

孔雀喙囊毛细线虫的分子鉴定

王荣琼¹ 刘永张² 邹丰才^{3*} 杨建发³ 彭洁¹

1. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212;

2. 云南省昆明动物园, 昆明 650021;

3. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201

摘要 通过分子生物学方法对来自昆明市圆通山动物园孔雀消化道中收集的线虫进行鉴定。结果显示, 该线虫与 GenBank 发表的澳大利亚袋鼠毛细线虫 COX1 序列的相似性为 77.3%, 证明该线虫为毛细科毛细属的毛细线虫。COX1 序列分析表明序列差异较明显, 说明孔雀毛细线虫不同于澳大利亚袋鼠毛细线虫, 它们存在着遗传背景的差异。

关键词 孔雀; 毛细线虫; COX1 序列; 分子鉴定

毛细线虫病是由毛细科(Capillariidae)毛细属(Capillaria)的多种线虫寄生于禽类食道、喙囊、肠道等消化道内的一种寄生虫病。轻度感染时, 局部出现轻微炎症和增厚; 严重感染时, 炎症加剧, 并出现黏液或浓性分泌物, 剖检可见寄生部位消化道出血, 黏膜上有大量虫体, 严重感染时, 可引起死亡。病初如误用消炎药或抗球虫药, 会延误病情的治疗, 因此对其鉴定到种显得尤为重要^[1]。

本项试验拟进一步深入研究形态学所不能解决的问题, 欲通过分子生物学技术鉴定孔雀喙囊内

的毛细属线虫, 以期能确定到种。这是首次在云南采用分子生物学的方法对孔雀寄生虫的种属关系进行鉴定。对保护世界濒危物种及鉴定寄生虫的种属来丰富虫种资源有重要的意义。也为今后孔雀体内线虫的分类、鉴别诊断、分子流行病学调查以及本病的防治等更深入的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

虫体样品: 由昆明市圆通山动物园提供。

收稿日期: 2015-07-04

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2010C130)

* 通讯作者

王荣琼, 女, 1978 年生, 在职兽医硕士, 副教授。

3 结果与讨论

1) 在阴性转阳性试验中, 首次免疫后抗体爬升速度很慢, 3~4 周才有体现。二次免疫没有体现出抗体提升的效果。当然, 也可能没有二次免疫的话, 免疫效果更差。

2) 在阴性转阳性二次免疫过程中, 2 个实验组整体抗体水平差异不大。有一段时间有差异, 也是和个别试验猪“不合群”的抗体表现有直接原因。

3) 在两试验组同时更换 TJM-F92 株疫苗进行免疫时, 差异非常明显。理论上 JXA1 株和 TJM-F92

株都属于高致病性蓝耳毒株, 核苷酸序列同源性很高, 但在试验中并没有很好的体现, 没有起到免疫记忆效果。而之前免疫 VR-2332 毒株的, 在更换 TJM-F92 株疫苗免疫后抗体快速上升, 确实很意外。

4) 就试验结果而言, 结合蓝耳疫苗免疫安全性的问题(高致病性毒株疫苗安全性差), 是否可以考虑采用经典毒株 VR-2332 株代替 TJM-F92 株的疫苗进行蓝耳免疫。至于其他经典毒株能否代替 TJM-F92 株以及 VR-2332 株能否代替其他高致病性蓝耳毒株, 本文试验未涉及, 不得而知。

主要试剂:购买于北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1)虫体的分离及处理。将园内发病死亡的 1 只成年孔雀,用寄生虫学完全解剖法获取寄生于孔雀嗦囊内的线虫,将洗净的虫体转移到新的离心管中用 75%乙醇保存备用。

用镊子将保存在 75%乙醇溶液中的虫体材料取出,用双蒸水反复吹打冲洗 2~3 次后,置于一新的 1.5 mL 的离心管中。

2)虫体 DNA 的提取。虫体 DNA 提取按细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒使用说明进行。

