

湖南省山羊脑多头蚴的线粒体 *nad1* 和 *nad4* 基因的序列测定及种系发育分析

何德肆*, 徐平源, 彭运潮

(湖南生物机电职业技术学院, 长沙 410128)

摘要: 本研究旨在阐明脑多头蚴湖南分离株线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 1 基因(*nad1*)部分序列(*pnad1*)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 4 基因(*nad4*)部分序列(*pnad4*)的遗传变异情况,并用 *pnad1* 和 *pnad4* 序列重构脑多头蚴与其它带科绦虫的种群遗传关系。利用聚合酶链反应(PCR)扩增脑多头蚴的 *pnad1* 和 *pnad4*,应用 ClustalX 1.81 程序对序列进行比对,再用 Phylip3.67 程序 MP 法和 Mage4.0 程序 NJ 法绘制种系发育树,并用 Puzzle5.2 程序构建最大似然树,同时利用 DNASTar5.0 中的 Megalign 程序进行同源性分析。结果显示所获得的 *pnad1* 和 *pnad4* 序列长度分别均为 666 和 887 bp,湖南分离株与已知多头带绦虫位于同一分枝。由于脑多头蚴 *pnad1* 和 *pnad4* 序列种内相对保守,种间差异较大,故均可作为种间遗传变异研究的标记,从而为脑多头蚴的分子流行病学和其相关疾病的诊断奠定基础。

关键词: 多头带绦虫;线粒体 DNA;*nad1* 基因;*nad4* 基因;种系发育关系

中图分类号:S852.734

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)12-1763-05

Sequence and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial *nad1* and *nad4* Genes for *Coenurus cerebralis* in Goats in Hunan Province

HE De-si*, XU Ping-yuan, PENG Yun-chao

(Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic College, Changsha 410128, China)

Abstract: The objectives of the present study were to examine sequence variation in the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) gene and NADH dehydrogenase subunit 4 (*nad4*) gene among *Coenurus cerebralis* isolates in Hunan Province, and to reconstruct their phylogenetic relationship using *nad1* and *nad4* sequences. The partial *nad1* (*pnad1*) and *nad4* (*pnad4*) were amplified from each *C. cerebralis*, and *pnad1* and *pnad4* sequences were aligned using the ClustalX 1.81. MP, and NJ trees of *pnad1* and *pnad4* were constructed using the software Phylip 3.67 version 4.0 and Mage version 4.0, and ML tree was also constructed using Puzzle version 5.2. Sequence homology analysis was performed using the Megalign program of the software DNASTar version 5.0. The results showed that the lengths of *pnad1* and *pnad4* sequences were 666 bp and 887 bp, respectively. The constructed phylogenetic tree revealed that the Hunan isolates and the *Taenia multiceps* available in GenBank were clustered in the same clade. There is no significant variation in *pnad1* and *pnad4* sequences within *C. cerebralis*, while inter-species difference is obvious. It is concluded that *pnad1* and *pnad4* sequences can be used as genetic marker for population genetic studies of cestodes. The results of the present study provided foundation for further studies of molecular epidemiology of *C. cerebralis*, and for diagnosis of the resultant disease.

Key words: *C. cerebralis*; mitochondrial DNA; *nad1* gene; *nad4* gene; phylogenetic relationship

收稿日期:2011-04-18

基金项目:湖南省教育厅项目(09C1209);湖南养殖科研项目(201009)

作者简介:何德肆(1973-),男,湖南永州人,副教授,硕士,主要从事兽医教学工作

* 通讯作者:何德肆, E-mail: hds4636781@163.com

脑多头蚴(*Coenurus cerebralis*)又称脑包虫,是多头带绦虫(*Taenia multiceps*)的中绦期幼虫,主要寄生于牛、羊等反刍兽的脑组织,是危害牛、羊养殖业健康发展的一种主要寄生虫,偶尔也感染人^[1]。脑多头蚴呈世界性分布,其报道多见于地中海沿岸和中东等国家^[2]。我国许多省、市均有报道,尤其多见于西北各省^[3]。因此,正确鉴别脑多头蚴,不仅具有重要学术价值,而且对预防和控制该病也具有重要意义。

