

羊毛尾线虫线粒体 *rrnL* 基因部分序列的克隆和进化分析

张悦文^{1,2}, 徐颖^{2,4}, 王燕^{2,5}, 朱兴全², 刘国华^{3*}

(1. 西交利物浦大学生物科学系, 江苏 苏州 215123; 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. 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128; 4. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 5. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为探明中国羊毛尾线虫(*Trichuris ovis*)广东分离株线粒体核糖体大亚基基因(*rrnL*)的部分序列(*prnL*)的遗传变异情况, 用 *prnL* 序列构建其与其他毛尾线虫的进化关系; 应用聚合酶链反应(PCR)扩增羊毛尾线虫虫株的 *prnL*, 将所获得的序列用 ClustalX 1.81 程序进行比对, 然后用 PAUP 4.0 Beta 10 程序 MP 法绘制种系发育树。结果表明: 所获得的 *prnL* 序列长度为 849~850 bp, 种内变异在 0~0.8%; 13 个羊毛尾线虫分离株位于同一分支, 羊毛尾线虫 *prnL* 序列种内很保守, 种间差异较大(33.4%~36.1%), 可作为种间遗传变异研究的标记。

关键词: 羊毛尾线虫; 线粒体 DNA; *rrnL* 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)01-0069-04

Cloning and sequence analysis of the partial mitochondrial *rrnL* gene of *Trichuris ovis* isolates in China

ZHANG Yue-wen^{1,2}, XU Ying^{2,4}, WANG Yan^{2,5}, ZHU Xing-quan², LIU Guo-hua^{3*}

(1. Department of Biological Sciences, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou, Jiangsu 215123, 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, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 5. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The purpose of this study was to analyze sequence variation in the partial mitochondrial ribosomal large subunit gene (*prnL*) among *Trichuris ovis* (*T. ovis*) isolates from Guangdong province, China and to study the phylogenetic relationships of *T. ovis* with other whipworms using *prnL* sequences. The *prnL* sequences were amplified from individual *T. ovis* samples by polymerase chain reaction (PCR) method and the obtained *prnL* sequences were aligned using ClustalX 1.81. Maximum parsimony (MP) tree was constructed using the software PAUP 4.0 Beta 10. The lengths of all *prnL* were 849–850 bp, and differences in *prnL* sequences within *T. ovis* were 0–0.8%. Phylogenetic analyses showed that all *T. ovis* isolates were clustered in the same clade. The *prnL* sequences were quite conserved within whipworm species while inter-species differences (33.4%–36.1%) were obvious. Thus *prnL* sequences can be used as a useful marker for the differentiation and identification of different whipworms.

Key words: *Trichuris ovis*; mitochondrial DNA; ribosomal large subunit gene (*rrnL*); phylogenetic relationship

收稿日期: 2012-09-29

基金项目: 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金(SKLEVB2010KFKT010、SKLEVB2011KFKT004); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38)

作者简介: 张悦文(1990—), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究, jessicazhang0803@gmail.com; *通信作者, liuguohua5202008@163.com

毛尾线虫也称为鞭虫(whipworm),属于毛尾目(Trichurata)、毛尾科(Trichuridae)、毛尾属(*Trichuris*),是人体和动物常见的寄生虫之一^[1-2],其成虫多寄生于宿主的盲肠,可引起人和动物的毛尾线虫病(Trichuriasis)。该病呈世界性分布,多见于热带地区的发展中国家(包括中国),是一种容易被忽视的热带寄生虫病;因此,准确鉴定毛尾线虫种类,不仅在预防和控制该病方面具有重要的意义,而且也具有重要学术价值。

目前,对毛尾线虫的种类鉴定主要依靠形态学特征^[3-4],但形态学鉴定方法不能对虫卵和幼虫及一些亲缘关系较近的毛尾线虫种进行准确的鉴定^[5]。分子分类学方法利用含有强大信息量的生物大分子(蛋白质和核酸等)对物种进行分类,是探明动物各个分类单元系统发生关系的较为先进的一种方法^[6-7],与传统形态学方法相比更适合物种的准确鉴定。线粒体DNA是广泛应用于各种动物、植物的分子进化和分子发育分析的生物大分子,被广泛用于寄生虫的分子分类和系统发育研究^[8-11]。笔者以从广东省斑鼻羚和剑羚宿主体内所采集的羊毛尾线虫作为研究对象,利用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增其线粒体核糖体大亚基基因 *rml* 部分序列并进行分析,旨在明确羊毛尾线虫线粒体大亚基 *rml* 部分序列的遗传变异情况,并利用线粒体大亚基 *rml* 部分序列重构羊毛尾线虫和其他毛尾线虫的种群关系,以期为羊毛尾线虫合理分子标记的选择、鉴别、诊断及防治等提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 虫体样品

