

文章编号: 1000-7423(2014)-03-0217-04

【论著】

基于核糖体 DNA ITS 区和 COX1 基因鉴别华支睾吸虫囊蚴

杨庆利^{1,2}, 申继清³, 蒋智华², 杨益超², 李红梅¹, 陈颖丹¹, 周晓农^{1*}

【摘要】 目的 基于核糖体 DNA ITS 区和 COX1 基因, PCR 鉴别鱼体内华支睾吸虫囊蚴。方法 于 2013 年 5 月底采集广西横县某水库的麦穗鱼, 用消化法从鱼肉组织中分离单个华支睾吸虫囊蚴及其他吸虫囊蚴; PCR 检测华支睾吸虫核糖体 DNA ITS 区和 COX1 基因, 并分析检测的灵敏性和特异性。结果 分离到不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴并经 PCR 检测证实。用针对核糖体 DNA ITS 区和 COX1 基因的 PCR 均能检测到单个华支睾吸虫囊蚴 DNA, 其特异性扩增条带大小分别为 437/549、156/249 和 195/166 bp。用核糖体 DNA ITS1 和 ITS2 区的通用引物和特异性引物扩增华支睾吸虫囊蚴 DNA 的阳性数之比分别为 0.905 和 0.952。针对 COX1 基因的特异性扩增均检测到目标 DNA, 并且扩增条带较亮。用该方法对其他吸虫囊蚴检测的对比试验显示特异性引物均未出现任何非特异性扩增反应; 用 ITS 区通用引物检测其他吸虫囊蚴则显示出严重的非特异性扩增反应。结论 通过形态观察结合 PCR 法识别出了不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴。用华支睾吸虫核糖体 DNA ITS 区的特异性引物进行 PCR 检测的灵敏性和特异性均优于相应通用引物。针对 COX1 基因的特异性 PCR 检测的灵敏性和特异性与核糖体 DNA ITS 区的检测结果相当。

【关键词】 华支睾吸虫; 囊蚴; ITS 区; COX1 基因; PCR

中图分类号: R383.22

文献标识码: A

Identification of *Clonorchis sinensis* Metacercariae Based on PCR Targeting Ribosomal DNA ITS Regions and COX1 Gene

YANG Qing-li^{1,2}, SHEN Ji-qing³, JIANG Zhi-hua², YANG Yi-chao²,
LI Hong-mei¹, CHEN Ying-dan¹, ZHOU Xiao-nong^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Center for Disease Control and Prevention of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530028, China; 3 Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 **Objective** To identify *Clonorchis sinensis* metacercariae using PCR targeting ribosomal DNA ITS region and COX1 gene. **Methods** *Pseudorasbora parva* were collected from Hengxian County of Guangxi at the end of May 2013. Single metacercaria of *C. sinensis* and other trematodes were separated from muscle tissue of *P. parva* by digestion method. Primers targeting ribosomal DNA ITS region and COX1 gene of *C. sinensis* were designed for PCR and the universal primers were used as control. The sensitivity and specificity of the PCR detection were analyzed. **Results** *C. sinensis* metacercariae at different stages were identified by PCR. DNA from single *C. sinensis* metacercaria was detected by PCR targeting ribosomal DNA ITS region and COX1 gene. The specific amplicons have sizes of 437/549, 156/249 and 195/166 bp, respectively. The ratio of the two positive numbers in PCR with universal primers and specific primers targeting *C. sinensis* ribosomal DNA ITS1 and ITS2 regions was 0.905 and 0.952, respectively. The target gene fragments were amplified by PCR using COX1 gene-specific primers. The PCR with specific primers did not show any non-specific amplification. However, the PCR with universal primers targeting ribosomal DNA ITS regions performed serious non-specific amplification. **Conclusion** *C. sinensis* metacercariae at different stages are identified by morphological observation and PCR method. Species-specific primers targeting ribosomal DNA ITS region show higher sensitivity and

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31260221); 广西自然科学基金 (No. 2010GXNSFB013066)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028; 3 广西医科大学寄生虫学教研室, 南宁 530021

* 通讯作者, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

specificity than the universal primers. PCR targeting *COX1* gene shows similar sensitivity and specificity to PCR with specific primers targeting ribosomal DNA ITS regions.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; Metacercaria; ITS region; *COX1* gene; PCR

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31260221) and Natural Science Fund of Guangxi (No. 2010GXNSFB013066)

