

5 株堆型艾美耳球虫顶质体 *rpoB* 基因的扩增及序列分析

刘国昌¹, 林瑞庆¹, 严浩¹, 胡钱江¹, 刘丽丹², 翁亚彪^{1*}

(1. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 佛山市正典生物技术有限公司, 广东 佛山 528138)

摘要: 以 5 株堆型艾美耳球虫为研究对象, 对其顶质体 *rpoB* 基因的部分序列进行了 PCR 扩增、测序及序列分析, 并与 GenBank 上发表的柔嫩艾美耳球虫及其他顶复门寄生虫相关序列进行比较, 研究顶质体的遗传变异情况。结果表明, 从堆型艾美耳球虫不同来源虫株均获得了 469 bp 的目的片段, 应用 DNASTar 软件进行序列对比发现, 5 株堆型艾美耳球虫的顶质体 *rpoB* 序列完全一致, 与柔嫩艾美耳球虫相应序列的相似性为 92.75%, 而与刚地弓形虫和疟原虫的相似性分别为 67.23% 和 64.62%。首次报道了堆型艾美耳球虫 *rpoB* 序列, 显示 *rpoB* 基因序列保守, 不同来源堆型艾美耳球虫虫株的序列没有差异, 为进一步研究艾美耳球虫的群体遗传学奠定了基础。

关键词: 堆型艾美耳球虫; 顶质体 DNA; *rpoB* 基因; 序列分析

中图分类号: S852.72 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0145-04

PCR Amplification and Sequence Analysis of Apicoplast *rpoB* of Five *Eimeria acervulina* Strains

LIU Guo-chang¹, LIN Rui-qing¹, YAN Hao¹, HU Qian-jiang¹, LIU Li-dan², WENG Ya-biao^{1*}

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

2. Foshan Standard Bio-Tech Co., Ltd., Foshan 528138, China)

Abstract: To research the genetic variation of apicoplast *rpoB* gene of *Eimeria acervulina*, the partial sequence of *rpoB* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and a 469 bp fragment was obtained from five strains of *E. acervulina*. Sequence comparison and comparative analysis of the *rpoB* gene sequences of *Eimeria tenella* with other reference apicomplexan parasites available in GenBank database showed that there was no nucleotide difference among the *rpoB* genes of five *E. acervulina* strains, and the sequence similarities were 92.75%, 67.23%, and 64.62% compared with corresponding sequences of *E. tenella*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium*, respectively. The results revealed that the *rpoB* sequence was conserved in different strains of *E. acervulina* and provided a foundation for further studies of population genetics of *Eimeria*.

Key words: *Eimeria acervulina*; apicoplast DNA; *rpoB* gene; sequence analysis

鸡球虫病是一种常见的急性流行性原虫病, 是由艾美耳科 (Eimeriidae)、艾美耳属 (*Eimeria*) 球虫感染所引起的肠道细胞内寄生虫病。鸡的艾美耳属

球虫公认的有 7 种, 即柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*)、巨型艾美耳球虫 (*E. maxima*)、堆型艾美耳球虫 (*E. acervulina*)、毒害艾美耳球虫 (*E. necatrix*)、布

收稿日期: 2012-09-25

基金项目: 广东省科技计划项目 (2012A020100001); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放课题 (SKLVEB2012KFKT003)

