

# 枝睾阔盘吸虫凉山州分离株 *nad4* 基因部分序列测定与种系发育分析

郝桂英 易利 潘用清 何学谦

(西昌学院动物科学学院,四川西昌 615013)

**摘要** 为探究山羊源枝睾阔盘吸虫的种内遗传变异和系统发育关系,对采集自四川省凉山州的5个吸虫样品 *nad4* 基因部分序列进行PCR扩增、序列测定及分析,并构建种系发育树。测序结果显示,所测得的5个山羊源枝睾阔盘吸虫 *nad4* 基因部分序列长度均为789 bp,核苷酸同源性为99.5%~100.0%,共检测到4个单倍型、4个变异位点。系统发育树显示,5个山羊源枝睾阔盘吸虫凉山州分离株聚在同一小支上,未与胰阔盘吸虫聚类在一支上,能与其他吸虫相鉴别。本研究结果为枝睾阔盘吸虫的分子分类和种群遗传的进一步研究奠定了基础。

**关键词** 枝睾阔盘吸虫;山羊;*nad4* 基因;种系发育

中图分类号 S8-05 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2019)12-0200-02

## Sequence and Phylogenetic Analysis of *nad4* Gene of *Eurytrema cladorchis* Isolated from Liangshan

HAO Gui-ying YI Li PAN Yong-qing HE Xue-qian

(School of Animal Science of Xichang College, Xichang Sichuan 615013)

**Abstract** In order to study the genetic variations of *Eurytrema cladorchis* and the phylogenetic relationships with other flukes, fragment of *nad4* gene of 5 flukes isolated from Liangshan Prefecture in Sichuan Province were amplified by PCR, then analyzed the sequences, and the NJ tree was reconstructed. The results showed that the partial sequences of *nad4* gene were 789 bp, with homology was 99.5%~100.0%, four haplotypes were detected in these sequences, with 4 variable sites. The phylogenetic tree showed that the isolates of *E. cladorchis* from goats in Liangshan were clustered in the same clade, which were not cluster together with *E. pancreaticum*, can be identified with other flukes. The results of this study could provide the foundation for further research on the molecular classification and population genetics of *E. cladorchis*.

**Key words** *Eurytrema cladorchis*; goat; *nad4* gene; phylogenetic

枝睾阔盘吸虫(*Eurytrema cladorchis*)隶属于吸虫纲(Trematoda)复殖目(Digenea)双腔科(Dicrocoeliidae)阔盘属(*Eurytrema*)<sup>[1]</sup>,在牛、羊等反刍动物胰腺胰管内均有寄生,但不如胰阔盘吸虫(*E. pancreaticum*)、腔阔盘吸虫(*E. coelomaticum*)常见<sup>[2]</sup>。阔盘属吸虫致病力低,常常在尸体剖检或屠宰时发现。然而,它能导致动物生产性能降低,如体重减轻、产肉量减少,甚至死亡,给养殖业造成一定经济损失<sup>[3]</sup>。

对枝睾阔盘吸虫的初步鉴定可通过观察其形态学特征进行,但受环境、宿主等多种因素的影响,其可靠性、准确性受到一定的限制。DNA技术已被广泛应用于寄生虫的分类学研究,其中的DNA序列分析因操作简便、结果准确、信息丰富等成为种系发生学和分类学的重要研究工具之一<sup>[4]</sup>。

*nad4* 基因是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位4基因的简称,是线粒体上进化速率较快的一个基因,利用它作遗传标记基因对寄生绦虫和线虫进行种群遗传和分类研究已有报道<sup>[5-6]</sup>。但目前关于枝睾阔盘吸虫分子分类的研究较少,仅见Mohanta等<sup>[7]</sup>对孟加拉共和国瘤牛源枝睾阔盘吸虫的18S rRNA和ITS2进行了研究,未见*nad4*基因用于枝睾阔盘吸虫分子鉴别的报道。

鉴于此,本研究对采自四川省凉山彝族自治州的5个山羊枝睾阔盘吸虫样品*nad4*基因部分序列(*pnad4*)进行PCR扩增和序列分析,并构建枝睾阔盘吸虫与其他吸虫的种系发育关系,从而明确*nad4*基因能否成为枝睾阔盘吸虫理想的遗传标记,以期今后枝睾阔盘吸虫的分子分类、种群遗传结构研究奠定基础。

