

文章编号: 1000-7423(2001)-02-0100-03

隐孢子虫种株的 RAPD 分析

田宗成 张西臣 王静敏 尹继刚 李建华 陈建宝 杨举

【摘要】 目的 对鼠隐孢子虫 (*Cryptosporidium muris*)、小球隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 和火鸡隐孢子虫 (*Cryptosporidium meleagridis*) 3 个种 8 个虫株进行随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析。方法 从 200 个引物中选用重复性较好的 26 个引物对所有虫株进行随机扩增。结果 RAPD 分析结果表明: ①在隐孢子虫不同种 (*C. muris*、*C. parvum* 和 *C. meleagridis*) 之间的基因存在明显的差异, 平均遗传距离为 7.037; ②同种不同分离株之间均有一定差异, 平均遗传距离为 5.162。结论 RAPD 技术能鉴别 8 个隐孢子虫分离株共有和各自特有基因片段。

【关键词】 隐孢子虫; RAPD; 遗传距离

中图分类号: R382.9

文献标识码: A

Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Cryptosporidium* Species and Strains

TIAN Zong-cheng, ZHANG Xi-chen, WANG Jing-min, YIN Ji-gang, LI Jian-hua, CHEN Jian-bao, YANG Ju
(Department of Preventive Veterinary Science, the Quartermaster University of PLA, Changchun 130062)

【Abstract】 Objective To analyse the genetic heterogeneity of 8 isolates of *Cryptosporidium* belonging to three species (*Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*) using RAPD technique. Methods DNA extracts of the 8 isolates were amplified by PCR using 26 out of 200 primers. The amplified products were separated by agar electrophoresis followed by staining with ethidium bromide. Results RAPD analysis revealed: ① Obvious differences among species were found, the average genetic distance being 7.037; ② Certain differences among different isolates of the same species were found, the average genetic distance being 5.162. Conclusion RAPD could differentiate the common and respective gene fragments of the 8 isolates of *Cryptosporidium*.

【Key words】 *Cryptosporidium*, RAPD, genetic distance

隐孢子虫是一种人兽共患的寄生原虫, 在婴幼儿和免疫缺陷患者, 尤其是获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 病人中感染率较高且危害严重。近年来国内外同行相继利用核酸限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析、基因克隆、分子杂交和聚合酶链反应 (PCR) 等分子生物学技术对隐孢子虫核酸进行研究, 深化了对该虫生物学与免疫学的认识。然而, 这些方法的实验操作相对复杂, 需要特异引物, 其临床应用受到限制, 而随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术具有独到的检测 DNA 多态性以及快速、简便、有效和实用等优点, 因此我们采用此方法对隐孢子虫种株进行 RAPD 分析, 试图阐明隐孢子虫种间、种内基因遗传差异, 进而为隐孢子虫病的免疫、诊断、药物治疗及疫苗研制提供依据。

材料与方法

1 虫株

①长春奶牛源 *Cryptosporidium muris* 株, 从长春市郊农村自然感染奶牛粪便中分离获得; ②黄牛源 *C. muris* 株, 从长春市郊农村自然感染肉用

黄牛粪便中分离获得; ③安徽奶牛源 *C. muris* 株, 从安徽自然感染奶牛粪便中分离获得; ④鼠源 *C. muris* 株, 从东北师范大学实验动物中心小鼠粪便中分离获得; ⑤鼠源 *C. parvum* 株, 由吉林农业大学实验动物中心小鼠粪便中分离获得; ⑥兔源 *C. parvum* 株, 由吉林农业大学实验动物中心小白兔粪便中分离获得; ⑦鸡 *C. meleagridis* 株, 用鸭 *C. meleagridis* 株接种 5 日龄雏鸡免疫抑制后, 从其粪便中分离获得; ⑧鸭 *C. meleagridis* 株, 从长春市郊自然感染鸭粪便中分离获得。

