

文章编号: 1000-7423(2008)-03-0183-05

【论著】

# 牛羊源土耳其斯坦东毕吸虫 ITS 和 28S rDNA-LSU 序列分析

仇建华, 李利, 王春仁\*, 陈佳, 陈爱华, 翟延庆

**【摘要】** 目的 探讨牛羊源土耳其斯坦东毕吸虫 (*Orientobilharzia turkestanicum*) 核糖体内转录间隔区 (ITS) 和 28S 核糖体大亚基序列 (rDNA-LSU) 的差异。方法 粪便检查、剖杀自然感染东毕吸虫的绒山羊、山羊、绵羊和黄牛, 收集虫体, 形态学鉴定为土耳其斯坦东毕吸虫。抽提成虫基因组 DNA, 扩增其 ITS (包括 ITS-1、5.8S rDNA 和 ITS-2) 和 28S rDNA-LSU 序列, 测序并分析以上序列, 以及 28S rDNA-LSU 序列 RNA 二级结构。结果 牛、羊源土耳其斯坦东毕吸虫的 ITS-1、5.8S rDNA、ITS-2 和 28S rDNA-LSU 序列分别长 384、159、331 和 1 304 bp。牛源和羊源的 ITS-1 和 5.8S rDNA 序列完全相同; 黄牛源、绵羊源和绒山羊源的 ITS-2 序列完全相同, 与山羊源存在 1 个碱基的差异; 绵羊源和绒山羊源的 28S rDNA-LSU 序列完全相同, 与牛源和山羊源分别有 2 个碱基的差异。绵羊源和绒山羊源的 28S rDNA-LSU 序列 RNA 二级结构相同, 与山羊源存在微小差异, 但牛源与羊源存在较大差异。结论 不同终末宿主源土耳其斯坦东毕吸虫的核糖体序列存在不同程度的差异, 羊源 28S rDNA-LSU 序列的 RNA 二级结构相同或相似, 但与牛源存在较大差异。

**【关键词】** 土耳其斯坦东毕吸虫; 核糖体内转录间隔区; 5.8S 核糖体 DNA; 28S 核糖体 DNA 大亚基序列; 序列分析

中图分类号: R383.29 文献标识码: A

## ITS and 28S rDNA-LSU Sequence Analysis of *Orientobilharzia turkestanicum* from Bovine and Caprine Hosts

QIU Jian-hua, LI Li, WANG Chun-ren\*, CHEN Jia, CHEN Ai-hua, ZHAI Yan-qing

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August-First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore sequence differentiation of ITS and 28S rDNA-LSU of *Orientobilharzia turkestanicum* from bovine and caprine hosts. **Methods** Adult worms of *O. turkestanicum* from the naturally infected cattle, sheep, cashmere goat and goat were collected and identified morphologically as *O. turkestanicum* according to existing keys and descriptions. The genomic DNA was extracted from parasites of different hosts. The internal transcribed spacer (ITS, contains ITS-1, 5.8S nuclear ribosomal DNA, ITS-2) and 28S nuclear ribosomal DNA-LSU were amplified by PCR, sequenced and analyzed by Chromas and DNASTAR softwares, and the RNA secondary structure of 28S rDNA-LSU was analyzed by DNAMAN software. **Results** ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 and 28S rDNA-LSU of *O. turkestanicum* from bovine and caprine hosts were 384, 159, 331 and 1 304 bp, respectively. ITS-1 and 5.8S rDNA of *O. turkestanicum* from different definitive hosts were identical; ITS-2 of *O. turkestanicum* from cattle, sheep and cashmere goat were identical, with one nucleotide variation compared with that of goat; 28S rDNA-LSU of *O. turkestanicum* from sheep and cashmere goat were identical, with two nucleotides variation compared with that of cattle and goat. The RNA secondary structure of 28S rDNA LSU of *O. turkestanicum* from caprine hosts were identical or similar, but with large variation compared with that of cattle. **Conclusion** The rDNA sequence from different definitive hosts shows nucleotide variations to some extent and the RNA secondary structure of 28S rDNA-LSU from caprine hosts shows large variation in comparison to that of bovine.

