

猎豹狮弓蛔虫线粒体 *cox1* 基因的 序列测定及系统发育分析

李向勇¹, 靳元春², 聂瑜², 粟玉刚³, 唐春华⁴, 李芬²

(1. 长沙生态动物园, 湖南长沙 410118;

2. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128;

3. 长沙市动物卫生监督所, 湖南长沙 410013;

4. 长沙市望城区动物卫生监督所, 湖南长沙 410200)

摘要: 以来源于湖南省长沙生态动物园猎豹体内的狮弓蛔虫为研究对象, 利用保守引物, 通过聚合酶链反应(PCR), 扩增猎豹狮弓蛔虫线粒体细胞色素c氧化酶I亚基基因(*cox1*)部分序列(*pcox1*), 并用*pcox1*序列构建与其他相关蛔虫的进化关系。将获得的序列, 用Clustal X 1.83程序进行比对, 用Phy ML 3.0程序中的最大似然树法(ML)绘制种系进化树。结果显示: 样品*pcox1*序列长度均为367 bp, 种内相对保守(1.4%~6.8%), 种间变异显著(9.7%~21.4%); 种系发育关系指示, 猫科动物狮弓蛔虫分离株位于同一分支, 犬科动物狮弓蛔虫分离株位于另一分支。由于狮弓蛔虫*cox1*序列种内相对保守, 种间差异较大, 故可作为狮弓蛔虫种间遗传变异研究的标记。

关键词: 狮弓蛔虫; 猎豹; 线粒体DNA; *cox1*基因; 种系发育关系

中图分类号: S858.9 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)08-0097-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.025

Sequence Comparison and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial *cox1* Gene of *Toxascaris Leonina* in Cheetah

Li Xiangyong¹, Jin Yuanchun², Nie Yu², Su Yugang³, Tang Chunhua⁴, Li Fen²

(1. Changsha Ecological Zoo, Changsha, Hunan 410118, China;

2. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

3. Changsha Animal Health Supervision Institution, Changsha, Hunan 410013, China;

4. Wangcheng District Animal Health Supervision Institution, Changsha, Hunan 410200, China)

Abstract: In order to analyze the sequence variation of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase 1 (*cox1*) gene of *Toxascaris leonina* isolated from cheetah in Hunan Province, the conserved primers were designed and partial sequence (*pcox1*) of *cox1* gene was amplified by PCR. Then the evolutionary relationship of *pcox1* sequences between the amplified strain and other related *Ascaris lumbricoides* was constructed. The obtained *pcox1* sequences were compared by software ClustalX 1.81, and phylogenetic tree was drawn by the maximum likelihood tree-building method in software PhyML 3.0. Results showed that, the lengths of whole *pcox1* sequence were 367 bp, which was relatively conserved within the species (1.4% to 6.8%), and the variation between species was significant (9.7% to 21.4%). Results of phylogenetic relationship analysis indicated that *Toxascaris leonina* isolated from feline animals located in the same branch, while the *Toxascaris leonina* isolated from canine animals located in another branch. Given that the sequence of *cox1* gene was relatively conserved within species and variable between different species, it could be used as a genetic marker for studying genetic variations between species.

Key words: *Toxascaris leonina*; cheetah; mitochondrial DNA; *cox1* gene; phylogenetic relationship

基金项目: 湖南省教育厅杰出青年基金项目(14B092)

通信作者: 李芬

狮弓蛔虫(*Toxascaris leonina*)属于蛔目(*Ascaridida*)蛔科(*Ascaridae*)弓蛔属(*Toxascaris*)，是猫科、犬科食肉动物(如虎、猎豹、猞猁、狼等)中较为常见的胃肠道寄生虫^[1]。狮弓蛔虫可寄生于猎豹的胃部和肠部，掠夺猎豹的营养，影响其营养代谢，易引发胃肠炎、肠梗阻等疾病，严重时可导致感染动物死亡^[2]。其幼虫亦可感染人类，引发宿主胃肠道机械性损伤，属于人兽共患寄生虫^[3-4]。另外，狮弓蛔虫属于土源性寄生虫，其虫卵可在土壤里存活数十日，易造成对宿主的反复感染，给我国珍稀野生动物保护工作带来了极大影响与危害^[5]。