13条羊毛尾线虫样品分别采自广东广州市和茂名市(表1),所有的样品均采自宿主的盲肠,单个样品经生理盐水冲洗和经形态学鉴定后,于70%的乙醇中保存。

表1 供试羊毛尾线虫样品来源

Table 1 *Trichuris ovis* isolates used in the present study

编号	宿主	宿主来源
TB11, TB 12, TB 14, TB 16, TB 17	斑鼻羚	广州市
TBM8, TBM11, TBM 12, TBM 13	斑鼻羚	茂名市
TJ8, TJ89, TJ810, TJ811	剑羚	广州市

1.2 主要试剂

*rTaq*酶(大连宝生物公司产品),蛋白酶K(Merck

公司产品),TIANamp Genomic DNA kit (TIANGEN 公司产品),PCR试剂(Buffer、MgCl₂、dNTPs,为大连宝生物公司产品)^[12-13]。

1.3 样品DNA的制备

从70%乙醇保存液中取单个虫体,用双蒸水反复吹打冲洗3次后,置于一新的1.5 mL Eppendorf管中,用灭菌的微型剪刀将虫体组织剪碎,用TIANamp Genomic DNA kit 试剂盒提取虫体DNA。具体为:加200 μL GA Buffer 到装有剪碎虫体的Eppendorf管,反复研磨虫体组织,再加20 μL 蛋白酶K(20 mg/mL),混匀后,置于60 °C恒温水浴箱中消化3 h(每30 min 混匀1次),消化好的虫体悬液按试剂盒说明书操作提取DNA。将获得的DNA样品进行分装,并保存于-20 °C冰箱备用^[12-13]。

1.4 PCR扩增

根据已报道的羊毛尾线虫线粒体基因组序列(GenBank 登录号为JQ996232)^[14],设计引物对TO16SF和TO16SR来扩增羊毛尾线虫线粒体 *rml*, TO16SF 引物的序列为5'-TTTGATATCTTTTACCTTACCATT-3'; TO16SR 引物的序列5'-AGGGCTTATTGCTATGTGGTTA-3'。

设计的引物由上海生工生物科技有限公司合成。PCR扩增体系和条件参照文献[12]。最后取5 μL PCR产物在1%TAE琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.5 *rml*基因部分序列测定及种系发育分析

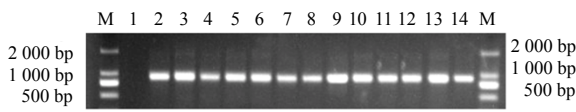
选择阳性PCR产物送上海生工生物科技有限公司进行测序。测序获得的羊毛尾线虫的序列与GenBank中发表的毛尾线虫 *rml* 序列,包括褪色毛尾线虫(*T. discolor*, GenBank登录号JQ996231)、猪毛尾线虫(*T. suis*, GenBank登录号GU070737)和人毛尾线虫(*T. trichiura*, GenBank登录号GU385218)的进行相似性比对,并以猪蛔虫(*Ascaris suum*; GenBank登录号HQ704901)作为外群,对毛尾线虫进行种系发育分析。所用序列比对及遗传距离用Clustal X1.81及Mega 5.0计算,种系发育树用PAUP 4.0 Beta 10程序MP法绘制。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果

用设计的引物对TO16SF和TO16SR进行PCR

扩增,13 个羊毛尾线虫样品均成功地扩增出约 900 bp 的片段,其大小与预期相符,空白对照为阴性(图 1)。



M DL-2000 标准分子质量;1 阴性对照;2~14 分别代表样品 TB11、TB12、TB14、TB16、TB17、TJ8、TJ9、TJ10、TJ11、TBM8、TBM11、TBM12、TBM13。

图 1 羊毛尾线虫线粒体 *prrnL* PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析结果

Fig.1 Analysis of PCR-amplified mtDNA *prrnL* from *Trichuris ovis* isolates by agarose gel electrophoresis

