

树鼩鞭毛虫的形态学观察及其 18S rRNA 基因分析

陈玲霞,尹博文,李振宇,孙晓梅,代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

【摘要】 目的 对树鼩体内的鞭毛虫进行形态学观察及基因分析鉴定。**方法** 取树鼩回盲部内容物和粪便经过滤离心处理直接涂片和碘液染色镜检,传统方法提取虫体总 DNA,PCR 扩增该鞭毛虫的 18S rRNA,测序后经 BLAST 进行同源性分析,并应用 MEGA5.1 绘制系统发育进化树。**结果** 形态学观察表明树鼩体内的鞭毛虫为三毛滴虫;测序分析表明树鼩鞭毛虫序列 18S rRNA 与已报道的胎儿三毛滴虫 18S rRNA (AY754332.1) 同源性高达 99%。**结论** 树鼩体内可感染胎儿三毛滴虫,研究结果为树鼩的寄生虫学质量控制提供依据。

【关键词】 鞭毛虫;树鼩;形态观察;18S rRNA

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.002

Morphological observation and analysis of its 18S rRNA gene of flagellate in tree shrews

CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, LI Zhen-yu, SUN Xiao-mei, DAI Jie-jie

(Chinese Academy of Medical Sciences / Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Center of Tree shrews Germplasm Resource, Yunnan Key Laboratory of major infectious diseases vaccine development, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective Morphological observation and gene analysis identification to the strain of flagellate in tree shrews. **Methods** The tree shrews ileocecal contents and feces by filtering centrifugal were observed microscopically direct smear and iodine staining, the total DNA extracted by the traditional method, the 18S rRNA of flagellate was amplified by PCR, then sequenced. Taking homology analysis by the BLAST, and developing the phylogenetic tree using MEGA5.1. **Results** Morphological observation showed that flagellate in tree shrews was tritrichomonas. Sequencing analysis indicated that homology of 18s ribosomal RNA between tree shrews giardia and the reported tritrichomonas fetus 18S ribosomal RNA (AY754332.1) was as high as 99%. **Conclusion** Tree shrews can affect tritrichomonas fetus and the results provide the basis for parasitology quality control of tree shrews.

【Key words】 Flagellate; Tree shrews; Morphological observation; 18S rRNA

树鼩,属攀鼩目树鼩科的小型哺乳动物,与非人灵长类动物最为近似,分布于东南亚地区以及我国的云南、广西和海南等地^[1]。树鼩具有体型小、繁殖周期短、操作简便和研究成本低等优点,且全

基因组研究发现它的代谢、神经及免疫系统与人类有着较为高度的同源性^[2],这使得树鼩在实验动物的地位越来越高。建立饲养繁殖、质量控制、微生物和寄生虫等级及检测标准是实现树鼩实验动物

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01);云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 陈玲霞(1992 -),女,硕士,研究方向:实验动物质量标准化研究,E-mail: 1071508954@qq.com。

[通讯作者] 代解杰,男,研究员,项目负责人,E-mail: dj@imbcams.com.cn。

化的重要的基础性工作^[3]。国际上 GPC^[4]对树鼩肠道鞭毛虫做过感染率的调查与形态观察,但并没有进行分子生物学方法的鉴定。实验室前期对树鼩体内蠕虫感染率进行了调查^[5],种类不多但感染率高。目前对树鼩体内感染鞭毛虫鲜有报道,所以本次对树鼩鞭毛虫的研究调查有一定的意义。本研究采用形态学结合分子生物学方法^[6-7]对该鞭毛虫进行鉴定,为树鼩进行生物净化及制定树鼩寄生虫等级检测标准提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1. 随机采集树鼩种质资源中心饲养的普通级成年树鼩 10 只的回盲部内容物和成年树鼩 130 只的粪便。实验动物来源于医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)2013-0001】。实验操作在医学生物学研究所树鼩种质资源中心实验设施进行【SYXK(滇)2013-0001】。

1.2 实验设备和试剂

Eclipse 50i Nikon 显微镜,TP600 梯度 PCR 仪,NC320 电泳仪,Universal Hood II 凝胶成像系统,CT15RE 低温离心机,载玻片。

PBS(购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司),10% 甲醛(购自重庆川东化工),碘液,Buffer TE(购自 AXYGEn),10% SDS,蛋白酶 K(购自 TIANGEN),平衡酚(购自北京索莱宝科技有限公司),氯仿(购自西陇化工),异戊醇(购自西陇化工),无水乙醇(购自西陇化工),PCR 扩增试剂盒 R011(购自大连宝生物)

