

斯氏副柔线虫 rDNA-ITS 片段的克隆及序列分析

张晓东¹, 杨晓野^{1*}, 杨莲茹¹, 李林川², 左海涛³, 娜仁花³, 赵治国¹, 王俊杰¹

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古动物疾病预防控制中心, 呼和浩特 010020; 3. 内蒙古阿拉善盟兽医工作站, 阿左旗 750306)

摘要: 运用 PCR 方法以保守引物 NC5、NC13、NC13r 和 NC2 扩增从内蒙古地区骆驼皱胃分离的 3 条斯氏副柔线虫 (*Parabronema skrjabini*) rDNA 的内转录间隔区 1 (ITS1)、5.8S 序列和内转录间隔区 2 (ITS2)。将 PCR 扩增出的片段纯化后克隆至 pGM-T 载体, 用 PCR 技术及酶切鉴定阳性菌落, 对阳性菌落质粒 DNA 进行测序。结果表明线虫 1 (P. sk1) 扩增的 ITS 片段大小为 837 bp, 包含部分的 18S、28S 及全部的 ITS1 (298 bp)、5.8S (157 bp) 及 ITS2 (281 bp) 序列; 线虫 2 (P. sk2) 扩增的 ITS1 片段大小为 372 bp, 包含部分的 18S、5.8S 及全部的 ITS1 (296 bp); 线虫 3 (P. sk3) 扩增的 ITS2 片段大小为 484 bp, 包含部分的 5.8S、28S 及全部的 ITS2 (284 bp) 序列。同其它属线虫同源性比较 ITS2 序列同源性在 30.2%~60.1%。本研究系首次报道骆驼斯氏副柔线虫的 ITS 序列, 为斯氏副柔线虫分子生物学的进一步研究奠定基础。

关键词: 斯氏副柔线虫; 内转录间隔区; PCR; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.731

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0775-05

Cloning and Sequence Analysis of the rDNA-ITS of *Parabronema skrjabini*

ZHANG Xiao-dong¹, YANG Xiao-ye^{1*}, YANG Lian-ru¹, LI Lin-chuan²,

ZUO Hai-tao³, NA Ren-hua³, ZHAO Zhi-guo¹, WANG Jun-jie¹

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia

Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. Inner Mongolia

Center for Animal Disease Prevention and Control, Huhhot 010020, China;

3. Veterinary Workstation of Alashan League, Alashan Left County 750306, China)

Abstract: The internal transcribed spacer (ITS1, 5.8S and ITS2) of ribosomal DNA nucleotide fragments of *Parabronema skrjabini* isolated from the camel of Inner Mongolia region were amplified by PCR using three pairs of conserved primers NC5, NC13, NC13r and NC2. The PCR fragments were purified and cloned into pGM-T vector. The inserts were successfully sequenced, and the results revealed that the first sample's (P. sk1) ITS inserts were 837 bp in length and consisted of partial 18S, 28S and complete ITS1 (298 bp), 5.8S (157 bp) and ITS2 (281) rDNA sequences. The second sample's (P. sk2) ITS1 inserts were 372 bp in length and consisted of partial 18S, 5.8S and complete ITS1 (296 bp). The third sample's (P. sk3) ITS2 inserts were 484 bp in length and consisted of partial 5.8S, 28S and complete ITS2 (284 bp). ITS2 sequences shared 30.2%—60.1% homology with other nematodes. It was the first time that the complete sequence of ITS and 5.8S rDNA of *P. skrjabini* were reported. The results of this study laid a foundation for further studies.