作者简介: 刘国昌 (1987-), 男, 河北正定人, 在读硕士研究生, 研究方向: 兽医寄生虫学。E-mail: 251065152@qq.com

* 通讯作者: 翁亚彪 (1963-), 男, 广东化州人, 副教授, 硕士, 主要从事寄生虫防控研究。E-mail: ybweng@qq.com

氏艾美耳球虫 (*E. brunetti*)、和缓艾美耳球虫 (*E. mitis*) 和早熟艾美耳球虫 (*E. praecox*)，所有的球虫均有一定的致病性^[1-2]。鸡球虫病分布很广，感染时常表现 2 种或 2 种以上球虫混合感染，发病率高达 50%~70%，死亡率为 20%~30%，严重者高达 80%^[1]。病愈的鸡生长发育受阻，体质量增加缓慢，成年鸡多为带虫者，对养鸡业危害极大，每年给我国养鸡业造成数十亿元损失^[3]。堆型艾美耳球虫最早是由 Tyzzer 于 1929 年报道，其寄生于鸡的小肠，具有中等毒力，是集约化鸡场中流行率最高的鸡球虫之一，引起的亚临床型球虫病对养鸡业造成的损失有时比临床型球虫病大得多，对养鸡业的危害仅次于柔嫩艾美耳球虫^[4-6]。

顶复门寄生虫包括有多种寄生性原虫，如恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、新孢子虫 (*Neospora caninum*)、艾美耳球虫等。这些原生动物含有一个质体样细胞器，环状，高度退化，被定名为顶质体 (apicoplast)，具有大小约为 35 kb 的独立基因组^[7]。该细胞器与植物中的细胞器质体同源，并有较为密切的联系^[8]。顶质体不受父本顶质体的影响而是进行母性遗传，因此，其产生的变异能准确地反映出母本的遗传变异，从而也能反映出母本所在虫体群体的遗传变异。目前，艾美耳球虫中只有柔嫩艾美耳球虫顶质体全长序列有报道，而未见其他 6 种虫种相关序列的上传。*rpoB* 基因是顶质体基因组的一个蛋白编码基因，本试验以 5 株堆型艾美耳球虫为研究对象，利用 PCR 技术扩增其顶质体 *rpoB* 基因的部分序列，然后对序列进行比较与分析，从顶质体的角度，开展球虫的遗传变异及 DNA 多态性的研究。

1 材料和方法

1.1 试验虫株

本试验共用 5 个堆型艾美耳球虫虫株，其编号及来源情况如表 1 所示，均已经过生物学特性和 ITS 序列分析定种。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 Wizard SV Genomic DNA Purification System 为 Promega 公司产品；蛋白酶 K 为 Merck 公司产品；*Taq* 酶、DL2000 Marker 和其他 PCR 试剂 (10×PCR Buffer、MgCl₂、dNTPs) 为大连宝生物公司产品。

表 1 试验所用堆型艾美耳球虫虫株

编号	虫株来源	备注
EAa	河北保定	野毒株
EAb	河北保定	野毒株
EAc	河北保定	野毒株
EAd	佛山正典生物技术有限公司保种	早熟弱毒疫苗株
E Ae	佛山正典生物技术有限公司保种	疫苗母株

1.3 球虫总 DNA 提取

将 4℃ 保存于 2.5% 重铬酸钾溶液的堆型艾美耳球虫卵囊液摇匀后，吸取 250 μL 置于 1.5 mL 离心管中，离心后小心吸取上清液弃去，然后加入 1 mL 双蒸水，漩涡振荡几秒钟，13 000 r/min 离心 10 min，再弃上清液，重复操作 1 次，最后管内是含少量双蒸水的卵囊液。加入与卵囊液等体积的玻璃珠，持续漩涡振荡 60~120 min，在显微镜下观察直到 95% 的卵囊破裂后，即可用于消化^[9]。

加入适量消化液 (含 Nuclei Lysis Solution 200 μL, pH 值 8.0 的 0.5 mol/L EDTA 50 μL, 20 g/L 蛋白酶 K 20 μL, 4 g/L RNase A Solution 5 μL) 置于 55℃ 恒温下，消化 16~18 h。消化后按照 Wizard SV Genomic DNA Purification System 使用说明进行 DNA 提取，最后将所提 DNA 于 -20℃ 冰箱中保存。

1.4 PCR 反应

根据 GenBank 上的柔嫩艾美耳球虫、弓形虫和疟原虫相关基因序列来设计 1 对引物，上游引物：5'-GCCCCATATTTCCATTCTCC-3'，下游引物：5'-GTGGTCGTTATGGAAATAAAGG-3'，由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 体系包括：dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, 上下游引物 (50 μmol/L) 各 0.1 μL, *Taq* 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA 1 μL, 最后加 ddH₂O 补足至 25 μL。反应参数：94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min。反应结束后，取 2 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳，观察结果。