线粒体基因组被广泛用作为遗传学研究的标记^[4-6],归咎于其结构简单、母系遗传、缺少重组、进化速率快等特点。在寄生虫领域,已被许多学者用来研究多种寄生虫的种内和种间遗传变异^[7-12]。本研究旨在分析湖南山羊体内采集的脑多头蚴的线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 1 基因(*nad1*)基因部分序列(*pnad1*)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 4 基因(*nad4*)部分序列(*pnad4*)的遗传变异情况,并利用 *pnad1* 和 *pnad4* 重构脑多头蚴与其它带绦虫的种群遗传关系,从而明确脑多头蚴线粒体 *nad1* 和 *nad4* 基因部分序列能否成为理想的种间遗传标记。

1 材料与方法

1.1 虫体样品

山羊多头蚴样品采自湖南湘西,代码依次为 CCXX1~CCXX23。

1.2 主要试剂

Taq 酶购自大连宝生物公司,蛋白酶 K 购自 Merck 公司。Wizard™ DNA Clean-up System 为 Promega 公司产品,PCR 试剂(Buffer、MgCl₂、dNTPs)为大连宝生物公司产品。

1.3 样品 DNA 的制备

从 70%乙醇保存液中取出单个虫体,置于 1.5 mL Eppendorf 管中。按照 Promega 公司基因组 DNA 提取试剂盒(Wizard SV Genomic DNA Purification System)使用说明书提取脑多头蚴基因组 DNA,将提取的基因组 DNA 置于 -20 °C 保存备用。

1.4 PCR 扩增

扩增线粒体 *nad1* 基因的部分序列(*pnad1*)的引物是作者根据 GenBank 上发表的多头带绦虫 *nad1* 基因序列所设计,上游引物 ND1F:5'-CATT-AGTGGTTTAACAGGTTTGTTA-3'(25 bp),下游引物 ND1R:5'-TGGTTAGGAATGGTTTAA-

ATGTTTG-3'(25 bp);扩增 *nad4* 基因的部分序列(*pnad4*)的引物是作者根据 GenBank 上发表的多头带绦虫 *nad4* 基因序列所设计,上游引物 ND4F:5'-GATTCTATTAGTTTTTATTTAAT-3'(23 bp),下游引物 ND4R:5'-TTGGGTTGGTTAGACAAAGATTG-3'(24 bp)。引物由上海生工生物技术有限公司进行合成。反应体系为 25 μL,其中 10×PCR buffer 2.5 μL;MgCl₂ 4 μL;dNTPs(25 mmol·L⁻¹)2 μL;Primer(50 pmol·μL⁻¹)0.25 μL;*Taq* polymerase(5 U·μL⁻¹)0.25 μL;双蒸水 14.75 μL;模板 DNA 1 μL。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,50 °C(*nad1*)、56 °C(*nad4*)退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,37 个循环;72 °C 后延伸 5 min。取 2 μL PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色,紫外投射仪下观察结果,凝胶成像系统摄像。PCR 产物保存备用。

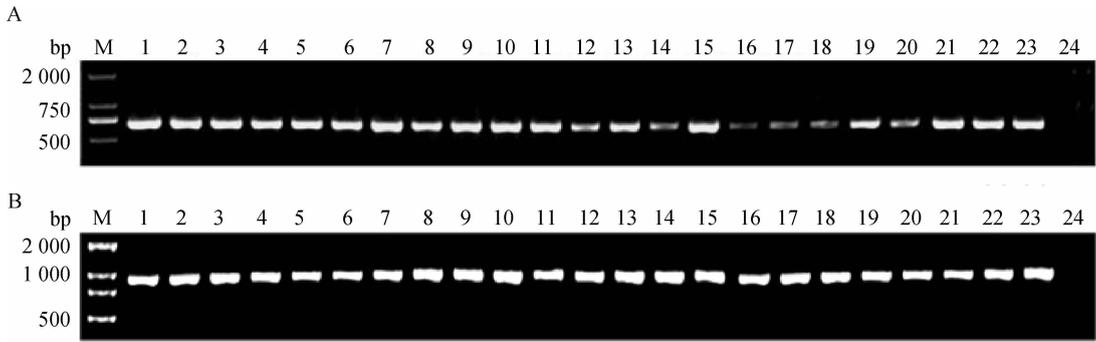
1.5 *nad1* 和 *nad4* 部分基因序列测定及其在种系发育分析中的应用