2 试剂

随机引物共 10 组 200 条单引物 (A_{1-20} , B_{1-20} , E_{1-20} , F_{1-20} , G_{1-20} , H_{1-20} , M_{1-20} , P_{1-20} , T_{1-20} , V_{1-20})、Taq 酶、dNTP、10 × PCR 缓冲液、DNA 试剂盒及标志物均购自北京鼎国生物技术发展中心; 琼脂糖购自 Promega 公司。

3 虫体纯化

C. muris 卵囊的纯化, 将含卵囊的粪便过筛, 硫酸锌漂浮, 2 次甘油梯度离心, G3 漏斗过滤, 计数, 冷冻保存。*C. parvum* 和 *C. meleagridis* 卵囊的纯化则

将含卵囊的粪便过筛, 硫酸锌漂浮, 55% 蔗糖漂浮, 2 次蔗糖梯度离心, G3 漏斗过滤, 计数, 冷冻保存。

4 模板制备

纯化的隐孢子虫卵囊 $\leq 10^7$ 个悬浮于 5 mol/L 异硫氰酸胍 300 μ l 中, 反复混匀, 室温 5 min, 加入 6 mol/L $KClO_4$ 800 μ l (pH 5.2)、树脂 (6 倍稀释) 50 μ l, 混匀, 室温 20 min, 25 000 g 离心 5 min, 沉淀加入 6 mol/L $KClO_4$ 400 μ l 混匀, 25 000 g 离心 5 min, 沉淀加入 50% 乙醇 500 μ l 室温混匀, 25 000 g 离心 30~60 s, 取 200 μ l TE 混匀, 40 $^{\circ}C$ ~50 $^{\circ}C$ 5 min, 25 000 g 离心 30~60 s, 取上清即为 DNA, 测含量于低温保存备用。

5 反应条件

利用 200 个单引物对隐孢子虫 DNA 进行随机扩增。反应容积为 25 μ l, 内含 1.5 U Taq 酶, 0.1 mmol/L dNTP, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 ng 模板, 8 pmol 随

机引物。扩增条件: 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 37 $^{\circ}C$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 70 s, 40 个循环, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色, 摄影保存。

6 数据分析

虫株间的遗传距离 d_{ij} 计算参照何晓群^[1]。分别登记所有 RAPD 标记电泳带, 相同的标记为 0, 不同的标记为 1, 再分别计算每个 RAPD 标记下的 x_i, x_j, x_{ij} , 求出株间欧氏距离, 列出距离矩阵, 根据矩阵, 采用最短距离法^[1], 绘出 8 个虫株间的亲缘关系树状图。

结 果

1 随机引物筛选及 DNA 扩增结果

在 200 种随机引物中有 75 个引物有扩增产物, 其中只有 26 个引物稳定性较好。在隐孢子虫不同种及同种不同株间均可检测出不同的扩增带型。部分引物的扩增结果见图 1~4。

