

文章编号: 1000-5471(2007)05-0086-05

肝片形吸虫种类鉴定 PCR 方法的建立^①

罗洪林¹, 钟晓艳¹, 汤忠进², 胡晓峰¹, 聂奎¹

1. 西南大学 动物科技学院, 重庆 400715; 2. 柳州林业管理所, 广西 柳州 545007

摘要: 为了建立一种快速鉴定肝片吸虫种类的特异 PCR 方法, 以肝片形吸虫基因组 DNA 为模板, 以前后盘吸虫, 胰阔盘吸虫, 日本分体吸虫, 牛弓首蛔虫、大片吸虫 gDNA 为对照, 用肝片形吸虫特异性引物 ITS-1、ITS-2 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察; 用核酸蛋白测定仪测定肝片形吸虫 gDNA 的浓度, 然后将 gDNA 原液进行不同倍数的稀释, 筛选最佳条件, 进行敏感性检测。结果显示只有肝片吸虫样品有特异性条带, 对照样品均呈阴性; 可以检测到的最低 DNA 浓度分别为 1.17 ng/ μ L、0.59 ng/ μ L。

关键词: 肝片吸虫; PCR; 鉴定

中图分类号: S852.73⁺5

文献标识码: A

片形吸虫是牛羊最主要寄生虫病的病原之一, 我国报道的片形吸虫病原主要有两个种: 肝片形吸虫 (*F. hepatica*) 和大片形吸虫 (*F. gigantica*)。世界寄生虫学者们普遍认为^[1-5], 肝片吸虫的虫体后端较尖, 呈“V”型, 体长一般在 3 cm 以下, 具有明显的肩, 虫体的长宽比约为 2, 肠道分支少, 内分支更少且短, 睾丸占体长的比一般为 2/3, 虫卵长度为 150 μ m 以下, 30 $^{\circ}$ C 孵化毛蚴需 9~10 d。相反, 大片吸虫的虫体后端较钝, 呈“U”型, 体长一般在 3 cm 以上, 没有明显的肩, 虫体的长宽比大于 3, 肠道分支多, 且复杂并有内分支, 睾丸占体长的比一般为 1/2。从这些特点可以看出, 如果虫体的形态比较规则, 运用传统的形态学方法还是能比较准确的鉴别鉴定出片形吸虫^[6]。但由于两种片形吸虫形态极其相似, 而且片形吸虫种内个体差异较大, 同一虫种又因宿主的种类、宿主的反应的不同而不同, 导致虫体的形态极其不规则, 这就使得利用传统的形态学方法对识别一些亲缘种及隐藏种有一些难度, 也迫使研究人员不得不另辟途径。随着分子生物学的发展, 聚合酶链反应 (PCR)、rDNA 的酶切图谱比较、核酸限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 及 DNA 序列分析等技术已广泛应用于寄生虫的分类研究中。大量资料证实核糖体 DNA 基因的内转录间隔区 (ITS-1、ITS-2) 是区分种群和研究种系之间关系的最适宜进化速率的基因, 因此被广泛应用^[7]。为此本研究通过 PCR 方法扩增出肝片吸虫的 ITS 基因片段, 分析其鉴定肝片吸虫的特异性与敏感性, 以初步建立肝片吸虫的特异 PCR 鉴定方法, 为重庆地区片型吸虫的种类鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 虫体样本

肝片吸虫, 前后盘吸虫, 胰阔盘吸虫, 日本分体吸虫, 牛弓首蛔虫, 大片吸虫由广西大学黄维义教授馈赠。

1.2 主要试剂及仪器

PCR 试剂 (Buffer、MgCl₂、dNTPs、TaqDNA 聚合酶等): 上海生工产品; 蛋白酶 K: 上海生工产品 (#

① 收稿日期: 2006-11-30

作者简介: 罗洪林 (1977-), 男, 重庆北碚人, 硕士, 主要从事寄生虫分子生物学与免疫学的研究。

通讯作者: 聂奎, 博士, 教授。

E4012); 琼脂糖: 上海 YITO 有限公司产品(200233); DL-2000 DNA Marker: 北京赛百盛公司产品(0603D); Goldview 核酸染料: 北京赛百盛公司产品(20051229); 其他试剂均为国产分析纯级产品. 主要溶液均参照《分子克隆》配制^[8].