**【Key words】** *Orientobilharzia turkestanicum*; ITS; 5.8S rDNA; 28S rDNA-LSU; Sequence analysis

Supported by a grant from the Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department (No. 11511253)

\* Corresponding author, E-mail: chunrenwang@yahoo.com.cn

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 11511253)

作者单位: 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

\* 通讯作者, E-mail: chunrenwang@yahoo.com.cn

土耳其斯坦东毕吸虫 (*Orientobilharzia turkestanicum*) 寄生于牛、羊等动物的门静脉和肠系膜静脉, 引起多种动物的东毕吸虫病, 该病广泛分布于中国、印度、伊拉克、伊朗和巴基斯坦等国<sup>[1-5]</sup>。我国 20 个省(市、区)有动物东毕吸虫病流行<sup>[6]</sup>, 黑龙江省是牛羊东毕吸虫病的高发区, 该病给畜牧业生产带来很大的经济损失。东毕吸虫的尾蚴可感染人, 引起人的尾蚴性皮炎, 因此也是一种重要的人兽共患病原<sup>[7-8]</sup>。目前东毕吸虫的研究主要集中在形态学、发育生物学、东毕吸虫病的流行病学调查、诊断和综合防治等方面<sup>[14,9-12]</sup>, 分子水平研究不同终末宿主源东毕吸虫的差异未见报道。因此, 本研究以寄生于黄牛、绵羊、绒山羊和山羊肠系膜静脉内的东毕吸虫为对象, 研究其核糖体内转录间隔区 (ITS) 序列 (包括 ITS-1、5.8S 核糖体 DNA 和 ITS-2) 及 28S 核糖体 DNA 大亚基序列 (rDNA-LSU) 的变异情况, 以为进一步研究东毕吸虫的分类、起源和裂体科血吸虫的系统发生奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 土耳其斯坦东毕吸虫成虫的采集

经粪便检查, 在黑龙江省大庆市选择自然感染东毕吸虫的绒山羊 (*Capra hircus*, cashmere goat)、绵羊 (*Ovis aries*, sheep)、山羊 (*Capra hircus*, goat) 和黄牛 (*Bos taurus*, cattle), 剖检收集虫体, 经形态学鉴定为土耳其斯坦东毕吸虫 (*O. turkestanicum*, 以下简称东毕吸虫), 70%乙醇保存备用。

### 2 成虫基因组 DNA 的提取

取不同动物来源的东毕吸虫成虫各 5 条, 去离子水洗涤 3 次, 加入 300  $\mu$ l DNA 裂解缓冲液 (0.115 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.025 mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 1.5 mg/ml 蛋白酶 K), 37  $^{\circ}$ C 消化过夜, 次日于 95  $^{\circ}$ C 15 min 灭活蛋白酶 K。酚/三氯甲烷抽提 DNA, 预冷乙醇沉淀, 去离子水溶解, -20  $^{\circ}$ C 保存。

### 3 目的基因的扩增

ITS 序列参考河马血吸虫 (*Schistosoma hippopotami*) 18SrDNA (登录号为 AY197343) 和爱德华血吸虫 (*S. edwardiense*) 28S rDNA (登录号为 AY197344) 的序列保守区, 应用 Oligo 6.0 软件设计引物, 上游引物为 5'-GTC GTA ACA AGG TTT CCG TAG GTG-3', 下游引物为 5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GTA ATC-3'; 28S rDNA-LSU 序列根据东毕吸虫 28S rDNA

