 编辑: 衣凤芸)