Key words: *Parabronema skrjabini*; internal transcribed spacer; PCR; cloning; sequence analysis

收稿日期: 2008-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660124); 内蒙古自然科学基金资助项目 (200607010401)

作者简介: 张晓东 (1981-), 男, 内蒙古鄂尔多斯人, 硕士生, 主要从事寄生虫分子生物学研究, E-mail: zhangxd913@126.com

* 通讯作者: 杨晓野 (1956-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事草食家畜寄生虫病的研究, Tel: 0471-4303726, E-mail: xiaoyeyang122@sohu.com

骆驼胃线虫病由旋尾目、副柔属 (*Parabronema*) 的斯氏副柔线虫 (*Parabronema skrjabini*) 所引起;除骆驼以外,绵羊、山羊、牛及其它反刍动物亦可感染,双峰骆驼 (Bactrian camel) 是其最适宜的宿主^[1-2]。斯氏副柔线虫的传播媒介和生活史一直不很清楚,20 世纪 50 年代前苏联一篇文献资料曾报道其传播媒介可能是某些吸血蝇类^[3],其发育期幼虫在媒介体内的详细发育情况及对骆驼的感染和传播过程一直不完全清楚,特别是在国内,完全不知其传播媒介是何种吸血蝇类。在探询我国双峰骆驼斯氏副柔线虫传播媒介的过程中,作者试图利用 PCR 方法扩增该线虫基因组保守区域,进而选择特异片段做为遗传标记,将分子鉴定技术用于传播媒介的筛选验证,以弥补常规生物学调查方法的不足。线虫内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 序列是 rDNA 中介于 18S 和 28S 间的高度重复的片段,包括 ITS1 和 ITS2 两段序列,进化速度快且长度不大,由于协同进化使得该片段在基因组不同单元间非常一致,因而十分适合进行各种分子操作,ITS 序列分析成为在序列水平上探讨寄生线虫科内属间及属下种间遗传关系的有效标记^[4-5]。作者参考了国外的相关研究^[6-8],对被认为具有较为保守的遗传区域——ITS 片段进行 PCR 扩增,并对扩增出的 ITS 特异性片段进行载体克隆和测序,旨在为斯氏副柔线虫的分类、传播媒介的分子鉴别诊断、分子流行病学调查等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 虫体样品

虫体采集于中国内蒙古地区双峰骆驼皱胃,形态学鉴定为斯氏副柔线虫 (*P. skrjabini*),用 70% 酒精保存。

1.2 主要试剂

线虫裂解液 (100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 250 mmol · L⁻¹ EDTA pH 8.0, 4% SDS, 0.28 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇, 10 mg · mL⁻¹ 蛋白酶 K), 自配; pGM-T 载体克隆试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒为北京 TIANGEN 产品; Ex Taq 酶、限制性内切酶 *EcoR* I、DL2000 DNA Marker 为 TaKaRa 产品; DH5α 感受态细胞为预防兽医学实验室保存。

1.3 虫体 DNA 提取

按 Winterrowd 等报道的方法裂解虫体^[9]。即取经形态鉴定的单个斯氏副柔线虫 3 条,分别标记

为 P. sk1、P. sk2、P. sk3 后,各置入 1.5 mL EP 管内,用含蛋白酶 K 的线虫裂解液消化过夜,然后按苯酚氯仿抽提法提取虫体基因组总 DNA。

1.4 PCR 扩增

引物如下, NC5: 5'-GTAGGTGAACCTGCG-GAAGGATCATT-3', NC2: 5'-TTAGTTTCTT-TTCCTCCGCT-3', NC13: 5'-ATCGATGAAGA-ACGCAGC-3', NC13r: 5'-GCTGCGTTCTTCATC-GAT-3' 为扩增寄生线虫 ITS、ITS1 和 ITS2 序列的保守引物^[7-8],由大连宝生物技术有限公司合成。P. sk1 虫体样品 DNA 作模板,以引物 NC5 和 NC2 扩增 ITS 片段,反应体系为 50 μL,反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。P. sk2 虫体样品 DNA 作模板,以引物 NC5 和 NC13 扩增 ITS1 片段; P. sk3 虫体样品 DNA 作模板,以引物 NC13r 和 NC2 扩增 ITS2 片段,反应体系同上,退火温度为 55 °C。均设不加 DNA 模板的阴性对照以及以宿主皱胃组织 DNA 为模板的宿主对照。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,于紫外透射仪上观察,并记录结果。

