

五步蛇源隐孢子虫分离株的分子鉴定

赵金凤¹, 党海亮¹, 何国声², 菅复春¹, 张龙现¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 中国农科院上海兽医研究所, 上海 200421)

[摘要] 【目的】采用分子生物学方法鉴定 1 个五步蛇(*Deinagkistrodon acutus*)源隐孢子虫分离株, 了解中国蛇隐孢子虫感染的种类分布。【方法】利用巢式 PCR 方法, 扩增隐孢子虫 18S rRNA 基因特异性片段, 对 PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)和同源性分析, 构建其种系发育进化树。【结果】成功扩增出 18S rRNA 基因目的片段, PCR 产物经 *Ssp* I 酶消化后获得的酶切结果和先前报道的蛇隐孢子虫(*Cryptosporidium serpentis*)一致。获得的 840 bp 18S rRNA 基因序列与 *C. serpentis* 同源性达到 99.8%。种系发育进化树分析表明, 该分离株与 *C. serpentis* 位于同一分支, 节点支持值达 100%。【结论】本研究获得的五步蛇源隐孢子虫分离株为 *C. serpentis*, 说明 *C. serpentis* 有更宽的感染宿主范围。

[关键词] 五步蛇; 隐孢子虫; 18S rRNA; PCR-RFLP; 种系发育关系

[中图分类号] S855.9; S865.3⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)06-0020-05

Molecular identification of *Cryptosporidium* isolate from a long-noded pit viper (*Deinagkistrodon acutus*)

ZHAO Jin-feng¹, DANG Hai-liang¹, HE Guo-sheng²,
JIAN Fu-chun¹, ZHANG Long-xian¹

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200421, China)

Abstract: 【Objective】The study was made to identify one *Cryptosporidium* isolate from a long-noded pit viper (*Deinagkistrodon acutus*) by molecular methods, thus to understand the distribution of *Cryptosporidium* spp. in reptiles in China and to assess the public healthy significance. 【Method】A nested PCR method was used to amplify specific fragment of 18S rRNA gene in *Cryptosporidium*, PCR product was analysed by restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP), and phylogenetic relationship was calculated. 【Result】The expected fragment of 18S rRNA gene was successfully amplified, and the PCR product was digested and the profile of fragments was in agreement with that of *Cryptosporidium serpentis* (*C. serpentis*) reported previously. A 840 bp fragment of 18S rRNA gene was obtained by sequencing, and the similarity was 99.8% between this isolate and the *C. serpentis*. Among these *Cryptosporidium* species/genotypes shown in the phylogenetic relationship tree, the present isolate formed the same taxon with *C. serpentis*, with the bootstrap value being 100%. 【Conclusion】The *Cryptosporidium* isolate from a long-noded pit viper was identified as *C. serpentis*. Thus, the result showed that the host range of *C. serpentis* was wider.

Key words: *Deinagkistrodon acutus*; *Cryptosporidium*; 18S rRNA; PCR-RFLP; phylogenetic relation-

* [收稿日期] 2010-11-30

[基金项目] 河南省重点科技攻关项目(92102110138); 国家自然科学基金项目(30871863)

[作者简介] 赵金凤(1970—), 女, 河南焦作人, 实验师, 硕士, 主要从事检疫检验和兽医药物防治技术研究。

[通信作者] 菅复春(1971—), 女, 河南永城人, 副教授, 硕士, 主要从事人兽共患原虫病分子及免疫诊断研究。

E-mail: jfchun2008@163.com

ship

隐孢子虫(*Cryptosporidium*)可以感染 80 多种爬行动物,包括蛇、蜥蜴和龟类等^[1]。目前,在爬行动物中仅鉴定出 2 个有效种,即寄生于胃的蛇隐孢子虫(*Cryptosporidium serpentis*)和寄生于肠道的巨蜥隐孢子虫(*C. varanni*)(同物异名 *C. saurophilum*)^[2-3]。然而,爬行动物寄生的隐孢子虫种类遗传多态性远不止此。基于 18S rRNA 基因,通过对 48 份蛇源、24 份蜥蜴源和 3 份龟源隐孢子虫样品进行分析,结果显示存在 9 种类型的隐孢子虫,包括 *C. serpentis*、*C. varanni*、*C. muris*、*C. parvum* 和隐孢子虫鼠基因型,1 种见于蜥蜴的类蛇隐孢子虫,2 种寄生于蛇的新基因型及 1 种寄生于龟的新基因型^[4]。最近,在一些龟类中又发现了几个隐孢子虫新基因型^[5-6]。

