

文章编号:1000-7423(2006)-06-0420-05

【论著】

我国 4 省 9 株牛带绦虫 RAPD 分子鉴别分析

张科¹, 杨明², 包怀恩^{1*}

【摘要】 目的 分别对 4 省 9 株牛带绦虫标本进行分子鉴别。方法 分别取台湾桃园株 (TW1), 贵州都匀株 (DY1、DY2)、贵州从江株 (CJ1、CJ2、CJ3、CJ4)、云南大理株 (DL1) 和新疆乌什株 (XJ1) 成虫节片, 提取 DNA, 以 13 条随机引物进行 PCR 扩增, 用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析, 并构建不同地理株系统发育树。结果 13 条引物共扩增 RAPD 片段 331 个 (以相同 bp 数为依据)。单条引物扩增的 RAPD 片段数在 3~28 个之间, 13 条引物平均扩增 RAPD 片段在 6.11~24.56 个, 平均 14.15 个; 9 个不同地理株牛带绦虫平均 RAPD 片段在 9.85~16.62, 平均 14.08 个。系统发育树显示: 9 个不同地理株牛带绦虫分为两支, DY1、DY2、DL1 和 TW1 聚为一支, 属于牛带绦虫亚洲亚种; CJ1、CJ2、CJ3、CJ4 和 XJ1 聚为另一支, 属牛带绦虫指名亚种。结论 我国 4 省 9 株牛带绦虫分别属于牛带绦虫亚洲亚种和牛带绦虫指名亚种。RAPD 分析可用于区分牛带绦虫亚洲亚种与牛带绦虫指名亚种的分类学参考。

【关键词】 牛带绦虫; 牛带绦虫亚洲亚种; 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

中图分类号:R383.322 文献标识码:A

The Random Amplified Polymorphic DNA Identification of 9 *Taenia saginata* Isolates from Four Provinces

ZHANG Ke¹, YANG Ming², BAO Huai-en^{1*}

(Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** To make molecular identification for 9 isolates of *Taenia saginata* from 4 provinces. **Methods** Genomic DNA was extracted from the segments of adult tapeworms collected from Taoyuan of Taiwan (TW1), Duyun of Guizhou (DY1, DY2), Congjiang of Guizhou (CJ1, CJ2, CJ3, CJ4), Dali of Yunnan (DL1) and Wushi of Xinjiang (XJ1) respectively. PCRs were carried out with 13 random primers. A phylogenetic tree of different geographical strains was constructed. **Results** 331 DNA fragments were amplified. The number of DNA fragments amplified by single primer was between 3 and 28. The average number of amplified DNA fragments by the 13 primers was 14.15. The average number of fragments from the 9 isolates of *T.saginata* was 14.08. Phylogenetic tree revealed that there were two branches in the tree, DY1, DY2, DL1 and TW1 occupied one branch, while CJ1, CJ2, CJ3, CJ4 and XJ1 occupied the other one. **Conclusions** By the RAPD analysis, the isolates DY1, DY2, DL1 and TW1 belong to *Taenia saginata asiatica*, and the isolates CJ1, CJ2, CJ3, CJ4 and XJ1 belong to *T.saginata saginata*.

【Key words】 *Taenia saginata*; *Taenia saginata asiatica*; Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30260102)

* Corresponding author, E-mail:bhe@gmc.edu.cn

牛带绦虫 (*Taenia saginata* Goeze, 1782) 和猪带绦虫 (*Taenia solium* Linnaeus, 1758) 是两种重要的人兽共患寄生虫病病原。自它们被描述以来的数百年间, 人们一直认为寄生人体的带绦虫仅此两种。然而近 30 年来, 在东南亚和西太平洋许多国家和地区发现了另一新种, 其成虫与牛带绦虫形态极其相似, 而