序列 (登录号为 AJ313461) 设计引物, 上游引物为 5'-TAT CAC TA AGC GGA GGA AAA GA-3', 下游引物为 5'-AGG GAA CCA GCT ACT AGA TGG-3', 由上海生工生物技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系为: 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ l, 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs 25 mmol/L) 2  $\mu$ l, 引物各 0.5  $\mu$ l (50 pmol/ $\mu$ l), 模板 DNA 0.5  $\mu$ l, *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ l (5 U/ $\mu$ l) (大连宝生物工程有限公司), 加水补至 25  $\mu$ l。ITS 序列的扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。28S rDNA-LSU 基因的扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶 (溴化乙啶浓度为 5  $\mu$ g/ml) 电泳后, 在凝胶成像系统 (2000 型, 美国 BioRad 公司) 下观察。

## 4 PCR 产物的纯化、克隆及测序

用 BioSpin 胶回收试剂盒 (日本 Bioer Technology 公司) 纯化 PCR 产物。应用 pMD18-T 载体 (大连宝生物工程有限公司) 与纯化后的 PCR 产物连接并转化大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞。筛选重组菌落, 经碱裂解提取质粒, 进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定 (*Eco*R I 和 *Hind* III 购自立陶宛 Fermentas 公司)。阳性重组菌由北京英骏生物技术有限公司测序。每条序列均经过双向测定, 以确保序列的准确性。

## 5 数据分析

用 Chromas 软件对所有样品的正、反向序列进行重叠区拼接并辅以人工核对, 确定序列长度; 用 DNASTAR 软件分析不同终末宿主源东毕吸虫 ITS 和 28S rDNA-LSU 序列的差异, 应用 DNAMAN 软件比较不同终末宿主源东毕吸虫 28S rDNA-LSU 的 RNA 二级结构的变化情况。

## 结 果

### 1 ITS 和 28S rDNA-LSU 序列 PCR 扩增结果

ITS 和 28S rDNA-LSU 序列 PCR 扩增产物的电泳结果显示分别获得约 1 000 bp 和 1 300 bp 条带, 与预期目的片段大小相符。筛选的阳性质粒经 PCR 鉴定和酶切鉴定结果与 PCR 扩增结果一致。

### 2 东毕吸虫 ITS 序列特征

测序结果显示, 黄牛、绵羊、绒山羊和山羊等 4 种终末宿主源东毕吸虫 ITS 区均获得特异性扩增, 片

段长为 954 bp, 其中 1~43 bp 和 918~954 bp 为 18S rDNA 部分序列和 28S rDNA 部分序列, 即引物设计的上、下游部分, ITS 长度为 874 bp。由 NCBI-BLAST 比对相关血吸虫序列推断 ITS 序列可划分为: ITS-1 (44~427 bp)、5.8S rDNA (428~586 bp) 和 ITS-2 (587~917 bp) 等 3 部分。已将 4 种终末宿主源东毕吸虫 ITS 序列提交 GenBank (登录号分别为 EU436663、EU436664、EU436665 和 EU436666)。序列分析结果显示, 4 种终末宿主源东毕吸虫的 ITS-1 和 5.8S rDNA 序列完全相同; 黄牛源、绵羊源和绒山羊源东毕吸虫 ITS-2 序列完全相同, 而山羊源东毕吸虫在 ITS-2 序列的 803 位点与其他 3 种动物源存在 A→G 单个碱基转换。

将本研究测得的不同终末宿主源与齐齐哈尔富裕县 (以下简称富裕县) 绒山羊源东毕吸虫<sup>[13]</sup> (登录号为 AJ313460) 的 ITS-2 序列进行对比排序。结果显示, 本研究的山羊源与富裕县绒山羊源东毕吸虫存在 2 处单碱基差异 (640 位点 T→C, 803 位点 A→G)。其他 3 种动物源与富裕县绒山羊源东毕吸虫存在 1 处单碱基差异 (640 位点 T→C)。序列的碱基差异分布于 ITS-2 区, 而 ITS-1 和 5.8S 编码区序列非常保守。