传统的寄生虫种类鉴定以形态学特征为主要依据。但这种手段主观性较大、周期性较长，且难以对形态相似虫种进行准确鉴别，因此单纯的形态学鉴定法具有很大局限性。随着分子生物学的发展，选择合适的基因片段作为标记，可以更好地探究寄生虫的遗传变异情况。线粒体 DNA (Mitochondria DNA) 是胞核外环状遗传物质，与核基因相比具有分子量小、结构简单、进化速率快、缺少重组等诸多特征^[6]。此外，由于线粒体基因组序列容易测定，且具有较高的突变率，所以特别适合作为遗传学研究的有效遗传标记^[7]，目前已被许多学者用于多种寄生虫的种间和种内遗传变异关系研究^[8-10]。本研究以从湖南省长沙市生态动物园猎豹体内采集的 14 条狮弓蛔虫为研究对象，对其线粒体细胞色素 c 氧化酶 I 亚基基因(*cox1*)部分序列(*pcox1*)并进行扩增、克隆和序列分析，从而明确该基因序列能否成为狮弓蛔虫理想的种间遗传标记。

1 材料与方法

1.1 虫体样品

14 条狮弓蛔虫(CS1~14)样品：采自湖南省长沙市生态动物园的猎豹粪便；单个样品经生理盐水冲洗后，保存于 70% 酒精中。

1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒 Wizard DNA Clean-up System、pGEM-T Easy 载体试剂盒、感受态细胞 JM 109：Promega 公司产品；蛋白酶 K：Merk 公司产品；Taq DNA 聚合酶、PCR 试剂(Buffer、MgCl₂、dNTPs 等)、DL2000 DNA Marker：大连宝生物公司产品。

1.3 样品 DNA 制备

将每个成虫截取虫体尾部小部分(1~2 cm)，用双蒸水反复吹打冲洗 3 次后，分别放入 1.5 mL 的灭菌离心管中；用灭菌微型剪刀，将虫体组织剪碎，分别加入 30 μL 蛋白酶 K (50 μg/μL) 和 270 μL SDS 裂解液，混匀后置于 55 °C 恒温培养箱中反应 15~18 h，每隔 1~2 h 震荡 1 次。消化完全后，用 Promega 公司的 DNA 抽提试剂盒提取虫体 DNA；将提取的 DNA 样品置于 -20 °C 条件下保存。

1.4 PCR 扩增

用文献^[11]报道的保守引物 JB3 和 JB4.5 扩增线粒体 *pcox1*。其核苷酸序列如下：

JB3: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'
(24 bp)；

JB4.5: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'
(24 bp)

引物由上海生工生物科技有限公司合成。扩增体系为 25 μL: ddH₂O 16.25 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2.0 μL, 上下游引物(50 pmol/μL)各 0.5 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.25 μL, 模板 DNA 1.0 μL。扩增条件为：95 °C 预变性 5 min，然后 95 °C 变性 15 s、54 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min，共 40 个循环，最后 72 °C 延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物在 1% TBE 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 扩增片段克隆及筛选

以 OMEGA Bio-Tek 公司的 DNA 胶回收试剂盒，对所扩增片段进行纯化；将纯化产物连接到 pGEM T Easy 载体上；将连接产物转化至感受态细胞 JM 109 中，在含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上，无菌挑选白色单菌落进行 PCR 鉴定和酶切鉴定，筛选获得阳性克隆。

1.6 *cox1* 基因部分序列测定及进化分析

将鉴定为阳性的重组菌送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序，并将测序结果用 DNA Star 软件进行分析。从 GenBank 上下载具有代表性的其他线虫的 *cox1* 序列，用 Clustal X 2.0 软件，对获得的 *cox1* 序列进行相似性比对和种系发育分析。以绵羊夏柏特线虫(*Chabertia ovina*)作为外群，用 Phy ML 3.0 程序中的最大似然树法(ML)，使用经过筛选获

得的最佳建树模型 GTR, 经过 100 次 bootstrap 推演后, 用 Tree View 1.65 程序绘制种系发育关系树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

14 个样品均扩增出约 400 bp 的片段, 与预期 *pcox1* 目的片段长度相符, 且无非特异性条带, 空白对照为阴性。(图 1)