幼虫形态、中间宿主种类和人体感染途径等却与前者存在明显差别。人体感染主要因生食含有囊尾蚴的猪肝或野猪等野生动物的内脏引起。经过我国台湾学者范秉真等^[1-3]、以及国外研究者 Eom 等^[4-5]、Zarlenga 等^[6]、Bowles 等^[7]及 Ito 等^[8,9]等多年来有关形态学、流行病学、生物行为学、分子遗传学、免疫学等多方面研究, 现多数研究者^[10-11]已公认该种绦虫属牛带绦虫的亚种, 称其为亚洲牛带绦虫或牛带绦虫亚洲亚种 (*Taenia saginata asiatica*), 原牛带绦虫则称为牛带绦虫指名亚种 (*Taenia saginata saginata*)。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30260102)

作者单位: 1 贵阳医学院寄生虫学教研室, 贵阳 550004; 2 贵阳医学院生物学教研室, 贵阳 550004。

* 通讯作者, E-mail: bhe@gmc.edu.cn

我国牛带绦虫病流行区主要分布在云南、贵州、广西、新疆、内蒙古和西藏等的农牧地区，这些地区有广袤的草场，当地农民主要依靠农牧业为生，牛带绦虫病的流行给当地的农业和畜产品加工造成极大的影响。但牛带绦虫亚洲亚种和传统牛带绦虫在上述地区的分布情况尚不清楚。此外，依靠现代分子生物学技术对牛带绦虫亚洲亚种和传统牛带绦虫进行可靠、有效、方便快捷的分类鉴别，是亟需解决的问题。

本研究应用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 方法对采自贵州都匀、从江，云南大理，新疆乌什和台湾桃园等 4 省(区)标本的基因组 DNA 进行随机扩增研究，以台湾桃园牛带绦虫亚洲亚种地理株为标准，对贵州都匀株、从江株、云南大理株和新疆乌什株牛带绦虫标本进行分子鉴别，以确定这些地区是否存在牛带绦虫亚洲亚种，并探讨 RAPD 方法是否可以作为牛带绦虫分类鉴别的一种新方法。

材料与方 法

1 标本来源

从贵州都匀、从江和新疆乌什等 3 地选择有临床症状的绦虫病感染者，以槟榔-南瓜子法驱虫，经流行病学调查^[12,13]和形态学观察初步鉴定为牛带绦虫后，剪取成节和孕节，以流水(当地河水)、生理盐水冲洗干净，70%乙醇固定保存。云南省大理牛带绦虫节片标本由大理医学院寄生虫学教研室惠赠，10%甲醛固定。台湾省桃园牛带绦虫亚洲亚种节片标本由台湾阳明医学院范秉真教授惠赠，虫体保存于 70%乙醇中。本实验共选择 9 个虫体作 RAPD 分析，标本编号为都匀 1 号(DY1)、都匀 2 号(DY2)、从江 1 号(CJ1)、从江 2 号(CJ2)、从江 3 号(CJ3)、从江 4 号(CJ4)、大理 1 号(DL1)、乌什 1 号(XJ1)和桃园 1 号(TW1)。

2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶(北京华美生物工程有限公司)，DNA 标志物(美国 MBI Fermentas 公司)，琼脂糖(美国 Promega 公司)。

3 绦虫基因组 DNA 提取

9 个虫体(DY1、DY2、CJ1、CJ2、CJ3、CJ4、DL1、XJ1 和 TW1) 分别根据参考文献^[14]用酚-氯仿法提取绦虫基因组 DNA。

4 RAPD 分析

4.1 随机引物 根据文献^[5]选择随机引物 OPA-03、OPA-08 和 OPA-20，自《2003-2004 基因公司试剂耗材目录 分子与细胞生物学分册》中随机选择余下 10 条随机引物，长度均为 10 个碱基，灭菌双蒸水配制成 10 pmol/μl，-20℃保存备用。引物编号及序列见表 1。