3)虫体 DNA 的 PCR 扩增。扩增体系中各试剂的量分别是 ddH₂O 10.75 μL,10×PCR buffer 3.0 μL,MgCl₂ (25 mmol/L)4.0 μL,dNTPs (2.5 mmol/L each)3.0 μL,Forward primer(50 pmol/μL)0.5 μL,Reverse primer(50 pmol/μL)0.5 μL,rTaq(5 U/μL)0.25 μL,模板(gDNA)3.0 μL,共计 25 μL。混匀然后于 PCR 扩增仪中按已设好 PCR 扩增条件进行扩增。

PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,于紫外透射仪上观察结果,并拍照记录。

4)引物的设计。依据 Bowles 文献^[10]设计 1 对引物,扩增了从孔雀嗦囊内分离的线虫线粒体 DNA (mtDNA)细胞色素 C 氧化酶第 1 亚基(COX1),由上海生物工程技术有限公司产品合成。

JB3(5' -TTTTTGGGGATCCTGAGGTTTAT-3')

JB4.5(5' -TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-

3')

2 结果与分析

2.1 测序结果

电泳后,通过线性 DNA 条带的相对位置可初步估计样品的分子量大约为 450 bp 左右,如图 1 所示。

序列碱基数共计 417 个 bp:

CCAATCATGATCTCGCATTTGGTGCAGTTTCT
GAGCTTTGATAAATATTTTCAGGAAAGTTTAAAGTA
TTTGGCCATTAGGAATAATCTATGCTATAATAAG
AATCGGCTTATTAGGCTGTTTTGTTTGAGGTCATCA

TATATATACTGTAGGAATAGACGTGGACACACGA
GCATATTTTACTGCTGCTACTATGATCATTGGAGTC
CCTACTGGAGTAAAAGTATTTAGCTGAATGGCTAC
TATATACGGAACCTCCACTAAATCTTCACCTCTTTT
ACTATGAACTTTAGGATTTATTTTCATTATTTACAAT
TGGAGGTCTAACCAGGAATTTCTCTCTCTAATGCTT
CTTTAGATCTTCTACTTTCATGATACATACTACGTAG
TAGGTCATTTTCATTATGTTCTTTCTTTTAA

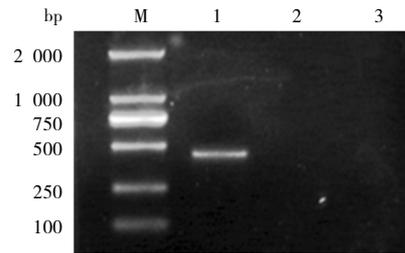


图 1 扩增的线虫 cox1 PCR 产物

注:1 代表孔雀线虫,2 和 3 分别代表宿主和阴性对照,M 代表 DNA marker。

测序结果与预期的一致,将上述测序结果上传到网上进行 Blast 分析,结果显示该线虫与澳大利亚袋鼠体内的毛细线虫有 77.3%的同源性,因此确认该线虫为毛细线虫。

2.2 COX1 序列的分析与比较

测序后去掉引物,找到 COX1 序列的头尾,结果发现孔雀毛细线虫样品的 COX1 序列的长度为 417 bp,而澳大利亚袋鼠毛细线虫 COX1 序列(GenBank 注册号 AJ288162.1)的长度为 374 bp。

将该线虫的 COX1 序列与网上公布的澳大利亚袋鼠毛细线虫 COX1 序列用 DNA Star 软件进行比较相似百分比分析(图 2~3)可知,其 COX1 相似性为

