

# 用 PCR-RFLP 技术鉴别鲁道夫 对盲囊线虫姊妹种的研究

何 芳<sup>1</sup>, 屈仁建<sup>2</sup>, 吴绍强<sup>1</sup>, 宋慧群<sup>1</sup>, 林瑞庆<sup>1</sup>, 朱兴全<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 山西恒丰强动物药业有限公司 广州分公司, 广东 广州 510650)

**摘要:** 用保守引物扩增鲁道夫对盲囊线虫 *Contracaecum rudolphii* 姊妹种和 *C. septentrionale* rDNA 第一内转录间隔区 (ITS-1) 片段并纯化, 根据鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 和 *C. septentrionale* rDNA ITS-1 序列, 选用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Nsi* I 酶切, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳分析。结果经 *Msp* I 酶切后, 鲁道夫对盲囊线虫姊妹种与 *C. septentrionale* 表现出不同的条带; 经 *Nsi* I 酶切后, 鲁道夫对盲囊线虫 B 和 *C. septentrionale* 结果一致, 与鲁道夫对盲囊线虫 A 不同。用 *Msp* I 可以鉴定出 *C. septentrionale*, 用 *Nsi* I 可以鉴定出鲁道夫对盲囊线虫 A, 2 个限制性内切酶合用可以将鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 以及 *C. septentrionale* 分别鉴定出来。根据鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 以及 *C. septentrionale* rDNA ITS-1 基因序列建立的鲁道夫对盲囊线虫姊妹种 PCR-RFLP 鉴别技术能够对鲁道夫对盲囊线虫姊妹种进行准确、特异和简便的鉴别。

**关键词:** PCR-RFLP; 鲁道夫对盲囊线虫姊妹种; rDNA; 第一内转录间隔区

中图分类号: S852.731

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0115-03

## Genetic identification of *Contracaecum rudolphii* complex by PCR-RFLP

HE Fang<sup>1</sup>, QU Ren-jian<sup>2</sup>, WU Shao-qiang<sup>1</sup>, SONG Hui-qun<sup>1</sup>, LIN Rui-qing<sup>1</sup>, ZHU Xing-quan<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Guangzhou Branch of Shanxi Hengfengqiang Animal Pharmaceutical Co., LTD, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Using a pair of conserved primers, the first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA (rDNA) of *Contracaecum rudolphii* complex and *C. septentrionale* were amplified by PCR. The purified amplicons were digested by *Msp* I and *Nsi* I selected according to the ITS-1 sequences of *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B and *C. septentrionale*, followed by agarose gel electrophoresis analyses. The banding profiles after digestion with *Msp* I were different between the *C. rudolphii* complex and *C. septentrionale*, and the profiles of *C. rudolphii* B digested by *Nsi* I was identical to that of *C. septentrionale*, but different from that of *C. rudolphii* A. In combination of using *Msp* I and *Nsi* I, *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B and *C. septentrionale* could be unequivocally differentiated. The PCR-RFLP approach was simple, specific and provided a useful molecular tool for the identification of the *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B and *C. septentrionale*.

**Key words:** PCR-RFLP; *Contracaecum rudolphii* complex; rDNA; ITS-1

鲁道夫对盲囊线虫 *Contracaecum rudolphii* 属于蛔虫目异尖线虫科 Anisakidae 对盲囊属 *Contracaecum*。它的成虫寄生于鸬鹚 *Phalacrocorax carbo sinensis* 的胃内, 幼虫寄生于各种鱼类, 其种群平均密度随宿主体长的增加呈指数形式增加<sup>[1]</sup>。鉴于鲁道夫对盲囊线虫属于异尖线虫科, 可能会导致人类异尖线虫

病<sup>[2]</sup>, 因此有必要对其进行详细研究。Mattiucci 等<sup>[3]</sup>在传统的形态学分类方法基础上用同工酶技术对鲁道夫对盲囊线虫研究, 发现该线虫是由 2 个姊妹种组成的复合种(鲁道夫对盲囊线虫 A 和鲁道夫对盲囊线虫 B)。但是同工酶技术存在技术复杂、费时、费力的缺点, 给临床检验应用带来不便。聚合酶链式反

收稿日期: 2004-08-27

作者简介: 何 芳(1979-), 女, 硕士研究生。通讯作者: 朱兴全(1963-), 男, 教授; E-mail:

xingquanzh@scau.edu.cn

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30225033)

© 2005 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

应连接的限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction linked restriction fragment length polymorphism, 简称 PCR-RFLP) 具有快速简便、成本较低、只需微量的 DNA 扩增、对样品的纯度要求不高以及不需要用放射性标记探针做杂交的优点. 近年来, 该方法被广泛用于各种寄生虫的分类鉴定<sup>[4-5]</sup>.

本研究旨在对鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 以及 *C. septentrionale* rDNA 第一内转录间隔 (ITS-1) 基因序列分析的基础上, 建立准确、特异而且简便的鲁道夫对盲囊线虫 A 与鲁道夫对盲囊线虫 B 的 PCR-RFLP 鉴别技术.

