

绵羊夏柏特线虫线粒体 *pcox1* 基因的克隆及序列分析

赵雷^{1,2}, 江海海², 赵光辉³, 刘国华⁴, 朱兴全^{1,2}, 钱爱东^{1*}

(1.吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118; 2.中国农业科学院兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046; 3.西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 4.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以从陕西省泾阳县山羊大肠中采集的 5 条绵羊夏柏特线虫为研究对象, 用通用引物 JB3 及 JB4.5 扩增绵羊夏柏特线虫的线粒体细胞色素 *c* 氧化酶第 1 亚基(*cox1*)基因部分序列(*pcox1*), 将测序获得的序列用 ClustalX 1.81 程序进行比对, 并用 PAUP 程序 MP 法构建系统发育树。结果表明: 所获得的 5 个绵羊夏柏特线虫样品 *pcox1* 序列长度均为 393 bp; 种系发育分析表明, 绵羊夏柏特线虫 5 个样品位于同一分支, 且绵羊夏柏特线虫的 *pcox1* 序列种内相对保守(0.5%~2.0%), 种间变异显著(9.4%~18.8%), *pcox1* 序列可作为种间变异研究的可靠遗传标记。

关 键 词: 绵羊夏柏特线虫; 线粒体 DNA; *pcox1* 基因; 种系发育关系

中图分类号: S855.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)05-0539-04

Cloning and sequence analysis of mitochondrial *pcox1* gene of *Chabertia ovina* from goat

ZHAO Lei^{1,2}, JIANG Hai-hai², ZHAO Guang-hui³, LIU Guo-hua⁴, ZHU Xing-quan^{1,2}, QIAN Ai-dong^{1*}

(1.College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2.State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 3. College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To analyze the sequence variation in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene among *Chabertia ovina* (*C. ovina*) isolates from goat in Shaanxi province, China and to study its phylogenetic relationships with other nematodes using the *cox1* gene sequences, the partial *cox1* (*pcox1*) was amplified from individual *C. ovina* samples by PCR. The amplified *pcox1* sequences were aligned using the ClustalX 1.81 and MP tree was constructed using the software PAUP 4.0. The lengths of all the *pcox1* sequences were 393 bp. Phylogenetic analyses showed that all the *C. ovina* samples from Shaanxi province were clustered in the same clade. Sequences variations in *pcox1* within *C. ovina* were limited (0.5%~2.0%), while inter-species differences were significant (9.4%~18.8%). Thus, the *pcox1* sequences can be used as a genetic marker for identification and population genetic studies of nematodes.

Key words: *Chabertia ovina*; mitochondrial DNA; *pcox1*; phylogenetic relationship

绵羊夏柏特线虫(*Chabertia ovina*)是圆线目(Strongylata)、圆线科(Strongyloidea)、夏柏特属(*Chabertia*)的土源性寄生线虫, 主要寄生于羊、牛、骆驼以及其他反刍兽的大肠内, 引起腹泻、血便等,

严重者会导致患畜大批死亡^[1]。

近年来, 线粒体基因组的研究受到越来越多的关注^[2-4]。随着生物种群的不断进化和分子生物学的不断发展, 传统的形态学鉴定方法的局限性更加

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 国家公益行业(农业)科研专项(201303037)

作者简介: 赵雷(1987—), 女, 黑龙江佳木斯人, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究, xinyao-2007@163.com; *通信作者, qianaidong0115@163.com

明显。分子分类学方法可以弥补形态学鉴定方法的不足,更适物种的准确鉴定。线粒体基因组高度保守,进化速度快,而且以母性方式遗传,可以作为一种有效的遗传标记^[5-7],已被用于多种寄生虫的种间和种内遗传变异研究^[8-13]。本研究以从中国陕西省泾阳县山羊大肠中采集的 5 条绵羊夏柏特线虫为研究对象,拟分析其线粒体细胞色素 *c* 氧化酶第 I 亚基基因(*cox1*)部分序列(*pcox1*)的特征,旨在为今后夏柏特线虫的分类鉴定提供依据。