1977 年, Brownstein 等^[7]在患有慢性肥厚性胃炎的 14 个蛇体中发现了隐孢子虫感染,并进行了虫体组织学观察。至此,隐孢子虫可以感染蛇才得以确认。目前,已在 20 多种蛇中检测到了隐孢子虫感染,包括路易斯安那州松蛇、玉米蛇、牛蛇、黑鼠蛇、绿蟒、乳蛇、新几内亚毒蛇巨蟒、蟒蛇、普通南棘蛇、亚马逊树蟒、球蟒、蝰蛇、布伦氏蟒、加州王蛇、翡翠树蟒、狐蛇、山毒蛇、盾尖吻蛇、墨西哥黑王蛇和松蛇等^[1]。整体而言,目前对蛇隐孢子虫的研究,尚没有其他哺乳动物的隐孢子虫深入,在隐孢子虫感染率、年龄分布、流行季节、感染种类和传播动力学等方面均还需要进行大量的研究。

在国内,仅党海亮等^[8]曾对上海地区的蛇、蜥蜴、蟾蜍、龟等部分爬行动物及两栖类动物隐孢子虫的感染情况进行过调查,并发现隐孢子虫是这些动物常见的感染寄生虫种类;然而,其并未对所获得的隐孢子虫阳性分离株进行分子生物学鉴定。本研究对采集自上海野生动物园的 1 份蛇源隐孢子虫样品进行了基于 18S rRNA 基因位点的 PCR-RFLP 分析和序列分析,并对该隐孢子虫分离株的种类进行了确定,以期对隐孢子虫的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 隐孢子虫样品

供试隐孢子虫分离株为 2007-05 在上海野生动物园进行隐孢子虫流行病学调查时获得,分离自五步蛇(*Deinagkistrodon acutus*)的胃内容物,样品保存于质量分数 2.5% 的重铬酸钾溶液中。

1.2 隐孢子虫卵囊的纯化

在 15 mL 离心管中加入 9 mL 质量分数 27% 的蔗糖溶液,在蔗糖溶液中小心加入 3 mL 样品悬液,3 500 r/min 离心 15 min,用吸管或针头吸取两液交界处的卵囊富集层于一新离心管中;加蒸馏水至 13 mL,3 000 r/min 离心 10 min,如此反复 3 次,以充分洗去蔗糖、重铬酸钾和其他杂质。将沉淀物转入 Eppendorf 管中,用于 DNA 提取。

1.3 隐孢子虫 DNA 的提取

使用日本 TOYOBO 公司生产的 Mag Extractor-Genome 提取试剂盒,按照使用指南进行隐孢子虫的 DNA 提取。DNA 用 TE 缓冲液溶解,置 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.4 隐孢子虫 18S rRNA 基因的 PCR 扩增

按照 Xiao 等^[9]报道的 18S rRNA 基因特异性引物进行扩增,引物由生工生物(上海)有限公司合成。第 1 对引物上游 5'-TTC TAG AGC TAA-TAC ATG CG-3',下游 5'-CCC TAA TCC TTC-GAA ACA GGA -3';第 2 对引物上游 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3',下游 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'。PCR 扩增试剂为日本 TOYOBO 公司生产的 KOD-Plus 扩增酶。反应体系组成:KOD plus Buffer 5 μ L, dNTP 5 μ L,上游引物 0.5 μ L,下游引物 0.5 μ L, MgSO₄ 2 μ L, 扩增酶(1 U/ μ L) 1 μ L, DNA 模板 2 μ L(第 2 个 PCR 则为 2.5 μ L),最后添加灭菌双蒸水至 50 μ L。反应程序:94 °C 预变性 5 min;然后 35 个循环(94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min);最后 72 °C 延伸 7 min;第 2 个 PCR 反应程序与第 1 个 PCR 基本一样,惟一区别是循环次数为 30 次。

