

海水养殖鱼类寄生新本尼登虫的 RAPD 分析

张 纹¹, 王 军¹, 苏永全¹, 全成干¹, 周化民¹, 杨文川²

(1. 厦门大学 海洋学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 生物学系, 福建 厦门 361005)

关键词: 本尼登虫; RAPD; 高体鳊; 日本黄姑鱼; 大黄鱼

中图分类号: S941. 52

文献标识码: A

文章编号: 0253- 4193(2002)04- 0136- 05

1 引言

近年来福建、广东等水产养殖海区频频暴发急性寄生虫流行病, 调研和相关研究表明梅氏新本尼登虫(*Neobenedenia melleni*, MacCallum, 1927) 是其主要病源。该虫分布广泛, 寄主特异性低, 在多种鱼类上均可寄生, 致病力强^[1], 常引发鱼类严重感染和并发感染, 甚至导致严重的死亡, 影响着海水养殖业的健康发展。迄今为止, 从分子生物学方面入手, 研究本尼登虫的遗传变异、分子分类等尚未见报道。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术以其操作简便、灵敏度高等优点, 已广泛应用于人、畜寄生虫病的研究, 在分析亲缘关系、确定分类地位、区分不同的种、株和种群以及揭示不同生物型的多态性等方面, 取得了不少研究成果^[2~4]。本文采用 RAPD 技术对海水养殖鱼类寄生的单殖吸虫的 DNA 多态性进行分析, 比较了福建的厦门、连江和莆田等地不同宿主、不同地理分布的梅氏新本尼登虫的遗传差异, 其结果不仅为传统的形态分类学鉴定提供依据, 也为深入进行海水养殖鱼类的寄生虫检测、遗传生化和免疫等分子生物学研究奠定基础。

2 材料和方法

2.1 样本采集

本尼登虫分别于 2000 年 8 和 9 月采自厦门火烧屿高体鳊 (*Seriola dumerili*)、日本黄姑鱼 (*Argyrosomus japonicus*), 以及福建省连江县下宫村和莆田市灵川镇胜利垦区养殖网箱的大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 鱼体上。活体带回实验室, 形态学鉴定为梅氏新本尼登虫。将其暂养于海水中至肠道内含物排空后, 置于装有抽提缓冲液的 Eppendoff 管中, - 20 °C 低温保存备

收稿日期: 2001- 02- 22; 修订日期: 2001- 04- 10.

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(863- 819- 02- 12)

作者简介: 张 纹(1976-), 女, 福建省厦门市人, 硕士生, 从事海洋生物病害分子生物学研究。

用.

2.2 实验方法

2.2.1 虫体表面处理

虫体表面处理采用两种方法: (1) 用无菌水反复冲洗后备用; (2) 按上法清洗后, 再用 1 unit/cm^3 DNase(购自上海生工生物工程公司)对虫体进行体表预处理, 处理时间系列为 0, 5, 10, 15, 20, 30 min.

2.2.2 RAPD 分析

样品 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》等方法^[5]并加以改进. 扩增反应参照 Williams 等^[6]方法在 PE-9700 型 PCR 仪中进行, 随机引物购自上海生工生物工程公司(表 1). 反应体系 (25 mm^3) 包括: 无菌双蒸水 (DDW) 16 mm^3 ; PCR $10 \times \text{bufer}$ (Mg^{2+} free) 2.5 mm^3 ; 2.5 mmol dNTP 1 mm^3 ; 4 U/mm^3 Taq 酶 0.25 mm^3 ; MgCl_2 (25 mmol) 2 mm^3 ; DNA 模板 (12.5 ng/mm^3) 2 mm^3 ; Primer (25 pmol) 1.25 mm^3 . 循环条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 min \rightarrow ($93 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min \rightarrow $36 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min \rightarrow $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 min) $\times 45 \text{ recycles}$ $\rightarrow 72 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min . 样品间的相似系数 $F(\%)$ 和遗传距离 D 按 Nei^[7]的方法, $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, $D = 1 - F$, N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 样品经各引物所扩增的 DNA 片段的总和, N_{xy} 为 x 和 y 样品中共有的分子量相同的扩增 DNA 片段的总数. 采用软件包 RAPD Distance Package- Version 1.04 计算, 并对所得结果采用紧邻连接法进行等级聚类.