* Corresponding author, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

华支睾吸虫囊蚴主要存在于易感的淡水鱼和虾的肌肉组织中。人因食用含华支睾吸虫囊蚴的淡水鱼和虾等受到感染。广西是我国华支睾吸虫病主要流行区之一^[1]。调查发现, 广西华支睾吸虫病流行区淡水鱼受感染程度严重, 且有扇棘单睾吸虫 (*Haplorchis taichui*)、横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokogawai*)、钩棘单睾吸虫 (*Haplorchis pumilio*)、台湾棘带吸虫 (*Centrocestus formosanus*)、台湾次睾吸虫 (*Metorchis taiwanensis*) 或抱茎棘隙吸虫 (*Echinochasmus perfoliatus*) 等混合感染^[2,3]。寄生于人体的小型吸虫囊蚴在形态上与华支睾吸虫囊蚴相似^[3,4], 镜检不易区分。本研究在综合华支睾吸虫PCR检测方法的基础上, 选择华支睾吸虫基因组核糖体DNA (rDNA) 内转录间隔区 (ITS) 和线粒体细胞色素C氧化酶亚基1 (*COX1*) 基因作为目标, 对来源于上述地区淡水鱼体内不同发育程度的囊蚴进行了PCR检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 囊蚴和华支睾吸虫DNA阳性对照来源 于2013年5月底采集广西横县某水库的麦穗鱼, 用消化法从鱼肉组织中分离华支睾吸虫单个囊蚴。华支睾吸虫DNA阳性对照品为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 胃蛋白酶 (1:3 000) 购自美国Amresco公司; DNA提取试剂盒 (DNeasy Blood & Tissue Kit) 购自德国Qiagen GmbH公司; 样品保护剂 (Sample Protector) 和*Premix ExTaq* 购自宝生物 (大连) 工程有限公司。体视显微镜 (SZ61TR) 为日本Olympus公司产品。梯度PCR仪 (verity) 为美国ABI公司产品。

1.2 方法

1.2.1 囊蚴分离 麦穗鱼去头、腮和内脏后, 洗净, 用含1%胃蛋白酶和1%盐酸的人工消化液37℃消化过夜; 然后用60目筛网过滤除去残渣, 消化物经3次重复水洗、沉淀, 收集全部消化物保存于少量生理盐水中。体视显微镜下观察并分离出不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴。经生理盐水洗涤后分别置于样品保护剂内, -20℃保存。

1.2.2 DNA提取和引物设计 取不同发育阶段的囊蚴各3个, 分别提取单个囊蚴的DNA。按照DNA提取试剂盒说明提取DNA。用200 μl AE缓冲液洗脱DNA, -20℃保存。分别针对华支睾吸虫rDNA ITS1和ITS2区以及*COX1*基因序列设计特异性引物各2对。引物设计采用 Primer-BLAST程序 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) 完成。分别用针对华支睾吸虫、扇棘单睾吸虫、钩棘单睾吸虫和麝猫后睾吸虫 (*Opisthorchis viverrini*) 4种吸虫rDNA ITS1和ITS2区的通用引物作为对照^[2]。引物由生工生物 (上海) 有限公司合成 (表1)。

表1 华支睾吸虫PCR检测引物
Table 1 PCR primers for *Clonorchis sinensis* detection

基因 Gene	登录号 Accession number	引物 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	产物大小/bp Product size/bp
ITS1	JQ048600	F1	AGCGTCTCTAGTTCTACCAA	437
		R1	CTCAATCAACTGGTAACCCA	
		F2	TAGTTCCGTCATCTGTCTTG	549
		R2	CAATCAACTGCTAACCCAGA	
ITS2	JQ048600	F1	TCTATGGCTTTTCCCCAATG	156
		R1	CAATACTGAAGCCTCAACCA	
		F2	TATAAATATCAGCAGCCCC	249
		R2	TACTGAAGCCTCAACCAAAG	
<i>COX1</i>	AF096229	F1	ATAGTTTGTCTGGGTAGGGT	195
		R1	CCCAATTATCCACCACATGA	
		F2	TTTACTGTGGGCTGGATTT	166
		R2	GCACCACAAACCAATTATC	

