

# 河南省猪等孢球虫的分子变异规律研究

刘光辉<sup>1</sup>, 程俊贞<sup>2</sup>, 宁长申<sup>3\*</sup> (1. 河南省动物疫病预防控制中心, 河南郑州 450008; 2. 许昌市动物疫病预防控制中心, 河南许昌 461000; 3. 河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002)

**摘要** [目的]掌握河南省猪等孢球虫的分子变异规律。[方法]从河南省豫东、豫南、豫西、豫北及豫中地区的部分规模化猪场采集粪便样品,进行猪球虫卵囊的分离与纯化;从分离到的8株猪球虫分离株中提取核酸并进行测序,并与猪等孢球虫扩增株基因序列及其他相关原虫基因序列进行比对。[结果]河南省不同地区的8个猪球虫株均为猪等孢球虫,并且没有明显遗传差异。*I. suis*与其他7种原虫差异较大,不属于同一个生物型,同一种动物所感染的不同种类原虫之间的同源性较低。[结论]该研究结果可为有效预防和控制仔猪球虫病提供科学依据。

**关键词** 猪等孢球虫;纯化;扩增;基因序列

**中图分类号** S858.28 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0093-03

## Study on the Molecular Variation Laws of *Isospora suis* in Henan Province

LIU Guang-hui<sup>1</sup>, CHENG Jun-zhen<sup>2</sup>, NING Chang-shen<sup>3\*</sup> (1. Henan Centre for Animal Diseases Control and Prevention, Zhengzhou, Henan 450008; 2. Center for Animal Diseases Control and Prevention in Xuchang City, Xuchang, Henan 461000; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract** [Objective] To master the molecular variation laws of *Isospora suis* in Henan Province. [Method] The pig manure samples were collected from some large-scale pig farms in eastern, western, southern, northern and central regions of Henan Province to isolate and purify porcine coccidian oocysts. 8 isolated strains of swine coccidiosis were used to extract nucleic acid and sequence. The gene sequence of *I. suis* were compared with that of other related protozoan. [Result] 8 swine coccidian strains from different regions of Henan Province were identified as *I. suis* and there was no obvious genetic differences. *I. suis* had greater differences with other 7 kinds of protozoan. *I. suis* and other 7 kinds of protozoan belonged to different biotypes. The homology of different kinds of protozoan infected in the same kinds of animals was lower. [Conclusion] The research results can provide scientific basis for effective prevention and control of piglet coccidiosis.

**Key words** *Isospora suis*; Purification; Amplification; Gene sequence

近年来,哺乳仔猪患球虫病是养猪场的常见问题之一,引起哺乳仔猪患球虫病的主要病原是猪等孢球虫<sup>[1-2]</sup>,主要发生在8~15日龄仔猪上,感染日龄越小,病情越严重。发病仔猪排出黄色至灰色粪便,开始时粪便松软或呈糊状,随着病情的加重,粪便变成液状,并散发出腐败乳汁样酸臭味;吮乳减少,被毛粗乱,脱水,体增重下降,从而导致新生仔猪死亡率增加,断奶时营养不良仔猪成为僵猪,给养猪生产造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。

为掌握河南省猪等孢球虫的分子变异规律,笔者从河南省豫中地区的漯河和许昌,豫南地区的南阳、信阳及驻马店,豫西地区的洛阳,豫北地区的鹤壁,豫东地区的周口等8个市的部分规模猪场进行采样,收集猪等孢球虫卵囊,并进行纯化。利用分子生物学方法对其18S rRNA基因进行PCR扩增,并对PCR扩增片段进行测序,然后利用DNASTAR、ClustalX、Paup、Phyplip等软件进行序列比对分析,构建分子基因树,分析河南省不同地区猪等孢球虫分离株的遗传特征,阐明猪等孢球虫病的分子变异规律,旨在为有效预防和控制仔猪球虫病提供科学依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂。**试验所用试剂有饱和糖-盐水溶液、DNA提取试剂盒等。