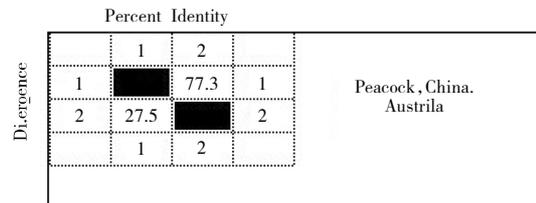


图 2 样品与网上澳大利亚袋鼠的毛细线虫 COX1 的相似百分比

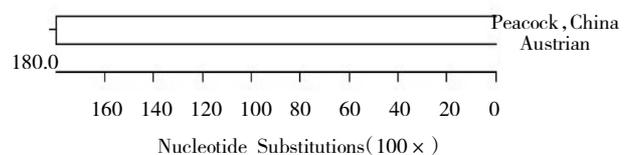


图 3 COX1 对比的进化树

注:Austrian 澳大利亚袋鼠的毛细线虫;Peacock 为样品。

```

A   CCTGAGGTTTATATTTTAGTCTTACCTGCTTTTGGTGCAATTTCTGAAGC-ATTAG
K   ..AA- ----- CA GA C T C ..A..... ..G..... -T GA
A   TAGCTATTTTCAGGTAAGTTTAAAGTTTGGCCCTTTAGGCATAATTTACGCAAT
K   ..AA.....A.....A.....A.....A.....C T T ..
A   AATAAGAATTGGTTTGTAGGTTGCTTTGTTGAGGTATCATATATATACTGTTG
K   .....C C A ..C T .....A
A   GTATAGATGTAGACACACGAGCTTATTTCACTGCTGCCACAATAATTATTGGAGT
K   A ..C G .....A ..T .....T T G C .....
A   TCCCACAGGTGTTAAAATTTTAGTTGATTAGCCACTTTATATGGGTCTACGATTA
K   C T T A A G A .....C A G T A C A A T C C
A   AATTTACTCCTTTACTTCTTTGAGTATTAGGATTTCTCCTTCTATTACTATTGGG
K   C T A C T T A A A A C T .....A TTCAT .....A A
A   GGTTTAACAGGAGTCTCTTTCCAACGCATCCTTAGATTT ←374
K   C C C A T .....C T T T T .....C

```

图 4 孔雀毛细线虫与澳大利亚袋鼠毛细线虫 COX1 序列比较

注:A 为澳大利亚袋鼠毛细线虫 COX1 序列;K 为孔雀毛细线虫样品 COX1 序列;“·”表示与 A 位置的碱基相同;“-”表示与 A 位置缺失 1 个碱基。77.3%, 序列差异较明显(图 4)。发现孔雀毛细线虫单独形成一个分支, 说明孔雀毛细线虫不同于袋鼠毛细线虫, 他们存在着地域及遗传背景的差异。也说明了孔雀毛细线虫 COX1 序列存在种的特异性, 可作为鉴别孔雀毛细线虫与相似种的有效遗传标记。

3 结 论

野生动物寄生虫研究较少, 很多寄生虫严重威胁着我国珍贵野生动物。将该线虫的 COX1 序列与 GenBank 公布的澳大利亚袋鼠的毛细线虫的 COX1 比较分析, 相似性为 77.3%。说明孔雀毛细线虫与袋鼠毛细线虫具有遗传背景差异, 也说明孔雀毛细线虫 COX1 序列存在种的特异性, 可作为鉴别孔雀毛细线虫与相似种的有效遗传标记。但对野生动物寄生虫的研究远远还不够, 需要投入更多的人力和物力来填补这方面的空白^[2-6,8]。

近年来线粒体 DNA 已被广泛用作多态性研究的重要遗传标记, 结合 PCR 扩增及其他方法已成功应用于多种寄生虫的分子鉴定和分类, 通过其序

列的变化可反映生物种群内和群体间的遗传变异, 且 mtDNA 特别适用于相似种和亚种的鉴定^[7-8]。

参 考 文 献

- [1] 谢辉, 冯志新. 香港地区螺旋线虫种类记述[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(1): 30-34.
- [2] 王伯瑶, 黄宁主编. 分子生物学技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 37-45.
- [3] 王洪英. 蓝孔雀常见疾病的症状及防治措施[J]. 养殖技术顾问, 2009(4): 55-56.
- [4] 陈虹虹, 陈晓梅, 朱兴全, 等. PCR-SSCP 对我国鲁道夫对盲囊线虫的分子鉴定[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(1): 35-38.
- [5] 索勋, 杨晓野. 高级寄生虫学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 221-228.
- [6] 牛庆丽, 罗建勋, 殷宏. 转录间隔区(ITS)在寄生虫分子生物学分类中的应用及其进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(4): 41-44.
- [7] 张路平, 孔繁瑶. 线粒体 DNA 在线虫学研究中的应用[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1997, 4(3): 178, 182.
- [8] 赵光辉, 张改平, 宁长申, 等. 基于 COX1 基因对猪囊尾蚴河南分离株种系发育关系的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(1): 72-78.