主要仪器: PCR 仪: Biometra 公司; SW-CJ-2FD 超净工作台: 苏净公司生产; TGL-16G 台式高速离心机: 上海菲恰尔分析仪器有限公司; 2F-1 型紫外分析仪: 江苏海门其林贝乐公司; 琼脂糖凝胶电泳系统: 北京六一仪器厂; 核酸紫外分光光度计: 美国 GeneQuant 公司; 凝胶图像分析系统: 英国 UVITEC 公司.

1.3 引物合成

采用 GeneBank 登录公布的肝片吸虫 ITS-1 和 ITS-2 基因利用 DNASTAR 和 Olig6.0 设计引物, 肝片吸虫的 ITS-1 序列全长为 245 bp, ITS-2 序列全长为 362 bp. 肝片吸虫 ITS-1 的特异性引物: 上游引物为 5'-CTCATTGAGGTCACAGCAT-3' 下游引物为 5'-CAATGGCAAAGAATGGCAAG-3' 肝片吸虫 ITS-2 的特异性引物: 上游引物为 5'-ATATTGCGCCATGGGTAG-3' 下游引物为 5'-CCAATGACAAAGTGACAGCG-3'

1.4 肝片形吸虫 gDNA 的制备

将单个虫体先用 PBS 液反复冲洗, 再用双蒸水冲洗 2 到 3 次, 剪碎后研磨, 取研磨好的浆液于高压灭菌的 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 裂解液, 混匀, 置于水浴锅中, 37 $^{\circ}$ C 作用 24~48 h, 其间不断振摇使虫体裂解充分. 虫体消化后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一离心管中(记录其体积). 然后加等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 轻轻摇匀, 分层后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中(记录其体积). 加等体积氯仿, 轻轻摇匀, 分层后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中(记录其体积). 加入 1/10 体积 3 mol/l NaAc 及 2 倍体积无水乙醇, 混匀后, 12 000 r/min 离心 5 min 弃去上清, 留取沉淀(此沉淀为 DNA). 向沉淀中加入 70% 乙醇洗涤 1~2 次后, 每次洗涤后均需离心 5 min, 自然干燥(勿完全干燥). 加入 1 \times TE 液 30~50 μ L(视 DNA 多少而定)溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用.

1.5 分光光度计测定 DNA 的浓度

用 TE 溶液将待测 DNA 样品做 1: 50 或更高倍数的稀释. 用 TE 溶液作为空白, 在波长为 260 nm 及 280 nm 处调节分光光度计读数至零. 加入 DNA 稀释液于两波长处读取 OD 值. 记录 OD 值, 确定 DNA 浓度.

1.6 PCR 扩增 ITS 基因

25 μ L 反应体系: 在 0.2 mL Eppendorf 管中依次加入 2.5 μ L 10 \times Buffer、2 μ L dNTPs(25 mM)、正反向引物各 0.5 μ L(100 pmol/ μ L)、模板 DNA 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, 用灭菌双蒸水加至总体积为 25 μ L, 混匀, 于 PCR 扩增仪进行扩增; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 30 次后, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 每次反应均设置空白对照, 扩增产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.7 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

配制 1.0% 的琼脂糖凝胶, 按终浓度 0.05 μ L/mL 加入 Goldview 核酸染料, 取 5 μ L PCR 产物加样, 以 DL 2000 Marker 作对照, 80~100 V 恒定电压电泳 30 min 后, 在紫外透射仪下观察, 并于凝胶成像系统成像, 保存并记录结果.

1.8 PCR 条件的优化

固定退火温度, 以不同浓度梯度的氯化镁浓度(2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mM)进行扩增, 确定最适氯化镁浓度; 固定氯化镁浓度, 以不同的退火温度进行扩增, 确定最佳退火温度.

1.9 特异性和敏感性检测

以宿主为牛或羊的前后盘吸虫、胰阔盘吸虫、日本分体吸虫、牛弓首蛔虫、大片吸虫作为对照样品, 按照肝片形吸虫的 gDNA 制备方法(参见 1.4)抽提以上样品的 gDNA, 用肝片吸虫的特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 再经紫外透射仪观察, 并记录结果; 用核酸蛋白测定仪测定肝片形吸虫 gDNA 的浓度, 然后将 gDNA 原液稀释成 1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 5000、1: 8000、1: 10000、1: 20000 七个稀释度. 各稀释度的 DNA 含量见表 1, 分别取各稀释度的模板 DNA 1.5 μ L, 根据筛

选的最佳条件,用特异性引物做 PCR 扩增,确定可以检测到的最低 DNA 浓度.