**1.1.2 仪器。**试验所用仪器有显微镜、PCR仪等。

**作者简介** 刘光辉(1975—),男,河南商水人,高级兽医师,硕士,从事动物疫病防控工作。\*通讯作者,研究员,硕士生导师,从事兽医寄生虫病研究。

**收稿日期** 2017-01-28

## 1.2 方法

**1.2.1 样品采集。**采用直肠取粪法,采集1~30日龄仔猪的粪样或刚排出的新鲜粪便50~100g,分别装入干净塑料袋中,标注猪场名称、编号以及猪的年龄,置于4℃冰箱内,备用。

**1.2.2 卵囊收集。**用饱和糖-盐水溶液漂浮法收集球虫卵囊<sup>[3-5]</sup>。在阳性粪样中加入4~5倍体积的水搅拌均匀,在装有80目和130目双层金属筛的漏斗中过滤,将滤液置于离心管中以3000 r/min的转速离心10 min,取出离心管,弃上清,再加入约50 mL的饱和糖-盐水溶液,用干净的玻璃棒搅拌均匀,再以3000 r/min的转速离心10 min,然后用专门收集卵囊用的铁丝圈网多次蘸取上层表面液在装有约100 mL自来水的烧杯中涮洗,即将卵囊收集到烧杯中,制成卵囊混悬液;最后,将卵囊混悬液以3000 r/min的转速离心10 min后取出离心管,弃去上清,即为球虫卵囊。

**1.2.3 卵囊的纯化。**取收集的卵囊液,采用饱和糖水溶液漂浮法和梯度离心法进行纯化。取收集的卵囊液置于10 mL离心管中,以2000 r/min的转速离心10 min后取出离心管,取上层(卵囊层)和上清液及中间层置于1个烧杯中,之后再加入等量的PBS工作液,混匀,备用。在10 mL离心管中先后加入3 mL饱和糖水溶液(饱和糖水溶液:自来水=1:1.2)、3 mL 1:2饱和糖水溶液(饱和糖水溶液:自来水=1:2)和3 mL上述卵囊液,以2000 r/min的转速离心10 min,取上面卵囊层和上清液置于1个烧杯中,此后再加入4倍量的PBS工作液,混匀后以4000 r/min的转速离心10 min,取沉淀即为浓集的卵囊,于-20℃下保存,备用。

### 1.2.4 PCR 扩增。

**1.2.4.1 猪等孢球虫 DNA 的提取。**取上述浓集的卵囊,加入约 5 mL 的 PBS 液,混匀后用超声波粉碎仪将猪等孢球虫卵囊打碎,以 16 000 r/min 的转速高速离心 30 min,弃上清,取沉淀,在沉淀物中加入 200  $\mu$ L 裂解液,振荡数次,混匀。5 次反复冻融(液氮中 5 min,37  $^{\circ}$ C 水浴中 5 min),然后按照 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 的提取。重溶 DNA 置于适量的缓冲液(pH 8.0)中,于 -20  $^{\circ}$ C 下保存。

**1.2.4.2 PCR 反应。**参照刘光辉等<sup>[6]</sup>PCR 扩增猪等孢球虫 18S rRNA 基因全序列的方法,PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 8 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,55  $^{\circ}$ C 1.5 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 37 个循环;最后延伸 72  $^{\circ}$ C,10 min。将反应液充分混匀,短暂离心后,置于 94  $^{\circ}$ C 预变性 8 min,再加入 5 U/ $\mu$ L TaKaRa Ex Taq 混匀,离心后将反应管置于 PCR 仪中按照相应程序进行热循环反应,结束后将样品置于 4  $^{\circ}$ C 下保存。

