

文章编号:1000-7423(2007)-02-0081-06

【论著】

## 隐孢子虫牛源分离株的分离和鉴定

刘海鹏<sup>1</sup>, 曹建平<sup>1\*</sup>, 沈玉娟<sup>1</sup>, 陈有贵<sup>2</sup>, 李小红<sup>1</sup>,  
卢潍媛<sup>1</sup>, 徐徐信<sup>1</sup>, 刘宜升<sup>2</sup>, 刘述先<sup>1</sup>, 周晓农<sup>1</sup>, 汤林华<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 分离和鉴定采自徐州自然感染奶牛粪便中的隐孢子虫卵囊。方法 在徐州某奶牛场采集经改良抗酸染色镜检确认为隐孢子虫感染的奶牛粪便, 用不连续 Sheather's 蔗糖密度梯度离心法纯化卵囊。采用 Chelex-100 方法提取卵囊基因组 DNA, 设计引物扩增小亚基核糖体 RNA(SSU rRNA)基因和卵囊囊壁蛋白(COWP)基因, 分别克隆到 pGEM-T 和 pGEM-T Easy 载体, 测定核苷酸序列, 运用 BLAST 和 MEGA 软件进行序列同源性和种系发生分析。结果 分离的隐孢子虫卵囊个体大小为  $(7.4 \pm 0.32) \mu\text{m} \times (5.4 \pm 0.21) \mu\text{m}$ , 长宽比为  $1.37 \pm 0.07 (n=20)$ 。徐州牛源隐孢子虫与 GenBank 公布的安氏隐孢子虫比较, SSU rRNA 和 COWP 基因序列同源性分别为 100% 和 99%。种系发生分析显示该株隐孢子虫与安氏隐孢子虫处于同一分支。结论 由徐州自然感染奶牛粪便中分离获得的隐孢子虫是安氏隐孢子虫。

**【关键词】** 安氏隐孢子虫; 小亚基核糖体 RNA; 卵囊囊壁蛋白; 种系发生分析

中图分类号:R382.3

文献标识码:A

## Isolation and Identification of an Isolate of Cow-origin *Cryptosporidium* sp.

LIU Hai-peng<sup>1</sup>, CAO Jian-ping<sup>1\*</sup>, SHEN Yu-juan<sup>1</sup>, CHEN You-gui<sup>2</sup>, LI Xiao-hong<sup>1</sup>,  
LU Wei-yuan<sup>1</sup>, XU Yu-xin<sup>1</sup>, LIU Yi-sheng<sup>2</sup>, LIU Shu-xian<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1</sup>, TANG Lin-hua<sup>1</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, Shanghai 200025, China; 2 Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China)

**【Abstract】** **Objective** To isolate and identify *Cryptosporidium* oocysts from feces of naturally infected cow. **Methods** Fecal samples were collected from *Cryptosporidium* infected cows confirmed by modified acid-fast staining method. Oocysts were isolated and purified with Sheather sucrose density gradient centrifugation technique. Genomic DNA was isolated with Chelex-100. Both primers were designed to amplify *Cryptosporidium* small subunit ribosome RNA gene (SSU rRNA) and *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP), respectively. The PCR products were cloned into pGEM-T and pGEM-T Easy vector and sequenced subsequently. Homology and phylogeny were analyzed with BLASTn and MEGA software. **Results** The results suggested that the size of oocysts was  $(7.4 \pm 0.32) \mu\text{m}$  by  $(5.4 \pm 0.21) \mu\text{m}$  and the ratio of length and width was  $1.37 \pm 0.07 (n=20)$ . BLASTn revealed that the identity of SSU rRNA and COWP gene of *Cryptosporidium* isolated from cow to the counterparts of *C. andersoni* was 100% and 99% respectively. Phylogenetic reconstruction placed the isolated *Cryptosporidium* within the *C. andersoni* clade based on the sequence of SSU rRNA and COWP gene. **Conclusion** What isolated from naturally infected cow feces has been identified as *C. andersoni*.