1.5 隐孢子虫 18S rRNA 基因 PCR 产物的检测

取 5 μ L PCR 扩增产物,在含 EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,在电泳凝胶成像系统中观察并拍照。Marker 为 DL2000 Marker,购自大连(宝)生物工程有限公司。

1.6 PCR 产物的酶切

对 18S rRNA 基因的第 2 次 PCR 产物采用限制性内切酶 *Ssp* I (Fermentas, 深圳)进行酶切。具体方法是:在 10 μ L 第 2 次 PCR 产物中加入 12 μ L 灭菌双蒸水、2 μ L 酶切缓冲液、1 μ L 内切酶,于 37 °C 水浴孵育 3 h。

1.7 PCR 产物的测序

第 2 次 PCR 产物采用第 2 对引物直接测序,测序反应试剂为 ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems);测序仪为 ABI PRISM[™] 3730 XL DNA Analyzer(Applied Biosystems)。测序由大连(宝)生物工程有限公司完成。

1.8 种系发育分析

核苷酸序列应用 Clustal X 1.83 软件进行比对,同源性分析使用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 程序进行。采用 PHYLIP version 3.67 进行邻接法(NJ 法)进化树的构建,分析模型为

Kimura 2-parameter。进化树的可靠性用 bootstrap 进行分析,共 1 000 个重复。

2 结果与分析

2.1 蛇源隐孢子虫 18S rRNA 基因的 PCR 扩增和 RFLP 分析

应用特异性引物成功扩增出了蛇源隐孢子虫阳性样品的 18S rRNA 基因片段,长约 840 bp(图 1)。PCR 产物经 *Ssp* I 限制性内切酶酶切,产生了 2 个主片段,分别长约 420 bp 和 380 bp(图 2);该酶切结果和先前报道的 *C. serpentis* 结果相一致^[4]。

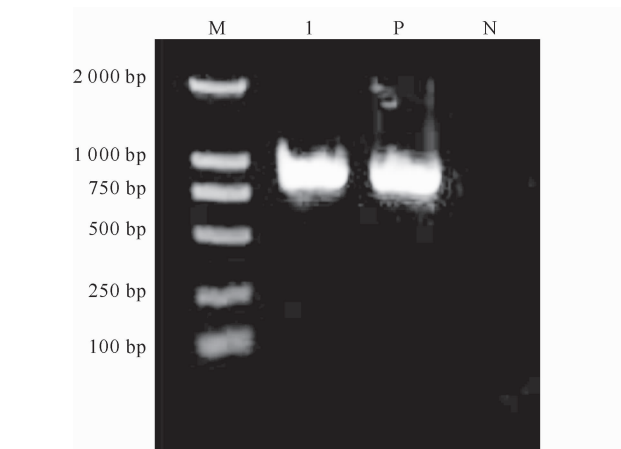


图 1 蛇源隐孢子虫 18S rRNA 基因 PCR 扩增产物的检测

M, DL2000 Marker;I. 五步蛇源隐孢子虫分离株 18S rRNA 基因片段;P. 阳性对照(*C. baileyi* 18S rRNA 基因片段);N. 阴性对照

Fig. 1 Detection of *Cryptosporidium* 18S rRNA PCR amplification products

M, DL2000 Marker;I. 18S rRNA gene fragment of *Cryptosporidium* isolate from long-noded pit viper; P. Positive control (18S rRNA gene fragment of *C. baileyi*); N. Negative control