1.3 方法

1.3.1 直接涂片观察

用无菌采样棒取树鼩米粒大小粪便置于载玻片,滴 1 滴 PBS,低倍镜观察。

1.3.2 碘液染色观察

取树鼩回盲部内容物,加入 1 mL PBS 制成混悬液,800 r/min 离心 3 min,取上清置于干净的 dorf 管,2500 r/min 离心 5 min,倒掉上清,加入 1 mL PBS 重悬。将处理后的悬液涂片,滴 1 滴 10% 甲醛固定,盖上盖玻片,碘液染色 1 min,40 倍镜下观察。

1.3.3 DNA 提取

1、处理后的回盲内容物加入 376 μ L TE buffer,再加入 20 μ L 10% SDS 和 4 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀,56℃ 2 h;

2、冷却至室温,加入等体积 400 μ L 的平衡酚,缓慢来回颠倒 10 min,混合为乳浊液 11200 r/min 离心 10 min;

3、取上清至干净的 dorf 管中,重复步骤 2;

4、取上清至干净的 dorf 管中,加等体积氯仿:异戊醇(24:1),缓慢来回颠倒 10 min,混为乳浊液,11200 r/min 离心 10 min;

5、取上清至干净的 dorf 管中,与两倍体积的冰乙醇混匀,11200 r/min 离心 10 min;

6、弃上清,用 75% 冰乙醇洗涤两次,11200 r/min 离心 1 min,倒掉上清,自然风干沉淀;

7、加入 50 μ L 的 TE, -20℃ 保存备用。

1.3.4 16S rRNA 基因扩增与序列分析

根据 NCBI 已发表的胎儿三毛滴虫 18 S rRNA 基因序列设计引物:上游引物 P1: 5'-GCTCGTAGTCAGAACTGC -3'; 下游引物 P2: 5'-CCCAATTAGAACTCTATCTC -3' (引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司设计并合成)。PCR 反应体系(25 μ L): dNTP 2 μ L, buffer 2.5 μ L, 上、下游引物各 0.2 μ L, 模板 1 μ L, 水 19 μ L。扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。

1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 120V, 20 min, 检测 PCR 产物片段大小。将 PCR 产物冰冻包装邮寄至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

登陆 NCBI, BLAST 进行核酸同源性比较, 应用 MEGA5.1 软件将测得序列与已报道的毛滴虫 18S rRNA 基因进行对比分析并绘制系统发育进化树。

2 结果

2.1 鞭毛虫感染及形态观察

直接涂片镜下观察粪便中的鞭毛虫, 共采新鲜粪便 130 份, 其中 129 份粪便中有游动活泼的鞭毛虫, 仅 1 份粪便镜下没有检出鞭毛虫, 感染率为 99.2%。

光学显微镜 200 倍下观察树鼩粪便涂片(彩插 4 图 1), 镜下可见大量活泼的蝌蚪形以转圈方式游动的虫体。经 10% 甲醛固定后进行碘液染色, 置于光学显微镜油镜(彩插 4 图 2)下观察虫体可见 3 根前鞭毛, 不同生长阶段的虫体前鞭毛数目 2~4 不等。测量虫体长度平均为 10 μ m, 宽度平均为 4 μ m, 前鞭毛长度平均为 5 μ m。1000 倍镜下观察可见由前上向后下呈波浪状运动的波动膜, 证实了

该滴虫以鞭毛转圈的方式游动。

2.2 基因测序结果与序列分析

应用所设计的引物体外扩增 18S rRNA, 扩增出的片段约为 646 bp, 与预期的扩增片段相符。

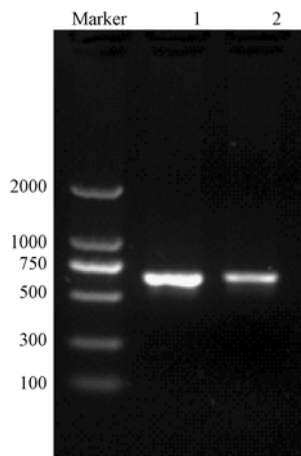


图3 树鼩三毛滴虫 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果
(1、2 为样品)

Fig.3 Identification of PCR-amplified tritrichomonas with 18S rRNA gene in tree shrews (1, 2 sample)

18S rRNA 基因的测序结果:

TGCTCGTAAGTTAGAACTGCCTGCAAAGGCGT
ACGAACTTCTGTTTCGTTTC50
ACTGTGAACAAATCAGGACGCTTAGTGTATGG
TTTTAGGAATGACTTAGC100
GCAGTATGATATCTTTACCTTTGGTAAGATCAA
TGAGAGCCACCGGGGGT150
AGATCTATTTTCATGGCGAACGGTGGAATGTTTT
GACCCATGAGAGAGAAA200
CGAAGGCGAAAGCATCTACCTAGAGGGTTTCT