# 1 材料与方法

## 1.1 虫体样本

鲁道夫对盲囊线虫 A: 编号 A14、B8、B9, 鲁道夫对盲囊线虫 B: 编号 A11、A12、B2, *C. septentrionale* (对照): 编号 1A2、1A3、2A2, 均由意大利罗马 Università di Roma “La Sapienza” 的 Lia Paggi 及 Stefano D’Amelio 博士惠赠, 分别来自意大利北部的鸬鹚及西班牙北海海岸的 *Alca tozola*.

## 1.2 主要试剂

*Nsi* I 限制性内切酶为 Promega 公司产品, *rTaq* 酶、*Msp* I 限制性内切酶为大连宝生物公司产品, UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒为生工生物工程 (上海) 有限公司产品.

## 1.3 样品总 DNA 的制备

将单个虫体用蒸馏水反复冲洗后, 剪碎, 加 300  $\mu$ L 消化液, 其中 NaCl 500 mmol 60  $\mu$ L; Tris-HCl (pH=8.0) 100 mmol 30  $\mu$ L; EDTA (pH=8.0) 50 mmol 150  $\mu$ L; 体积分数为 10% SDS 30  $\mu$ L; Proteinase K 25 mg/mL 30  $\mu$ L. 置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中, 经过夜充分消化后, 将消化好的虫体悬液用 Wizard<sup>TM</sup> Clean-up System 提取基因组 DNA (gDNA), 于 -20  $^{\circ}$ C 保存.

## 1.4 PCR 扩增及 PCR 产物的纯化回收

为验证虫体 DNA 抽提是否有效, 先进行 ITS 保守引物的 PCR 扩增, 扩增引物为 NC5 及 NC13R<sup>[6]</sup>, 由上海博亚生物技术有限公司合成. 扩增体系为: 10 $\times$  PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol) 3.0  $\mu$ L、dNTP mixture (2.5 mmol each) 2  $\mu$ L、上游引物 (50 pmol/ $\mu$ L, NC5) 0.25  $\mu$ L、下游引物 (50 pmol/ $\mu$ L, NC13R) 0.25  $\mu$ L、*rTaq* (5 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、模板 (gDNA) 1  $\mu$ L, 最后加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L. 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 后延伸 5 min. PCR 产物经 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳后, 再经紫外透射仪观察. PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯

化, 纯化的 PCR 产物于 -20  $^{\circ}$ C 贮存备用.

## 1.5 PCR 产物的酶切分析

根据已在 GenBank 注册的鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 以及 *C. septentrionale* ITS-1 序列 (AJ634782-AJ634784), 经 DNASTar 软件分析, 选择 *Msp* I 及 *Nsi* I 来进行 RFLP 分析. 用 *Msp* I 酶切, 反应总体积为 20  $\mu$ L, 反应体系如下: PCR 纯化产物 15  $\mu$ L, *Msp* I (10 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$  T buffer 2  $\mu$ L, 0.001 g/mL BSA 2  $\mu$ L; 用 *Nsi* I 酶切, 反应总体积为 20  $\mu$ L, 其中 PCR 纯化产物 16.6  $\mu$ L, *Nsi* I (10 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 2  $\mu$ L, BSA 0.4  $\mu$ L; 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱消化 3~4 h, 酶切产物用 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳, 用溴化乙锭染色, 紫外投射仪下观察结果, 凝胶成像系统摄像.

# 2 结果与分析

## 2.1 PCR 扩增结果及其纯化产物的酶切分析 (PCR-RFLP)

经 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, 9 个虫体样品均成功扩增出约 520 bp 的条带 (图略). PCR 产物经纯化后用 *Msp* I 酶切, 再经 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, 鲁道夫对盲囊线虫 A 和鲁道夫对盲囊线虫 B 被切出 2 条清晰的片段, 分别约 280 bp 和 240 bp; *C. septentrionale* 被切出 3 条片段, 分别约 280 bp、170 bp、70 bp. 用 *Nsi* I 酶切后的产物经 0.02 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, 鲁道夫对盲囊线虫 A 的 3 个虫体样品被切出 2 条片段, 分别约 430 bp 和 90 bp; 鲁道夫对盲囊线虫 B 及 *C. septentrionale* 的 6 个样品没有酶切片段, 大小仍是原来的 520 bp 左右, 2 种酶结合可以将 3 个种鉴别开来 (图 1).