1 材料和方法

1.1 虫体样品

5 条绵羊夏柏特线虫(CHO 1, CHO 2, CHO 3, CHO 5, CHO 7)样品均采自陕西省泾阳县的山羊,用 70%乙醇保存,备用。

1.2 主要试剂

蛋白酶 K(Merck 公司产品); Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System(Promega 公司产品); *rTaq* 酶(TaKaRa 公司产品); PCR 试剂(10×PCR Buffer、MgCl₂、dNTPs, 为 TaKaRa 公司产品); pMD18-T 载体(TaKaRa 公司产品); DNA 胶回收试剂盒(OMEGA Bio-Tek 公司产品)。

1.3 样品 DNA 的制备

虫体 DNA 提取按 Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System 说明书进行。提取前对虫体进行如下处理:从保存液中取出虫体,剪下虫体一部分置于 1 个 1.5 mL 离心管中,并用双蒸水反复吹打冲洗 3~4 次,然后将其转移到新的离心管中,用灭菌的微型剪刀将虫体组织剪碎,加入 200 μL 的 Nuclei Lysis Solution 反复研磨,再加 50 μL EDTA、5 μL RNase A Solution、30 μL 蛋白酶 K,混匀后置于 55 °C 恒温水浴锅中消化 15~18 h(每 2 h 混匀 1 次),直至消化完全。制备出来的 DNA 样品分装后,置-20 °C 冰箱保存,备用。

1.4 PCR 扩增

线粒体 *pcox1* 的扩增采用 Bowles^[8]等报道的引物 JB3 和 JB4.5,其序列分别为 5'-TTTTTTGGGCAT CCTGAGGTTTAT-3'(24 bp); 5'-TAAAGAAAGAA

CATAATGAAAATG-3'(24 bp)。

引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系和循环参数见文献[9]。取 5 μL PCR 产物与 1 μL 6×Loading Buffer 混匀,经 1%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察结果并摄像。

1.5 PCR 产物的纯化、克隆及测序

用 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,并将之与 pMD18-T 载体连接,然后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。对阳性转化子进行 PCR 鉴定,将阳性转化子的菌液送上海生工生物工程有限公司测序。每条序列均经过正、反链双向测定,以确保序列的准确性。

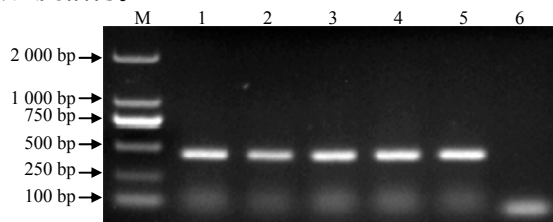
1.6 *cox1* 基因部分序列测定及其进化分析

对测序结果进行序列分析。检索 GenBank 中发表的现有代表性圆线目线虫 *cox1* 序列,包括有齿食道口线虫(*Oesophagostomum dentatum*)、长尾食道口线虫(*O. quadrispinulatum*)、环形线虫(*Cylicocycylus insignis*)、普通圆线虫(*Strongylus vulgaris*),将测序获得的绵羊夏柏特线虫的 *cox1* 序列与之进行相似性比对,并以猪蛔虫(*Ascaris suum*, GenBank 登录号 HQ704901)作为外群,对绵羊夏柏特线虫进行种系发育分析。用 Clustal X1.81 及 Mega 5.0 进行序列比对和遗传距离计算;用 PAUP 4.0 Beta 10 程序 MP 法绘制种系发育树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

从图 1 可看出,5 个样品都能扩增出清晰且一致的条带,大小约为 450 bp,与预期 *pcox1* 目的片段长度相符。



M DL2000 DNA Marker; 1~5 分别代表样品 CHO1、CHO2、CHO3、CHO5、CHO7 的 PCR 产物; 6 阴性对照。

图 1 绵羊夏柏特线虫线粒体 *pcox1* PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析结果

Fig.1 Analysis of PCR-amplified mtDNA *pcox1* from *C. ovina* samples by agarose gel electrophoresis

2.2 测序结果及分析

5 个绵羊夏柏特线虫样品 *pcox1* 序列长度均为 441 bp，去除引物后均得到 393 bp 的序列。5 个样品 *pcox1* 序列的 A+T 含量(68.48%~69.16%)明显高于 G+C 含量(30.84%~31.52%)。对 5 个不同个体的绵羊夏柏特线虫 *pcox1* 序列进行种内比对，发现绵羊夏柏特线虫 *pcox1* 基因序列总共有 11 个碱基发生