将 PCR 产物送金思瑞生物科技有限公司直接测序,测序结果用 DNASTAR 5.0 软件进行分析。从 GenBank 检索现有带科绦虫 *nad1* 和 *nad4* 序列,然后与之进行相似性比对和其它绦虫种系发育分析,以狷迭宫绦虫(*Spirometra erinaceieuropaei*)作为外群。利用 Clustal X1.81 及 Mega 4.0 软件对本试验获得的 *pnad1* 和 *pnad4* 序列进行比对及计算遗传距离,然后用 Phylip3.67 程序中的最大简约法(Maximum parsimony, MP)和 Mega 4.0 程序中的邻接法(Neighbor-joining method, NJ)绘制种系发育树,并用 Puzzle 5.2 程序构建最大似然树(Maximum Likelihood, ML)。邻接法采用 Tamura-Nei 模型进行分析;最大简约法采用 Branch and bound 模型分析,采用自展检验(Bootstrap test)估算所构建系统树的可靠性,ML 法采用 Hky 替代模型和 Quartet puzzling 搜索程序进行分析,复制数均为 1 000。同时利用 DNASTAR 5.0 中的 Megalign 程序进行相似性分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

23 个脑多头蚴样品均成功地扩增出约 700 bp (*nad1*)和 900 bp(*pnad4*)的片段,与预期目的片段长度相符,且无非特异性条带,空白对照为阴性。它们的 PCR 产物电泳图见图 1。



M. DL2000 相对分子质量标准;1~23. 分别代表 CCXX1- CCXX23;24. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker;1-23. Samples of CCXX1- CCXX23;24. Negative control

图 1 脑多头蚴线粒体 *pnad1*(A)和 *pnad4*(B) PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR-amplified mtDNA *pnad1* (A) and *pnad4*(B) from *Coenurus cerebralis* by agarose gel electrophoresis

2.2 测序结果及分析

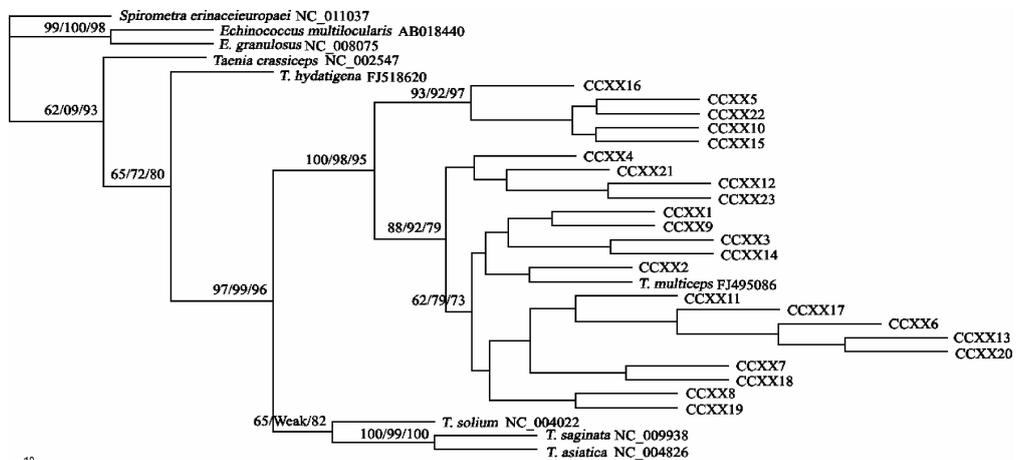
23 个样品的 *pnad1* 碱基序列长度相同,均为 716 bp,剔除引物后,均得到 666 bp 的序列;23 个样品的 *pnad4* 碱基序列长度相同,均为 934 bp,剔除引物后,均得到 887 bp 的序列。样品序列与 GenBank 收录的多头带绦虫的相应序列(*nad1* 和 *nad4* 登录号为 FJ518620)进行比较,经 DNASTAR 5.0 的 MegAlign 程序分析显示,*nad1* 基因的部分虫株测序结果与 FJ518620 序列完全一致,其余有变异的序列的变异碱基数皆小于 16,变异率在 0%~2.4%;*nad4* 基因的部分虫株测序结果与 NC_012894 序列变异碱基数皆小于 30,变异率在 0%~3.3%。