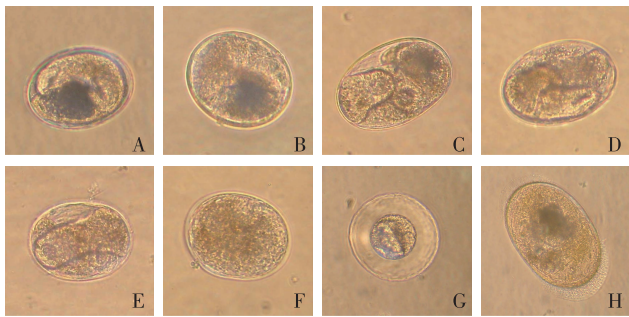
1.2.3 目的基因扩增 PCR反应体系为: *ExTaq* 0.625 U、dNTP 混合物各0.4 mmol/L、MgCl₂ 4 mmol/L、引物 (20 μmol/L) 各0.5 μl和模板DNA溶液1 μl, 总体系25 μl。PCR反应条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共35个循环; 72℃ 3 min。PCR产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。分别用ITS1区、ITS2区和*COX1*基因特异性引物进行PCR扩增; 用ITS1和ITS2区通用引物进行PCR扩增验证。

1.2.4 灵敏性和特异性 用通用引物与相应特异性引物进行PCR扩增华支睾吸虫囊蚴DNA, 将两者的检测阳性数之比作为分析检测灵敏性的指标。比值大于1, 说明通用引物检测灵敏性大于特异性引物; 比值小于

1说明特异性引物检测灵敏性大于通用引物。同时,根据通用引物和特异性引物扩增其他吸虫囊蚴DNA时非特异性条带出现与否判断检测特异性的优劣。

2 结果

2.1 不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴 在体视显微镜下观察并分离到不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴6种,随着华支睾吸虫囊蚴趋于成熟,其囊壁逐渐清晰,排泄囊内排泄物逐渐增多,颜色逐渐加深(图1A~F)。同时,麦穗鱼消化物中存在数量较多的其他吸虫囊蚴,主要分离到2种(图1G、H)。



A~F: 成熟程度由高至低的华支睾吸虫囊蚴($\times 40$); G、H: 其他两种吸虫囊蚴(G: $\times 40$; H: $\times 20$)。

A~F: *Clonorchis sinensis* metacercariae from high to low maturity level ($\times 40$); G、H: Metacercariae of other flukes (G: $\times 40$; H: $\times 20$)。

图1 从麦穗鱼分离到的华支睾吸虫囊蚴及其他囊蚴

Fig. 1 Metacercariae isolated from *Pseudorasbora parva*

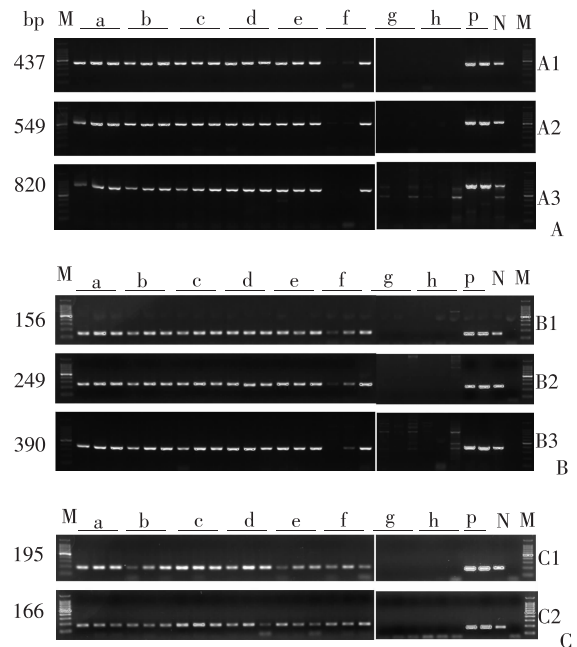
2.2 基于rDNA ITS区和COX1基因鉴别华支睾吸虫囊蚴

2.2.1 基于ITS1区的PCR检测结果 对于不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴(图1A~F组),用ITS1区的2对特异性引物均能扩增出特异性产物,大小分别为437 bp和549 bp。同时用ITS1区通用引物进行扩增也得到较一致的鉴定结果(产物大小为820 bp)。但模板量较少的样品(图1F组),用通用引物则检测不到可见的条带。用ITS1区通用引物与特异性引物进行PCR扩增的阳性数比值为0.905 (19/21),即特异性引物的扩增灵敏性高于相应通用引物。用ITS1区的2对特异性引物对2种其他吸虫囊蚴(图1G和H组)的检测未出现特异条带;而用ITS1区的通用引物对2种其他吸虫囊蚴的检测则出现非特异性扩增(图2A),即特异性引物的扩增特异性优于通用引物。