1.5 扩增片段的克隆及测序

以 DNA 胶回收试剂盒纯化扩增片段,连接到 pGM-T 载体上,连接产物的转化参照萨姆布鲁克等的方法^[10],后将连接产物转化至感受态细胞 DH5α 中,在含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板培养基 37 °C 恒温培养 12 h,蓝白斑筛选挑取白色的单菌落进行 PCR 鉴定和提取质粒酶切鉴定,获得阳性克隆。将鉴定为阳性的重组菌送大连宝生物技术有限公司测序,然后进行序列比较和分析。

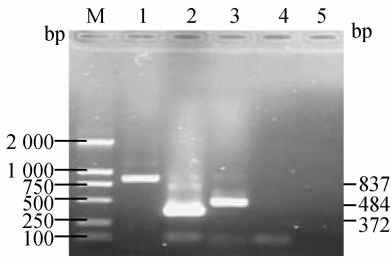
2 结果与分析

2.1 ITS 序列的 PCR 扩增

以提取的单个虫体基因组为模板,以 NC5 和 NC2、NC5 和 NC13、NC13r 和 NC2 作为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,可见 837、372 和 484 bp 的条带 (见图 1),与预期目的片段大小一致。

2.2 ITS 及 5.8S rDNA 片段的克隆、PCR 鉴定和酶切鉴定

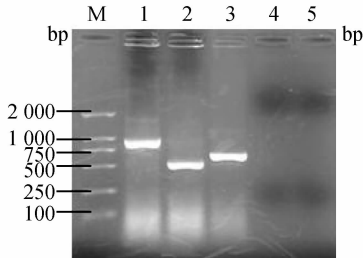
用凝胶纯化回收试剂盒回收 PCR 产物并将之克隆至 pGM-T 载体,转化至感受态细胞 DH5α 培养,挑取白色单菌进行 PCR 鉴定 (图 2)。对 PCR



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. ITS; 2. ITS1; 3. ITS2; 4. 骆驼皱胃组织对照; 5. 阴性对照
M. DL2000 DNA marker; 1. ITS; 2. ITS1; 3. ITS2; 4. Host (camel) control; 5. Negative control

图 1 斯氏副柔线虫 ITS 及 5.8S、ITS1、ITS2 序列 PCR 产物电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of ITS, 5.8S, ITS1 and ITS2 rDNA from *P. skrjabini*



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. pGM-PI PCR 产物; 2. pGM-PI1 PCR 产物; 3. pGM-PI2 PCR 产物; 4. 空菌对照; 5. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker; 1. pGM-PI PCR product; 2. pGM-PI1 PCR product; 3. pGM-PI2 PCR product; 4. Bacteria control; 5. Negative control

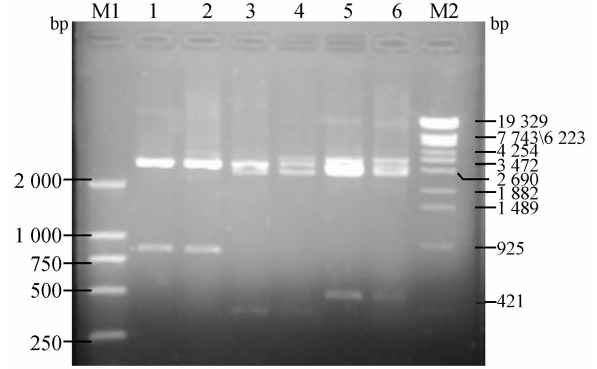
图 2 斯氏副柔线虫 ITS、ITS1、ITS2 序列重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmids by PCR amplification of ITS, ITS1 and ITS2

鉴定为阳性的单菌落扩增培养后进行质粒小量抽提,所得重组菌质粒分别命名为 pGM-PI、pGM-PI1 和 pGM-PI2;经 *EcoR* I 酶切后,1.5%琼脂糖凝胶电泳出现 2 条带,其中 857、392 和 504 bp 为插入的小片段,大片段为质粒载体(图 3)。

