

# 华南虎绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 序列 扩增与序列分析

张新高<sup>1</sup>, 侯杰<sup>2</sup>, 陈武<sup>3</sup>, 程田<sup>2</sup>, 林瑞庆<sup>2\*</sup>

(1. 深圳市南山区动物防疫监督所, 广东 深圳 518051; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

3. 广州动物园, 广东 广州 510070)

**摘要:** 以从广州动物园华南虎体内采集的 2 条绦虫作为研究对象, 利用核糖体 DNA (rDNA) 内转录间隔区序列 (ITS) 的遗传标记特点, 用保守引物 BD1 和 BD2 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 经胶回收纯化后, 连接到 pGEM-T Easy 载体上, 然后转化并鉴定出阳性菌落, 对菌落进行 PCR 扩增并测序, 将测序结果与 GenBank 公布的相关绦虫 ITS 序列进行对比分析, 结果显示, 采自广州动物园华南虎的 2 条绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 序列总长均为 1387 bp, 序列相似性为 100%, 与狭带宫绦虫 (*Spirometra erinaceieuropaei*)、舌形属绦虫 (*Diphyllobothrium ligula*)、宽节双叶槽绦虫 (*Diphyllobothrium latum*) 的 ITS 及 5.8S rDNA 序列相似性分别为 96.7%、66.5%、71.5%, 结果显示, 此次分离的绦虫属于狭带属的狭带宫绦虫, 所测得的华南虎狭带宫绦虫的 ITS 序列为首次报道。

**关键词:** 华南虎; 绦虫; 核糖体 DNA; 内转录间隔区序列; 鉴定

**中图分类号:** S855.9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)08-0205-05

## Amplification and Sequence Analysis of the ITS and 5.8S rDNA of Cestodes From *Panthera tigris amoyensis* in China

ZHANG Xin-gao<sup>1</sup>, HOU Jie<sup>2</sup>, CHEN Wu<sup>3</sup>, CHENG Tian<sup>2</sup>, LIN Rui-qing<sup>2\*</sup>

(1. Nanshan District Institute of Animal Diseases Prevention and Control, Shenzhen 518051, China;

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. Guangzhou Zoo, Guangzhou 510070 China)

**Abstract:** Utilizing the first and second internal transcribed spacers of ribosomal DNA (ITS rDNA) as the genetic marker, the specific identity of the cestodes from a South China tiger (*Panthera tigris amoyensis*) in Guangzhou Zoo was performed in the present study. The ITS rDNA was amplified by PCR using the conserved primer pair BD1 and BD2. The PCR products were purified, cloned into pGEM-T Easy vector, and then the positive clones were selected for sequencing. DNA sequences were compared with relevant sequences previously reported in GenBank. The results showed that the ITS and 5.8S rDNA of the cestodes from *Panthera tigris amoyensis* was 1387 bp in length and have no sequence variation existed between two samples. The sequence similarities were 96.7%, 66.5%, and 71.5% respectively for ITS and 5.8S rDNA compared to those of *Spirometra erinaceieuropaei*, *Diphyllobothrium ligula*, and *Diphyllobothrium latum*. This indicates that the cestodes from *Panthera tigris amoyensis* in China represents the *S. Eri-*

收稿日期: 2011-03-16

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目 (IRT0723)

作者简介: 张新高 (1972-), 男, 广东五华人, 兽医师, 本科, 主要从事动物病原检验和防控工作。

E-mail: xg\_zhang@163.com

\*通讯作者: 林瑞庆 (1973-), 男, 广东阳江人, 副研究员, 博士, 主要从事功能基因组学及分子生物学研究。

E-mail: rqlin@scau.edu.cn

naceiueuropaei.

**Key words:** *Panthera tigris amoyensis*; Cestodes; Ribosomal DNA (rDNA); Internal transcribed spacers (ITS); Identification

绦虫寄生于家畜、禽类及人体内,属于扁形动物门绦虫纲。圆叶目绦虫和假叶目绦虫对家畜及人体具有感染性而常能致人、畜以严重的病患<sup>[1]</sup>。其中假叶目的猬迭宫绦虫(*Spirometra erinaceiueropaei*)是一种人兽共患寄生绦虫,中绦期幼虫寄生于蛇、蛙、人的肌肉、皮下组织、胸腹腔等处,幼虫感染人后,在机体各组织器官移行引起裂头蚴病,导致失明、肢体麻痹,甚至死亡;成虫寄生于犬、猫、狼等肉食动物的小肠内,也可感染虎、狼、豹、狐狸、狮子、浣熊等,动物会有不定期的腹泻、便秘、消瘦及发育受阻等;猬迭宫绦虫呈世界性分布,其感染人的报道多见于东亚地区各国,我国感染该虫主要见于南方各省<sup>[2-9]</sup>。因此,控制猬迭宫绦虫病,不但对畜牧业生产有重要意义,也具有重要的公共卫生意义。