2.2.2 基于ITS2区的PCR检测结果 与对ITS1区的PCR检测结果相一致,图1A~F组囊蚴,用ITS2区的2对特异性引物均能扩增出特异性产物。其产物大小分别为156 bp和249 bp。图1F组同样由于模板量较少的原因导致条带较暗。用ITS2区通用引物进行扩增也得到比较一致的结果(其产物大小为390 bp)。对于模板量

较少的样品(图1F组),用ITS2区通用引物进行PCR扩增时也有个别样品检测不到可见的条带。用ITS2区通用引物与特异性引物进行PCR扩增的阳性数比值为0.952 (20/21),即特异性引物扩增的灵敏性高于相应通用引物。用ITS2区的2对特异性引物对2种其他吸虫囊蚴(图1G和H组)的检测未出现相应的特异性条带;用ITS2区的通用引物则出现非特异性扩增(图2B),即特异性引物的扩增特异性优于通用引物。

2.2.3 基于COX1基因的PCR检测结果 同时用COX1基因特异性引物进行PCR扩增,进一步验证检测结果。与对ITS区的PCR检测结果相一致,图1中A~F组囊蚴,用COX1基因的2对特异性引物均能扩增出特异性产物。其产物大小分别为195 bp和166 bp。对于模板量较少的标本(图1F组)同样显示出较亮的扩增条带。用COX1基因的两对特异性引物对两种其他吸虫囊蚴(图1G和H组)的检测未见扩增产物(图2C)。



A: 2对华支睾吸虫 rDNA ITS1 区特异性引物 (A1 和 A2) 和 1对 ITS1 区通用引物 (A3) 扩增结果。B: 2对 rDNA ITS2 区特异性引物 (B1 和 B2) 和 1对 ITS2 区通用引物 (B3) 扩增结果。C: 用 2对 COX1 基因特异性引物 (C1 和 C2) 扩增结果。M: 100 bp DNA 标志物; a~f: 不同发育阶段的华支睾吸虫囊蚴; g~h: 2种其他吸虫囊蚴; p: 阳性对照; N: 空白对照。

A: Using two sets of specific primers (A1, A2) and a set of universal primers (A3) targeting rDNA ITS1 region of *C. sinensis*; B: Using two sets of specific primers (B1, B2) and a set of universal primers (B3) targeting rDNA ITS2 region of *C. sinensis*; C: Using two sets of specific primers (C1, C2) targeting COX1 gene of *C. sinensis*; M: 100 bp DNA marker; a~f: *C. sinensis* metacercariae at different stages; g~h: Metacercariae from other trematode; p: *C. sinensis* positive control; N: Blank control.

图2 基于 rDNA ITS 区和 COX1 基因的 PCR 法鉴别华支睾吸虫囊蚴

Fig. 2 Identification of *Clonorchis sinensis* metacercariae by PCR targeting ribosomal DNA ITS regions and COX1 gene

3 讨 论

自然环境下,淡水鱼受华支睾吸虫尾蚴感染的程度以及囊蚴的成熟程度除与鱼的种类有关外,还受鱼的繁殖生长季节、地区雨季时间(关系到虫卵被集中冲入河塘的时间)等因素影响。本研究的采集点为广西横县,时间为5月下旬。选择最易感的麦穗鱼进行囊蚴分离^[5,6]。鱼肉经消化后发现部分具有典型形态且较成熟的华支睾吸虫囊蚴,其余囊蚴的形态、大小与成熟的华支睾吸虫囊蚴相近,但无法确认。有研究通过在实验室建立华支睾吸虫生活史,结果发现逸尾蚴螺类与鱼类共同饲养30 d后可检查到未成熟囊蚴,至45 d囊蚴逐渐成熟^[7]。本研究根据囊蚴形态相似程度将其分为6组。此外还在鱼肉消化物中发现数量较多的形态大小与华支睾吸虫囊蚴有较大差异的2种其他吸虫囊蚴。PCR证实6组与成熟华支睾吸虫囊蚴形态近似的囊蚴属于同种。