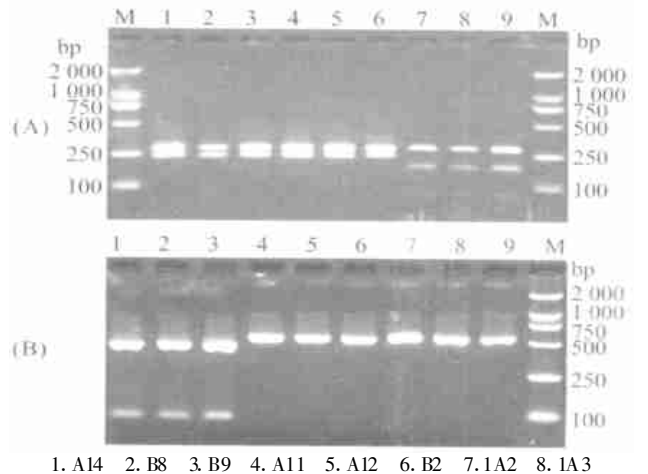


图 1 鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 及 *C. septentrionale* ITS-1 片段的 *Msp* I (A) 及 *Nsi* I (B) 酶切分析

Fig. 1 Enzymatic analysis of ITS-1 PCR products for *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B and *C. septentrionale* using restriction enzymes *Msp* I (A) and *Nsi* I (B).

3 讨论

本研究运用 PCR-RFLP 技术对鲁道夫对盲囊线虫姊妹种和 *C. septentrionale* rDNA ITS-1 序列进行分析, 结果发现经 *Msp* I 限制性内切酶酶切后, 鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 与 *C. septentrionale* 表现出不同的条带, 从而鉴定出 *C. septentrionale*; 经 *Nsi* I 酶切后, 鲁道夫对盲囊线虫 B 和 *C. septentrionale* 结果一致, 但与鲁道夫对盲囊线虫 A 不同, 从而成功鉴定出了鲁道夫对盲囊线虫 A, 再次证明鲁道夫对盲囊线虫是由 2 个姊妹种组成的复合种, 并说明 PCR-RFLP 技术可以区分姊妹种。

本研究根据鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 及 *C. septentrionale* ITS-1 序列特征, 利用 DNASTar 软件选择的限制性内切酶酶切结果, 与对鲁道夫对盲囊线虫 A、鲁道夫对盲囊线虫 B 和 *C. septentrionale* ITS-1 序列分析结果完全吻合。鲁道夫对盲囊线虫 A 和鲁道夫对盲囊线虫 B ITS-1 序列连同它们两侧保守的 ITS-1 引物序列应为 527 bp, *C. septentrionale* 则为 534 bp。因为鲁道夫对盲囊线虫 A 和鲁道夫对盲囊线虫 B ITS-1 序列有 1 个 *Msp* I 酶切位点, 位于 5'端 283 bp 处, 所以经 *Msp* I 酶切后呈现 283 bp 和 244 bp 2 条带, 而 *C. septentrionale* 有 2 个 *Msp* I 酶切位点, 分别位于 5'端 284 bp 和 353 bp 处, 所以经 *Msp* I 酶切后呈现 284 bp、171 bp 和 69 bp 3 条带。同时鲁道夫对盲囊线虫 A ITS-1 序列有 1 个 *Nsi* I 酶切位点, 位于 5'端 93 bp 处, 所以经 *Nsi* I 酶切后呈现 434 bp 和 93 bp 2 条带, 而鲁道夫对盲囊线虫 B 和 *C. septentrionale* 没有 *Nsi* I 酶切位点, 所以 *Nsi* I 不能将它们的 PCR 产物切开, 电泳时仍然分别呈现 527 bp 或 534 bp 单一条带。

本研究所建立的鲁道夫对盲囊线虫姊妹种 PCR-

RFLP 鉴别技术, 是依据鲁道夫对盲囊线虫 A 和鲁道夫对盲囊线虫 B rDNA ITS-1 序列特征而建立的一种准确、特异和简便的鲁道夫对盲囊线虫姊妹种基因鉴别技术, 该项基因鉴别技术是对传统的形态学特征鉴定方法的有效补充。

致谢: 感谢意大利 Università di Roma “La Sapienza” 的 Lia Paggi 及 Stefano D' Amelio 博士提供研究样品。

参考文献:

[ 1 ] 杨廷宝, 廖翔华, 曾伯平. 青海湖裸鲤寄生对盲囊线虫的种群生态研究[ J ]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 213—218.

[ 2 ] McCARTHY J, MOORE T A. Emerging helminth zoonoses [ J ]. Int J Parasitol, 2000, 30: 1 351—1 360.

[ 3 ] MATTIUCCI S, TURCHETTO M, BRAGANTINI F, et al. On the occurrence of the sibling species of *Contracaecum rudolphii* complex (Nematoda: Anisakidae) in comorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) from Venice and Caorle lagoons: genetic markers and ecological studies[ J ]. Parassitologia, 2002, 44 (Suppl. 1): 105.

[ 4 ] ZHU X Q, GASSER R B, PODOLSKA M, et al. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences[ J ]. Int J Parasitol, 1998, 28: 1 911—1 921.

[ 5 ] ZHU X Q, CHILTON N B, JACOBS D E, et al. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences[ J ]. Int J Parasitol, 1999, 29: 469—478.

[ 6 ] ZHU X Q, D'AMELIO S, 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.

【责任编辑 柴焰】