

黄艾美耳球虫纯种分离及 ITS-1 序列测定

方素芳, 崔平, 顾小龙

(河北北方学院 动物科技学院, 河北 张家口 075000)

摘要: 为建立一种有效鉴定兔球虫的分子生物学方法, 采用单卵囊分离技术, 分离纯化黄艾美耳球虫。根据 GenBank 中发表的艾美耳属球虫 18S rDNA 和 5.8S rDNA 序列, 设计特异性引物, 建立 PCR 方法并针对黄艾美耳球虫第 1 内转录间隔区进行扩增, PCR 产物直接测序。结果分离出黄艾美耳球虫, 并扩增出包含黄艾美耳球虫第 1 内转录间隔区的基因条带, 随后测定了该条带序列, 大小为 455 bp。研究结果填补了兔球虫第 1 内转录间隔区序列遗传资料的空白, 为兔球虫虫种及虫株的准确鉴定奠定了基础。

关键词: 黄艾美耳球虫; 单卵囊分离; ITS-1; PCR; 测序

中图分类号: S852.72⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0144-03

Isolation of the Pure Species and Sequencing of ITS-1 of *E. flavescens*

FANG Sufang, CUI Ping, GU Xiaolong

(College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: To establish a molecular biological method for identifying coccidium species, a pair of specific primers was designed according to previously published sequences of 18S rDNA and 5.8S rDNA of *Eimeria* coccidia in the GenBank database. The pure species of *Eimeria flavescens* was isolated using single oocyst isolating technique and the gene of ITS-1 of *E. flavescens* was amplified by PCR assay. The PCR product was cloned and sequenced, which showed that the pure species of *E. flavescens* was successfully isolated and the gene fragment including ITS-1 of *E. flavescens* was 455 bp long.

Key words: *E. flavescens*; Single oocyst isolating; ITS-1; PCR; Sequence

兔球虫病是危害家兔最严重的疾病之一, 尤以断奶至 2 月龄的幼兔最易感, 其感染率极高, 几乎达 100%。国际上公认兔球虫有 11 个种^[1], 其中黄艾美耳球虫是兔球虫中致病力较强、危害较大的球虫种类之一, 能引起严重的球虫病^[2]。对于球虫种类的鉴定, 传统方法是以形态学、生物学特性(寄生部位、潜在期、孢子化时间、致病性、病变特征等)为鉴别指标^[3], 但这些鉴别指标有时会发生变化, 不能作为虫种鉴别的精确指标^[4]。分子生物学方法可有效弥补形态学鉴定的不足。ITS (Internal transcribed spacers,

ITS) 是核糖体 DNA (Ribosomal DNA rDNA) 中介于 18S 和 28S 之间的内转录间隔区, 包括 ITS-1 和 ITS-2 两段序列。本研究在分离出纯种黄艾美耳球虫的基础上, 对其 ITS-1 基因进行分离和测序, 为建立分子生物学检测方法准确鉴定黄艾美耳球虫提供依据。

1 材料和方法

1.1 黄艾美耳球虫的分离及继代增殖

采用常规方法处理张家口、保定、衡水、廊坊、邢台、南京等地农户饲养和养兔场不同日龄兔的粪便,

收稿日期: 2010-09-03

基金项目: 国家兔产业技术体系(农业部)资助项目(nycytx-44)

作者简介: 方素芳(1968), 女, 河北张家口人, 副教授, 在读博士研究生, 主要从事寄生虫免疫及分子寄生虫学研究。

E-mail: zjkfsf@126.com

收集卵囊培养至孢子化。在高倍镜下根据形态学特征分离黄艾美耳球虫,接种无球虫兔^[5]。从卵囊排出时开始收集兔粪直至排卵结束,收集粪便分离卵囊、培养至孢子化。将孢子化的第一代卵囊接种另一组无球虫兔,每只兔5 000个卵囊,当有大量卵囊排出时收集粪便、分离卵囊,加2.5%的重铬酸钾溶液培养至孢子化,4℃保存备用。

1.2 球虫卵囊的纯化

用自来水洗去收集的孢子化卵囊溶液中的重铬酸钾,依次用0.07 mm、0.05 mm和0.04 mm孔径铜筛过滤,滤液经3 000 r/min离心15 min,去掉上清液,在沉淀中加入饱和盐水1 500 r/min离心10 min,离心管上层飘浮的乳白色似“塞子”状物质即卵囊带。将其移入新管中,用10倍蒸馏水稀释,3 000 r/min离心15 min收集沉淀,然后于沉淀中加入20%次氯酸钠(NaClO),在4℃下作用20 min,最后用灭菌的蒸馏水离心洗涤3次,除去小的杂质和次氯酸钠,即可得到纯化的孢子化卵囊。