**【Key words】** *Cryptosporidium andersoni*; Small subunit ribosome RNA(SSU rRNA); Oocyst wall protein; Phylogenetic analysis

Supported by the Key Science and Technology Project of the National Tenth Five-year Plan (No.2003BA712A03-06)

\* Corresponding author, E-mail:caojp@yahoo.com

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(No.2003BA712A03-06)

作者单位:1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 徐州医学院, 徐州 221004

\* 通讯作者, E-mail:caojp@yahoo.com

隐孢子虫(*Cryptosporidium* Tyzzer, 1907)是一种专性细胞内寄生原虫, 可感染包括人在内的 170 余种脊椎动物。以腹泻为主要症状的隐孢子虫病极易传播, 该病作为全球性分布的人兽共患病常导致严重的公共卫生问题, 对其进行预防控制具有重要的现实意义

义。迄今已发现的隐孢子虫至少有 14 种, 其中已知可感染人致病的有人隐孢子虫(*C. hominis*)、微小隐孢子虫(*C. parvum*)、安氏隐孢子虫(*C. andersoni*)、火鸡隐孢子虫(*C. meleagridis*)、猫隐孢子虫(*C. felis*)、狗隐孢子虫(*C. canis*)、猪隐孢子虫(*C. suis*)、鹿隐孢子虫(*C. cervine*)等<sup>[1]</sup>。近 20 年来, 国内外对隐孢子虫生物学及其检测与鉴定技术开展了较多的研究, 并取得一定进展。依据形态学、生活史、易感宿主与寄生部位、地理分布等传统的方法获得的资料往往难以区分种间差异和种内变异。Xiao 等<sup>[26]</sup>借助分子生物学和生物信息学技术, 采用分子标记, 测定并分析隐孢子虫特定基因片的特征或序列在种间或种内的差异, 为隐孢子虫分类研究及虫种鉴定提供了更有效的手段。

我国自 20 世纪 80 年代以来已有很多例隐孢子虫病病例报告, 迄今已报道的人和动物感染虫种不下 6 种, 我国隐孢子虫虫种分类研究亟待加强。本研究对徐州牛源隐孢子虫进行了初步分离, 获得 1 株隐孢子虫, 采用小亚基核糖体 RNA (SSU rRNA) 基因与卵囊囊壁蛋白 (COWP) 基因序列分析和种系发生分析对该隐孢子虫进行了鉴定。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 标本来源 在徐州某奶牛场选择经改良抗酸染色法确诊隐孢子虫感染的奶牛, 收集粪便, 2.5% 重铬酸钾溶液 4℃ 保存。

1.2 质粒、菌株和主要试剂 pGEM-T 和 pGEM-T Easy 载体、*Taq* DNA 聚合酶和  $T_4$  DNA 连接酶购自美国 Promega 公司; 感受态大肠埃希菌 JM109、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒均购自北京博大泰克公司; Chelex-100 树脂购自美国 BIO-RAD 公司。

### 2 方法

2.1 隐孢子虫卵囊的纯化 参照 Arrowood 等<sup>[7,8]</sup>建立的方法加以改进, 纯化卵囊。以适量生理盐水稀释收集的感染奶牛粪便, 先后过 100 目、150 目和 200 目筛, 去除粗渣。以适当生理盐水稀释后, 2000×*g* 离心 30 min, 弃上清液, 沉渣采用不连续 Sheather's 蔗糖密度梯度离心法纯化, 收集中间卵囊层, 显微镜观察并计数, 生理盐水-20℃ 保存备用。将该隐孢子虫命名为 XZ-BOV。

2.2 隐孢子虫 SSU rRNA 与 COWP 基因的克隆

2.2.1 隐孢子虫基因组 DNA 提取 取 10<sup>4</sup> 纯化的卵囊用蒸馏水洗涤 3 次, 沉淀中加入 200 μl 15% Chelex-100 树脂 (w/v, 150 mg Chelex-100 树脂中加入 1 ml 去离子

双蒸水), 充分混匀, 100℃ 水浴 20 min, 再经 10 000×*g* 离心 15 min, 吸取上清作为 PCR 扩增模板。

2.2.2 目的基因引物设计 根据 GenBank 中隐孢子虫 SSU rRNA 和 COWP 基因序列, 用 OLIGO6.0 软件分别设计引物, 并由上海生工生物工程有限公司合成。

#### (1) SSU rRNA 基因

上游引物(PF490\_SSU rRNA): 5'-TCCTGACACAG-GGAGGTAG-3'

下游引物(PR490\_SSU rRNA): 5'-TCCTTGGCAAA-TGCTTTTCG-3'

#### (2) COWP 基因

上游引物(PF553\_COWP): 5'-GTAGATAATGGAA-GAGATTGTG-3'

下游引物(PR553\_COWP): 5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3'

#### 2.2.3 目的基因 PCR 扩增

SSU rRNA 基因部分序列的扩增。PCR 反应体系为: 10×PCR 反应缓冲液 5 μl、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4 μl、三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTPs) (10 mmol/L) 2 μl、上、下游引物 (20 μmol/L) 各 2 μl、基因组 DNA (模板) 1 μl、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.5 μl, 加去离子双蒸水补足至 50 μl。反应条件为: 热启动 100℃ 5 min; 变性 94℃ 1 min, 退火 54℃ 45 s, 复性 72℃ 45 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 8 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