2.2 蛇源隐孢子虫分离株 18S rRNA 基因序列的同源性分析

PCR 产物的测序结果表明,获得了长约 840 bp 的 18S rRNA 基因片段。序列比对分析显示,该分离株与先前报道的 *C. serpentis* 18S rRNA 基因序列(AF151376)仅有 2 个碱基的差异,分别是 265 bp 位置的 A→G 及 388 bp 位置上 T→C 的变异。同源性分析表明,该蛇源隐孢子虫分离株与 *C. serpentis* (AF151376)的同源性最高,为 99.8%;与另一个蛇基因型(Snake genotype, AY120913)的同源性为 93.8%。

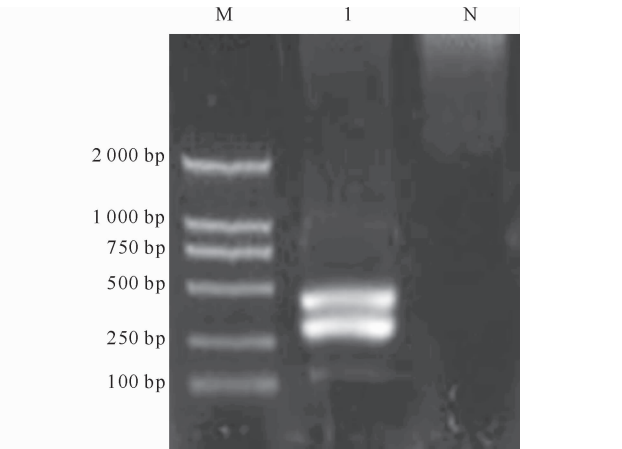


图 2 蛇源隐孢子虫 18S rRNA 基因 PCR 产物的 *Ssp* I 酶切结果

M, DL2000 Marker;I. 五步蛇源隐孢子虫分离株;N. 阴性对照

Fig. 2 Result of PCR product of *Cryptosporidium* 18S rRNA gene digested by *Ssp* I enzyme

M, DL2000 Marker;I. *Cryptosporidium* isolate from long-noded pit viper;N. Negative control

2.3 基于 18S rRNA 基因序列的种系发育分析

用邻接法(NJ 法)构建的种系发育进化树见图 3。由图 3 可见,隐孢子虫形成了 2 个主要的群:一群为肠道寄生隐孢子虫,包括 *C. baileyi* (AF093495)、*C. bovis* (AY741305)、*C. canis* (AB210854)、*C. varanii* (AF112573)、*C. meleagridis* (AF180339)、*C. suis* (AF108861)、*C. hominis* (AF093492)、*C. parvum* (AF093493)、*C. wrairi* (AF115378)、Snake genotype (AY120913);另一群包括先前已知的胃寄生隐孢子虫 tortoise genotype (AY120914)、*C. muris* (AY642591)、*C. andersoni*

(AB089285)、*C. serpentis* (AF151376) 和本研究分离的蛇源隐孢子虫分离株。其中本研究得到的五步蛇源隐孢子虫分离株与 *C. serpentis* 处于同一进化