近年来,随着分子生物学技术的发展,对寄生虫的分子鉴定、分子遗传研究也得到重视,以核糖体序列和线粒体序列为分子标记对猬迭宫绦虫的相关研究在国内外已有报道<sup>[7-9]</sup>,但研究的样品主要来自于犬及蛙等动物,未见来源于华南虎猬迭宫绦虫样品的报道。本研究应用分子寄生虫实验技术,对分离自广州动物园的华南虎体内的 2 条通过形态学初步鉴定为猬迭宫绦虫的绦虫样品的内转录间隔区(Internal transcribed spacers, ITS)序列进行 PCR 扩增测序,对从华南虎体内分离的绦虫进行分子鉴定,并对其 ITS 序列进行遗传变异分析,进一步为分子鉴定和分子遗传学以及猬迭宫绦虫病的防治研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 虫体采集

虫体样本采自广州动物园华南虎体内,形态学初步鉴定为猬迭宫绦虫,样本代码为 TC1、TC2,保存在 70%酒精内备用。

### 1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 Wizard<sup>TM</sup> DNA Clean-Up System 为 Promega 公司产品;蛋白酶 K 为 Merck 公司产品;*rTaq* 酶、DNA Marker DL2000、胶回收试剂盒、IPTG 和 X-gal 均为 TaKaRa 公司产品。Biometra PCR 仪为德国 Biometra 公司产品,Bio-Rad 电泳系统为美国 Bio-Rad 公司产品;凝胶图像分析系统为英国 UVITEC 公司产品。

### 1.3 虫体总 DNA 的提取

从在 -20℃ 的 70% 酒精保存液中取出单个虫体,置于一新鲜灭菌过的 1.5 mL Eppendorf 管中,用蒸馏水反复吹打冲洗 3 次后,浸泡 20 min,吸干表面水分。按照 Promega 的 DNA 提取试剂盒(Wizard SV Genomic DNA Purification System)使用说明书,加入 275 μL 的 SDS DNA 裂解液(Nuclei lysis solution, 200 μL; 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 50 μL; 4 g/L RNase A solution, 5 μL; 20 g/L Proteinase K, 20 μL)。混匀后,放于微量恒温器中,55℃ 作用 15~18 h,每隔 1~2 h 振荡 1 次。消化完全后,根据 Promega 试剂盒的 Wizard<sup>TM</sup> DNA Clean-Up System 使用说明,提取样品虫体的 DNA,置于 -20℃ 中保存。

### 1.4 核糖体 ITS 序列的 PCR 扩增

由上海生工生物工程技术有限公司合成上游引物 BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3')和下游引物 BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3')扩增目的序列片段。扩增体系为 25 μL 体系(无菌水 18.0 μL, 10×Buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 3.0 μL, 上下游引物各 0.25 μL, *rTaq* 酶 0.25 μL, DNA 样品 1 μL)。

PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 次循环;最后 72℃ 延伸 5 min。同时设置阴性对照组,只加入相同于 DNA 分量的双蒸水。PCR 扩增产物以 1% 的琼脂糖凝胶为载体,在 0.5×TBE 缓冲液中进行电泳,电泳过程中用 0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)染色,电泳结束后将凝胶放于紫外透射仪上,通过凝胶成像系统摄像并记录结果。

### 1.5 扩增片段的克隆及筛选

用 DNA 胶回收试剂盒对扩增片段进行纯化,纯化产物连接到 pGEM-T Easy 载体上,将连接产物转化至感受态细胞 JM109 中,振荡培养后涂布在含氨苄青霉素和 IPTG 的 LB 平板上,过夜培养后挑选白色的单菌落,对菌落进行 PCR 鉴定,筛选阳性克隆。