2.3 *nad1* 和 *nad4* 基因序列同源性比较

通过同源性比对分析显示,湖南分离株序列与 GenBank 中多头带绦虫序列的相似性均较高(*nad1* >97.6% 和 *nad4* >96.7%),湖南分离株序列与 GenBank 中其它带绦虫序列的相似度均较低(*nad1* <82% 和 *nad4* <71%)。

2.4 *nad1* 和 *nad4* 基因序列系统发生树

种系发育分析显示,无论 MP 法、ML 法,还是 NJ 法,种系发育树的拓扑结构基本一致(图 2),湖南分离株具有高度同源性(CCXX1-23),与 GenBank 中报道的多头带绦虫位于同一分枝,系统发生树中的 Bootstrap 值较高,湖南分离株所属分枝与其它带绦虫所属分支相隔较远,得到了鉴别。



节点处数据由左到右依次为 MP、ML、NJ 的 Bootstrap 值(%)

Numbers at nodes indicate bootstrap values resulting from MP, ML and NJ

图 2 基于 *pnad1* 和 *pnad4* 基因序列以最大简约法所构建的自展一致树

Fig. 2 The Bootstrap consensus phylogram of the stationary tree reconstructed by Maximum parsimony (MP) using the *pnad1* and *pnad4* sequences

3 讨 论

mtDNA 作为一种核外遗传物质,与核基因组 DNA 相比,具有相对分子质量小、进化速度快、结构简单、无组织特异性、母性遗传等特点。也正是由于 mtDNA 的这些特点,使之成为研究寄生虫系统进化的一种很好的分子标记^[14]。在寄生虫的分类鉴定和群体遗传方面,许多学者认为 *nad1* 和 *nad4* 基因序列是理想的遗传标记^[15-20]。

关于带绦虫的分类问题多年来一直是国际争论的焦点,有的学者把带科分成 5 个属(带属、带吻属、多头属、泡尾属和棘球属)^[21],但有的学者认为带科绦虫只有 2 个属(带属和棘球属)^[22],后一种观点较为大家接受。近年来对带科绦虫分子分类的研究也似乎证实了后一种观点。如刘自逵等用 14 种带绦虫的线粒体基因进行种系发育分析表明,棘球属绦虫与其它带绦虫的遗传距离较远^[17];刘国华等用 10 种带绦虫的线粒体基因进行种系发育分析结果也是如此^[23],本研究所得的种系发育树的结果也显示棘球属绦虫与其它带绦虫的遗传距离较远。要想彻底解决带科绦虫的分类问题,还需要对更多的不同宿主和不同地域的带科绦虫进行分子分类研究。

本研究的结果显示,脑多头蚴湖南分离株与 GenBank 中的多头带绦虫均有相当高的相似性(*nad1* > 97.6% 和 *nad4* > 96.7%),23 个脑多头蚴分离株与 GenBank 中其它带绦虫种相比,相似性较低(*nad1* < 82% 和 *nad4* < 71%)。23 个湖南分离株 *nad1* 和 *nad4* 基因序列种间的变异远大于种内的变异,说明 *nad1* 和 *nad4* 均能为种间的遗传变异提供遗传标记,可用于脑多头蚴的鉴定。这一结论不但与意大利学者 Varcasia 等对多头绦虫的线粒体 *nad1* 基因序列分析一致^[24],而且也可从李文卉等对脑多头蚴线粒体 *cox1* 基因序列分析所得出的结论中获得有力的支持^[25]。采用 3 种不同方法构建的进化树具有一致性,均显示出湖南分离株与多头带绦虫位于同一分枝,高度同源,23 个分离株所属分枝与其它带绦虫所属分枝相隔较远,得到了很好地鉴别。湖南分离株又分成 2 个分枝,显示湖南分离株是存在 2 个不同的种内变异或者不同的基因型。本研究结果符合意大利学者 Varcasia 对来自意大利的 40 个脑多头蚴或多头带绦虫的线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因序列进行分析,认为意大利的脑多头蚴或多头带绦虫至少存在 3 个不同的种内变异