表 1 随机引物列表
Table 1 Random primers used in the study

引物 Primer	序列 Sequence
OPA-03	5'-ACTCAGCCAC-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'
L-01	5'-GGCATGACCT-3'
L-02	5'-TGGGCGTCAA-3'
L-05	5'-ACGCAGGCAC-3'
L-06	5'-GAGGGAAGAG-3'
L-08	5'-AGCAGGTGGA-3'
L-09	5'-TGGGAGAGTC-3'
L-12	5'-GGGCGGTACT-3'
L-15	5'-AAGAGAGGG-3'
L-18	5'-ACCACCCACC-3'
L-19	5'-GACTGGTGAC-3'

4.2 反应条件 按照 RAPD-PCR 方法，每次 PCR 反应加入 100 ng/μl DNA 模板 1.0 μl，10 pmol/μl 引物 1.0 μl，3 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl，2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸(dNTP) 2.0 μl，25.0 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl，10×PCR 加样缓冲液 2.5 μl，总反应体积 25.0 μl。循环条件为 94℃ 5 min，94℃ 1 min，37℃ 1 min，72℃ 2 min，45 次循环，72℃ 10 min，4℃保存。

4.3 结果检测 制 1.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙啶 5 μg/ml)，每孔分别加入上述 PCR 产物 25 μl 与 5 μl 6×加样缓冲液的混合液，每孔加 5 μl DNA 标志物，0.5 倍稀释硼酸电泳缓冲液(0.5×TBE)，80 V 电压稳压电泳 8.5 h。在 UVP 凝胶成像仪(UVP8000，美国 UVP 公司)上观察结果。

4.4 结果记录 先用凝胶成像仪照相记录琼脂糖凝胶电泳，直接在紫外灯下迅速记录扩增结果。以 DNA 相对分子质量(*M_r*)的标准条带为参照，记录各泳道上的条带情况(有扩增=1，无扩增=0)。

5 聚类分析

按照 RAPD PLOT(3.0)软件能识别的矩阵格式处理 13 条随机引物的 RAPD 扩增结果，生成 1 个纯文本文件(TXT 文件)。用 RAPD PLOT 软件处理该文件，生成 PHYLIP(3.65)软件包能识别的后缀为 ph 的文件。用 PHYLIP(3.65)软件包中的 NEIGHBOR 程序依非加权算术平均法(UPGMA 法)分析，获得树文件。