1.3 球虫DNA模板的制备

将纯化好的虫卵以3 000 r/min离心10 min,弃掉上清后加入灭菌蒸馏水进行计数,以虫卵数达到 10^6 个/mL时即可提取基因组DNA。取1 mL计数后的虫卵液加入到组织研磨器中研磨球虫卵囊约8 min,显微镜下观察到约90%卵囊壁破碎后,再加入1 mL卵囊裂解液分装于1.5 mL离心管中,65℃作用3 h,之后用酚-氯仿抽提,异丙醇沉淀DNA,沉淀用50 μL TE溶解。

1.4 PCR反应体系

PCR反应引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物序列如下:ITS-1上游引物P1, 5'-AAGTTGCGTAAATAGAGCCC-3' (与18S DNA结合), ITS-1下游引物P2, 5'-CAAGACATCCATTGCTGAAA-3' (与5.8S DNA结合);

扩增体系:10×PCR Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL, dNTP mixture 2 μL, 引物(20 mmol/L) 0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.25 μL, 模板DNA 1 μL, 补加灭菌ddH₂O至总体积为25 μL。

反应条件:94℃预变性4 min; 94℃变性1 min, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳后,再经紫外透射仪观察并记录结果。

1.5 PCR反应的敏感性

将提取的黄艾美耳球虫基因组DNA进行5、25、125、375、625倍稀释,取稀释后的基因组DNA 1 μL作为模板进行PCR反应。

1.6 PCR产物测序

将在张家口分离的黄艾美耳球虫的PCR产物送宝生物工程(大连)有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 黄艾美耳球虫的形态观察及继代增殖

从张家口、南京的兔粪中获得纯种黄艾美耳球虫(图1),其孢子化卵囊为倒梨形或宽卵圆形,大小为(28~34) μm × (20~25) μm。在宽端有明显的卵膜孔,卵囊壁由窄端向宽端显著加厚,光滑、呈淡黄色或褐色,无外残体,孢子囊为长卵圆形,有斯氏体和内残体。图2为继代增殖后获得的卵囊,以供制备DNA模板。

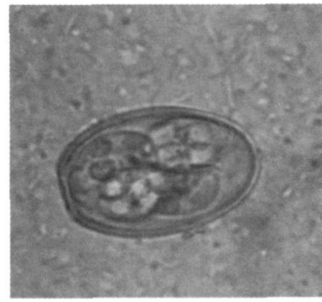


图1 黄艾美耳球虫孢子化卵囊(40×10)

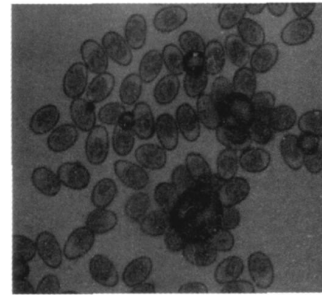
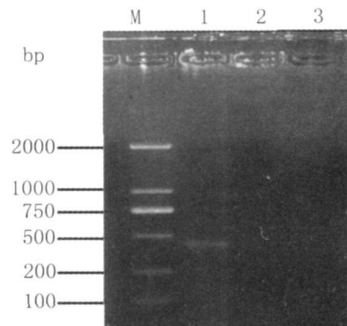


图2 黄艾美耳球虫未孢子化卵囊(10×10)

2.2 PCR扩增结果

结果显示,黄艾美耳球虫张家口株卵囊扩增出清晰的约为455 bp的目的条带,无其他非特异性条带出现,与预期大小相符合(图3)。



M. DNA标准DL2000; 1, 2. PCR产物; 3. 阴性对照

图3 黄艾美耳球虫PCR扩增结果

2.3 PCR 反应的敏感性

由图 4 可见, 将提取的黄艾美耳球虫基因组 DNA 进行 5、25、125、375、625 倍稀释, 分别进行 PCR 扩增, 扩增产物依次点样 2、3、4、5、6 孔, 在第 5 孔仍