2.3 序列测定与分析

测序结果表明:由 NC5 和 NC2 作为引物扩增的线虫 1(*P. sk1*)内蒙古株 rDNA ITS 扩增片段为 837 bp,包括 ITS1 全序列(298 bp)、5.8S 全序列(157 bp)、ITS2 全序列(281 bp)和部分 18S 和 28S 序列,GenBank 注册号为 EU420130;由 NC5 和



M1. DL2000 相对分子质量标准; M2. λ -*EcoT14* I digest; 1,2. pGM-PI;3,4. pGM-PI1;5,6. pGM-PI2
M1. DL2000 DNA Marker; M2. λ -*EcoT14* I digest; 1, 2. Digested product of pGM-PI;3,4. Digested products of pGM-PI1; 5,6. Digested products of pGM-PI2

图 3 重组质粒的 *EcoR* I 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids by *EcoR* I restriction enzyme digestion

NC13 作为引物扩增线虫 2(*P. sk2*)内蒙古株 rDNA ITS1 扩增片段为 372 bp,包括 ITS1 全序列(296 bp)、部分 28S 和 5.8S 序列,GenBank 注册号为 EU420131;由 NC13r 和 NC2 作为引物扩增的线虫 3(*P. sk3*)内蒙古株 rDNA ITS2 扩增片段为 484 bp,包括 ITS2 全序列(284 bp)、部分 5.8S 和 28S 序列,GenBank 注册号为 EU420132。

在 GenBank 检索中,尚无斯氏副柔线虫或副柔线属内的其它虫种的序列,对所测得的 rDNA-ITS 序列用 BLAST 进行同源搜索,选用 GenBank 中旋尾目下相近的其它科属虫种的 ITS2 序列应用 DNAs-tar5.01 软件的 Jotun Hein 比对方法进行了同源性分析(图 4)并构建了系统进化树(图 5),可见斯氏副柔线虫 ITS2 序列与霍加披属的日本霍加披线虫同源性最高,为 73.1%,且遗传分歧较低,为 34.0%;与柔线科、柔线属的小口柔线虫同源性次之,为 60.1%;18S、5.8S 和 28S 区由于 GenBank 记录的相近科属只有部分序列,相应部分粗略比较同源性达 90% 以上;ITS1 序列由于 GenBank 记录的相近科属只有部分序列且分类相距较远,所以未进行比较。

对 3 个同种不同个体间的 rDNA 序列进行了种内比较,结果显示,不同个体间的序列在 18S 和 5.8S 间无差异;在 ITS1 和 ITS2 的序列中存在一定差异,*P. sk2* 株的 ITS1 在 20-21 位比 *P. sk1* 少 2 个 A 碱基,且在 133、170、234 位不同,存在碱基替换,

		同源性 Percent Identity						
		1	2	3	4	5	6	
分歧度 Divergence	1	■	60.1	73.1	30.2	39.1	31.7	1
	2	57.2	■	59.2	31.3	43.1	38.4	2
	3	34.0	59.2	■	32.3	41.2	30.8	3
	4	100.0	100.0	100.0	■	37.9	45.9	4
	5	100.0	100.0	100.0	100.0	■	40.2	5
	6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	6
		1	2	3	4	5	6	

1. 斯氏副柔线虫(No. EU420130); 2. 小口柔线虫(No. AY251023); 3. 日本霍加披线虫(No. AB369106); 4. 棘颚口线虫(No. AB181155); 5. 曼氏鸟胃线虫(No. AY702701); 6. 囊形线虫(No. AY161297)

1. *Parabronema skrjabini*; 2. *Habronema microstoma*; 3. *Oka pinema japonica*; 4. *Gnathostoma spinigerum*; 5. *Cyrnea mansioni*; 6. *Cystidicola stigmatura*