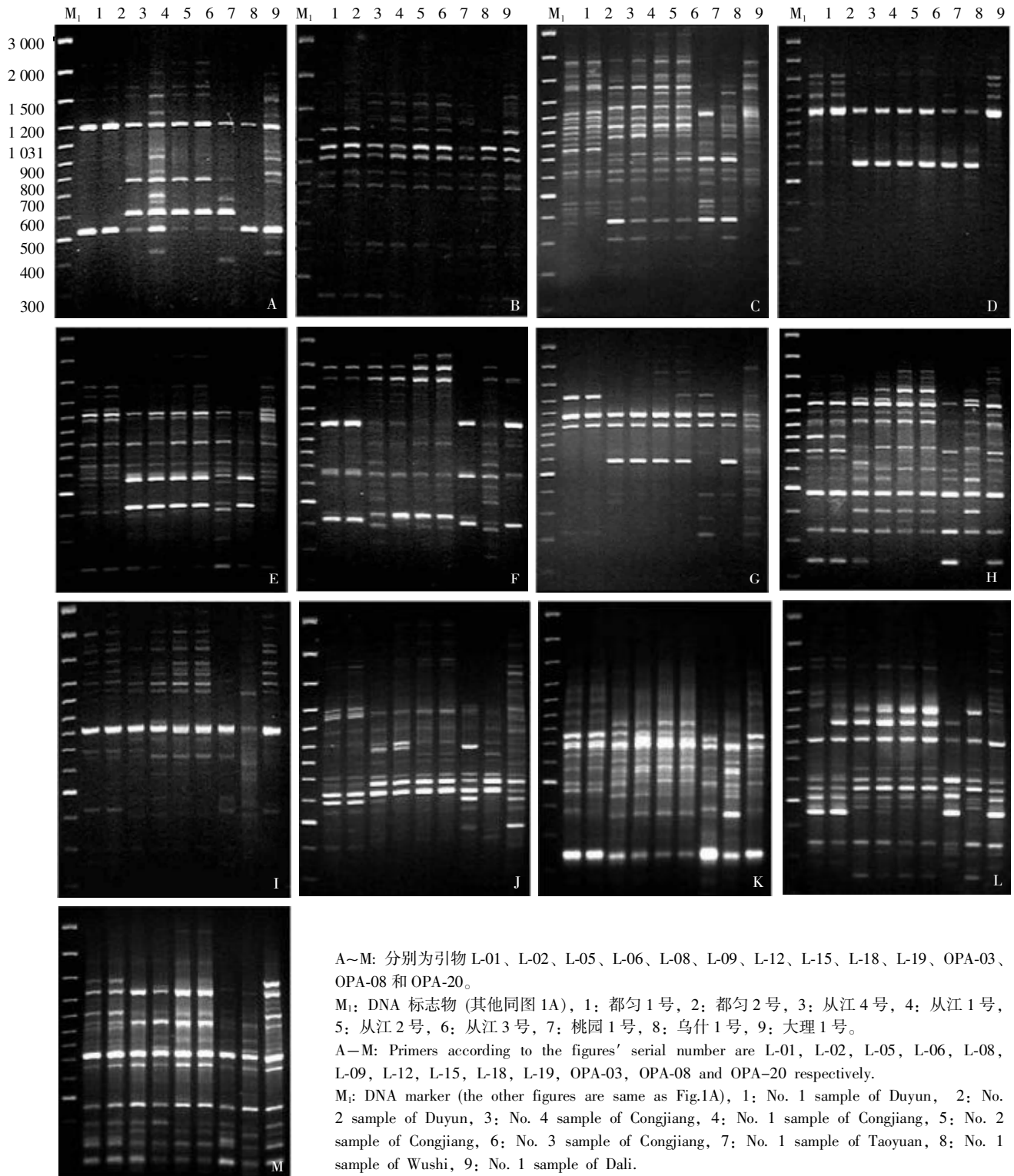
6 绘制系统发育树

使用 TREEVIEW (2.0) 软件绘制系统发育树。

结 果

1 随机引物扩增结果

用 13 条随机引物对 4 省区牛带绦虫进行 PCR 扩增, 每条引物的 RAPD 带型均无单带型出现 (图 1)。13 条引物共扩增 RAPD 片段 331 个。单条引物扩增的 RAPD 片段数在 3~28 个之间, 13 条引物平均扩



A~M: 分别为引物 L-01、L-02、L-05、L-06、L-08、L-09、L-12、L-15、L-18、L-19、OPA-03、OPA-08 和 OPA-20。

M₁: DNA 标志物 (其他同图 1A), 1: 都匀 1 号, 2: 都匀 2 号, 3: 从江 4 号, 4: 从江 1 号, 5: 从江 2 号, 6: 从江 3 号, 7: 桃园 1 号, 8: 乌什 1 号, 9: 大理 1 号。

A—M: Primers according to the figures' serial number are L-01, L-02, L-05, L-06, L-08, L-09, L-12, L-15, L-18, L-19, OPA-03, OPA-08 and OPA-20 respectively.

M₁: DNA marker (the other figures are same as Fig.1A), 1: No. 1 sample of Duyun, 2: No. 2 sample of Duyun, 3: No. 4 sample of Congjiang, 4: No. 1 sample of Congjiang, 5: No. 2 sample of Congjiang, 6: No. 3 sample of Congjiang, 7: No. 1 sample of Taoyuan, 8: No. 1 sample of Wushi, 9: No. 1 sample of Dali.