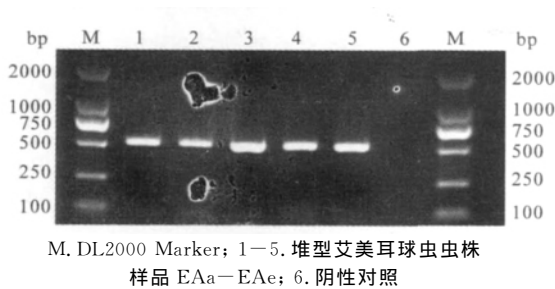
1.5 DNA 片段序列测定及分析

将 PCR 产物直接送华大基因公司测序，测序结果用 DNASTar 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

样品均成功地扩增出目的 DNA 片段，约 500 bp，与预期片段长度相符合，且无非特异性条带，阴性对照无条带 (图 1)。

图1 堆型艾美耳球虫顶质体 *rpoB* 的 PCR 扩增结果

2.2 序列测定与分析结果

获得的 5 个虫株测序结果经剔除引物后,得到有效序列为 469 bp, 5 个样品 *rpoB* 序列完全一致。样品序列用 DNASTar 软件与 GenBank 收录的柔嫩艾美耳球虫(登录号:AY217738)、刚地弓形虫(登录号:U87145)和疟原虫(登录号:NC_017928)的相应序列进行比对分析,显示有不同程度的变异,相似性分别为 92.75%、67.23%和 64.62%(图 2)。

<i>E. acervulina</i>	AAATCTTTGCTCCATTTTATTTCTACCTTTTACAGGTGCTGCATTAATTCAGTATATGGTCTATAGTTCTATAATGTAATTTATCTTTATCATA	100
<i>E. tenella</i>A.....TT.....T.....A.....C.....	100
<i>Toxoplasma gondii</i>G.....A.....T.AA.....T.....A.....T.AA.....A.....G.....A.....A.....A.....	100
<i>Plasmodium</i>A.....C.....TIG.....TG.....AT.....TT.....T.....AG.....A.....AAA.....AA.....TCTA.....A.....	100
<i>E. acervulina</i>	TGTATTAATTTAGATAATTTAGATACTCTAAAAAAGAGGTTCTGATAATTTATATCTGTTCTACCGTCTCTTAATAAAATTTTCCAGGATTATAG	200
<i>E. tenella</i>A.....TA.....TG.....C.....	200
<i>Toxoplasma gondii</i>A.....T.....CC.....A.....AC.....G.....ACC.....AAGA.....TT.....TACA.....A.....T.....A.....TA.....T.....T.....TAA.....TAA	200
<i>Plasmodium</i>A.....T.....T.....A.....T.....A.....T.....AT.....T.....C.....A.....TAC.....AT.....CATAT.....A.....CAG.....AA.....TG.....AT.....T.....A.....T.....A.....ATTAT.....A.....A	197
<i>E. acervulina</i>	AAATTATATAATCATAAATTTCTGATTCTTTCTTTAAATTTATTAATATAATTAATAATGTTTAAATGTAATAATTTAGGTAATAATTAATGTAATTT	300
<i>E. tenella</i>TC.....A.....T.....A.....C.....	300
<i>Toxoplasma gondii</i>ATT.....AAA.....TT.....AAAG.....ATT.....AACA.....T.....A.....T.....AA.....T.....GA.....TTAAA.....TA.....G.....A.....A.....G.....G	300
<i>Plasmodium</i>GAC.....T.....T.....CT.....TT.....A.....TAAA.....A.....AT.....TATT.....T.....A.....TA.....A.....TATGA.....TAA.....TGTTA.....A.....TAATTT.....TT.....AA.....	297
<i>E. acervulina</i>	---TATACATAA---TCGTGTAATTTGAAAAATAACAATTTAATCCAAATAAATTTTCAAATAATGACCAATATTCATTCTGGAAGGAATACCTAAAGAA	394
<i>E. tenella</i>T.....T.....A.....C.....G.....T.....T.....	394
<i>Toxoplasma gondii</i>	AAA.....GA.....GG.....AAT.....TAA.....AT.....G.....A.....TTA.....TTC.....C.....GC.....T.....T.....A.....G.....A.....T.....G.....C.....	400
<i>Plasmodium</i>	---GATAT.....TATA.....TA.....A.....T.....TA.....T.....C.....T.....TTC.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....C.....	394
<i>E. acervulina</i>	TCAGAAATAATATCTGGAATAATTCAGAAATAGAAATAAGGTAATCATTTGATGATAAAATATATGCTATAATA	469
<i>E. tenella</i>T.....T.....T.....T.....T.....A.....G.....T.....	469
<i>Toxoplasma gondii</i>	C.....ACA.....TA.....AAGA.....TTT.....GTA.....A.....GCGTT.....TC.....GCT.....A.....A.....A.....T	475
<i>Plasmodium</i>	CTTAT.....AT.....A.....TTG.....TT.....TT.....TA.....T.....T.....AT.....TCACT.....A.....A.....	469