分支上,而且与 *C. serpentis* 最接近,节点支持值达到 100%。

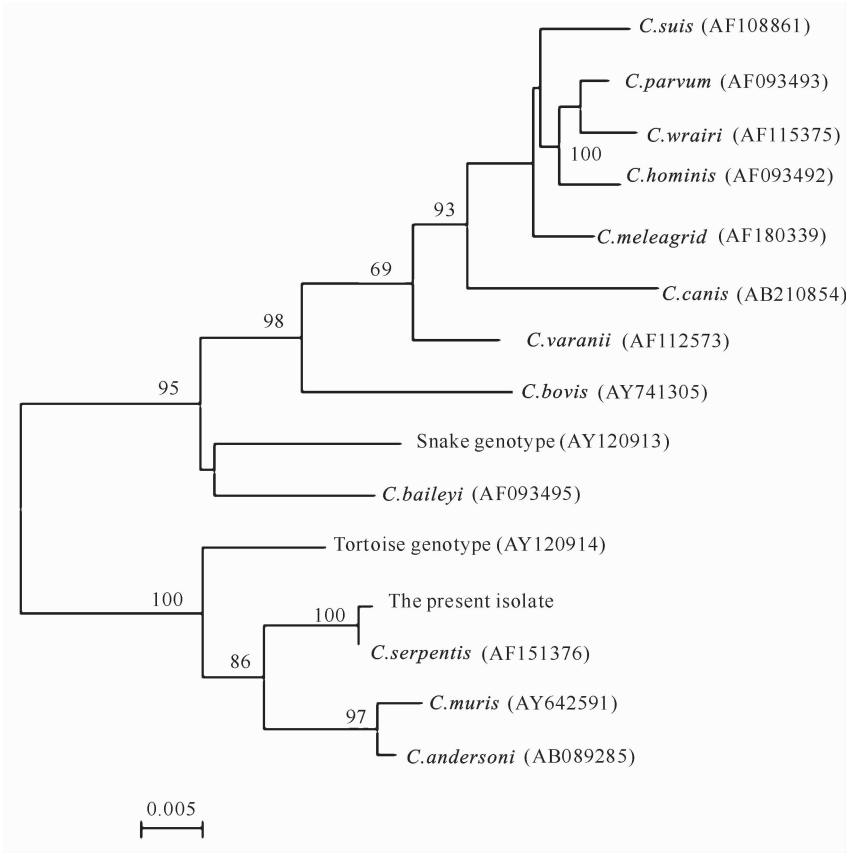


图 3 基于邻接法构建的隐孢子虫 18S rRNA 基因核苷酸序列的种系发育进化树

Fig. 3 Evolutionary relationships among *Cryptosporidium* parasites inferred by neighbour-joining analysis using Kimura 2-parameter model of 18S rRNA nucleotide sequences

3 讨 论

目前,小亚基核糖体 RNA(18S rRNA)基因作为分型工具已被广泛应用于人、动物和水源性隐孢子虫的基因分型,特别是基于 18S rRNA 基因的 PCR-RFLP 工具以及利用 *Ssp* I 和 *Vsp* I 限制性内切酶进行酶切的分型方法^[9]最为常见。18S rRNA 基因之所以广泛应用于隐孢子虫基因分型,很大程度上缘于该基因的多拷贝特性及其存在的半保守和高变区域,适合于设计属特异性引物。本研究依据 Xiao 等^[9]报道的特异性引物对隐孢子虫阳性样品 DNA 进行 18S rRNA 基因扩增,获得了长约 840 bp 的目的片段,经 *Ssp* I 酶切消化之后发现,2 个主片段大小与文献报道的 *C. serpentis* 的酶切结果一致^[4]。另外,测序获得的 18S rRNA 基因序列与 *C. serpentis*(AF151376)仅有 2 个碱基的差异,同源性达到 99.8%,高于与 *C. parvum* 和 *C. hominis* 之

间 99.3%的同源性以及与 *C. muris* 和 *C. andersoni* 之间 99.5%的同源性。同时,从种系发育关系图中也可以看出,本研究中的分离株和 *C. serpentis* 处于同一进化分支,节点支持值达 100%。以上数据均表明,本研究分离自五步蛇的隐孢子虫分离株为 *C. serpentis*。

1980 年,Levine 根据蛇体内隐孢子虫引起高度萎缩性胃炎的病理特征,命名了一个新种即蛇隐孢子虫(*C. serpentis*),但一直是无效学名,直到 1990 年 Tilley 等^[10]提供了详细的形态学和生物学资料之后才被大家所接受。1999 年,Kimbell 等^[11]首次报道了捕获的一野生玉米蛇源 *C. serpentis* 的遗传特征。截止目前,*C. serpentis* 除了感染至少 18 种蛇外,还发现于其他 10 多种爬行动物中,包括草原巨蜥、豹纹壁虎、沙漠巨蜥、尼罗巨蜥、石龙子、褶边蜥蜴、巨人马达加斯加变色龙、鬃狮蜥、石像鬼壁虎、山变色龙等^[1]。本研究结果表明,五步蛇