表 1 随机引物及其序列

引物	序列(5' 到 3')	引物	序列(5' 到 3')	引物	序列(5' 到 3')
S463	CTGATACGCC	S474	CCAGCCGAAC	S507	ACTGGCCTGA
S464	GTGTCTCAGG	S475	GGAAGCCAAC	S508	CCCGTTGCCT
S465	CCCCGGT AAC	S477	TGACCCGCCT	S509	TGAGCACGAG
S466	GTGGGCTGAC	S478	GGCTTGGCCT	S510	CCATTCCCCA
S467	GTCCATGCCA	S479	GGGAAGGACA	S511	GTAGCCGTCT
S468	ACATCGCCCA	S501	TGCGGGTCCT	S512	ACAGTGCCT
S469	GTGGTCCGCA	S502	CACAGCTGCC	S513	GGACGACAAG
S470	TCCCCCTAC	S503	ACACAGAGGG	S517	CCGTACCTAG
S472	AAGGGCGAGT	S504	CCCCTAGCAC	S519	CCTCCTCATC
S473	GGAGTGCCTC	S506	GTCTACGGCA	S520	ACGGCAAGGA

3 结果

3.1 虫体表面细菌处理

为了排除虫体表面残留细菌的 DNA 对虫体 DNA 提取产生污染, 本文进行了虫体表面细菌清除的预试验, 比较不同清除方法对虫体 RAPD 分析的影响. 3 次的对照结果表明, 用无菌水冲洗和 DNase 处理两种方法各自对虫体表面处理后的 DNA 提取和 RAPD 分析结果没有明显差异, 不同时间的 DNase 预处理后的 RAPD 分析结果也无不同(见图 1). 由此可见,

本尼登虫 DNA 提取前只需用无菌水反复清洗虫体表面即可消除虫体表面细菌附着物等外源 DNA 对实验可能产生的影响. 另外, 实验前也对置于抽提缓冲液中的虫体进行镜检, 发现虫体肠道中的内含物已全部排空, 所提 DNA 应未受其他异源 DNA 的干扰, 从而确保 DNA 提取和 RAPD 分析结果的准确性和可靠性.

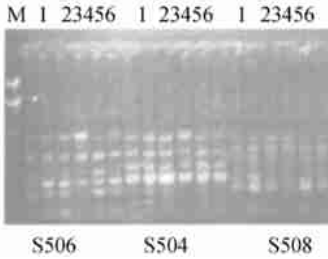


图 1 不同时间 DNase 预处理后 RAPD 的扩增产物电泳图(部分, 引物 S506, S504, S508) M 为 ADNA EcoRI/HindIII 分子标记, 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别为样品经 DNase 预处理 0, 5, 10, 15, 20, 30 min 后的 RAPD 结果

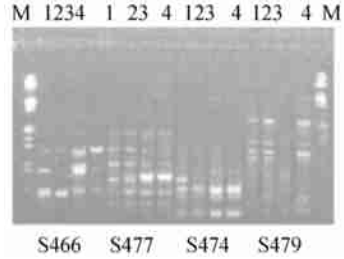


图 2 不同海区梅氏新本尼登虫 RAPD 的扩增产物电泳图(部分, 引物 S466, S477, S474, S479, S473, S469) 1. 厦门黄姑鱼本尼登虫 2. 厦门高体 本尼登虫 3. 莆田大黄鱼本尼登虫 4. 连江大黄鱼本尼登虫

3.2 RAPD 分析

RAPD 标记符合孟德尔遗传规律^[6, 8], 且是共显性遗传标记, 所以在分析时是将一个产物片段做为一个位点来处理^[9]. 本实验所用的 30 个随机引物共扩增出 152 条产物片段(400~1 500 bp), 其中具有多态性的片段为 89 条(图 2). 各个样品间的遗传差异度和相似性列于表 2.

表 2 不同海区新本尼登虫的遗传差异度和遗传相似性(%)

	厦门黄姑鱼本尼登虫	厦门高体 本尼登虫	莆田大黄鱼本尼登虫	连江大黄鱼本尼登虫
厦门黄姑鱼本尼登虫		95. 2%	93. 4%	94. 1%
厦门高体 本尼登虫	0. 047 6		93. 2%	94. 3%
莆田大黄鱼本尼登虫	0. 066 3	0. 067 9		93. 1%
连江大黄鱼本尼登虫	0. 059 6	0. 057 1	0. 069 1	

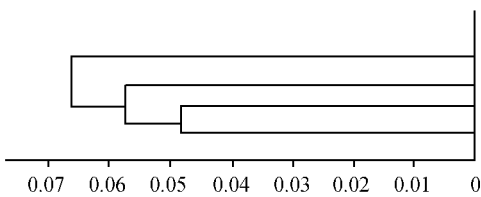


图 3 不同海区新本尼登虫遗传差异度的等级聚类图 1. 厦门黄姑鱼虫 2. 厦门高体 虫 3. 莆田大黄鱼虫 4. 连江大黄鱼虫

研究结果表明梅氏新本尼登虫具有较高的遗传同源性, 相似性在 93% 以上, 但寄生在不同海区、不同寄主的本尼登虫仍出现了一定的差异和分化. 同为厦门养殖海区, 日本黄姑鱼和高体鱼体上的新本尼登虫显示出较高的遗传相似性, 为 95. 2%. 寄主同为大黄鱼, 连江海区与莆田海区新本尼登虫的相似性则为 93. 1%. 对其进行等级聚类, 采用紧邻连接法, 所得结果(图 3)表明, 相同海区但寄主不同的梅氏新本尼登虫的遗传差异要小于不同海区但寄主相同的本尼登虫.