图4 斯氏副柔线虫 ITS-2 序列与 GenBank 中收录的相近序列的核苷酸同源性比较

Fig. 4 Homology of nucleotide sequences of ITS-2 of *P. skrjabini*

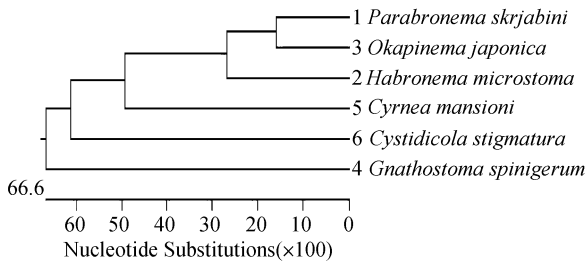


图5 斯氏副柔线虫 ITS-2 序列与 GenBank 中收录的相近序列的系统进化树比较

Fig. 5 Phylogenetic tree of nucleotide sequences of ITS-2 of *P. skrjabini*

差异占 ITS1 碱基数的 1.68%。P. sk1 株的 ITS2 在 161 位比 P. sk3 缺失 2 个碱基,且在 25、129、279 位与 P. sk3 不同,差异占 ITS1 碱基数的 2.14%。

3 讨论

以 ITS 为遗传标记,结合 PCR 扩增及其它方法,已被成功地应用于多种寄生虫的分子鉴定和分类^[11-12]。虫种的特异性分子鉴别主要是通过将其 ITS 序列与相似种进行比较而决定,目前在 GenBank 中尚无斯氏副柔线虫或副柔属内的其它虫种序列。本试验选取扩增分离自内蒙古地区骆驼皱胃

内的斯氏副柔线虫 ITS 序列进行研究。测序结果表明:利用报道的寄生虫通用引物 NC5、NC13、NC13r 和 NC2,可以成功扩增出斯氏副柔线虫 ITS 片段,28S、5.8S、18S 区域较保守,同 GenBank 中其它寄生虫有较高的同源性,可见寄生虫 ITS 通用引物确实具有广泛适用性。扩增同种不同个体间 ITS1、ITS2 序列碱基差异较小,分别为 1.68% 和 2.14%。与相近科的线虫 ITS 序列同源性较低,表明 ITS 序列具有较高的稳定性和种属特异性,可以作为理想的遗传标记应用于传播媒介分子鉴定。

斯氏副柔线虫(*Parabronema skrjabini*)隶属于副柔属(*Parabronema*),而对于副柔属的归类,现有资料介绍有两种,一种是将其归于锐形科(华首科 Acuariidae)^[1],另一种是将其归于柔线科(Habronematidae)^[3]。对于这两种分类方法尚无统一结论。根据同源性比较结果,作者认为斯氏副柔线虫(*Parabronema skrjabini*)与锐形科日本霍加披线虫(*Oka pinema japonica*)的同源性要略高于柔线科的小口柔线虫(*Habronema microstoma*)。因此从该结果来看,副柔属分类似乎与霍加披属更近一些。日本霍加披线虫(*Oka pinema japonica*) ITS2 序列注册者将该虫归类于锐形科,但是亦有分类法将霍加披属归类于柔线科副柔亚科^[3],由此看出关于霍加披属的分类也同样模糊。但由于比较数量较少,最终的结论尚不能确定,还需要通过更多的数据进一步比较分析。

本项研究所测得的斯氏副柔线虫 ITS 序列为国内外首次报道,测序结果初步证实了 ITS 片段可作为斯氏副柔线虫虫种的遗传标记。这为斯氏副柔线虫的分子生物学深入研究奠定了基础,并为建立斯氏副柔线虫幼虫发育过程中分子鉴别及传播媒介的筛选和快速诊断的 PCR 检测方法提供了重要依据。

参考文献:

- [1] 沈杰,黄兵. 中国家畜家禽寄生虫名录[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004:105-111.
- [2] 卢俊杰,靳家声. 人和动物寄生线虫图谱[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2002:417-420.
- [3] IVASHKIN V M. Elucidation of the life-cycle of the nematode *Parabronema skrjabini* of ruminants[R]. C R Acad Sci URSS, 1956, 107: 773-775(in Russian).
- [4] 林瑞庆,陈丽莎,翁亚彪,等. 有齿食道口线虫 ITS 及 5.8S DNA 片段的 PCR 扩增、克隆及序列分析[J].