COWP 基因部分序列的扩增。PCR 反应体系为: 10×PCR 反应缓冲液 5 μl、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 6 μl、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、上、下游引物 (20 μmol/L) 各 2 μl、基因组 DNA (模板) 1 μl、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.5 μl, 加去离子双蒸水补足至 50 μl。反应条件为: 热启动 100℃ 5 min; 变性 94℃ 1 min, 退火 50℃ 45 s, 复性 72℃ 45 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 8 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.4 PCR 产物克隆及测序 PCR 产物回收纯化后经 TA 克隆, 转化 JM109 感受态细菌, 蓝白斑筛选。挑取分隔良好的白色菌落于 3 ml LB 培养液 (含氨苄青霉素 100 μg/ml) 中过夜培养, 抽提质粒 DNA, 分别通过限制性内切酶 *Eco*R I 酶切及 PCR 扩增对重组子进行鉴定。挑选阳性重组质粒送美国 Invitrogen 公司测定核苷酸序列。

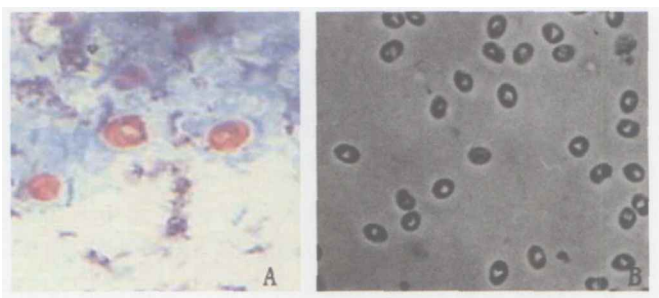
2.3 隐孢子虫 SSU rRNA 和 COWP 基因的核苷酸序列分析 对测定的核苷酸序列分别采用 BLAST 和 MEGA V3.1<sup>[9]</sup> 软件进行序列同源性和种系发生分析。种系发生分析方法如下: 利用 MEGA 软件检索 GenBank 中不同隐孢子虫的相应基因核苷酸序列, 用

CLUSTALx进行联配 (alignment), 并计算 Tamura-Nei 距离, 以邻接法 (neighbor-joining) 分别基于 SSU rRNA 基因和 COWP 基因进行种系发生分析, 并以自展法(Bootstrap)评估进化树, 采样大小均为 1 000。

## 结 果

### 1 隐孢子虫卵囊纯化结果及形态特征

改良抗酸染色后卵囊呈玫瑰红色 (图 1A), 对卵囊显微观测, 卵囊呈椭圆形, 其大小为  $(7.4 \pm 0.32) \mu\text{m} \times (5.4 \pm 0.21) \mu\text{m}$ , 长宽比为  $1.37 \pm 0.07$  (图 1B)。



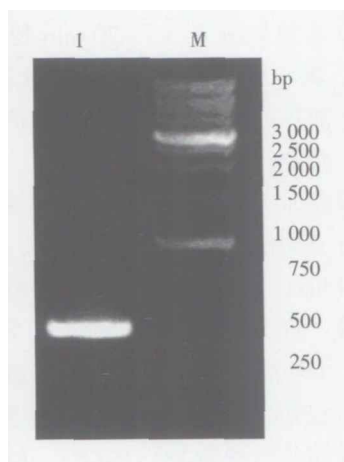
A: XZ-BOV 卵囊改良抗酸染色 (10×100), B: 纯化处理后涂片中的 XZ-BOV 卵囊 (10×40).  
A: Modified acid-fast staining of XZ-BOV oocysts (10×100), B: Smear of purified XZ-BOV oocysts (10×40).

图 1 XZ-BOV 卵囊显微镜观察

Fig.1 Microscopic observation on XZ-BOV oocysts

### 2 隐孢子虫 SSU rRNA 与 COWP 基因的克隆

2.1 PCR 扩增产物的鉴定 以纯化的 XZ-BOV 卵囊基因组 DNA 为模板, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, SSU rRNA 基因片段长度约 480 bp (图 2), COWP 基因片段长度约为 550 bp (图 3), 与预期的一致。

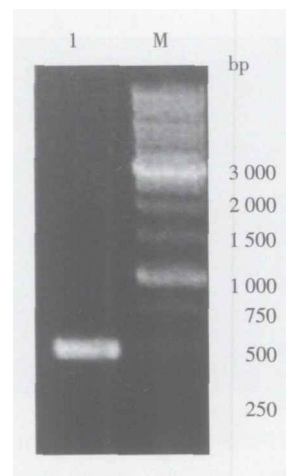


1: PCR 扩增产物, M: 1 kb DNA 标志物。

1: PCR product, M: 1 kb DNA marker.