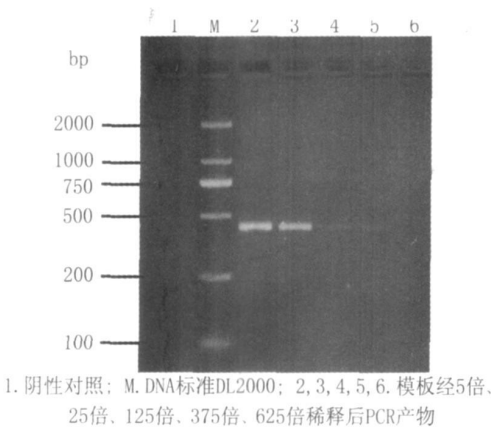


图 4 黄艾美耳球虫 PCR 敏感性

```
1  AAGTTGCGTAAATAGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTT
51  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACACATTGGTGGGAAGAAC
101 AGTTTCTAACTCCATTTAGCACGAATTTCCACATTGTGGGAGTTTGA
151 GGCTATTTGTGGGTTGGTGTGGTTTGTTCGTACCAACCGAGGGGGTAACCT
201 TTGCATTTTCGAACCTCTGAATCTTTTTCATTCTACAACGCTTTTCGA
251 AAGTATGCTATTTGATCTAATTTCTCCTTCTGCACACTTTTTTTCCCAG
301 TAAAATGGAATAATGGAAGTGTGGCAGATGGATGTTTGAAGCGACAG
351 ACTCGCCCGGAATAACAGCGTCAAAATGCTGTTTTTGTGGATGAGGA
401 GGGTAGCTTTATGTTGTAATGGAAGAAAAAACTTTTCAGCAATGGATG
451 TCTTG
```

图 5 兔黄艾美耳球虫的 ITS 1 序列

3 讨论

分离与纯化兔球虫卵囊, 有助于鉴别球虫的种类和建立球虫的纯种体系, 对进一步研究兔球虫的生物学特性(致病性、免疫原性、内生性发育等)、早熟选育系、分子生物学特性等均有极其重要的意义。单卵囊分离是分离纯化球虫的一种常规方法, 鸡球虫单卵囊感染成功率一般能达到 75%。国外多用断奶无球虫幼兔进行单卵囊接种, 本试验采用 60 日龄的无球虫兔进行单卵囊接种和纯种传代。

在 PCR 技术用于球虫分子分类学的研究中, 选择合适的靶序列至关重要。内转录间隔区(ITS)之所以被越来越多地用于物种分类和遗传进化关系的研究^[6-7], 是因为其进化速度比 rRNA 基因本身要快, 该序列具有功能上的保守性和进化上的时钟性^[8]。本试验中, 黄艾美耳球虫基因组 DNA 稀释 375 倍(相当于 27 个卵囊基因组 DNA), 仍可扩增出清晰条带。目前 GenBank 中没有黄艾美耳球虫的 ITS-1 序列, 本研究在分离出纯种黄艾美耳球虫的基础上, 对其 ITS-1 基因进行扩增和测序, 填补了兔球虫第一内转录间隔区序列遗传资料的空白。

可以看到清晰的条带, 表明本试验最低能检出相当于 27 个卵囊的基因组 DNA。

2.4 PCR 产物测序结果

由大连宝生物测得的黄艾美耳球虫的 ITS-1 序列如图 5 所示。图 5 所示测序列包含黄艾美耳球虫 18S rDNA 部分序列、ITS-1 全序列及 5.8S rDNA 部分序列。在生物遗传进化过程中, 核糖体 RNA 序列在同一种属内高度保守, 与同属内鸡柔嫩的艾美尔球虫 AF026388 18S rDNA 序列和 5.8S rRNA 序列进行比对, 黄艾美耳球虫的 ITS-1 全序列位于所测序列的 81-431 位, 共 351 个碱基。黄艾美耳球虫 ITS-1 全序列在 GenBank 中没有公布, 本研究结果填补了兔球虫第一内转录间隔区序列遗传资料的空白, 为兔球虫虫种及虫株的准确鉴定奠定了基础。

参考文献:

[1] 蒋金书. 动物原虫病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.

[2] Twigg L, Lowe T, Martin G, et al. The ecology of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in coastal southern Western Australia[J]. Wild Res, 1998, 12: 212-225.

[3] Pakandl M. Coccidia of rabbit: a review[J]. Folia Parasitol, 2009, 56(3): 153-166.

[4] 索勋, 李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.

[5] 程宝艳. 安徽省肥西县家兔球虫感染情况初步调查[J]. 动物医学进展, 2006, 27(3): 90-93.

[6] Su Yao Chi, Andrew Fei Chang Young, Tsai Fang Mei. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer1(ITS-1) sequence[J]. Veterinary Parasitology, 2003, 117: 221-227.

[7] Hnida J A, Duszynski. Taxonomy and systematics of some *Eimeria* species of murid rodents as determined by the ITS1 region of ribosomal gene complex[J]. Veterinary Parasitology, 1999, 119, 349-357.

[8] Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution[J]. Nature, 1982, 299: 111-117.