**基金项目** 攀西动物疫病检测与防控四川省高校重点实验室基本科研业务费项目(341B);西昌学院博士科研启动基金项目(15BZ04);四川省教育厅基金项目(16ZA0267)。

**作者简介** 郝桂英(1980-),女,四川荣县人,博士,副教授,从事动物寄生虫病防治研究工作。

**收稿日期** 2019-02-28

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 供试仪器。**电子天平(型号为FA2204N),购自瑞安市安特称重设备有限公司;高速离心机(型号为TDL-60B),购自上海安亭科学仪器厂;梯度基因扩增仪,购自德国Eppendorf公司;水平电泳仪(型号为DYY-6C),购自北京市六一仪器厂;BIO-RAD Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(型号为1708195),购自美国伯乐公司。

**1.1.2 供试试剂。**蛋白酶K购自Merck公司,2×Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker、GreenView核酸染料、柱式DNA胶回收试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 虫体的采集及保存。**从四川省凉山彝族自治州自然感染的5只山羊胰管内采集枝睾阔盘吸虫样品,用灭菌生理盐水清洗干净,进行形态学鉴定后,分别编号为LS01~LS05,于-20℃条件下保存备用。同一只山羊分离出的枝睾阔盘吸虫为1个分离株。

**1.2.2 枝睾阔盘吸虫虫体总DNA提取。**从冷冻保存的5个山羊枝睾阔盘吸虫样品中分别随机取出1条,用剪刀剪碎并研磨,加入1 μg/μL SDS裂解液和10 μg/μL蛋白酶K,放入56℃水浴锅中消化过夜,然后将消化好的虫体悬液用酚/氯仿法<sup>[8]</sup>提取虫体总DNA,保存于-20℃条件下备用。

**1.2.3 枝睾阔盘吸虫*nad4*基因扩增及序列测定。**用Chang等<sup>[9]</sup>报道的引物进行枝睾阔盘吸虫*nad4*基因部分序列的扩增。由上海杰李生物技术有限公司合成引物序列,引物序列如下:*nad4P*<sub>1</sub>为5'-GTT TTG ATG TTT TTA TGA GT-3';*nad4P*<sub>2</sub>为5'-CTA ATA TGA CGA ACC AGG AA-3'。PCR扩增体系为50 μL:2×Taq PCR Master Mix 25 μL,引物*nad4P*<sub>1</sub>、*nad4P*<sub>2</sub>(10 pmol/μL)各2 μL,模板DNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 19 μL。同时,以ddH<sub>2</sub>O作空白对照。扩增条件:94℃预变性5 min;

94 °C 变性 40 s, 45 °C 复性 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 6 min。反应结束后分别取 5 μL PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统检测目的条带的大小。各 PCR 扩增产物经柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收纯化后送上海杰李生物技术有限公司测序。

**1.2.4 序列分析及系统进化分析。**检索 GenBank 收录的部分吸虫的 *nad4* 基因序列并下载(表 1), 然后用 Clustal X 1.81 软件进行序列比对, MEGA 5.0 软件分析碱基组成, 基于 p-

distance 模型计算遗传距离; 用 DNASTAR 中的 MegAlign 程序进行序列同源性分析; 用 DnaSP 4.0 软件计算单倍型数(haplotypes, *H*)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, *Pi*)、单倍型多样性(Haplotypes diversity, *Hd*)和平均核苷酸差异(average number of nucleotide differences, *K*)。以猪带绦虫(*Taenia solium*, AB086256)作为系统发育分析的外群, 采用 p-distance 模型, 用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 树, 并进行重复 1 000 次的自举检验(bootstrap test)。

**表 1 部分吸虫的 *nad4* 基因序列信息**

种名	宿主	样品采集地	GenBank 登陆号	来源
胰阔盘吸虫( <i>E. pancreaticum</i> )	肉牛	黑龙江	KP241855	Chang et al <sup>[9]</sup> , 2016
矛形双腔吸虫( <i>Dicrocoelium dendriticum</i> )	山羊	中国	KF318787	Liu et al <sup>[10]</sup> , 2014
中华双腔吸虫( <i>Dicrocoelium chinensis</i> )	牦牛	中国	KF318786	Liu et al <sup>[10]</sup> , 2014
华支睾吸虫( <i>Clonorchis sinensis</i> )	-	韩国	JF729304	Cai et al <sup>[11]</sup> , 2012
大片吸虫( <i>Fasciola gigantica</i> )	水牛	中国	KF543342	Liu et al <sup>[12]</sup> , 2014
鹿前后盘吸虫( <i>Paramphistomum cervi</i> )	-	-	KT198987	未发表