(*D. acutus*)也可以感染 *C. serpentis*,说明五步蛇是 *C. serpentis* 的又一个自然感染宿主。

蛇类可以感染多个隐孢子虫种类或基因型。除了 2 个常见的隐孢子虫种类 *C. serpentis* 和 *C. varanii* 外,还发现了 *C. muris*、鼠基因型和 2 个隐孢子虫新基因型^[4]。其中 *C. muris* 为人兽共患种类,暗示蛇类可以作为人兽共患隐孢子虫的贮藏宿主。因此,研究蛇源隐孢子虫具有重要的意义。本研究在国内首次报道了蛇源隐孢子虫的分子特征,并将其鉴定为 *C. serpentis*,丰富了爬行动物隐孢子虫的分子流行病学数据。然而,尚需要大量的研究来进一步阐明蛇隐孢子虫的感染情况、种类分布和传播动力学等。

[参考文献]

[1] Graczyk T K. Fish, amphibians, and reptiles [C]//Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 2008; 387-394.

[2] Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium* [J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124: 90-97.

[3] 王荣军,茹宝瑞,张龙现,等.爬行动物隐孢子虫的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2007,23(2):180-183.

Wang R J, Ru B R, Zhang L X, et al. Advance on the *Cryptosporidium* in reptiles [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2007, 23(2): 180-183. (in Chinese)

[4] Xiao L, Ryan U M, Graczyk T K, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 891-899.

[5] Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora L M, Carrión B A, et al. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 160(3/4): 204-210.

[6] Traversa D, Iorio R, Otranto D, et al. *Cryptosporidium* from tortoises: Genetic characterisation, phylogeny and zoonotic implications [J]. *Mol Cell Probes*, 2008, 22(2): 122-128.

[7] Brownstein D G, Strandberg J D, Montali R J, et al. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis [J]. *Vet Pathol*, 1977, 14: 606-617.

[8] 党海亮,何国声,张龙现,等.上海地区爬行类及两栖类动物隐孢子虫感染调查[J].中国人兽共患病学报,2008,24(2):179-181.

Dang H L, He G S, Zhang L X, et al. Investigation on the prevalence of *Cryptosporidium* in reptiles and amphibians in Shanghai [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, 24(2): 179-181. (in Chinese)

[9] Xiao L, Morgan U M, Limor J, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3386-3391.

[10] Tilley M, Upton S J, Freed P S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa; Cryptosporidiidae) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 1990, 21: 463-467.

[11] Kimbell L M III, Miller D L, Chavez W, et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(12): 5345-5349.

(上接第 19 页)

[9] 何冉娅,孙伟,罗玉均,等.猪圆环病毒 2 型感染对小鼠脾脏中 *IFN-γ* 基因表达的影响[J].中国畜牧兽医,2009,36(2): 75-77.

He R Y, Sun W, Luo Y J. The Effects of PCV2 experimental infection on gene expression of *IFN-γ* of murine splenic [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 36(2): 75-77. (in Chinese)

[10] Darwich L, Pie S, Rovira A, et al. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2117-2125.

[11] Sipoš W, Duvigneau J C, Willheim M, et al. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 99(1/2): 63-71.

[12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 463-471.

Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning laboratory manual* [M]. 3rd ed. Huang P T, Translation. Beijing: Science press, 2002: 463-471. (in Chinese)

[13] Rowland R R R, Robinson B, Stefanick J, et al. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(3): 539-555.

[14] Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mouse MX2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus [J]. *Virology*, 1992, 187(2): 796-800.

[15] Lindenmann J, Lane C A, Hobson D. The resistance of A2G mice to myxoviruses [J]. *J Immunol*, 1963, 90: 942-951.

[16] Liang S L, Quirk D, Zhou A. RnaseL: Its biological roles and regulation [J]. *IUBMB Life*, 2006, 58(9): 508-514.