### 3 东毕吸虫 28S rDNA-LSU 序列特征

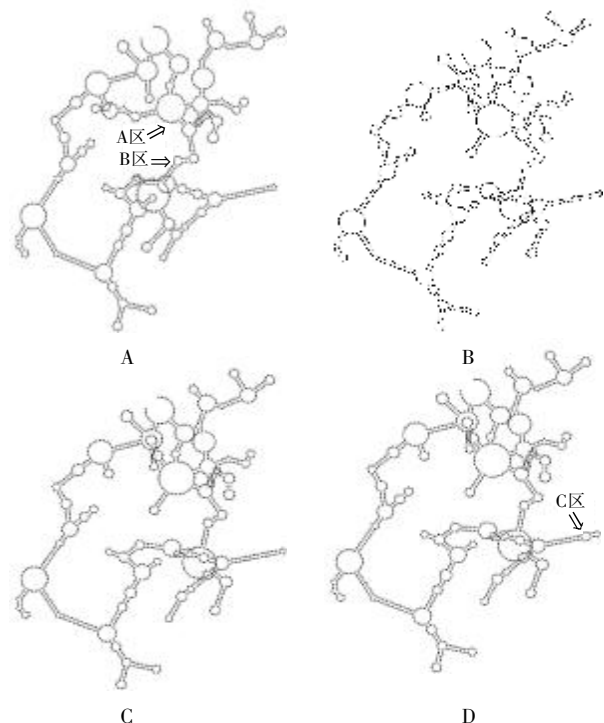
4 种终末宿主源东毕吸虫的 28S rDNA-LSU 均获得特异性扩增, 片段长为 1 304 bp, 提交 GenBank (登录号分别为 EU436662、EU436661、EU436660 和 EU436659)。绵羊源与绒山羊源的序列完全相同, 山羊源与绵羊和绒山羊源 28S rDNA-LSU 序列存在 2 处单碱基差异 (657 和 684 位点, 均为 T→C), 黄牛源与绵羊和绒山羊源 28S rDNA-LSU 序列存在 2 处单碱基差异 (371 和 1 158 位点, 均为 A→G)。

不同终末宿主源与已报道的相应来源东毕吸虫 28S rDNA-LSU 序列比较<sup>[13]</sup>, 本研究的绵羊源和绒山羊源的 28S rDNA-LSU 序列与富裕县绒山羊源 (登录号为 AJ313461) 完全相同, 山羊源与黄牛源分别存在 2 个位点差异 (黄牛源 371 和 1 158 位点均为 A→G; 山羊源 657 和 684 位点均为 T→C)。本研究的绵羊源和绒山羊源的 28S rDNA-LSU 序列与伊朗绵羊源<sup>[14]</sup> (登录号为 AF167092) 相比存在 1 处差异 (均为 421 位点 C→T), 山羊源与之相比存在 3 处差异 (421 位点 C→T, 657 和 684 位点 T→C), 黄牛源存在 3 处差异 (371 和 1 158 位点 A→G, 421 位点 C→T)。

### 4 东毕吸虫 28S rDNA-LSU 序列 RNA 二级结构分析

应用 DNAMAN 软件比较不同终末宿主源东毕吸

虫 28S rDNA-LSU 序列的 RNA 二级结构, 比较 1~993 bp 的部分 28S rDNA-LSU 序列, 系统默认结构能量为最小。结果显示, 绵羊源与绒山羊源东毕吸虫 28S rDNA-LSU 序列的 RNA 二级结构相同; 山羊源 C 区与绵羊和绒山羊源存在微小差异; 黄牛源在 A 区和 B 区与绵羊、绒山羊和山羊源存在较大差异, 其 A 区的茎环结构和 B 区茎环角度发生改变 (图 1)。



注: A: 黄牛源, B: 绵羊源, C: 绒山羊源, D: 山羊源。

Note: The RNA secondary structure of 28S rDNA-LSU of *O. turkestanicum* from cattle (A), sheep (B), cashmere goat (C) and goat (D).