变异，变异率为 0.5%~2.0%(表 1)。样品序列与 GenBank 收录的绵羊夏柏特线虫的相应序列(登录号为 GQ888721)进行比对，经 DNASTar 5.0 的 MegAlign 程序分析显示，*pcox1* 基因变异率为 3.6%~4.3%。对圆线目线虫 *pcox1* 基因序列进行种间分析发现，*pcox1* 序列绵羊夏柏特种间存在比较大的差异，变异率为 9.4%~18.8%。

表 1 绵羊夏柏特线虫 mtDNA *cox1* 序列变异位点

编号	<i>cox1</i> 变异位点										
	63 bp	75 bp	78 bp	120 bp	162 bp	171 bp	177 bp	237 bp	276 bp	379 bp	433 bp
CHO1	A	A	C	C	T	T	G	T	T	T	C
CHO2	T	G	C	T	C	C	A	C	T	C	A
CHO3	A	A	T	T	T	C	A	C	T	T	C
CHO5	T	A	C	T	C	C	A	T	T	T	C
CHO7	A	A	T	T	T	C	A	C	C	T	C

2.3 *cox1* 基因序列系统发生树

以猪蛔虫为外群所构建的 MP 系统发生树(图 2)显示，绵羊夏柏特线虫陕西样品位于同一大分支，系统发生树中的自举检验值(Bootstrap 值)较高。绵羊夏柏特线虫陕西样品所属分支与其他圆线虫所属分支相隔较远。

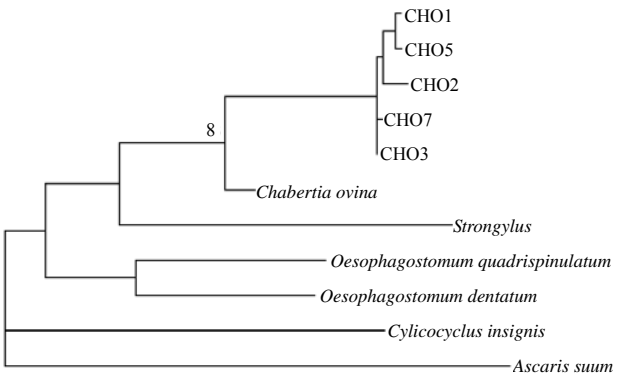


图2 基于*pcox1*基因序列以MP法所构建的绵羊夏柏特线虫系统发生树

Fig. 2 The Bootstrap consensus phylogram of the stationary tree reconstructed by maximum parsimony (MP) using the *pcox1* sequences

3 结论与讨论

寄生虫的准确鉴定和分类，对有效诊断、治疗和控制寄生虫病有重要的作用。寄生虫学研究中传统的分类鉴定主要依靠形态学特征，但形态学鉴定无法区分形态相似的相近种或近缘种以及虫卵和

幼虫。线粒体能为细胞提供能量，是半自主性细胞器。mtDNA 作为一种核外遗传物质，为双链闭环分子，它具有相对分子量小、结构简单、进化速度快、按母性方式遗传等特点，因此，mtDNA 是研究遗传变异的理想物质，尤其是在形态特征相似的相近虫种之间的鉴定方面优势明显。在寄生虫的分类鉴定和种群遗传方面，许多学者认为 *cox1* 基因序列是较理想的分子标记^[14-18]。

笔者对来自陕西省泾阳县的绵羊夏柏特线虫线粒体 *pcox1* 基因序列进行了遗传变异分析。研究结果显示，绵羊夏柏特线虫陕西样品之间线粒体 *pcox1* 基因序列相似性均在 98.0% 以上，与 Praphathip 等^[19]基于线粒体 *pcox1* 基因的研究结果相符。陕西绵羊夏柏特线虫各样品与 GenBank 中其他圆线虫相应序列的相似度均低于 91%，说明 *cox1* 能为种间的遗传变异研究提供遗传标记，可用于绵羊夏柏特线虫的种间鉴定，这一结论与 Lin 等^[20]对有齿食道口线虫和长尾食道口线虫线粒体全基因组分析所得出的结论相符。