2.2 测序结果及分析

13 个羊毛尾线虫样品 *prrnL* 序列长度为 896 ~ 897 bp, 剔除引物后均得到 849 ~ 850 bp 的序列。所有羊毛尾线虫样品 *prrnL* 序列的 A、G、T、C 碱基平均含量分别为 37.29%、12.71%、35.88% 和 14.12%, 其中 A+T 的平均含量 (73.17%) 明显高于 G+C 的平均含量 (26.83%)。对羊毛尾线虫 13 个不同个体的 *prrnL* 序列进行种内比较,发现羊毛尾线虫 *prrnL* 基因序列总共有 7 个碱基发生变异,变异率为 0 ~ 0.8% (表 2)。对所有的毛尾线虫(褪色毛尾线虫,人毛尾线虫和猪毛尾线虫) *prrnL* 基因序列进行种间分析发现, *prrnL* 序列毛尾线虫种间存在比较大的差异,差异率为 33.4% ~ 36.1%。

表 2 羊毛尾线虫 mtDNA *prrnL* 序列变异位点

Table 2 Nucleotide substitution in the partial mitochondrial ribosomal large subunit gene (*prrnL*) among *Trichuris ovis* isolates

编号	<i>rrnL</i> 变异位点(nt)						
	92	124	237	696	721	723	744
TJ8	T	A	G	A	T	A	T
TJ9	T	A	A	A	T	T	A
TJ10	T	A	G	A	T	T	A
TJ11	T	G	A	A	T	T	A
TB11	T	A	A	A	T	A	A
TB12	C	A	A	A	T	T	A
TB14	C	A	A	—	T	T	A
TB16	C	A	A	A	T	T	A
TB17	T	A	G	A	T	T	A
TBM8	T	A	G	A	T	A	T
TBM11	T	A	G	A	C	A	A
TBM12	T	A	A	—	T	T	A
TBM13	T	G	A	A	T	T	A

2.3 羊毛尾线虫 *rrnL* 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,羊毛尾线虫广东分离株位于同一大分支,系统发生树中的自举检验值(Bootstrap 值)较高。羊毛尾线虫广东分离株所属分支与其他毛尾线虫所属分支相隔较远,相对来说,与褪色毛尾线虫的关系稍近,与人毛尾线虫的关系稍远。

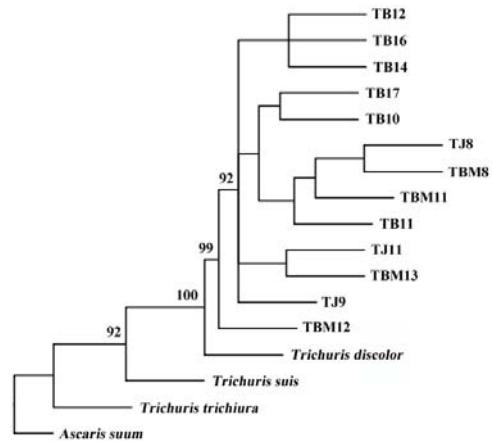


图 2 基于 *prrnL* 基因序列以 MP 法所构建的毛尾线虫系统发生树

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

3 结论与讨论

目前,分子分类学方法是国际上最普遍和常用的一种分类方法,也是寄生虫分类学研究中发展最快的一种方法。选择合适的 DNA 片段用于寄生虫分类学研究显得尤其重要。线粒体 DNA 为双链闭环分子,具有独立进化、结构简单且稳定、基因组较小、母系遗传、基因间不发生重组等特点^[6-7],更适宜于寄生虫群体遗传学和进化生物学研究^[15]。

笔者对来自广东广州市和茂名市不同宿主体内的羊毛尾线虫线粒体部分 *rrnL* 基因序列进行了遗传变异分析。研究结果显示,羊毛尾线虫广东分离株之间线粒体 *rrnL* 基因部分序列相似性均在 99.0% 以上,符合 Wang 等基于线粒体 *cox1*、*nad5* 和 *cytb* 基因的研究结果(待发表)。各广东分离株与 GenBank 中其他毛尾线虫(人和猪毛尾线虫)相应序列的相似度均低于 68%,说明 *prrnL* 能为种间的遗传变异研究提供遗传标记,可用于羊毛尾线虫的种