### 1.2.5 序列测定与分析。

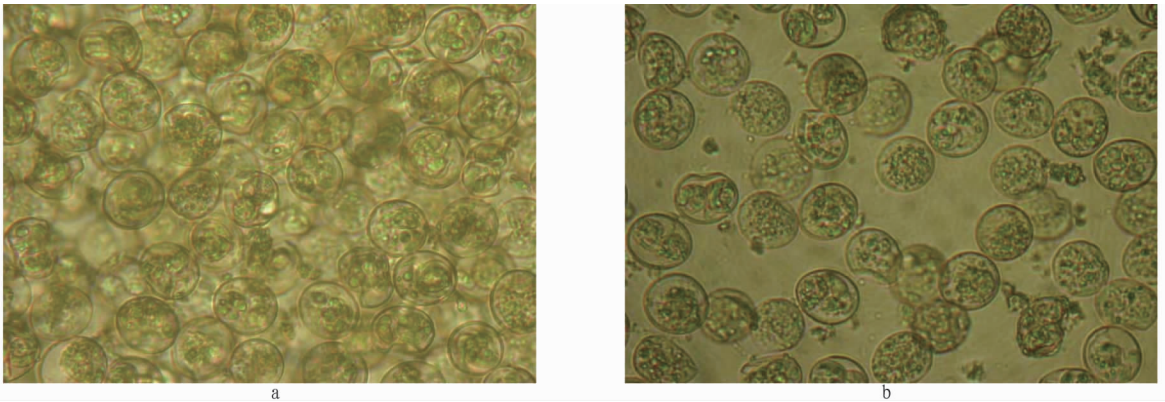
**1.2.5.1 PCR 产物测序。**PCR 产物及测序用引物直接送交宝生物工程(大连)有限公司测序。结合 GenBank 数据库上

登录的相关原虫序列,使用 DNASTAR 4.0 软件比较其同源性,经过 ClustalX 1.81 软件序列比对,使用 Paup 4.0、Treeview 3.0、Phylip 种系发育关系软件进行聚类分析,绘制基因树。

**1.2.5.2 PCR 产物序列及 GenBank 下载的其他原生动 18S rRNA 基因序列。**①猪等孢球虫扩增传代株(以下简称 KZ 株);②猪等孢球虫漯河地区分离株(以下简称 LH 株);③猪等孢球虫许昌地区分离株(以下简称 XC 株);④猪等孢球虫南阳地区分离株(以下简称 NY 株);⑤猪等孢球虫信阳地区分离株(以下简称 XY 株);⑥猪等孢球虫驻马店地区分离株(以下简称 ZMD 株);⑦猪等孢球虫洛阳地区分离株(以下简称 LY 株);⑧猪等孢球虫鹤壁地区分离株(以下简称 HB 株);⑨猪等孢球虫周口地区分离株(以下简称 ZK 株);⑩L76471 *I. felis*;⑪U97523 *I. suis*;⑫U94787 *I. belli*;⑬AF029303 *I. ohioensis*;⑭M97703 *T. gondii*;⑮AF080612 *I. rohini*;⑯AF108861 *C. pig*;⑰L16996 *C. parvum*。

## 2 结果与分析

**2.1 卵囊纯化结果** 经过 4~5 次纯化,在浓集的球虫卵囊液中仍含少量的微粒杂质,具体纯化效果如图 1 所示。



注:a.浓集的球虫卵囊液;b.5倍稀释后的球虫卵囊液

Note:a. concentrated oocyst fluid of *I. suis*;b. oocyst fluid of *I. suis* diluted by 5 times

图 1 纯化后的猪等孢球虫卵囊

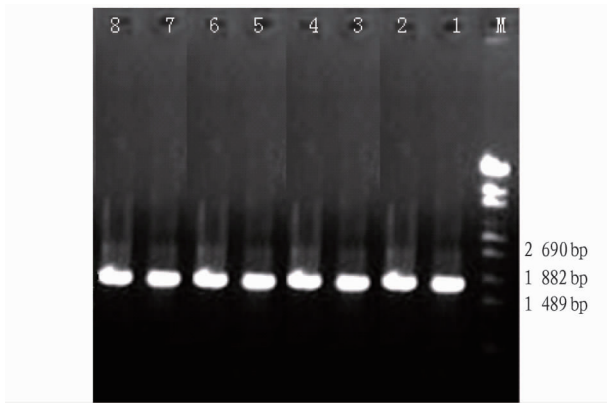
Fig.1 The oocyst of *I. suis* after purification