GTCGATCAAGGGCGAGAG250

TAGGAGTATCCAACCGGATCAGAGACCCGGGT
AGTTCTACCTTAAACGA300

TGCCGACAGGGGCTTGTCTTTTCATGAGGGCA
GGACCTTAGGAGAAATCA350

TAGTTCTTGGGCTCTGGGGGAACACGACCGC
AAGGCTGAAACTTGAAGG400

AATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGC
TTGTGGCTTAATTTGAATC450

AACACGGGGAAACTTACCAGGACCAGATGTTT
TTAATGACTGACAGGCTT500

CGGGTCTTTCAGGATATGACTTTTGGTGGTGCA
TGGCCGTTGGTGCTGCG550

TGGGTTGACCTGTCAAGCGTTGATTACAGATAA
CGAGCGAGATTATCGCCA600

ATTAAATACTCGTTTCTGTTTACAGAGATAGAG
TCTTAATTTGGGA646

以上基因序列通过 NCBI BLAST 进行核酸同源性比较, 结果与已报道的胎儿三毛滴虫的核酸序列 (AY754332.1) 具有高度同源性, 同源性为 99%。与胎儿三毛滴虫序列比较, 在该滴虫上述序列第 9 位为插入碱基 A、第 12 位碱基 T-C 转换、第 39 位碱基 T-A 颠换、第 323 位碱基 C-T 转换、第 635 位碱基 C-T 转换、第 636 位碱基 T-C 转换、第 642 位碱基 T-G 颠换。

测得序列使用 MEGA5.10 软件与已报道的相关毛滴虫 18S rRNA 基因对比分析绘制系统发育进化树, 结果表明树鼩三毛滴虫 18S rRNA 基因与已报道的胎儿三毛滴虫 18S rRNA (AY754332.1) 位于同一进化分支, 与其他相关毛滴虫亲缘关系较远。

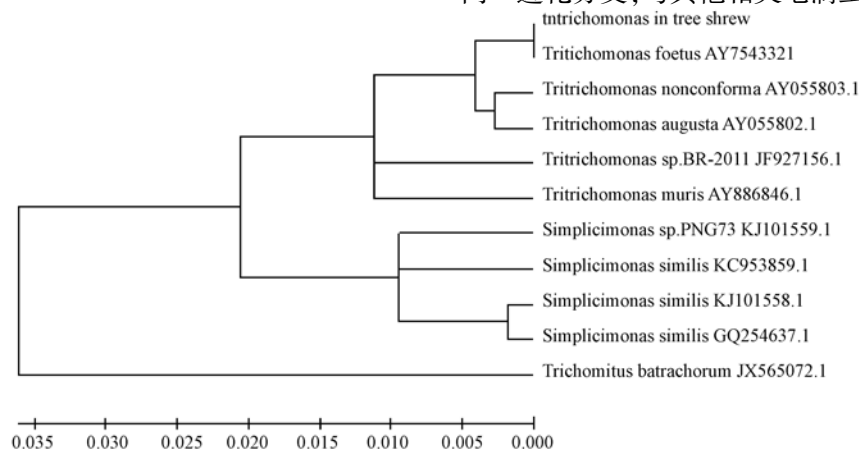


图4 树鼩三毛滴虫与已报道毛滴虫 18S rRNA 的系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene of tritrichomonas in tree shrews and the referenced tritrichomonas

3 讨论

胎儿三毛滴虫是导致牛生殖器疾病的一种寄生虫,寄生于公牛生殖器或其精液传播于母牛,可引起不育、流产或子宫积脓,危害性大^[8]。已报道在急性呼吸窘迫综合症病人的呼吸道和腹泻猫、犬的肠道检测分离到胎儿三毛滴虫^[9-11]。我们观察到树鼩的鞭毛虫分布于回肠末端、回盲端及结肠近端,这与已报道的树鼩鞭毛虫分布区域一致^[4]。本研究中在一只肺部感染致死的树鼩的十二指肠、空肠、回肠、回盲端及结肠等消化道都检测发现数目不等的鞭毛虫,这提示鞭毛虫的寄生部位的扩散可能跟树鼩其它疾病的感染、免疫力低下等有一定的关联。