**2 结果与分析**

**2.1 枝睾阔盘吸虫 *nad4* 基因部分序列的特征和同源性比较**

比对校正剔除多余序列后, 本研究测得的 5 个枝睾阔盘吸虫凉山州分离株的 *nad4* 基因部分序列长度均为 789 bp (占全长的 61.7%), A+T 碱基的平均含量为 61.4%。5 个测序序列均不存在碱基插入/缺失, 其中保守位点 785 个, 变异位点 4 个(简约信息位点、单变异位点各 2 个)。核苷酸变异位点主要发生在密码子第 1 位(占 50%), 第 2 位和第 3 位各占 25%, 且全为转换(3 个 A-G、1 个 C-T), 无颠换。

5 个枝睾阔盘吸虫凉山州分离株测序序列的同源性为 99.5%~100.0%, 碱基变异率为 0~0.5%。5 个测序序列与胰阔盘吸虫的同源性为 85.8%~85.9%, 与矛形双腔吸虫、中华双腔吸虫、华支睾吸虫、大片吸虫、鹿前后盘吸虫的同源性均低于 70%。

**2.2 遗传多样性分析**

5 个山羊源枝睾阔盘吸虫的 *nad4* 基因部分序列共检测到 4 个单倍型, 遗传距离为 0~0.005(平均遗传距离为 0.003), 与胰阔盘吸虫的遗传距离为 0.402~0.406, 与矛形双腔吸虫、中华双腔吸虫、华支睾吸虫、大片吸虫、鹿前后盘吸虫的遗传距离均 ≥ 0.493。5 个测序序列总的单倍型多样性(*Hd*)和核苷酸多样性(*Pi*)分别为 0.900 和 0.002 53, 平均核苷酸差异(*K*)为 2.000。

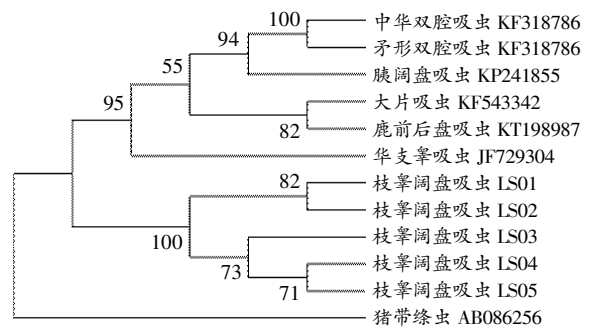
**2.3 系统发育分析**

基于 *nad4* 基因部分序列构建的 NJ 树(图 1)显示, 5 个山羊源枝睾阔盘吸虫凉山州分离株单独聚为一支, 未与胰阔盘吸虫聚在一支上, 而胰阔盘吸虫与中华双腔吸虫和矛形双腔吸虫聚类在同一小支上, 与形态学分类的结果不一致。

**3 结论与讨论**

目前, 对胰阔盘吸虫和腔阔盘吸虫的研究主要集中在虫体形态结构、发育过程及阔盘吸虫病的感染情况调查、诊断和综合防治等传统寄生虫学方面, 分子水平的研究较少。

用于胰阔盘吸虫和腔阔盘吸虫分子分类的靶分子主要有 18S rRNA<sup>[13-15]</sup>、ITS-2<sup>[15]</sup>, 虽然已有胰阔盘吸虫线粒体基因组全序列的报道<sup>[9]</sup>, 但并未见基于线粒体基因对胰阔盘吸虫、腔阔盘吸虫、枝睾阔盘吸虫等进行分析的报道。



注: 分支上标注的数字表示支持率。

**图 1 基于 *nad4* 基因部分序列采用 NJ 法构建的枝睾阔盘吸虫系统发育树**

本研究对测序获得的 5 个山羊源枝睾阔盘吸虫凉山州分离株的 *nad4* 基因部分序列进行分析, 发现其核苷酸同源性为 99.5%~100.0%, 平均遗传距离为 0.003, 构建的进化树显示枝睾阔盘吸虫凉山州样品位于同一分支, 与其他吸虫得到了很好地鉴别。