图2 堆型艾美耳球虫与其他顶复门原虫 *rpoB* 序列对比结果

3 讨论

顶质体拥有自己独特的基因组,不同于核DNA。研究认为,所有生物体的质体都来源于同一个祖先——蓝绿藻^[10]。Kohler 等^[11]通过对顶复门寄生虫顶质体 *Tufa* 序列的研究,认为顶质体起源于绿藻。而 Cai 等^[12]对柔嫩艾美耳球虫顶质体 *rpoB*、*rpoC1* 和 *rpoC2* 基因分析认为,顶质体更有可能起源于红藻。一直以来,人们认为顶质体并不具有特殊的生物学功能,只是生物体在进化过程中的遗迹,然而近期的研究表明,顶质体与虫体侵入宿主细胞及虫体正常生理功能的维持有密切的联系,能够为虫体合成生存所必需的脂肪酸、铁硫簇、类异戊二烯和血红素等^[13-14]。随着对顶质体的深入研究,人们认为顶质体有可能是新型抗顶复门原虫药物研究的一个理想靶位^[15]。顶质体是母性遗传,不受父本的影响,所以其产生的遗传变异能准确地反映出母本的遗传变异,可用于研究顶复门寄生虫种间和种内的遗传进化关系^[16]。

目前,艾美耳球虫中仅有柔嫩艾美耳球虫顶质体基因组全长序列的报道^[12],而没有其他 6 种虫种有关序列的报道。鉴于此,本研究对 5 株堆型艾美耳球虫顶质体 *rpoB* 基因部分序列进行 PCR 扩增、

测序和序列分析,结果表明,不同来源的堆型艾美耳球虫虫株的 *rpoB* 序列之间没有差异,说明堆型艾美耳球虫 *rpoB* 序列种内保守。与 GenBank 上收录的刚地弓形虫、疟原虫的相应序列进行比对分析,显示有很大程度的差异;与柔嫩艾美耳球虫的对应序列进行分析,显示具有较高的相似性,推测 *rpoB* 序列在艾美耳球虫属间具有较高的保守性,由于缺少其他艾美耳球虫的相关序列,所以还不能确定 *rpoB* 序列能否作为研究艾美耳球虫不同虫种之间遗传变异的分子标记。

参考文献:

- [1] 汪明. 兽医寄生虫学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2003:284-288.
- [2] Morris G M, Wood W G, Richards D G, et al. The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments[J]. Mol Cell Probe, 2007, 21 (4): 288-294.
- [3] 王鑫, 黄兵, 赵其平, 等. 鸡艾美耳球虫单卵囊分离与种类鉴定[J]. 复旦学报, 2007, 46(6): 930-936.
- [4] Doran D J. The life cycle of *Eimeria dispersa* Tyzzer 1929 from the Turkey[J]. Int J Parasitol, 1978, 64(5):