间鉴定,这一结论与 Liu 等^[14]对羊毛尾线虫和褪色毛尾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羊毛尾线虫广东分离株位于同一大分支,系统发生树中的 Bootstrap 值较高,羊毛尾线虫广东分离株所属分支与其他毛尾线虫所属分支相隔较远,得到了很好的鉴别。有研究^[16]表明,来自不同地方和不同宿主的褪色毛尾线虫 (*T. discolor*) 存在隐藏种。本研究的种系发育树显示来自不同地方和不同宿主的羊毛尾线虫没有隐藏种的存在。当然,本研究基于线粒体 *rrnL* 基因部分序列构建的种系发育树样品来源十分有限,而且 *prrmL* 所包含的信息量也十分有限,这给推演羊毛尾线虫系统关系带来了一定的干扰;因此,要更科学和准确地推演出不同宿主和来源的羊毛尾线虫是否存在隐藏种,可能需要更多不同宿主和地方来源的羊毛尾线虫进行序列分析,并结合形态学、生态学和细胞生物学等相关数据综合考虑才能实现。笔者研究中国羊毛尾线虫广东分离株的 *prrmL* 序列变异情况,发现羊毛尾线虫 *prrmL* 序列种内变异较小,种间差异很大,是较理想的羊毛尾线虫种间鉴定检测标记,这为羊毛尾线虫的分类鉴定以及进一步的分子流行病学调查作好了准备。

参考文献:

- [1] Bethony J M ,Cole R N ,Guo X ,et al .Vaccines to combat the neglected tropical diseases [J] . Immunological Reviews, 2011 , 239(1) : 237-270 .
- [2] Roepstorff A , Mejer H , Nejsun P , et al . Helminth parasites in pigs : New challenges in pig production and current research highlights [J] . Veterinary Parasitology , 2011 , 180(1/2) : 72-81 .
- [3] Knight R A . Redescription of *Trichuris discolor* (von Linstow , 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov , 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T. ovis* (Abildgaard , 1795) [J]. Journal of Parasitology , 1971 , 57(2) : 302-310 .
- [4] Spakulová M . Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes [J] . Systematic Parasitology , 1993 , 29(2) : 113-119 .
- [5] Knight R A . Morphological differences in *Trichuris ovis* associated with different host species [J] . Parasitology , 1984 , 70(5) : 842-843 .
- [6] Wolstenholme D R . Animal mitochondrial DNA , structure and evolution [J] . International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology , 1992 , 141 : 173-216 .
- [7] Boore J L . Animal mitochondrial genomes [J] . Nucleic Acids Research , 1999 , 27(8) : 1767-1780 .
- [8] Liu G H , Lin R Q , Li M W , et al . The complete mitochondrial genomes of three cestode species of *Taenia* infecting animals and humans [J] . Molecular Biology Report , 2011 , 38(4) : 2249-2256 .
- [9] Liu G H , Wu C Y , Song H Q , et al . Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs [J]. Gene , 2012 , 492(1) : 110-116 .
- [10] Liu G H , Gasser R B , Su A , et al . Clear genetic distinctiveness between human- and pig-derived *Trichuris* based on analyses of mitochondrial datasets [J] . PLoS Neglected Tropical Diseases , 2012 , 6(2) : e1539 .
- [11] Lin R Q , Qiu L L , Liu G H , et al . Characterization of the complete mitochondrial genomes of five *Eimeria* species from domestic chickens [J] . Gene , 2011 , 480(1/2) : 28-33 .
- [12] 王燕 , 刘国华 , 李佳缘 , 等 . 中华双腔吸虫线粒体 *cox1* 基因的克隆及序列分析 [J] . 中国畜牧兽医 , 2012 , 39 (5) : 118-120 .
- [13] 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 .
- [14] Liu G H , Wang Y , Xu M J , et al . Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* (Nematoda : Trichuridae) [J] . Infection Genetics Evolution , 2012 , 12(8) : 1635-1641 .
- [15] Hu M , Gasser R B . Mitochondrial genomes of parasitic nematodes-progress and perspectives [J]. Trends in Parasitology , 2006 , 22(2) : 78-84 .
- [16] Callejón R , Halajian A , de Rojas M , et al . 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations [J] . Veterinary Parasitology , 2012 , 186(3/4) : 350-363 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维