M. DL-2000 DNA Marker; 1~14. 14 个样品; 15. 阴性对照

图 1 猎豹狮弓蛔虫样品 *cox1* 序列 PCR 产物电泳图

2.2 测序结果及分析

扩增产物测序结果显示: 14 个猎豹狮弓蛔虫样品 *pcox1* 碱基序列长度均为 415 bp, 剔除引物后, 均得到 367 的序列; 14 个样品 *pcox1* 序列的 A+T 含量 (65.94%~66.21%) 明显高于 G+C 含量 (33.78%~34.06%)。对 14 个样品的 *pcox1* 序列进行分析比较发现, 猎豹狮弓蛔虫 *cox1* 基因序列共有 10 个碱基发生变异, 变异率为 0~0.3% (表 1)。将获得的样品序列与 GenBank 登录号上发表的猫科动物东北虎、华南虎、猞猁 (登录号分别为 JF780947、JF780950、JF780951) 的相应序列进行比较分析, 发现 *cox1* 基因变异率为 1.4%~4.1%。与犬科动物狐狸、狼、犬 (登录号分别为 KX963448、JF780946、KC293930) 的相应序列进行比较, 发现 *cox1* 基因变异率为 5.3%~6.8%。对蛔目线虫的 *cox1* 基因序列进行种间分析发现, 猎豹狮弓蛔虫 *cox1* 序列与其他蛔

表 1 猎豹狮弓蛔虫 mtDNA *cox1* 序列变异位点

| 编号 | <i>cox1</i> 变异位点 | | | | | | | | | |
|------|------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 27 | 35 | 59 | 242 | 260 | 275 | 278 | 284 | 366 | 367 |
| CS1 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS2 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS3 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS4 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS5 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS6 | G | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS7 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS8 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | C |
| CS8 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS10 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS11 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS12 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |
| CS13 | A | A | A | C | G | G | G | A | T | |
| CS14 | A | G | G | T | A | A | A | G | C | T |

虫种存在较大差异, 变异率为 9.7%~21.4%。

2.3 *cox1* 基因序列系统发生树

以绵羊夏柏特线虫为外群, 通过 Phy ML 3.0 程序中的 ML 法, 构建了种系发育树 (图 2), 发现狮弓蛔虫可分为两个分支: 14 个猎豹狮弓蛔虫分离株与 GenBank 中收录的东北虎、华南虎、猞猁 (猫科动物) 的狮弓蛔虫参考株位于同一分支, GenBank 中收录的狼和犬 (犬科动物) 狮弓蛔虫参考株位于另一分支。猎豹狮弓蛔虫所属分支与其它蛔目线虫所属分支相隔较远, 得到了很好的区别。

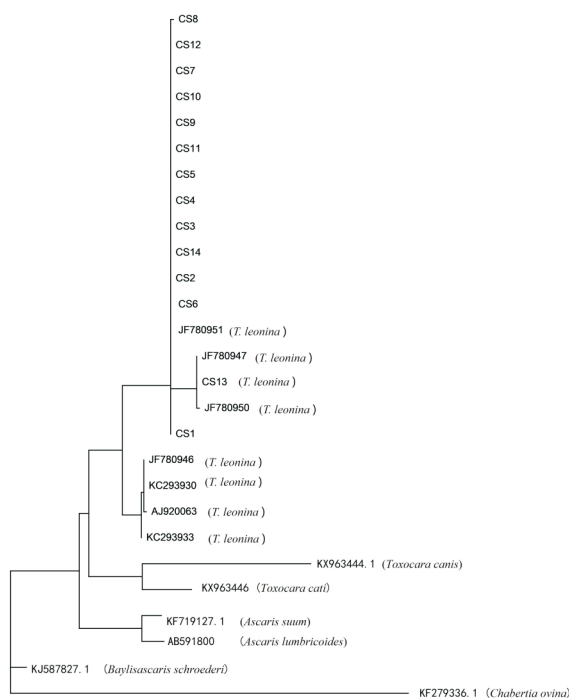


图 2 基于 *pcox1* 基因序列以 ML 法构建的猎豹狮弓蛔虫系统发育树

3 讨论

准确鉴定寄生虫种类是从事寄生虫研究的重要科学问题之一, 对防制寄生虫病具有重要意义。传统的寄生虫分类主要根据形态学特征进行。但随着时间的推移和生物种群的进化, 形态学鉴定的局限性愈加明显, 如对近缘种而言, 很难从形态学上对寄生虫进行准确区分。随着分子生物学的发展, 选择合适的基因作为标记, 可以更好地探究寄生虫的遗传变异情况, 从而为此问题的解决开辟了新途径。线粒体基因作为一种核外遗传物质, 具有分子量小, 很少发生基因重组, 基本上为母系遗传, 突

变率高等特点,十分适合作为分子标记进行生物分类和种系发育方面的研究^[12-14]。其中, *cox1* 是线粒体基因组中进化速率较慢的,目前已被许多学者作为分子标记应用于寄生虫的分类鉴定^[15-17]。