- 中国农业科学,2005,38(3):639-642.
- [5] ZHU X Q, JACOBS D E, CHILTON N B, et al. Molecular characterization of a *Toxocara variant* from cats in Kuala Lumpur, Malaysia[J]. *Parasitology*, 1998, 117: 155-164.
- [6] HUNG G C, CHILTON N B, BEVERIDGGE I, et al. Molecular evidence for cryptic species within *Cyllocostephanus minutus* (Nematoda: Strongylidae)[J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29: 285-291.
- [7] ZHU X Q, CHILTON N B, JACOBS D E, et al. Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequence[J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29:469-478.
- [8] GASSER R B, ROSSI L, ZHU X Q. Identification of *Nematodirus* species (Nematoda: Molineidae) from wild ruminants in Italy using ribosomal DNA markers [J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29: 1909-1917.
- [9] WINTERROWD C A, POMROY W E, SANGSTE N C, et al. Benzimidazole-resistant β -tubulin alleles in a population of parasitic nematodes(*Cooperia oncophora*) of cattle[J]. *Veterinary Parasitology*, 2003, 117: 161-172.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002: 96-98.
- [11] HEISE M, EPE C, SCHNIEDER T. Differences in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of eight species of gastro-intestinal nematodes of ruminants [J]. *J Parasitol*, 1999,85(3):431-435.
- [12] CONOLE J C, CHILTON N B, JARVIS T, et al. Mutation scanning analysis of microsatellite variability in the ITS-2 (precursor rRNA) for three species of *Metastrongylus* (Nematoda; Metastrongyloidea) [J]. *Parasitol*, 2001, 122:195.

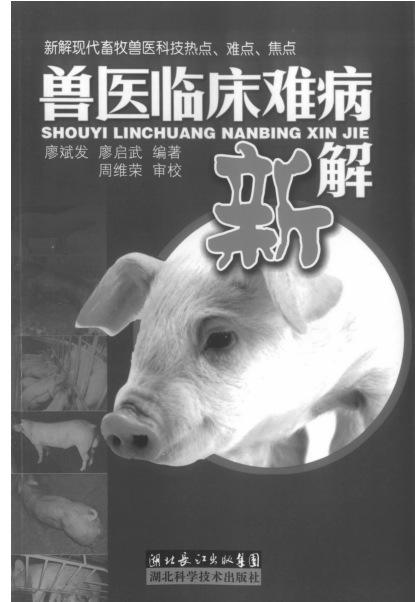
《兽医临床难病新解》简介

兽医临床工作者廖斌发、廖启武编著的《兽医临床难病新解》一书由湖北科学技术出版社出版,面向全国公开发售。

书中就当前流行或散发的猪瘟、疑似猪瘟、蓝耳病、圆环病毒病、伪狂犬病、链球菌病、水肿病、附红细胞体病、无名高热等病毒、细菌、原虫病以及其混合感染的温热病等一百多个热门话题,运用中兽医模糊黑箱理论,通过病例,新解难病,治法独特,疗效灵验,且具有科学性、实用性、简单操作性。可谓是一书在手,解难不愁。可供养猪场、养殖专业户及广大农村基层畜牧兽医技术人员在兽医临床实践中参考,也可作为农业大专院校师生和科技人员启迪资料。

该书售价 35 元/本(含包装邮费)需要者从邮局汇款,汇款地址:湖北省天门市根瘟灵研究所(天门市马湾镇人民大道 33 号)廖斌发收。

邮编:431715,汇单附言栏内注明“难病新解”。



联系电话:0728-4561354(兼传真)

手机:13872992321 13707222763