4 讨论

目前在单殖吸虫包括本尼登虫的分类上仍沿用传统的形态学鉴定方法。但长期以来,就虫体形态、附甲片及吸盘的变化是种的标志还是种内分化的特征一直存在着争议。已报道的新本尼登属(*Neobenedenia Yamaguti*, 1963)的种类有 10 余种,但被明确定为本属的只有 6 种^[1]。本文所取样品经厦门大学生物系寄生虫教研室相关人员鉴定为同种梅氏新本尼登虫,但从形态学水平上也观察到它们在虫体大小、钩子形状等结构上存在差异。通过对 3 个不同海区、3 个不同寄主上的新本尼登虫进行 RAPD 遗传标记分析,发现各采样间的遗传差异不尽相同,介于 0.045 9 到 0.069 1 之间,说明它们之间在分子水平上存在不同,这一点与形态观察的结果相吻合。

本文研究结果表明,寄生于不同鱼类宿主(高体、日本黄姑鱼和大黄鱼)上的本尼登虫表现出一定的遗传差异,但该差异要小于生存于不同海区(厦门、连江和莆田)的本尼登虫的遗传差异。可见,对于同一虫种而言,各海区养殖环境、宿主本身的食性等方面对虫体遗传变异可能存在影响,甚至有可能导致同一虫种在分子水平上产生一定的变异和分化,形成不同的地理种群。申纪伟等^[10]在对黄海、渤海鱼类吸虫的研究中也阐明了这一点。这也表明表型是内在因素(遗传因素)与外在因子(环境因子)共同作用的结果。当然,各种不同因子的影响程度是否一致、何种因子起到决定性作用等还有待于进一步深入的研究。

目前在物种的分子遗传比较研究中,一般采用固有遗传差异来衡量遗传分化、确定种的划分边界。对于哺乳动物 15% 的固有遗传差异是区分种的标准,但在蠕虫方面,尚未有合适的标准^[11]。该标准的建立,需要对形态上已确定的种及有明确分类特征的蠕虫种群进行广泛、普遍的研究。本文所研究的样品经鉴定为同一虫种,种内差异为 0.045 9~ 0.069 1,该数据也可作为单殖吸虫 DNA 多态性研究的参考。

由于虫体微小且须活体观察,以及相关分类资料的不足、分类标准的不确定等,给本尼登虫的分类鉴定带来了不少困难,也阻碍了相关疾病快速检测和遗传免疫研究的进一步开展。而且仅依靠形态观察和生活史研究等传统方法也无法确定虫种的分类地位和亲缘关系。RAPD 标记着重研究基因结构本身而非其产物,故可避免生活史阶段的变异、环境和宿主诱导的修饰及翻译后的影响,是鉴定不同亚种和株的最直接方法^[12]。而且其直接、灵敏、高效等特点,应用于寄生虫的分类、鉴定、遗传变异及疾病诊断方面更可以发挥优势。

衷心感谢厦门大学生物系李丽伟、海洋学系 孙雄等人对本实验给予的指导和帮助。

参考文献:

- [1] OGAWA K, BONDADREANTASO M G, FUKUDOME M, et al. *Neobenedenia girellae* (hargis, 1955) *yamaguti*, 1963 (monogenea, capsalidae) from cultured marine fishes of Japan[J]. *Journal of Parasitology*, 1995, 81(2): 223-227.
- [2] GUO Z G, JOHNSON A M. Genetic characterization of *Taxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction[J]. *Parasitology*, 1995, 111: 127-132.
- [3] HUMBERT J F, CABARET J. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of ruminant trichostrongylid nematodes[J]. *Parasitol Res*, 1995, 81: 1-5.
- [4] GASSER R B, QIAN B Z, NANSEN P, et al. Use of RAPD for the detection of genetic variation in the human blood fluke,

Schistosoma japonicum, from Mainland China[J]. *Mol Cell Probes*, 1996, 10: 353—358.

- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [6] WILLIAMS J G, KUBELIK K J, RAFALSKI J A, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6 531—6 535, 8 531.
- [7] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5 269—5 273.
- [8] 汪小全, 邹喻苹, 张大明. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. *植物学报*, 1996, 68(12): 954—962.
- [9] WELSH J, MICHAEL M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 18(24): 7 213—7 218.
- [10] 申纪伟, 邱兆祉. 黄渤海鱼类吸虫研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 5—8.
- [11] 刘俊燕. 等位基因酶电泳用于蠕虫研究中的困难[J]. *国外医学寄生虫病分册*, 2000, 27(3): 118—120.
- [12] 边春香, 李 杰, 聂文清. 用 RAPD 技术对我国两个地区马来丝虫 DNA 多态性的比较分析[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 1999, 12(4): 260—262.

Random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Neobenedenia melleni* from cultured marine fishes

ZHANG Wen¹, WANG Jun¹, SU Yong-quan¹,

QUAN Cheng-gan¹, ZHOU Hua-min¹, YANG Wen-chuan²

(1. *Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China*; 2. *Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

Key words: benedeniine; RAPD; *Seriola dumerili*; *Agyrosomus japonicus*; *Pseudosciaena crocea*