图 1 4 种不同终末宿主土耳其斯坦东毕吸虫 28S rDNA-LSU 序列 RNA 二级结构

Fig.1 The RNA secondary structure of 28S rDNA-LSU of *O. turkestanicum* from four definitive hosts

## 讨 论

由于自然、地理和环境等生态环境因素的长期影响, 血吸虫种株之间存在不同程度遗传分化, 但这些变化不能被传统方法所区分。DNA 技术可精确地测量生物自然种群的遗传变异程度, 是目前进行物种遗传变异、分类和分子种系发生等研究的主要手段之一。核糖体 DNA 是生物体内最保守的基因之一, 是细胞核内编码核糖体 RNA 的基因, 其中的 ITS-1、5.8S rDNA、ITS-2 和 28S rDNA 序列作为分子标记已广泛应用于多种寄生虫遗传变异、分类和进化等方面的研究<sup>[15-18]</sup>。

本研究结果表明, 大庆地区不同终末宿主源东毕吸虫 ITS-1 和 5.8S rDNA 序列完全相同, 而 ITS-2 和

28S rDNA-LSU 序列存在不同程度的差异; 绒山羊源与富裕县绒山羊源东毕吸虫 ITS-2 序列有 1 处碱基差异, 绵羊源与伊朗绵羊源东毕吸虫 28S rDNA-LSU 存在 1 处碱基差异, 说明不同地区相同终末宿主源东毕吸虫的核糖体基因存在差异, 而且相同地区不同终末宿主源东毕吸虫核糖体基因也存在不同程度的差异, 这一结果与作者以往对不同终末宿主源东毕吸虫的线粒体基因细胞色素 C 氧化酶亚基 1 基因 (cytochrome c oxidase subunit 1 gene, *cox1*) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 1 基因 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 gene, *nad1*) 的研究结果一致<sup>[19]</sup>。在大庆地区适宜东毕吸虫寄生的宿主种类繁多, 其终末宿主包括绵羊、山羊、绒山羊、黄牛和奶牛。中间宿主淡水螺, 包括耳萝卜螺 (*Radix auricularia*)、卵萝卜螺 (*R. ovata*) 和小土蜗螺 (*Galba pervia*)。宿主的多样性和复杂性可能是造成东毕吸虫核糖体序列差异的原因之一。

由于核糖体 DNA 具有多拷贝以及不同区域具有不同的进化速率等特点, 因此, 部分研究者选取不同区段的核糖体 DNA 为分子标志构建 RNA 的二级结构, 揭示了一些在一级结构比较中难以发现的现象<sup>[20,21]</sup>。真核生物 rDNA-LSU 序列主要由 26S/28S rDNA 组成, 在生物体内含量较大且包括与核糖体功能密切相关的保守的核心区段<sup>[22,23]</sup>, 因此本研究对 28S rDNA-LSU 序列的 RNA 二级结构进行了分析。研究发现, 虽然绵羊、绒山羊和山羊源东毕吸虫的 28S rDNA-LSU 核苷酸序列存在不同程度的差异, 但其 RNA 二级结构却具有很多相同或相似结构; 黄牛源东毕吸虫的 28S rDNA-LSU 核苷酸序列与 3 种羊源相比仅发生微小改变, 但其 RNA 二级结构存在较大差异。作者推测这种差异是由于虫体寄生于不同种属终末宿主所致, 这种差异的规律性和稳定性及在分类学上的意义有待进一步研究。