**2.2 不同地区猪等孢球虫分离株 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果** 对 PCR 扩增产物进行鉴定,发现 LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株和 ZK 株都能扩增出特异性 DNA 带,大小在 1 800 bp 左右(图 2),符合预期的目的条带大小。

**2.3 测序结果** 经过 PCR 扩增后,LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株和 ZK 株及 KZ 株的猪等孢球虫 18S rRNA 基因的 PCR 产物由宝生物工程(大连)有限公司进行测序,测序结果如下:①*I. suis* LH 株(测序编号为 ZZS340) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 720 bp;②*I. suis* XC 株(测序编号为 ZZS341) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 721 bp;③*I. suis* NY 株(测序编号为 ZZS342) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 723 bp;④*I. suis* XY 株(测序编号为 ZZS343) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 659 bp;⑤*I. suis* ZMD 株(测序编号为 ZZS344) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 710 bp;⑥*I. suis* LY 株(测序编号为 ZZS345) 18S rRNA 基因序列,测

序长度为 1 724 bp;⑦*I. suis* HB 株(测序编号为 ZZS346) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 727 bp;⑧*I. suis* ZK 株(测序编号为 ZZS347) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 708 bp;⑨*I. suis* KZ 株(测序编号为 ZZS348) 18S rRNA 基因序列,测序长度为 1 725 bp。

**2.4 序列比对结果** 试验测定 9 株猪等孢球虫序列,结合从 GenBank 下载的其他原生动 18S rRNA 基因序列,以 L16996(*C. parvum*)作为外群,用 DNASTAR 4.0 软件比较其同源性,经过 ClustalX 1.81 序列比对,使用 Paup 4.0、Treeview 3.0、Phylip 种系发育关系软件分析进行聚类分析,并构建基因树(图 3)。从图 3 可以看出,17 种原虫分别处在 3 个进化枝上。其中,KZ 株单独作为第 1 枝;*I. felis*、*I. suis*(下载)、*T. gondii*、*I. rohini*、*C. parvum*、*C. pig*、*I. belli*、*I. ohioensis* 形成第 2 枝,而 LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株和 ZK 株作为第 3 枝。第 3 枝,LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株和 ZK 株之间差异不显著,同源性较



注: M.  $\lambda$ -EcoT14 I; 1. LH 株; 2. XC 株; 3. NY 株; 4. XY 株; 5. ZMD 株; 6. LY 株; 7. HB 株; 8. ZK 株

Note: M.  $\lambda$ -EcoT14 I; 1. LH strain; 2. XC strain; 3. NY strain; 4. XY strain; 5. ZMD strain; 6. LY strain; 7. HB strain; 8. ZK strain

图 2 猪等孢球虫不同分离株 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of 18S rRNA gene from different isolated strains of *I. suis*