### 1.6 测序与序列分析

挑选 TC1、TC2 样本中鉴定为阳性的菌液送上海生工生物技术有限公司测序,测序结果用 DNA-Star 软件进行序列分析和比较。

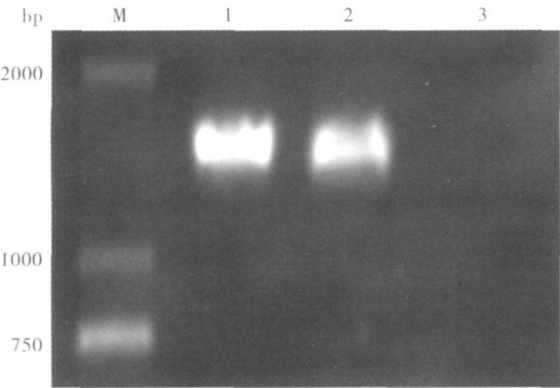
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增电泳结果

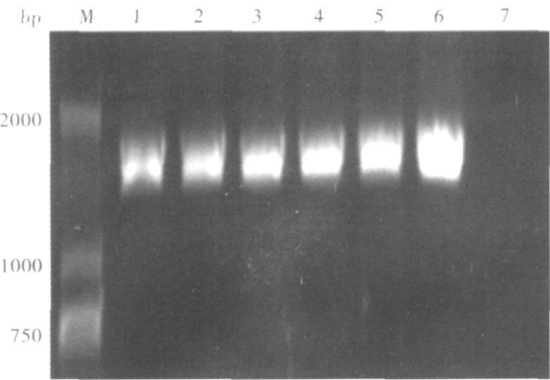
PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 可见大小约为 1400bp 的片段, 与预期目的片段大小一致(图 1)。

2.2 连接、转化及鉴定结果

用纯化回收试剂盒回收 2 个样品的 PCR 产物并将之克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 转化至感受态细胞 JM109, 然后进行菌液 PCR 鉴定, 电泳结果见图 2。



M. Marker DL2000; 1. TC1; 2. TC2; 3. 阴性对照  
图 1 华南虎绦虫 ITS 序列扩增结果



M. Marker DL2000; 1. TC1-1; 2. TC1-2; 3. TC1-3;  
4. TC2-1; 5. TC2-2; 6. TC2-3; 7. 阴性对照

图 2 重组质粒转化 JM109 后 ITS 序列扩增结果

2.3 DNA 测序及序列分析

华南虎绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 序列全长为 1387 bp, 其与 GenBank 公布的相关绦虫 ITS 序列比较如下: 华南虎绦虫 ITS 序列 2 个样本间序列相似性为 100%, 与猓迭宫绦虫(*Spirometra erinaceieuropaei*, 注册号: FJ886753. 1)、舌形属绦虫(*Diphyllbothrium ligula*, 注册号: AF385761. 1)、宽节双叶槽绦虫

(*Diphyllbothrium latum*, 注册号: AB302387. 1) 的 ITS 序列及 5.8S rDNA 序列相似性分别为 96.7%、66.5%、71.5%(图 3)。本次试验的华南虎绦虫的 ITS 及 5.8S 的碱基序列与猓迭宫绦虫的相应序列相似性高, 证明华南虎绦虫属于猓迭宫绦虫。

3 讨论

国内外研究者对从不同动物上分离的猓迭宫绦虫基因序列的遗传变异已有一些研究。李淳等<sup>[7]</sup>对猓迭宫绦虫广东分离株线粒体 *pcox1* 基因的克隆及序列分析结果不仅表明广东分离株与已知猓迭宫绦虫位于同一分枝, 并且证明 *pcox1* 序列种内保守种间存在差异, 可作为种间遗传变异研究的标记。伍慧兰<sup>[8]</sup>克隆并分析了猓迭宫绦虫湖南分离株线粒体 *cox3* 基因。刘自逵等<sup>[9]</sup>对其线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因进行克隆及序列分析, 绘制了系统发育树, 证明了湖南分离株与已知猓迭宫绦虫位于同一分枝。大量研究表明<sup>[10-12]</sup>, 核糖体的内转录间隔区(ITS)是 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。ITS 序列进化速度快且长度不大, 既有种内高度保守性, 又保持种间有不同程度的差异, 因此, ITS 成为了理想的种间鉴定标记。以 ITS 为遗传标记, 进行 PCR 扩增与序列比较已成功应用于多种寄生虫的分子鉴定和分类<sup>[13-15]</sup>。刘自逵等<sup>[16]</sup>扩增了猓迭宫绦虫湖南分离株的 ITS 序列, 有效验证了 ITS 序列可用来研究种间遗传变异。