2 结果

2.1 PCR 条件的优化

首先优化肝片吸虫的 PCR 扩增条件,先调整 $MgCl_2$ 的浓度, $MgCl_2$ 的浓度梯度为 2.5 mM、3.0 mM、3.5 mM、4.0 mM、4.5 mM. 琼脂糖凝胶电泳发现 $MgCl_2$ 在 3.0 mM(ITS-1)、3.5 mM(ITS-2)时,肝片吸虫条带清楚,无非特异性条带产生.再调整退火温度.当 $MgCl_2$ 的浓度

为 3.0 mM 时,温度梯度为 50 °C、51 °C、53 °C、55 °C,琼脂糖凝胶电泳发现肝片吸虫 ITS-1 所扩增的条带在 51 °C 时最为明亮,且没有非特异性条带出现,因此固定 51 °C 作为最佳退火温度;当 $MgCl_2$ 的浓度为 3.5 mM 时,温度梯度为 50 °C、51 °C、53 °C、55 °C,琼脂糖凝胶电泳发现标准肝片吸虫 ITS-2 所扩增的条带在 53 °C 时最为明亮,且没有非特异性条带出现,因此固定 53 °C 作为最佳退火温度.最后确定扩增肝片吸虫 ITS-1 的最佳 $MgCl_2$ 浓度为 3.0 mM,最佳退火温度为 51 °C;ITS-2 的最佳 $MgCl_2$ 浓度为 3.5 mM,最佳退火温度为 53 °C.

2.2 特异性检测结果

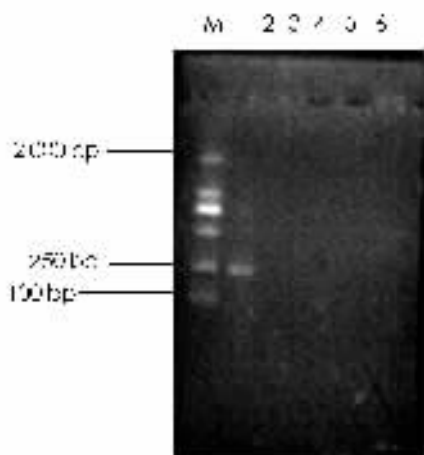
以肝片吸虫的 gDNA 为模板,用肝片吸虫的两对特异性引物分别进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,发现用肝片吸虫均能扩增出明亮的特异性条带,片段大小约为:ITS-1, 250 bp;ITS-2, 360 bp,而对照样品均呈阴性(图 1、2).

2.3 敏感性检测结果

用核酸蛋白测定仪测定肝片形吸虫 gDNA 的浓度,然后将 gDNA 原液进行不同倍数的稀释,分别取各稀释度的模板 DNA 1.5 μ L,根据筛选的最佳条件,分别用肝片吸虫特异性引物 ITS-1、ITS-2 做 PCR 扩增,确定可以检测到的最低 DNA 浓度分别为 1.17 ng/ μ L、0.59 ng/ μ L,(图 3、4).

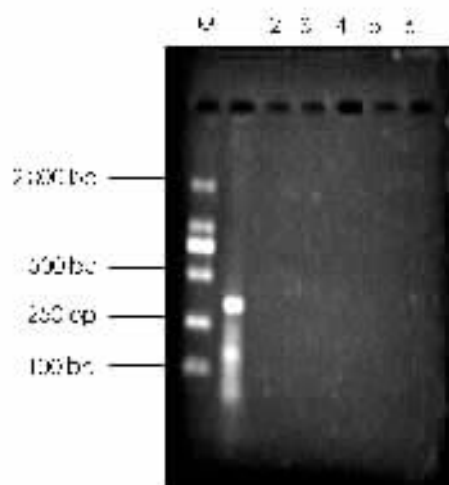
表 1 标准肝片形吸虫 DNA 梯度浓度稀释表

DNA 稀释度	肝片吸虫 DNA 含量/ng · μ L ⁻¹
DNA 原液	5873
1 : 500	11.75
1 : 1000	5.87
1 : 2000	2.94
1 : 5000	1.17
1 : 8000	0.73
1 : 10000	0.59
1 : 20000	0.29