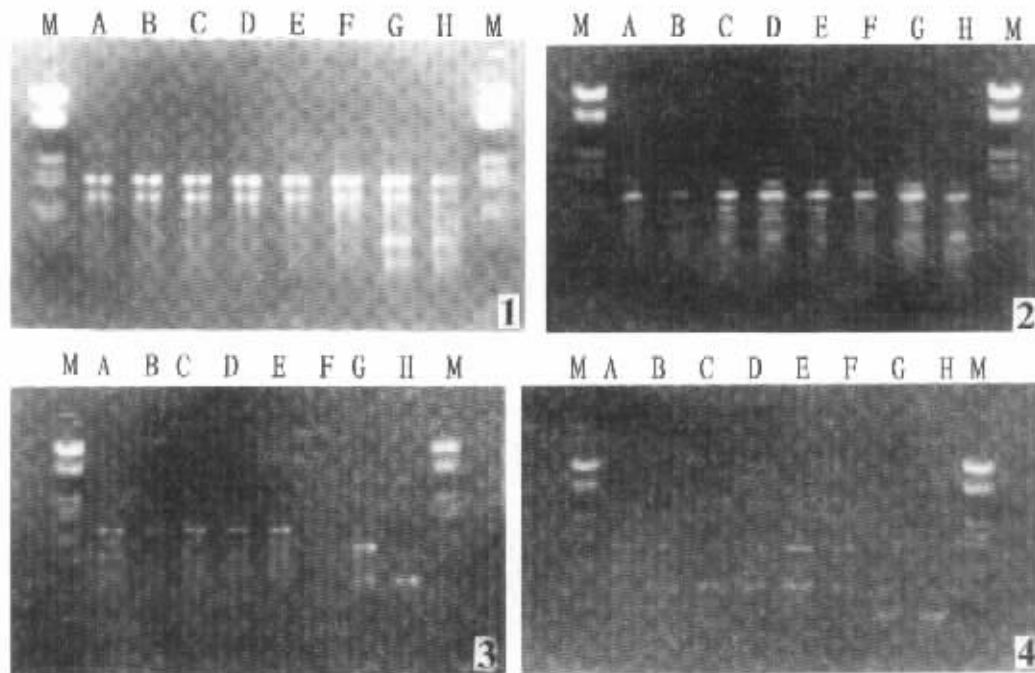


图 1~4 为 RAPD 指纹图谱 图 1 引物为 H4 图 2 引物为 V8 图 3 引物为 T7 图 4 引物为 V1M λ EcoRI + $Hind$ III 分子标志物 A 长春奶牛源 *C. muris* 株 B 黄牛源 *C. muris* 株 C 安徽奶牛源 *C. muris* 株 D 鼠源 *C. muris* 株 E 鼠源 *C. parvum* 株 F 兔源 *C. parvum* 株 G 鸡 *C. meleagridis* 株 H 鸭 *C. meleagridis* 株
 Figs. 1~4 RAPD fingerprint pattern. The primers used were as follows: Fig. 1 primer H4 Fig. 2 primer V8 Fig. 3 primer T7 Fig. 4 primer V1 M λ EcoRI + $Hind$ III marker A *C. muris* from milk cow from Changchun B *C. muris* from cattle C *C. muris* from milk cow from Anhui D *C. muris* from mice E *C. parvum* from mice F *C. parvum* from rabbits G *C. meleagridis* from chickens H *C. meleagridis* from ducks.

2 隐孢子虫种内遗传距离

从 26 个引物的 RAPD 扩增带型来看, 本实验隐孢子虫种内遗传距离在 4.772~5.568, 平均值为 5.162, 其中长春奶牛 *C. muris* 株与安徽奶牛 *C. muris* 株遗传距离为 4.472, 两者与长春黄牛 *C. muris* 株的遗传距离为 5.477; 兔 *C. Parvum* 株与鼠 *C. Parvum* 株的遗传距离为 5.000; 鸡 *C. meleagridis* 株与鸭 *C. meleagridis* 株的遗传距离为 5.292。

3 隐孢子虫种间遗传距离

在隐孢子虫的 3 个种中, 彼此间遗传距离都在 5.6 以上。平均值为 7.037, 其中 *C. muris* 种与 *C. parvum* 种间遗传距离为 5.657, *C. parvum* 种与 *C. meleagridis* 种间遗传距离为 6.164, *C. muris* 种与 *C. meleagridis* 种间遗传距离为 6.481。

4 遗传距离及亲缘关系树状图

4.1 8 株隐孢子虫欧氏距离矩阵 (附表)

附表 8 株隐孢子虫欧氏距离矩阵
Table The distance matrix of Euclidean of 8 isolates of *Cryptosporidium**