本研究结果表明, 不同终末宿主源东毕吸虫的核糖体 ITS-2 和 28S rDNA-LSU 序列存在不同程度的差异, 其中亲缘关系较近的终末宿主 (羊源) 其 28S rDNA-LSU 序列的 RNA 二级结构相同或相似, 而亲缘关系较远的终末宿主 (牛源和羊源) 则差异较大。本实验为进一步研究东毕吸虫在不同宿主内的发育关系、分子种系发生、近缘种鉴别及分子流行病学调查等方面奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Hsü ST, Yang P. A preliminary study on blood flukes of cattle and sheep in Gansu Province, including descriptions of a new species [J]. Acta Vet Zootech Sin, 1957, 2(2): 117-124. (in Chinese) (许绥泰, 杨平. 甘肃省牛羊血吸虫的初步研究包括一新种的描述[J]. 畜牧兽医学报, 1957, 2(2): 117-124.)
- [2] Srivastava HD, Trisal KN. On the occurrence of *Ornithobilharzia turkestanicum* in cattle in India[C]. Kolkata: Indian Science Congress Association, 1957. 3: 370.
- [3] Machattie C. A preliminary note on the life-history of *Schistosoma turkestanicum* (Skrjabin, 1913)[J]. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1936, 30(1): 115-124.
- [4] Arfaa F, Sabaghian H, Ale-Dawood H. Studies on *Ornithobilharzia turkestanicum* (Skrjabin, 1913), Price, 1929 in Iran[J]. Ann Parasitol, 1965, 40(1): 45-50.
- [5] Abdussalam M, Sarwar MH. Occurrence of *Ornithobilharzia turkestanicum* in Pakistan[C]. Lahore: Pakistan Association for the Advancement of Science, 1952. 3: 143.
- [6] Wang CR, Pi BA, Song Z, et al. Investigation on the endemic situation and the distribution feature of orientobilharziasis in cattle and sheep in Heilongjiang[J]. Progr Vet Med, 2002, 25(5): 91-93. (in Chinese) (王春仁, 皮宝安, 宋卓, 等. 黑龙江省牛羊东毕吸虫病流行情况与地理分布特征的调查研究[J]. 动物医学进展, 2002, 25(5): 91-93.)
- [7] Sahba GH, Malek EA. Dermatitis caused by cercariae of *Orientobilharzia turkestanicum* in the Caspian Sea area of Iran[J]. Am J Trop Med Hyg, 1979, 28(5): 912-913.
- [8] Bai GM, Liu Z, Liu ZM. Survey and research of the etiology of swimmer's itch in Jilin Province I. *Orientobilharzia turkestanica* and its relation associated with rice paddy itch[C]. Beijing: Science Press, 1963. 167-168. (in Chinese) (白功懋, 刘忠, 刘兆铭. 吉林省稻田皮炎病因的调查研究 I. 土耳其斯坦东毕吸虫及其与稻田皮炎的关系[C]. 北京: 科学出版社, 1963. 167-168.)
- [9] Massoud J. The pathology of *Ornithobilharzia turkestanicum* and *Schistosoma bovis* in cattle, sheep and goats in Iran[J]. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1971, 65(4): 431.
- [10] Massoud J, Nelson GS. Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. 6. Observations on cross-immunity to *Ornithobilharzia turkestanicum*, *Schistosoma bovis*, *S. mansoni*, and *S. haematobium* in mice, sheep, and cattle in Iran[J]. Bull WHO, 1972, 47(5): 591-600.
- [11] Wang CR, Xu LM, Wang HX, et al. Application of dot-immunogold filtration assay in detection of orientobilharziasis of sheep[J]. Heilongjiang J Ani Sci Vet Med, 2000, 5: 24-25. (in Chinese) (王春仁, 许腊梅, 王洪新, 等. 应用斑点免疫金渗滤法检测羊东毕吸虫病的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000, 5: 24-25.)
- [12] Wang CR, Han Y, Xu LM, et al. The observation of effect of Kangxuexichong II against the *Orientobilharzia* spp. in naturally infected sheep[J]. Heilongjiang J Animal Sci Vet Med, 2000, 6: 20-21. (in Chinese) (王春仁, 韩燕, 许腊梅, 等. 抗血吸虫 II 号对绵羊自然感染东毕吸虫的驱杀效果观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000, 6: 20-21.)
- [13] Zhang GJ, Verneau O, Qiu CP, et al. Africa or Asia, which is the evolutionary origin of human schistosomes?[J]. C R Acad Sci III, 2001, 324(11): 1001-1010.
- [14] Snyder SD, Loker ES. Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*[J]. J Parasitol, 2000, 86(2): 283-288.
- [15] Song HQ, Li B, Lin RQ, et al. Cloning and sequence analysis of the ITS and 5.8S rDNA of *Ancylostoma caninum* in China[J]. Vet Sci Chin, 2007, 37(9): 756-759. (in Chinese) (宋慧群, 李宾, 林瑞庆, 等. 我国犬钩虫 ITS 及 5.8S rDNA 的