本研究对来自湖南省长沙市生态动物园的猎豹狮弓蛔虫线粒体 *pcox1* 基因序列进行了遗传变异分析。研究结果显示,来自不同宿主的狮弓蛔虫分离株之间的线粒体 *cox1* 基因序列差异性均小于 6.8%,狮弓蛔虫与其他相关蛔目线虫相应序列的差异性均大于 9.7%,即种间差异明显大于种内变异,说明 *cox1* 基因可以作为种间遗传标记应用于猎豹狮弓蛔虫的种间鉴定。然而,不同宿主的狮弓蛔虫分离株 *cox1* 基因序列差异性达 6.8%,说明狮弓蛔虫也许存在隐藏种,但是需要更多的数据去证实。采用 ML 法构建的进化树显示,14 个猎豹狮弓蛔虫分离株同 GenBank 中收录的东北虎、华南虎、猞猁(猫科动物)的狮弓蛔虫参考株位于同一分支,与 GenBank 中收录的狼和犬(犬科动物)狮弓蛔虫参考株关系最近,两者共同形成一个大分支,且与其他蛔目线虫所属分支相隔较远,因而得到了很好的鉴别。这一结论与宋美冉等^[18]对华南虎狮弓蛔虫三种线粒体基因的遗传进化分析所得结论相符。本试验为猎豹狮弓蛔虫的分类鉴定以及进一步的分子流行病学调查工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] PENG Z W, LIU S J, HOU Z J, et al. Ascarid infestation in captive Siberian tigers in China[J]. *Veterinary parasitology*, 2016, 226: 74-77.
- [2] 盛中华. 五种野生动物蛔虫核糖体及线粒体 DNA 多态性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [3] 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.
- [4] SYMEONIDOU I, GELASAKIS A I, ARSENOPOULOS K, et al. Feline gastrointestinal parasitism in Greece: emergent zoonotic species and associated risk factors[J]. *Parasites vectors*, 2018, 11(1): 227.
- [5] EMAMAPOUR S R, BORJI H, NAGIBI A. An epidemiological survey on intestinal helminths of stray dogs in Mashhad, North-east of Iran[J]. *Journal of parasitic diseases*, 2015, 39 (2): 266-271.
- [6] CRIMI M, RIGOLIO R. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle[J]. *International journal of nanomedicine*, 2008, 3 (1): 51-57.
- [7] MCMANUS D P, BOWLES J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics[J]. *International journal for parasitology*, 1996, 26 (7): 687-704.
- [8] BLOUIN M S. Molecular prosecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer[J]. *International journal for parasitology*, 2002, 32 (5): 527-531.
- [9] 贾万忠, 闫鸿斌, 倪兴维, 等. 线虫线粒体基因组全序列分析研究进展[J]. *中国农业科学*, 2011, 44 (6): 1255-1265.
- [10] 梁轩, 刘毅. 犬弓首蛔虫线粒体 *cox1* 基因的克隆及序列分析[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32 (3): 66-69.
- [11] BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Molecular and biochemical parasitology*, 1992, 54 (2): 165-174.
- [12] LI K X, YANG F, ABDULLAHI A Y, et al. Sequence analysis of mitochondrial genome of *Toxascaris leonina* from a South China Tiger[J]. *Korean journal of parasitology*, 2016, 54 (6): 803-807.
- [13] HU M, HILTON 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]. *Advances in parasitology*, 2004, 56: 133-212.
- [14] LIU G H, WU C Y, SONG H Q, et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs[J]. *Gene*, 2012, 492 (1): 110-116.
- [15] 刘自远, 刘国华, 戴荣四, 等. 湖南省猎迷宫绦虫的线粒体 *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.
- [16] PRAPHATHIP E, PHAIK E L, GABRIELA S, et al. Molecular differentiation of *Angiostrongylus* (Nematoda: Angiostrongylidae) by cytochrome oxidase subunit I (COI) gene sequences [J]. *Acta tropica*, 2010, 116: 152-156.
- [17] 陈红玲, 林瑞庆, 李国清, 等. 线粒体 *cox1* 序列分析支持北半球欧氏对盲囊线虫是一个新种[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27 (1): 31-37.
- [18] 宋美冉, 李康信, 石先利, 等. 华南虎狮弓蛔虫三种线粒体基因的遗传进化分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23 (6): 68-75.

(责任编辑: 朱迪国)