本研究对采集自凉山州山羊源的枝睾阔盘吸虫 *nad4* 基因的部分序列进行扩增和序列分析, 结果表明, 枝睾阔盘吸虫的 *nad4* 基因部分序列种内相对保守, 种间差异加大, 说明 *nad4* 序列片段可作为枝睾阔盘吸虫种间鉴定及种内遗传变异研究的标记。研究结果为进一步研究枝睾阔盘吸虫的分子分类、遗传变异奠定了基础。

**4 参考文献**

[1] 杨光友. 兽医寄生虫病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 73-76.  
 [2] 赵辉元. 人兽共患寄生虫病学[M]. 长春: 东北朝鲜民族教育出版社, 1998: 236.  
 [3] IHA M R, LORETTI A P, REIS A. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the State of Paraná, southern Brazil[J]. Vet Parasitol, 2005, 133(1): 49-60.  
 [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] 郝桂英. 猪囊尾蚴西昌分离株线粒体 *Cytb* 和 *nad4* 基因的序列测定与种系发育分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(5): 59-63.  
 [6] 王燕, 杨言川, 张悦文, 等. 羊毛线虫线粒体 *nad4* 基因的序列变异分析[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4): 81-84.

(下转第 208 页)

- 品工业科技, 2009(4): 315-318.
- [7] 田华, 王莉. 昆虫蛋白类功能成分研究进展[J]. 河南农业科学, 2011, 40(4): 22-26.
- [8] 杨金兰, 阎杰. 昆虫蛋白开发利用的研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(2): 114-116.
- [9] 姬玉娇, 孔祥峰, 印遇龙. 昆虫营养价值及其在畜禽养殖中的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2012(增刊1): 220-223.
- [10] WU Y L, XIA L J, LI J Y, et al. CecropinXJ inhibits the proliferation of human gastric cancer BGC823 cells and induces cell death in vitro and in vivo[J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(5): 2181-2193.
- [11] JIN X, MEI H, LI X, et al. Apoptosis-inducing activity of the antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and the possible mechanism[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2010, 42(4): 259-265.
- [12] XIA L, WU Y, KANG S, et al. CecropinXJ, a silkworm antimicrobial peptide, induces cytoskeleton disruption in esophageal carcinoma cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2014, 46(10): 867-876.
- [13] IWASAKI T, ISHIBASHI J, TANAKA H, et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface[J]. Peptides, 2009, 30(4): 660-668.
- [14] RODRIGUES E G, DOBROFF A S, CAVARSAN C F, et al. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin[J]. Neoplasia, 2008, 10(1): 61-68.
- [15] KIM I W, LEE J H, KWON Y N, et al. Anticancer activity of a synthetic peptide derived from harmoniasin, an antibacterial peptide from the ladybug *Harmonia axyridis*[J]. International Journal of Oncology, 2013, 43(2): 622-628.
- [16] HILCHIE A L, SHARON A J, HANEY E F, et al. Mastoparan is a membrane-active anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1858(12): 3195-3204.
- [17] DE AZEVEDO R A, FIGUEIREDO C R, FERREIRA A K, et al. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo[J]. Peptides, 2015, 68: 113-119.
- [18] RAGHURAMAN H, CHATTOPADHYAY A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions[J]. Biosci Rep, 2007, 27(4/5): 189-223.
- [19] 王龙, 冯群, 高嘉敏, 等. 昆虫抗菌肽分类及在医学中应用[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(6): 1387-1396.
- [20] AI H, WANG F, ZHANG N, et al. Antiviral, immunomodulatory, and free radical scavenging activities of a protein-enriched fraction from the larvae of the housefly, *Musca domestica*[J]. Journal of Insect Science (Online), 2013, 13: 112.
- [21] AMIR G, RUBINSKY B, HOROWITZ L, et al. Prolonged 24-hour subzero preservation of heterotopically transplanted rat hearts using antifreeze proteins derived from arctic fish[J]. The Annals of thoracic surgery, 2004, 77(5): 1648-1655.