图 1 9 条牛带绦虫 RAPD 结果

Fig.1 RAPD amplifications of 9 *T.saginata* isolates

增 RAPD 片段在 6.11~24.56 个, 平均 14.15 个; 9 个个体平均 RAPD 片段在 9.85~16.62, 平均 14.08 个(表 2)。

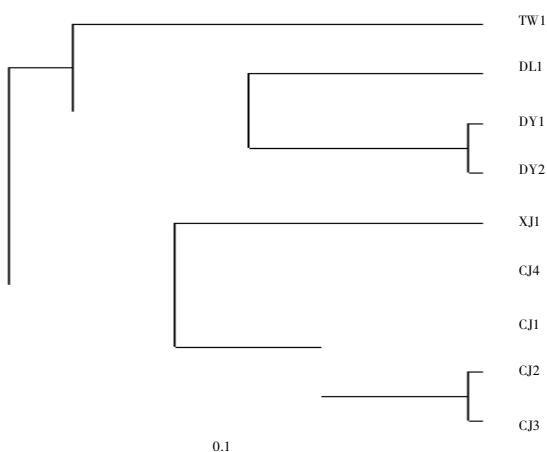
2 系统发育树

按照前述数据分析方法构建系统发育树(图 2),

可见系统发育树由两支组成: 都匀 1 号与都匀 2 号先聚为一支, 与地理位置形成对应关系, 再与大理 1 号聚类, 最后和桃园 1 号聚类组成发育树的一支; 另一支由从江 1 号与从江 4 号, 从江 2 号与从江 3 号分别聚类, 再合成一支, 该支在和乌什 1 号聚类后组成发

表 2 9 个牛带绦虫个体的 RAPD 概况
Table 2 Number of RAPD fragments from 9 isolates of *T.saginata*

引物 Primer	不同牛带绦虫的 RAPD 片段数(个) Number of fragments									平均片段 数(个)Mean	总计(个) Total
	DY1	DY2	CJ4	CJ1	CJ2	CJ3	TW1	XJ1	DL1		
L-01	6	6	7	14	10	10	3	10	15	9.00	81
L-02	13	14	12	12	11	12	11	11	14	12.22	110
L-05	26	26	22	23	21	20	16	16	25	21.67	195
L-06	9	7	4	5	7	7	5	5	6	6.11	55
L-08	18	18	16	16	16	16	16	12	20	16.44	148
L-09	9	9	15	13	15	16	5	14	10	11.78	106
L-12	5	5	8	5	8	9	9	5	20	8.22	74
L-15	17	17	14	12	16	16	8	13	19	14.67	132
L-18	15	15	14	18	17	17	7	9	15	14.11	127
L-19	18	18	13	14	13	14	10	9	22	14.56	131
OPA-03	25	24	25	28	28	28	18	24	21	24.56	221
OPA-08	20	20	17	18	21	21	11	11	19	17.56	158
OPA-20	14	14	13	13	15	15	9	10	15	13.11	118
平均片段数 Mean	15.00	14.85	13.85	14.69	15.23	15.46	9.85	11.15	16.62	14.15	-
总计(个) Total	195	193	180	191	198	201	128	149	221	-	1 656



注: 都匀 1 号 (DY1)、都匀 2 号 (DY2)、从江 1 号 (CJ1)、从江 2 号 (CJ2)、从江 3 号 (CJ3)、从江 4 号 (CJ4)、大理 1 号 (DL1)、乌什 1 号 (XJ1) 和桃园 1 号 (TW1)

图 2 9 个牛带绦虫个体的系统发育树(UPGMA 法)
Fig.2 Phylogenetic tree of the 9 isolates of *T.saginata* (UPGMA method)