采用 MP 法构建的进化树显示出绵羊夏柏特线虫陕西样品位于同一大分支，系统发生树中的 Bootstrap 值较高，其所属分支与其他圆线虫所属分支相隔较远，得到了很好的鉴别。笔者研究中国绵羊夏柏特线虫陕西样品的 *cox1* 序列变异情况，发现

绵羊夏柏特线虫 *pcox1* 序列种内变异较小, 种间差异很大, 是较理想的绵羊夏柏特线虫种间鉴定检测标记, 这为绵羊夏柏特线虫的分类鉴定以及进一步的分子流行病学调查工作打下了基础。

参考文献:

- [1] 秦永福, 严爱萍. 绵羊夏柏特线虫病的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(7): 78.
- [2] Crimi M, Rigolio R. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle[J]. International Journal of Nanomedicine, 2008, 3(1): 51-57.
- [3] Lupi R, de Meo P D, Picardi E, et al. MitoZoa: A curated mitochondrial genome database of metazoans for comparative genomics studies[J]. Mitochondrion, 2010, 10(2): 192-199.
- [4] 贾万忠, 闫鸿斌, 倪兴维, 等. 线虫线粒体基因组全序列分析研究进展[J]. 中国农业科学, 2011, 44(6): 1255-1265.
- [5] Blouin M S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: Mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer[J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32(5): 527-531.
- [6] Wang Z F, Shen X, Liu B, et al. Phylogeographical analyses of domestic and wild yaks based on mitochondrial DNA: New data and reappraisal[J]. Journal of Biogeography, 2010, 37(12): 2332-2344.
- [7] 钱建新, 钱和平, 徐志伟, 等. 基于线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因对青海牦牛种系发育关系的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 151-154.
- [8] Bowles J, Blair D, Mcmanus D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1992, 54(2): 165-174.
- [9] 李佳缘, 刘国华, 王燕, 等. 鸡蛔虫线粒体 *cox1* 基因的克隆及序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5): 41-43.
- [10] Hu M, Gasser R B, Abs EI-Osta Y G, et al. Structure and organization of the mitochondrial genome of *Dirofilaria immitis*[J]. Parasitology, 2003, 127: 37-51.
- [11] Hu M, Chilton N B, Gasser R B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: Recent progress, and implications for population genetics and systematics[J]. Advance in Parasitology, 2004, 56: 133-212.
- [12] 张悦文, 徐颖, 王燕, 等. 羊毛尾线虫线粒体 *rrnL* 基因部分序列的克隆和进化分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(1): 69-72.
- [13] 杨益超, 欧阳颐, 苏爱荣, 等. 广西 4 地带绦虫分离株 *cox1* 序列分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(3): 307-310.
- [14] Hu M, Chilton N B, Gasser R B. The mitochondrial genomes of the two human hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea)[J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32(2): 145-158.
- [15] 刘国华, 戴荣四, 赵光辉, 等. 湖南长沙及湘西泡状带绦虫分离株线粒体 *cox1* 基因的克隆及序列分析[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(2): 117-120.
- [16] Gasser R B, Zhu X Q, Mcmanus D P. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda)[J]. International Journal for Parasitology, 1999, 29(12): 1965-1970.
- [17] Nakao M, Okamoto M, Sakao Y, et al. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tape worm *Taenia solium* worldwide[J]. Parasitology, 2002, 124(6): 657-662.
- [18] 伍慧兰, 庄远红, 黄文. 湖南省华支睾吸虫线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的克隆及进化分析[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(1): 8-12.
- [19] Praphathip Eamsobhana, Phaik Eem Lim, Gabriela Solano, et al. Molecular differentiation of *Angiostrongylus* (Nematoda: Angiostrongylidae) by cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences[J]. Acta Tropica, 2010, 116(2): 152-156.
- [20] Lin R Q, Liu G H, Hu M, et al. *Oesophagostomum dentatum* and *Oesophagostomum quadrispinulatum*: Characterization of the complete mitochondrial genome sequences of the two pig nodule worms[J]. Experimental Parasitology, 2012, 131(1): 1-7.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维