- 882-885.
- [5] 闫晓菲, 黄兵, 岳城. 堆型艾美耳球虫生物学特性研究进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15(5): 40-44.
- [6] 林娇娇, 沈杰. 畜禽寄生虫病防治技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [7] Wilson R J M, Denny P W, Preiser P R, *et al.* Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. J Mol Biol, 1996, 261(2): 155-172.
- [8] Parson M, Karnataki A, Feaqin J E, *et al.* Protein trafficking to the apicoplast: deciphering the apicomplexan solution to secondary endosymbiosis [J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(7): 1081-1088.
- [9] Fernandez S, Pagotto A H, Furtado M M, *et al.* A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria species* that infect domestic fowl[J]. Parasitology, 2003, 127: 317-325.
- [10] Delwiche C F, Palmer J D. The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis[J]. PLSyst Evol, 1997, 11(suppl): 51-86.
- [11] Kohler S, Delwiche C F, Denny P W, *et al.* A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites[J]. Science, 1997, 275: 1485-1489.
- [12] Cai X M, Fuller L, McDougald L R, *et al.* Apicoplast genome of coccidian *Eimeria tenella*[J]. Gene, 2003, 321: 39-46.
- [13] Ralph S A, Dooren G G, Waller R F. Tropical infection diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(3): 203-216.
- [14] Dooren G G, Stimmler L M, McFadden G I. Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(4): 596-630.
- [15] 张维, 刘群. 顶复门寄生虫顶质体的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(8): 674-678.
- [16] Cynthia Y He, Michael K Shaw, Charles H Pletcher, *et al.* A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. The EMBO Journal, 2001, 20(3): 330-339.

(上接第 144 页) Esb_3 用量呈负相关。是否由于磺胺剂量过大产生毒副作用所致, 尚不得而知, 原因有待进一步探讨。

所试几种磺胺药单独应用时的抗球虫效果均不理想, 与 DVD 配伍后抗球虫效果均有所提高, 联合用药 D_1 组 (0.06% SM_2 + 0.012% DVD)、 E_1 组 (0.05% SQ + 0.01% DVD)、 F_2 组 (0.025% SMM + 0.005% DVD) 和 G_2 组 (0.025% SQ + 0.03% Esb_3 + 0.005% DVD) 的抗球虫指数分别为 179、178、174、176, 抗球虫效果为中效 (接近于高效); 联合用药 F_1 组 (0.05% SMM + 0.01% DVD) 和 G_3 组 (0.0125% SQ + 0.015% Esb_3 + 0.0025% DVD) 抗球虫指数分别为 184、186, 抗球虫效果为高效, 表现出很好的抗球虫效果。

本试验中, 除 E_3 、 F 组外 DVD 分别与 SM_2 、SQ、SMM 联合应用的抗球虫效果为中效, 且与 SM_2 、SQ、SMM 的剂量呈正相关, 在此基础上继续增加上述磺胺药的剂量是否会进一步提高抗球虫效

果, 尚待研究; 同理, DVD 与 SQ + Esb_3 配伍, 随用量减小抗球虫效果增强, 其最佳用量是多少有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 索勋, 李国清. 鸡球虫病[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] 樊生超, 姚惠娟, 陈金伟, 等. 抗鸡球虫药配合用药方案的优化及疗效测定[J]. 上海农业学报, 2005(1): 109-113.
- [3] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 227-230, 234.
- [4] 朱模忠. 兽药手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 187.
- [5] Johnson J, Reid W M. Anticoccidiosis drugs: lesion-scoring techniques in batte yand floor-open experiments with chickens[J]. Exp Parasitology, 1970, 28: 30-36.
- [6] 角田清·监修. 鸡球虫病[M]. 陈谊, 明如镜, 译. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1986: 87-93.