育树的另一支。

讨 论

随机扩增多态性 DNA(RAPD)^[15]方法是运用随机

引物扩增寻找可作为分子标记的多态性 DNA 片段。该方法可在缺乏分子生物学背景材料的情况下, 所需 DNA 模板量极微, 可高效低耗地找出生物遗传标志。对于绦虫分子鉴定研究, 可有效克服相关绦虫分子生物学研究文献的不足, 极有针对性。另外, 由于 RAPD 方法的引物种类很多, 只要使用足够多的随机引物, 即可以对整个基因组进行细致的多态性分析, 两个基因组之间的微小差异也能被反映。

RAPD 的引物合成是随机的, 但须满足以下两个条件: G-C 含量不低于 40%; 5' 与 3' 端的碱基序列非反向对称。引物长度以 10 个碱基为宜^[16]。

RAPD 反应稳定性问题: 由于实验条件的改变, 对于同一材料及使用同一引物, 合成的带谱可能会有出入^[17]。本实验为确保各条引物扩增条件的一致性, 使用了统一标本的 DNA 模板量至 100 ng, 反应体积及循环条件完全一致, 使用同一台 PCR 仪, 琼脂糖凝胶电泳的浓度、上样量、电泳电压、电泳时间与凝胶板长度均一致, 由此可最大限度确保 RAPD 的稳定性与可重复性。

由于 RAPD 能在短时间内提供大量的遗传位点,

这样较容易找到与某个重要基因的紧密连锁, 连锁的紧密程度甚至在一个遗传单位内, 就可以用这个随机合成的 DNA 片段作为分子标记探针, 进行分子鉴定^[16]。用 RAPD 方法对不同种群、不同生物群、不同品系的个体进行广泛的多态分析后, 通过统计分析, 从大量的引物中找出关键的引物, 从不同的电泳谱带中找出特异性谱带, 可以建立一套检索系统。这些特异性的谱带, 如果在各次扩增中稳定出现, 重复性良好, 将可以用于筛选探针。在本研究中, 也发现了这样的特异性 DNA 片段, 如 L-05 引物的 680 bp、300 bp 处, L-08 引物的 420 bp 处, L-12 引物的 580 bp 处, L-15 引物的 700 bp 处, OPA-08 引物的 450 bp 处。

在 RAPD 数据处理中, 使用非加权算术平均法 (UPGMA 法) 构建了系统发育树, 可见发育树由两支组成, 显示了贵州都匀、云南大理、台湾桃园标本亲缘关系更接近, 而贵州从江和新疆乌什标本更接近。

根据 RAPD 方法对 4 省区 9 条牛带绦虫标本的研究结果, 表明本研究调查的贵州都匀牛带绦虫和云南大理牛带绦虫属于牛带绦虫亚洲亚种, 而贵州从江牛带绦虫和新疆乌什牛带绦虫属于牛带绦虫指名亚种。以上结果, 对了解我国牛带绦虫亚洲亚种和牛带绦虫指名亚种的分布, 提供了有力的分子水平佐证, 并与本课题组之前的研究相呼应^[18]。也说明在牛带绦虫亚洲亚种与牛带绦虫指名亚种分类学研究中, 在选择适当随机引物的前提下, RAPD 方法可作为一种可靠、有效、方便快捷的方法加以应用。

参 考 文 献

[1] Fan PC. Taeniasis and *Taenia saginata asiatica* in Asia[J]. Chin J Parasitol, 2000, 13: 71-94.

[2] Fan PC. Comparative morphological studies of *Taenia saginata asiatica* and *Taenia saginata saginata*[C]. Proceedings of the Sixth Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Taipei, Taiwan, 2000. 65-68.

[3] Fan PC, Chung WC, Lin CY, et al. Vaccination trials against *Taenia solium* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *T. solium* or *Taenia saginata asiatica*[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2003, 36: 96-100.

[4] Eom KS, Rim JH. Morphological descriptions of *Taenia asiatica* sp. n[J]. Korean J Parasitol, 1993, 31: 1-6.