对比观察发现,横川后殖吸虫囊蚴与未成熟华支睾吸虫囊蚴类似,抱茎棘隙吸虫囊蚴也类似于华支睾吸虫幼稚型囊蚴,上述2种吸虫同样存在于广西华支睾吸虫病流行区^[3]。本研究虽未确定所分离出来的形态与华支睾吸虫囊蚴有差异的其他2种囊蚴是否为横川后殖吸虫和抱茎棘隙吸虫囊蚴,但本研究所设计的引物可将其与华支睾吸虫囊蚴区别开。因此,本研究所建立的PCR法对华支睾吸虫病的监测具有一定意义。

用PCR法检测华支睾吸虫的DNA靶序列主要有rDNA ITS区^[3]、线粒体COX1基因^[8]和线粒体基因组COX1基因外区域^[9]。Sato等^[2]建立的通用性PCR法对ITS1和ITS2检测的敏感性分别为76.2%和95.2%。本实验结果也验证了其相应特异性引物扩增结果的敏感性,两者扩增结果的阳性数比值分别为0.905和0.952。Thaenkham等^[8]根据扇棘单睾吸虫和麝猫后睾吸虫COX1基因设计简并引物,成功对这2种吸虫进行了PCR检测,其产物大小为372 bp。其中,对麝猫后睾吸虫的检测灵敏性最高;对华支睾吸虫也可进行检测,但灵敏性较低;用此简并引物对钩棘单睾吸虫等检测的灵敏性和特异性则都很低。本研究采用华支睾吸虫COX1基因特异性引物对华支睾吸虫囊蚴进行了检测,结果显示其检测灵敏性与rDNA ITS区的检测结果相当,且条带较亮。用华支睾吸虫COX1基因特异性引物对其他吸虫囊蚴的扩增也未见任何非特异性

反应。近来报道,用荧光定量PCR法检测华支睾吸虫DNA也选择COX1基因^[10]。因此,综合分析认为,COX1基因是检测华支睾吸虫DNA的首选靶标,其次为rDNA ITS2区。

调查发现,广西等流行区淡水鱼感染华支睾吸虫情况严重^[6,11],并且广西华支睾吸虫病流行区混合有严重的扇棘单睾吸虫感染,在某些地区,其比例占吸虫感染的半数以上^[12]。本研究设计引物利用PCR法鉴别了不同成熟度的华支睾吸虫囊蚴,并将其与其他2种吸虫囊蚴区别开来。

志谢 感谢广西横县疾病预防控制中心韦斯亮、陈豫等医师在标本采集过程中的协助。

参 考 文 献

- [1] 方悦怡,陈颖丹,黎学铭,等.我国华支睾吸虫病流行区感染现状调查[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2008,26(2):99-103.
- [2] Sato M, Thaenkham U, Dekumyoy P, et al. Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions [J]. Acta Tropica, 2009, 109(1): 81-83.
- [3] Sohn WM, Eom KS, Min DY, et al. Fishborn trematode metacercariae in freshwater fish from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China[J]. Korean J Parasitol, 2009, 47(3): 249-257.
- [4] 林金祥,李莉莎,陈宝建,等.人体5种小型吸虫病原形态观察[J].热带医学杂志,2006,6(2):194-196.
- [5] 刘孝刚,刘刚,张文雯.辽西地区野生淡水鱼华支睾吸虫囊蚴感染情况[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2011,29(2):157-158.
- [6] 申海光,周振座,何曲波,等.广西柳江河鱼类华支睾吸虫囊蚴感染情况[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2010,28(2):157-159.
- [7] 梁焜,胡旭初,吕志跃,等.华支睾吸虫生活史在实验室的建立[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2009,27(2):148-150.
- [8] Thaenkham U, Visetsuk K, Dung T, et al. Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker [J]. Acta Trop, 2007, 103(1): 26-32.
- [9] Le TH, Van De N, Blair D, et al. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination [J]. Exp Parasitol, 2006, 112(2): 109-114.
- [10] Qiao T, Zheng PM, Ma RH, et al. Development of a real-time PCR assay for the detection of *Clonorchis sinensis* DNA in gallbladder bile and stone samples from patients with cholecystolithiasis[J]. Parasitol Res, 2012, 111(4): 1497-1503.
- [11] 黄庆梅.广西横县集贸市场淡水鱼虾华支睾吸虫囊蚴感染调查[J].口岸卫生控制,2009,14(1):27-29.
- [12] 杨益超,李树林,谭裕光,等.广西肝吸虫流行区人群及淡水鱼扇棘单睾吸虫感染调查[J].应用预防医学,2012,18(2):75-77.

(收稿日期:2013-12-11 编辑:衣凤芸)