菌株 Isolate	A	B	C	D	E	F	G
B	5.477						
C	4.472	5.477					
D	6.000	7.141	5.568				
E	6.245	6.403	5.657	5.745			
F	6.164	6.708	5.831	6.325	5.000		
G	7.348	8.062	6.928	6.856	6.708	6.164	
H	7.071	7.483	7.348	6.481	7.141	6.856	5.292

* 菌株代号同图 1~4

* The codes for the isolates are the same as in Figs. 1-4

4.2 8 株隐孢子虫亲缘关系树状图 根据欧氏距离绘制亲缘关系树状图见图 5。

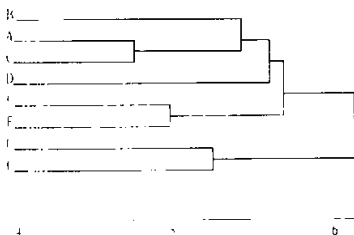


图 5 8 株隐孢子虫亲缘关系树状图 (菌株代号同图 1~4)

Fig. 5 Simplified dendrogram showing genetic relationship among 8 isolates of *Cryptosporidium* (The codes for the isolates are the same as in Figs. 1-4)

讨 论

有关隐孢子虫种内基因的差异性, 国外学者报道的绝大多数是关于 *C. parvum* 种内不同虫株的 RAPD 分析, 他们的结果均表明: 影响种内基因差异的主要因素是宿主差异, 其次是地理位置及气候条件的差异^[1-5]。本研究与国外报道的一致。兔源 *C. parvum* 与鼠源 *C. parvum* 基因有差异是由于两者宿主有明显的种间差异。长春奶牛 *C. muris* 株与安徽奶牛 *C. muris* 株亲缘性较近, 两者与长春黄牛 *C. muris* 株亲缘性较远, 也是由于前两个宿主同种而与第三个宿主不同种。这可能是因为隐孢子虫长期适应宿主体内环境条件, 经过长期演化的结果。

C. muris 与 *C. parvum* 两种虫体大小接近 (直径分别为 6 和 5 μm), 宿主同为哺乳动物, 因此两者亲缘性较近, 而禽类与哺乳类种间差异较大, 因此禽类的 *C. meleagridis* 与哺乳类的 *C. muris* 和 *C. parvum* 种间差异也很明显。这与国内外研究结果一致。Leng 等 (1995) 应用 PCR-RFLP 检测 *C. parvum*、*C. muris* 和 *C. baileyi*, 发现 3 个种之间有明显差异; Xiao 等^[6]用 SSUrRNA 分析了 7 个隐孢子虫种, 其中 *C. parvum* 和 *C. muris* 间的遗传距离比 *C. meleagridis* 近。

本试验同种虫体绝大多数带型相同, 表明虫体纯化方法正确及 RAPD 方法可靠。获得 3 种虫体的共享带与各自特异带为进一步制作隐孢子虫通用分子标记或特有分子标记提供了依据。这一设想与国内外同行一致。如 Morgan 等^[7]用 RAPD-PCR 寻找诊断 *C. parvum* 的引物, 找到一个引物 R4 扩出的带, 纯化后长度为 680 bp, 经特异性实验证明, 此带为 *C. parvum* 特有, 而在贾第鞭毛虫、人血、人粪便和胚胎三毛滴虫和蛇隐孢子虫均未发现。

参 考 文 献

- [1] 何晓群. 现代统计分析方法与应用. 北京: 中国人民大学出版社, 1998: 219-229.
- [2] 余新炳. 现代应用寄生虫学. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 61-62.
- [3] Deng MQ. Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by a simplified randomly amplified polymorphic DNA technique. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1954-1957.
- [4] Margaretha Carraway. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium* ribosomal repeat. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 712-716.
- [5] Kevin V. Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from the watershed of the Red River of the North. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2262-2265.
- [6] Xiao LH. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3386-3391.
- [7] Morgan UM. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 77: 103-108.

(收稿日期: 2000-02-14 编辑: 李雅卿)