(上接第201页)

- [7] MOHANTA U K, ICHIKAWA-SEKI M, HAYASHI K, et al. Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh[J]. Parasitol Res, 2015, 114(6): 2099-2105.
- [8] SAMBROOK J, RUSSEL D W. Molecular cloning. A laboratory manual [M]. 3rd ed. New York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 463-470.
- [9] CHANG Q C, LIU G H, GAO J F, et al. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genome from the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae)[J]. Gene, 2016, 576(1): 160-165.
- [10] LIU G H, YAN H B, OTRANTO D, et al. *Dicrocoelium chinensis* and *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda: Digenea) are distinct lancet fluke species based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2014, 79(1): 325-331.
- [11] CAI X Q, LIU G H, SONG H Q, et al. Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda)[J]. Parasitol Res, 110(1): 235-243.
- [12] LIU G H, GASSER R B, YOUNG N D, et al. Complete mitochondrial genomes of the 'intermediate form' of *Fasciola* and *Fasciola gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*[J]. Parasit Vectors, 2014, 7(1): 150.
- [13] 郑亚东, 骆学农, 施程洪, 等. 腔阔盘吸虫 18S rRNA 及亲缘关系分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(5): 345-358.
- [14] ZHENG Y, LUO X, JING Z, et al. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelmaticum* and *Eurytrema pancreaticum*[J]. Parasitol Res, 2007, 100(3): 645-646.
- [15] 常巧呈, 郑旭, 段红, 等. 基于核糖体 18S 和 ITS2 序列探讨胰阔盘吸虫的分子进化地位[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(4): 50-53.

(上接第202页)

能提高产量和质量, 小蚕期做好超前扩座和匀座, 选择优质桑叶饲养, 注意温度控制, 调节好蚕室内的温度, 保证小蚕发育一致、体质强健; 做好蚕室的消毒及防病工作, 小蚕出现感染后会在大蚕 5 龄期发病, 应加强小蚕的防感染措施, 要按季节选择抗病性和抗逆性强的品种, 给桑要均匀、新鲜, 坚持换鞋、洗手、踏灰后进入蚕室, 早晚进行蚕座消毒, 避免蚕病发生影响产量。三是做好大蚕管理。大蚕期的桑叶供应是关键, 为保其质量, 应做到稀松放养, 良桑饱食; 确保蚕室的通风换气, 做好蚕室及周围的消毒, 避免蚕病。四是实行多批次养蚕。积极开展分批次养蚕, 如春蚕 2 批、夏蚕 1 批、秋蚕 3 批的多批次模式。分批养蚕可以提高设备设施的利用率, 减轻劳动强度, 提高劳动效率, 实现养蚕的高效益。五是加强桑园管理。大规模养蚕需要大量桑叶支持, 应做好桑树的培植和管理, 以提供优质的桑叶, 保证蚕的质量。首先, 要做到桑园的沟系配套, 确保桑树能得到及时灌溉, 涝季能及时排水。其次, 合理施用有机复合肥, 注意氮、磷、钾合理搭配, 实行科学施肥, 切忌盲目增肥; 夏伐后可以利用秸秆还田, 改善土壤有机质含量, 提高桑树质量; 尽量进行人工除草, 慎用化学药剂除草, 防止土壤板结和影响桑

树质量。再次, 春蚕二眠前完成桑树摘心, 以提高桑叶成熟度, 保证其质量。最后, 做好桑树防虫治虫, 严格按照科学配药, 统一浓度、统一时间进行喷洒。

### 3 结语

综上所述, 实现山区的规模化和省力化养蚕, 要结合当地的养蚕生产现状, 制定适宜的养蚕技术标准, 同时加大小蚕共育的设施和养蚕机械机具的投入应用, 村委会应加大宣传力度, 推广及完善小蚕共育、条桑育等技术, 促进蚕业生产实现省力化及规模化。养蚕过程中要注意蚕病的预防和防治, 做好日常清洁及消毒工作, 切断病源, 防止相互感染, 降低其发病的损失率。另外, 可优选蚕种, 保证桑叶质量, 增强蚕体质, 提高其抵抗力, 以保证产量和质量, 实现经济效益最大化<sup>[4-9]</sup>。

### 4 参考文献

- [1] 杜占军, 陈凤林, 郭天凯, 等. 论开展炸蚕省力化放养新技术研究的必要性[J]. 北方蚕业, 2017, 38(2): 52-54.
- [2] 刘德馨. 沂蒙山区桑蚕业发展调研分析[J]. 乡村科技, 2017(24): 29-30.
- [3] 刘慧. 山区栽桑养蚕的技术措施分析[J]. 农技服务, 2017, 34(9): 146.
- [4] 王宗才. 浅析山区栽桑养蚕的技术措施[J]. 云南农业科技, 2016(5): 27-30.
- [5] 周咏梅. 农村养蚕常见问题及改进措施[J]. 农民致富之友, 2018(22): 39.