[5] Eom KS, Jeon HK, Kong Y, et al. Identification of *Taenia asiatica* in China: Molecular, morphological, and epidemiological analysis of Luzhai isolate[J]. J Parasitol, 2002, 88: 758-764.

[6] Zarlenga DS, McManus DP, Cross JH, et al. Characterization and detection of a newly described Asian taeniid using cloned ribo-

somal DNA fragments and sequence amplification by polymerase chain reaction[J]. Exp Parasitol, 1991, 72: 174-183.

[7] Bowles J, McManus DP. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of human[J]. Am J Trop Med Hyg, 1994, 50: 33-44.

[8] Ito A, Fan PC, Chung WC, et al. Cross protection against *Taenia taeniaefromis* in rats vaccinated with non-viable oncosphere of Asian *Taenia* or *T.saginata*[J]. J Helminthol, 1994, 68: 83-85.

[9] Ito A, Wandra T, Yamasaki H, et al. Cysticercosis/taeniasis in Asia and the Pacific[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2004, 4: 95-107.

[10] Fan, PC, CY Lin., CC Chen., et al. Morphological description of *Taenia saginata asiatica* (Cyclophyllidae: Taeniidae) from man in Asia[J]. J Helminthol, 1995, 69: 299-303.

[11] Loos-Frank B. An up-date of Verster's (1969) "Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus" (cestoda) in table format[J]. Syst Parasitol, 2000, 45: 155-183.

[12] Chen Y, Bao HE, Li JF, et al. Epidemiological investigation of *Taenia saginata asiatica* in Duyun, Guizhou and detection of amino acids and elements of adult worms[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21: 311-313. (in Chinese)
(陈艳, 包怀恩, 李金福, 等. 贵州都匀牛带绦虫亚洲亚种的调查和虫体内元素及氨基酸的检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21: 311-313.)

[13] Lang SY, Mou R, Zhu WJ, et al. Epidemiological investigation of *Taenia saginata* infection in Congjiang area of Guizhou province [J]. J Trop Med, 2004, 4: 738-739. (in Chinese)
(郎书源, 牟荣, 朱武军, 等. 贵州省从江地区牛带绦虫的流行病学调查[J]. 热带医学杂志, 2004, 4: 738-739.)

[14] Zhang CY, Yang M, Zhang K, et al. Molecular identification of *Taenia saginata* from three regions of Yunnan and Guizhou Provinces—Sequence analysis of the first internal transcription spacer (ITS1) of ribosomal DNA[J]. J Guiyang Medical College, 2006, 31: 291-295. (in Chinese)
(张朝云, 杨明, 张科, 等. 云贵两省三地牛带绦虫核糖体 rDNA-ITS1 序列分析[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31: 291-295.)

[15] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18: 6531-6535.

[16] Yang DS, Deng B. The use of molecular biology technology for mosquito identification[J]. Chin J Vector Bio & Control, 2003, 14: 74-77. (in Chinese)
(杨东升, 邓兵. 分子生物学技术在蚊虫分类中的应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2003, 14: 74-77.)

[17] Lu J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) a new molecular marker[J]. Acta Botanica Sinica, 1993, 35(Suppl): 119-127. (in Chinese)
(卢江. 随机放大多态性 DNA (RAPD) 一种新的分子遗传标记技术[J]. 植物学报, 1993, 35(增刊): 119-127.)

[18] Zhang CY, Bao HE, Yang M, et al. Molecular identification of *Taenia* in three regions of Yunnan and Guizhou Provinces—Restriction fragment length polymorphism (RELP) analysis of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2005, 18: 330-332. (in Chinese)
(张朝云, 包怀恩, 杨明, 等. 云贵两省三地牛带绦虫的分子鉴定—核糖体 DNA 第一内转录间隔区 (ITS1) 限制性酶切片段长度多态性 (RFLP) 分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18: 330-332.)

(收稿日期: 2006-04-26 编辑: 盛慧锋)