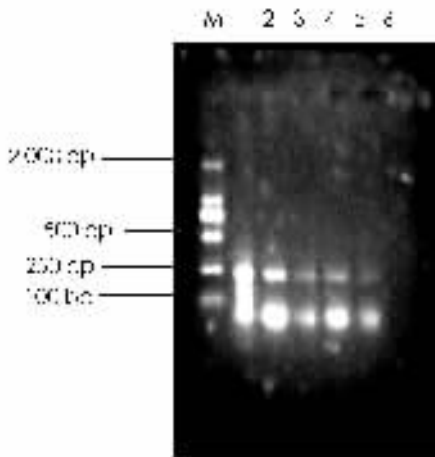
M. Marker(DL2000);1. 肝片吸虫;2. 前后盘吸虫;
3. 胰阔盘吸虫;4. 日本分体吸;5. 牛弓首蛔虫;6. 大片吸虫

图 1 肝片吸虫和对照样品经肝片吸虫特异性引物 ITS-1 扩增的结果



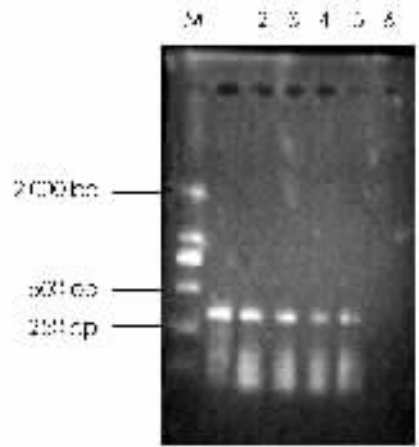
M. Marker(DL2000);1. 肝片吸虫;2. 前后盘吸虫;
3. 胰阔盘吸虫;4. 日本分体吸;5. 牛弓首蛔虫;6. 大片吸虫

图 2 肝片吸虫和对照样品经肝片吸虫特异性引物 ITS-2 扩增的结果



M: Marker(DL2000); 1. 5.873 ng/ μ L; 2. 11.75 ng/ μ L;
3. 5.87 ng/ μ L; 4. 2.94 ng/ μ L; 5. 1.17 ng/ μ L; 6. 0.59 ng/ μ L

图 3 肝片吸虫用肝片吸虫特异性
引物 ITS-1 扩增的敏感性试验



M: Marker(DL2000); 1. 5.873 ng/ μ L; 2. 5.87 ng/ μ L;
3. 1.17 ng/ μ L; 4. 0.73 ng/ μ L; 5. 0.59 ng/ μ L; 6. 0.29 ng/ μ L

图 4 肝片吸虫用肝片吸虫特异性
引物 ITS-2 扩增的敏感性试验

3 讨论与分析

由于聚合酶抑制剂、环境及操作过程的污染、不适宜的反应条件影响反应灵敏度, 导致假阴性或假阳性结果等原因, 因此利用 PCR 方法建立的鉴定体系, 必须在对影响 PCR 反应的各个因素进行优化, 筛选出最佳反应体系, 从而达到提升 PCR 鉴定方法敏感性和特异性的目的. 此次试验表明: DNA 模板含量、纯度、引物设计、脱氧核苷三磷酸(dNTP)、DNA 聚合酶以及 PCR 扩增条件对扩增的影响不大. 相反, Mg^{2+} 浓度和退火温度是影响 PCR 结果的主要因素, 直接影响到 PCR 成功与否. 在不同的引物-模板系统中, 最适合的 Mg^{2+} 也不相同, Mg^{2+} 浓度过高或过低都可能使扩增效果较差甚至出现假阴性. 而退火温度升高, 可以防止非特异性扩增现象, 但同时退火效率下降; 退火温度降低, 可以提高退火效率, 但会增加非特异性扩增. 所以本次试验主要从 Mg^{2+} 浓度和退火温度来优化反应条件, 确定特异引物所能扩增理想模板量的最佳反应条件, 这对简化操作程序具有重要意义. 本试验最终确定 ITS-1 的最佳 $MgCl_2$ 浓度为 3.0 mM, 最佳退火温度为 51 $^{\circ}C$; ITS-2 的最佳 $MgCl_2$ 浓度为 3.5 mM, 最佳退火温度为 53 $^{\circ}C$, 这与董世娟等^[8]报道的有差异, 分析其原因, 可能与虫体的地域不同所致的基因组的微小差异或者是所采用的生化试剂的生产厂家和试剂的种类的差异有关, 也可能与本试验的系统试验条件与试验环境有关.