(下转第 190 页)

在家蝇卵、I 龄幼虫、II 龄幼虫、III 龄幼虫、蛹和成虫等 6 个生长阶段中的表达情况。结果显示，家蝇抗菌肽基因在所选的 6 个不同时期均有表达，其中 III 龄幼虫期和成虫期表达水平最高，卵期、I 龄幼虫期和蛹期的表达水平较低，在整个幼虫发育期抗菌肽的表达量呈增强趋势。其原因可能是：①抗菌肽基因在家蝇卵期缺乏转录活性，其表达的可能为母源性转录产物，所检测到的可能是母体的遗留，故呈低水平表达<sup>[6-8]</sup>；②整个家蝇幼虫期抗菌肽基因表达呈上调趋势，在 III 龄幼虫期达到最大转录活性，可能是随着幼虫的不断发育其免疫防御机制逐渐完善，同时也表明抗菌肽在家蝇幼虫发育中具有重要的作用；③完全变态的昆虫在蛹期对外界具有较强抵抗力<sup>[9]</sup>，而家蝇蛹期抗菌肽基因表达呈低水平，蛹期的发育前期 III 龄幼虫期与蛹期的发育后期成虫期表达均明显趋高，说明家蝇蛹期抗菌肽转录途径较复杂，同时也说明在家蝇免疫体系中抗菌肽可能不是唯一的防御免疫分子；④家蝇成虫期抗菌肽表达量增高，是因为此期家蝇免疫系统发育成熟所致，另一方面也是家蝇成虫期活动范围增大，受外界刺激的几率大大增加，机体自身免疫系统适应进化的结果，这也是昆虫适应防御微生物入侵的主要方式<sup>[10]</sup>。

本研究结果说明，尽管 3 种抗菌肽 cecropin、defensin 和 attacin 在家蝇各生长阶段表达水平存在明显差异，但在家蝇体内为组成型表达，说明抗菌肽在家蝇的免疫防御体系和生长发育中发挥着重要作用。

参 考 文 献

[1] Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. Science, 1999, 284(2): 1313-1318.

[16] Yang YC, Li XM, Zhao TL, et al. Study on sequence and secondary structure of *Haplorchis taichui* from Guangxi[J]. Appl Prev Med, 2007, 13(4):193-196. (in Chinese)  
(杨益超, 黎学铭, 赵同领, 等. 广西扇棘单睾吸虫 5.8S rRNA 序列及二级结构的研究[J]. 应用预防医学, 2007, 13(4): 193-196.)

[17] Lin RQ, Lü XS, Deng Y, et al. PCR amplification, cloning and sequence analysis of the ITS and 5.8S rDNA of *Dipylidium caninum*[J]. J Trop Med, 2007, 7(2): 109-111. (in Chinese)  
(林瑞庆, 吕晓生, 邓艳, 等. 犬复孔绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 的 PCR 扩增、克隆及序列分析[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(2): 109-111.)

[18] Li ZH, Feng XM, Lu SQ, et al. Sequencing and analysis of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 of *Pneumocystis* isolated from *Meriones unguiculatus*[J]. J Cap Univer Med Sci, 2006, 27(1): 135-136. (in Chinese)  
(李自慧, 冯宪敏, 卢思奇, 等. 长爪沙鼠源肺孢子虫 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列测定及分析[J]. 首都医科大学学报, 2006, 27

[2] Boman HG, Nilsson-Faye-I, Paul K, et al. Insect immunity. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae[J]. Infect Immun, 1974, 10(6): 136-145.