型^[24]的结论。

4 结 论

通过对脑多头蚴的 *nad1* 和 *nad4* 基因部分序列的分析,发现种间的变异远大于种内的变异,表明线粒体 *nad1* 和 *nad4* 均适合作为脑多头蚴种间的遗传标记,可用于脑多头蚴的鉴定,从而为脑多头蚴的种群遗传学研究和其相关疾病的诊断奠定了基础。

参考文献:

- [1] AVCIOGLU H, YILDIRIM A, DUZLU O, et al. Prevalence and molecular characterization of bovine coenurosis from Eastern Anatolian region of Turkey [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 176(1): 59-64.
- [2] EL-ON J, SHELEF I, CAGNANO E, et al. *Taenia multiceps*: a rare human cestode infection in Israel [J]. *Vet Ital*, 2008, 44(4): 621-631.
- [3] 牟 静, 杨应东, 杨光友, 等. 多头带绦虫四川株的生物学特性 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(09): 895-899.
- [4] MCMANUS D P, BOWLES J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics [J]. *Int J Parasitol*, 1996, 26(7): 687-704.
- [5] GASSER R B, NEWTON S E. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects [J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30(4): 509-534.
- [6] BLOUIN M S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer [J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32(5): 527-531.
- [7] HU M, CHILTON N B, GASSER R B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics [J]. *Adv Parasitol*, 2004, 56: 133-212.
- [8] BOORE J L. Animal mitochondrial genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [9] HU M, GASSER R B, ABS EL-OSTA Y G, et al. Structure and organization of the mitochondrial genome of *Dirofilaria immitis* [J]. *Parasitology*, 2003, 127: 37-51.
- [10] HU M, CHILTON N B, GASSER R B. The mitochondrial genomes of the two human hookworms *Ancylostoma*

- lostoma duodenale and Necator americanus (Nematoda: Secernentea) [J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32(2): 145-158.
- [11] BLOUIN M S. Mitochondrial DNA diversity in nematodes [J]. *Helminthol*, 1998, 72(4): 285-289.
- [12] ANDERSON T J C, BLOUIN M S, BEECH R N. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers [J]. *Adv Parasitol*, 1998, 41: 219-283.
- [13] BOWLES J, BLAIR D, McMANUS D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54 (2): 165-174.
- [14] DESPRES L, IMBERT-ESTABLET D, COMBES C, et al. Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 47 (1): 139-141.
- [15] GASSER R B, ZHU X, McMANUS D P. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome oxidase subunit 1 sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda) [J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29 (12): 1965-1970.
- [16] 李明伟, 林瑞庆, 邹丰才, 等. 弓首蛔虫和狮弓蛔虫线粒体 *nad1* 基因部分序列多态性研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1915-1920.
- [17] 刘自逵, 刘国华, 戴荣四, 等. 湖南省猬迭宫绦虫的线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的序列测定及种系发育分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41 (4): 463-468.
- [18] 李明伟, 林瑞庆, 曹湛, 等. 弓首蛔虫及狮弓蛔虫线粒体基因组 *nad4* 基因多态性研究 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(3): 236-240.
- [19] LI MW, LIN RQ, SONG HQ, et al. Electrophoretic analysis of sequence variability in three mitochondrial DNA regions for ascaridoid parasites of human and animal health significance [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29, (13): 2912-2917.
- [20] 李利, 邢继兰, 王春仁, 等. 4种终末宿主土耳其斯坦东毕吸虫 *cox1* 和 *nad1* 基因的序列分析 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38 (4): 303-307.
- [21] 沈杰, 黄兵. 中国畜禽寄生虫形态分类图谱 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006.
- [22] 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(3): 155-183.
- [23] 刘国华, 戴荣四, 赵光辉, 等. 湖南长沙及湘西泡状带绦虫分离株线粒体 *cox1* 基因的克隆及序列分析 [J]. 热带医学杂志, 2009, 9(2): 117-120.
- [24] VARCASIA A, LIGHTOWLERS M W, CATTOLI G, et al. Genetic variation within *Taenia multiceps* in Sardinia, Western Mediterranean (Italy) [J]. *Parasitol Res*, 2006, 99, (5): 622-626.
- [25] 李文卉, 盖文燕, 姚菊霞, 等. 多头带绦虫甘肃分离株分子 CO I 基因部分序列比较分析 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2010, 17(3): 129-134.

(编辑 白永平)