我们对树鼩的粪便直接涂片观察发现,其高度感染鞭毛虫(129/130 份),且无明显病症。这与德国灵长类中心发现该鞭毛虫不侵入基底膜、不引起树鼩机体的免疫反应且无致病性的结果一致^[4]。此外,研究过程中发现颜色呈胆汁色的粘状粪便中鞭毛虫数量明显高于正常灰棕色粪便的鞭毛虫数量,由此推测重度感染鞭毛虫可能会引起树鼩轻度腹泻,这与腹泻猫、犬分离出胎儿三毛滴虫的结果一致^[10-11],但该鞭毛虫直接或间接导致腹泻的原因还需要深入地研究查证。野生树鼩高度感染鞭毛虫,与树鼩在野外栖息环境和其杂食性的饮食习惯密切相关;而驯养树鼩高度感染鞭毛虫,与其饲养环境的卫生相关。被树鼩自身粪便污染的水盒,鞭毛虫通过粪口传播途径感染与其共同生活的成年树鼩或者幼年树鼩。因此,对于每批从野外引进的树鼩,在隔离期应进行抗寄生虫药物驱虫,保障饮水和食物符合卫生标准的前提下,水盒换成滴水式水瓶以防止外源物的污染,切断经水源的粪口传播途径。

本次从树鼩体内观察到的鞭毛虫,虫体呈蝌蚪状,有 2~4 根前鞭毛和 1 根后鞭毛,波动膜和肋发育良好,经形态学观察参照《实验大鼠、小鼠肠道鞭毛虫检索表》^[12],属于三毛滴虫属。形态学观察不同虫体的长度、形状和前鞭毛数目不同,2~4 根前鞭毛不等,3 根居多,该形态与 GPC^[4]只观察到 3 根前鞭毛有所不同,猜测这可能与该鞭毛虫的生长阶段有关。有个别虫体甚至无鞭毛,镜下只见波动膜的虫体部分,只依靠波动膜来运动。

通过对 18S rRNA 序列分析,表明该鞭毛虫与

胎儿三毛滴虫(AY754332.1)高度同源,其碱基转换频率^[13]是颠换频率的 2 倍,其中转换碱基主要发生在 T 与 C 之间,颠换发生在 T 与 A/G 之间,一次碱基插入。且寄生部位、致病性与胎儿三毛滴虫相似。根据 NCBI 提供的有限数据对树鼩核基因 18S rRNA 序列测定分析,初步判断树鼩所感染的鞭毛虫是鞭毛纲毛滴虫目毛滴虫科三毛滴虫属胎儿三毛滴虫,而与鼠三毛滴虫等其它报道的三毛滴虫亲缘关系较远。

参考文献:

- [1] 郑永唐,姚永刚,徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型[M]. 昆明:云南科技出版社,2014:4-14.
- [2] 徐林,张云,梁斌. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J]. 动物学研究,2013,34(2):59-69.
- [3] 沈培清,郑红,刘汝文. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究,2011,32(1):109-114.
- [4] Brack M, Kaup F J, Fuchs E. Intestinal trichomoniasis due to *Tritrichomonas mobilensis* in tree shrews (*Tupaia belangeri*) [J]. Laboratory Animal Science, 1995, 45(5):533-537.
- [5] 孙晓梅,全品芬,匡德宣. 野生树鼩肠道蠕虫感染调查及分析[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(2):15-17.
- [6] Kamaruddin M, Tokoro M, Rahman M M, et al. Molecular Characterization of Various Trichomonad Species Isolated from Humans and Related Mammals in Indonesia [J]. Korean Journal of Parasitology, 2014, 52(5):471-478.
- [7] 史深,姚刚,岳城. 鼠三毛滴虫新疆灰仓鼠分离株形态学观察及其 16S rRNA 基因分析[J]. 中国实验动物学报,2014,22(4):28-30.
- [8] 韩贞珍. 毛滴虫病引起牛低育的临床症状、诊断及防控[J]. 现代畜牧科技, 2015,1:108-108.
- [9] Duboucher C, Pierce RJ, Capron M, et al. Recent advances in pulmonary trichomonosis [J]. Trends in Parasitol, 2008, 24(5):201-202.
- [10] Gookin J L, Birkenheuer A J, St J V, et al. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea [J]. Journal of Parasitology, 2005, 91(4):939-943.
- [11] Yao C, K02ster L S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat [J]. Veterinary Research, 2015, 46(35):2-16.
- [12] 高诚,符杰,王胜昌. 实验大鼠、实验小鼠肠道鞭毛虫种类和检索[J]. 中国兽医寄生虫病,1999,6(3):142-145.
- [13] Rowan R G, Hunt J A. Rates of DNA change and phylogeny from the DNA sequences of the alcohol dehydrogenase gene for five closely related species of Hawaiian *Drosophila* [J]. Molecular Biology & Evolution, 1991, 8(1):49-70.

[修回日期]2015-09-18