到目前为止, 未见有对华南虎的猓迭宫绦虫的基因序列的遗传变异进行研究。本研究对分离自广州动物园华南虎的 2 条绦虫的 ITS 序列进行扩增与分析, 结果显示, 与 GenBank 上公布的猓迭宫绦虫相应序列相似性极高, 达 96.7%, 与舌形属绦虫(*D. ligula*)、宽节双叶槽绦虫(*D. latum*)的 ITS 序列及 5.8S 序列相似性分别为 66.5%和 71.5%。试验从基因标记序列上证明本次从华南虎分离的绦虫属于猓迭宫绦虫。

本试验结果表明, 广州动物园华南虎存在猓迭宫绦虫感染的现象, 该寄生虫对华南虎造成严重危害, 相关工作人员要做好驱虫防治工作, 以降低该虫对华南虎的危害, 从而保证华南虎的数量和质量。同时, 本试验所测得的华南虎猓迭宫绦虫的 ITS 序列为首次报道, 为猓迭宫绦虫的分子生物学进一步研究奠定了基础, 同时为猓迭宫绦虫与相似种或近源种的虫种分类提供了有效的遗传标记。

“.”表示与 TC 位置的碱基相同;“—”表示与 TC 位置缺失 1 个碱基  
*S. erina*; NCBI 中注册的 *Spizomera exinacei* ITS 序列注册号: FJ886753.1  
*D. latum*; NCBI 中注册的 *Diphyllobothrium latum* ITS 序列注册号: AB302387.1  
*D. ligula*; NCBI 中注册的 *Diphyllobothrium ligula* ITS 序列注册号: AF38576.1

图3 华南虎绦虫(TC1、TC2) ITS序列与 GenBank 公布的绦虫 ITS 序列

## 参考文献:

- [ 1 ] 孔繁瑶. 家畜寄生虫学[ M ]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1997: 93-131.
- [ 2 ] Murata K, ABE T, Gohda M, *et al.* Difficulty in diagnosing a case with apparent sequel cerebral sparganosis [ J ]. *Surg Neuro*, 2007, 67(4): 409-412.
- [ 3 ] Iwatani K, Kubota I, Hirotsu Y, *et al.* *Sparganum mansoni* parasitic infection in the lung showing a nodule[ J ]. *Pathol Int*, 2006, 56(11): 674-677.
- [ 4 ] Nobayashi M, Hirabayashi H, Sakaki T, *et al.* Surgical removal of a live worm by stereotactic targeting in cerebral sparganosis[ J ]. *Neurol Med Chir*, 2006, 46(3): 164-167.
- [ 5 ] Li M W, Lin H Y, Xie W T, *et al.* *Enzootic sparganosis* in Guangdong, People' s Republic of China[ J ]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1317-1318.
- [ 6 ] 刘维忠. 河南省人畜共患病寄生虫名录[ J ]. 河南农业大学学报, 1988, 22(3): 373-380.
- [ 7 ] 李淳, 李明伟, 刘国华, 等. 猬迭宫绦虫广东分离株线粒体 *pcox1* 基因的克隆及序列分析[ J ]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(8): 644-646.
- [ 8 ] 伍慧兰. 猬迭宫绦虫线粒体 *cox3* 基因的克隆及序列分析[ J ]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(11): 73-75.
- [ 9 ] 刘自逵, 刘国华, 戴融四, 等. 湖南省猬迭宫绦虫的线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的序列测定及种系发育分析[ J ]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(4): 463-468.
- [ 10 ] Zhu X Q, Gasser R B, Chilton N B, *et al.* Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species[ J ]. *J Helminthol*, 2001, 75: 101-108.
- [ 11 ] Zhu X Q, Amolio S D, Palm H W, *et al.* SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA[ J ]. *Parasitology*, 2002, 124: 615-623.
- [ 12 ] Gasser R B, Monti J R. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA[ J ]. *Mol Cell Probes*, 1997, 11: 201-209.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] Zhu X Q, D'Amelio S, Paggi L, *et al.* Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae)[ J ]. *Parasitology Research*, 2000, 86(8): 677-683.
- [ 15 ] 方素芳, 崔平, 顾小龙. 艾美耳球虫纯种分离及 ITS-1 序列测定[ J ]. 河南农业科学, 2011, 40(1): 144-146.
- [ 16 ] 刘自逵, 刘国华, 戴融四, 等. 湖南省猬迭宫绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 的克隆及序列分析[ J ]. 中国兽医学报, 2011, 31(2): 209-212.