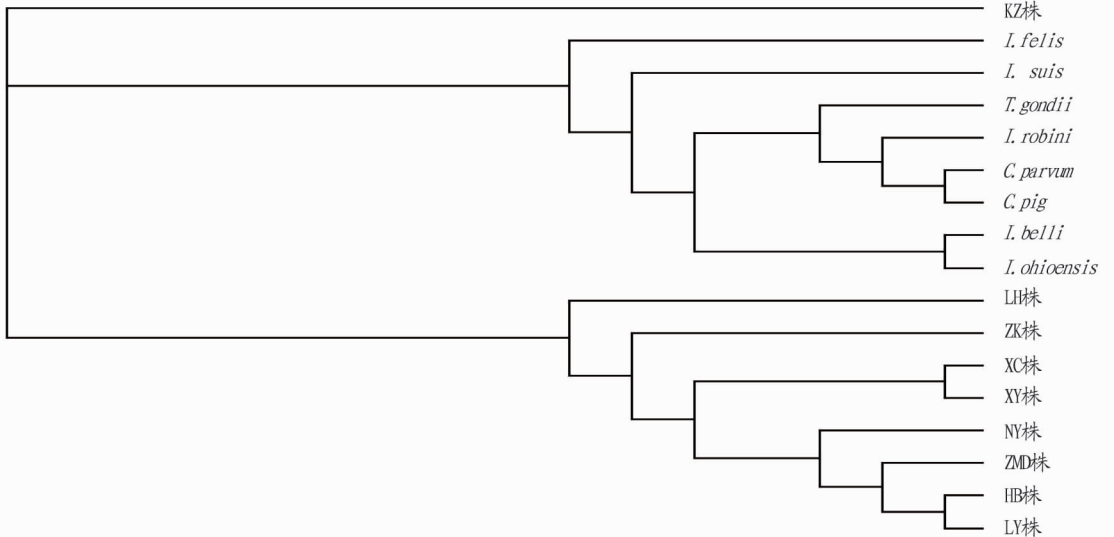


图 3 基于 18S rRNA 基因序列的 *Isospora suis* 和相近原虫的聚类分析结果

Fig. 3 The clustering results of 18S rRNA gene sequence between *Isospora suis* and other related protozoan

现 8 株猪等孢球虫 18S rRNA 基因序列之间的同源性较高, 为 99.7% ~ 100%, 说明河南省猪等孢球虫不同分离株之间不存在基因变异; 与 GenBank 上登录的 *I. suis* 18S rRNA 基因序列相比, 同源性为 96.3%, 说明所扩增的 18S rRNA 基因序列符合预期目的要求。 *I. suis* 与其他 7 种原虫之间差异较大, 同源性较低, 为 79.6% ~ 85.2%, 说明 *I. suis* 与其他 7 种原虫不属于同一个生物型, 证实同一种动物所感染的不同种类原虫之间的同源性较低。

#### 参考文献

[1] 蓝荣庚. 猪等孢球虫病对规模猪场生长育肥猪的生长危害值得关注

高, 为 99.7% ~ 100%, 形成一个单种系; 其中, XC 株和 XY 株、HB 株和 LY 株之间的同源性高达 100%。 LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株、ZK 株和 KZ 株虽不在同一个进化枝上, 但通过同源性比较和差异性分析, 第 3 枝与第 1 枝的同源性为 98.6%, 与 *I. suis* (下载) 的同源性为 96.3%, 说明扩增的 18S rRNA 基因序列符合预期目的要求, 并且 LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株、ZK 株和 KZ 株之间没有变异, 分离株为猪等孢球虫。此外, *I. suis* 与其他 7 种原虫之间差异较大, 同源性较低, 为 79.6% ~ 85.2%, 说明 *I. suis* 与其他 7 种原虫不属于同一个生物型。

#### 3 结论

(1) 从分离的 8 株猪等孢球虫 (LH 株、XC 株、NY 株、XY 株、ZMD 株、LY 株、HB 株和 ZK 株) 提取 DNA 后, 通过 PCR 扩增都能扩增出大小约 1800 bp、特异性的目的 DNA 条带, 并测得其 18S rRNA 基因全序列。

(2) 经过 ClustalX 1.81 序列比对, 使用 Paup 4.0、Treeview 3.0、PhyIip 和 DNASTAR 4.0 等分子生物学软件分析, 发

[J]. 今日养猪业, 2011(4): 13-17.

[2] 高峰, 刘建军. 猪等孢球虫病的病原、流行与诊治[J]. 现代畜牧科技, 2015(5): 55-56.

[3] 刘光辉, 宁长申, 张龙现, 等. 猪等孢球虫纯种卵囊扩增及生物学特性研究[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(4): 410-416.

[4] 温福利, 岳良平, 黄翠琴, 等. 福建地区部分猪场猪等孢球虫感染情况调查与分析[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(4): 69-74.

[5] 黄仪娟. 广东猪等孢球虫感染情况调查及其部分生物学特性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.

[6] 刘光辉, 宁长申, 张龙现, 等. 猪等孢球虫 PCR 诊断方法的建立[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 63-69.