本次试验建立的肝片形吸虫 PCR 方法特异性很强, 对照组前后盘吸虫、胰阔盘吸虫、日本分体吸虫、牛弓首蛔虫、大片吸虫未见有扩增条带, 而只有肝片吸虫样品才出现明亮的特异性条带, 且与目的片段大小一致, 片段大小约为: ITS-1, 245 bp; ITS-2, 362 bp, 这与黄维义等^[9]报道的基本一致. 此外, 本次试验用 Goldview 核酸染料替代高度致癌物质溴化乙锭, 大大减少了可能因溴化乙锭带来的对人体的危害, 提高了试验的安全性, 试验操作简单方便. 同时该 PCR 方法敏感性较强, 肝片吸虫特异性引物 ITS-1、ITS-2 能检测到的最低 DNA 量分别为 1.17 ng/ μ L、0.59 ng/ μ L; 而广西大学董世娟^[8]检测到的最低 DNA 浓度为 0.35 ng/ μ L. 由于所选引物的不同及所抽提到的 DNA 浓度、纯度的影响, 而且实验所用试剂也有所差别, 使两者存在一定的差异, 但相差不大.

本试验所建立的 PCR 方法克服了传统方法的一些弱点, 具有特异性强, 敏感性高, 稳定性强, 简便, 快速的优点, 对于片形吸虫虫种的分类、鉴定、遗传变异研究、防治都具有重要的意义. 虽然 ITS 基因片段可以作为遗传标记来区分大片形吸虫和肝片形吸虫, 但大量资料证实^[9,10]我国除了此 2 种片形吸虫外, 还可能存在介于肝片吸虫与大片吸虫的“中间型”的片形吸虫. 所以只用肝片吸虫核糖 DNA 基因的内转录间隔区 PCR 扩增方法对于肝片吸虫和中间型的区别鉴定就略显乏力. 因此, 目前, 此方法应结合传统的形态

学鉴定及 PCR 扩增大片吸虫的 ITS 基因序列以明确区分肝片吸虫及“中间型”;但如果能找到另一种更稳定、更特异的分子标记用于“中间型”的鉴定的话,或许会有不同的发现,这将是本实验室希望开展的研究。

参考文献:

- [1] Bowles J, Blair D, McManus D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54: 165 – 174.
- [2] Marcilla A, Bargues M D, Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16: 327 – 333.
- [3] Hashimoto K, Watanobe T, Liu C X, et al. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola hepatica* is *Fasciola gigantica* [J]. *Parasitol Res*, 1997, 83: 220 – 225.
- [4] Itagaki T, Tsutsumi K I, Sakamoto T, et al. Characterization of Genetic Divergence Among Species with in the Genus *Fasciola* by PCR-SSCP [J]. *Jpn. J. Parasitol*, 1995, 44(3) : 244 – 247.
- [5] Mar P H, Yang I C, Chang G N, et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2) [J]. *Veterinary Parasitology*, 2002, 106(3): 243 – 252.
- [6] 杨维平. 人体片形吸虫病的流行与防治 [J]. *医学综述*. 2005, 11(11): 1007 – 1009.
- [7] 沈永林, 胥全彬, 张洪英. 片形吸虫种类鉴定的分子生物学研究进展 [J]. *动物医学进展*. 2002, 23(3): 15 – 18.
- [8] 莎姆布鲁克. J. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂译. 北京:科学出版社, 2002.
- [9] 董世娟. 我国片形吸虫核糖体 DNA 及线粒体 DNA 多态性的研究 [M]. 广西大学出版社, 2005, 25(4): 37 – 38.
- [10] 黄维义, 何波. 酶切图谱及序列分析虫体 ITS2 鉴别中国的片形吸虫 [J]. *动物科学与动物医学*. 2002, 19(10): 2 – 6.

Establishment of Specific PCR Assays to Identify the *F. hepatica*

LUO Hong-lin, ZHONG Xiao-yan,
TANG Zhong-jin, HU Xiao-feng, NIE Kui

1. School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Forestry Administration Bureau, Liuzhou, Guangxi 545007, China

Abstract: Aim to establish a specific PCR assays for the identification of *Fasciola*. Methods: two species-specific primers were designed according to the ITS-1 and ITS-2 sequence. The specificity and sensitivity of these assays were evaluated. Results: the specificity test indicated that there was no amplification from genomic DNAs of other parasites commonly found in ruminants, such as *Paramphistomum* spp., *Eurytrema pancreaticum*, *Schistosoma japonicum* and *Neoascaris vitulorum*. And the sensitivity PCR assays show that DNA concentration of detection for *F. hepatica* was 1.17 ng/ μ L, 0.59 ng/ μ L respectively. Conclusion ITS-1 and ITS-2 sequences provided genetic makers for the identification and studying of genetic variation in *Fasciola* from Chongqing of mainland China.

Key words: *F. hepatica*; PCR; identification

责任编辑 夏娟