[3] Jin XB, Zhu JY, Ma Y. The expression of anti-bacterial peptide cecropin gene in COS-7 cells and the preliminary study on the activities of its gene product[J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23(6): 566-568. (in Chinese)  
(金小宝, 朱家勇, 马艳. 家蝇抗菌肽基因 cecropin 在 COS-7 细胞中的表达及产物活性初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(6): 566-568.)

[4] Zhai GR. A method of rearing housefly[J]. Chin J Prev Med, 1980, 14(1): 59-60. (in Chinese)  
(翟桂荣. 家蝇的饲养方法[J]. 中华预防医学杂志, 1980, 14(1): 59-60.)

[5] Wen JJ, Xie J. Study on differential expression and its feature of a fish gene containing WD domain protein in oogenesis process [J]. Sci Chin (Series C), 2001, 31(4): 343-352. (in Chinese)  
(文建军, 谢京. 1 个含 WD 结构域蛋白的基因在鱼类卵子发生过程中的差异表达及其特征分析[J]. 中国科学(C 辑), 2001, 31(4): 343-352.)

[6] Liang YL, Zhao XF, Wang JX. The expression pattern of defensin gene in housefly (*Musca domestica*) larva[OL]. Chin Sci Paper on Line(<http://www.paper.edu.cn>). 2005-06-24. (in Chinese)  
(梁永利, 赵小凡, 王金星. 家蝇防御素基因在家蝇幼虫体内的表达模式[OL]. 中国科技论文在线(<http://www.paper.edu.cn>). 2005-06-24.)

[7] Wang Y, Jin XB, Zhu JY. Expression pattern of attacin gene in larvae of *Musca domestica*[J]. Chin Trop Med, 2007, 7(6): 862-864. (in Chinese)  
(王艳, 金小宝, 朱家勇. 家蝇 attacin 基因在家蝇三龄幼虫中的时间表达模式研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(6): 862-864.)

[8] Geng H, An CJ, Hao YJ, et al. Molecular cloning and expression of attacin from housefly (*Musca domestica*)[J]. Acta Genet Sin, 2004, 31(12): 1344-1350. (in Chinese)  
(耿华, 安春菊, 郝友进, 等. 家蝇攻击素 attacin 基因的克隆与表达[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1344-1350.)

[9] Li YL. Human Parasitology [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004. 229. (in Chinese)  
(李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 229.)

[10] Naitza S, Ligoxygakis P. Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far[J]. Mol Immunol, 2004, 40(7): 887-896.  
(收稿日期: 2007-09-29 编辑: 盛慧锋)

(上接第 186 页)

克隆与序列分析[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(9): 756-759.)

[19] Li L, Yu LY, Zhu XQ, et al. *Orientobilharzia turkestanicum* is grouped within African schistosomes based on phylogenetic analysis using sequences of mitochondrial genes[J]. Parasitol Res, 2008, 102(5): 939-943.

[20] Ouvrard D, Campbell BC, Bourgoin T, et al. 18S rRNA secondary structure and phylogenetic position of Peloridiidae (Insecta: Hemiptera)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2000, 16(3): 403-417.

[21] Gagnon S, Bourbeau D, Levesque RC. Secondary structures and features of the 18S, 5.8S and 26S ribosomal RNAs from the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. Gene, 1996, 173(2): 129-135.

[22] Erpenbeck D, Nichols SA, Voigt O, et al. Phylogenetic analyses under secondary structure-specific substitution models outperform traditional approaches: case studies with diploblast LSU[J]. J Mol Evol, 2007, 64(5): 543-557.

[23] Friedrich M, Tautz D. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods[J]. Nature, 1995, 376(6536): 165-167.  
(收稿日期: 2008-01-24 编辑: 杨频)