图 2 XZ-BOV 基因组 DNA 中扩增到的 SSU rRNA 基因部分序列的电泳检测

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of SSU rRNA partial gene sequence amplified by PCR from genomic DNA of XZ-BOV

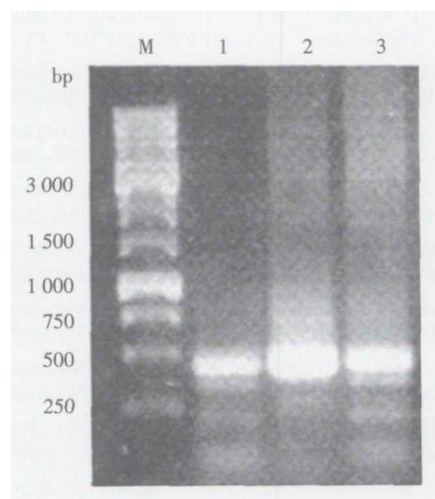


M: 1 kb DNA 标志物, 1: PCR 扩增产物。

M: 1 kb DNA marker, 1: PCR product.

图 3 XZ-BOV 基因组 DNA 中扩增到的 COWP 基因部分序列的电泳检测  
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of COWP partial gene sequence amplified by PCR from genomic of DNA of XZ-BOV

2.2 重组质粒的鉴定及序列测定 PCR 扩增产物克隆到 T 载体后, 以 PCR 法鉴定 pGEM-T/SSU rRNA 重组质粒, 以 *EcoR* I 酶切鉴定 pGEM-T Easy/COWP 重组质粒。结果显示以重组质粒为模板的 PCR 扩增产物与以基因组 DNA 为模板的扩增产物大小一致 (图 4), 证实已将 SSU rRNA 基因部分序列成功克隆入 pGEM-T 载体。pGEM-T Easy/COWP 重组质粒经酶切后可见大小约 600 bp (包括 pGEM-T Easy 载体部分序列) 的片段, 与预期的一致 (图 5), 表明 COWP 基因部分序列成功克隆到 pGEM-T Easy 载体。

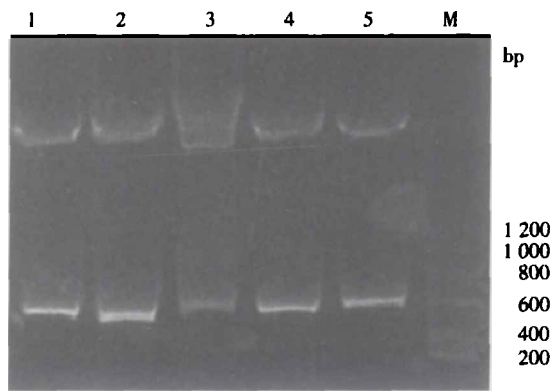


M: 1 kb DNA 标志物, 1: XZ-BOV 基因组 DNA 中扩增到的 SSU rRNA 基因部分序列, 2~3: 以重组质粒为模板 PCR 扩增产物, 质粒模板分别为 0.5  $\mu\text{l}$  和 1  $\mu\text{l}$ 。

M: 1 kb DNA marker, 1: SSU rRNA partial gene sequence amplified by PCR from XZ-BOV genomic DNA, 2-3: PCR product with 0.5  $\mu\text{l}$  and 1  $\mu\text{l}$  recombinant plasmid as template respectively.

图 4 pGEM-T/SSU rRNA 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of the recombinant plasmid pGEM-T/SSU rRNA with PCR method



1~5: 阳性克隆重组质粒经 *EcoRI* 单酶切, M: 200 bp DNA 标志物。  
1-5: pGEM-T Easy/COWP recombinant plasmid digested with *EcoRI*,  
M: 200 bp DNA marker.

图 5 pGEM-T Easy/COWP 重组质粒 *EcoRI* 酶切鉴定  
Fig.5 Identification of the recombinant plasmid pGEM-T  
Easy/COWP digested with *EcoRI*

重组质粒测序结果显示, 插入的 SSU rRNA 基因序列长度为 483 bp, 插入的 COWP 基因序列长度为 551 bp。XZ-BOV 的 SSU rRNA 克隆序列经 BLASTn 分析, 其核苷酸序列与安氏隐孢子虫 18S rRNA (gil33563050) 的同源性为 100%, 无碱基差异。

XZ-BOV 的 COWP 序列经 BLASTn 分析, 与安氏隐孢子虫 zzca 株 COWP 基因序列 (gil66968369) 的同源性为 99%, 存在一个插入突变 (插入碱基为 T, 以方格标记)(图 6)。

XZ-BOV	GTAGATAATGGAAGAGATTGTG	TAGCGTTTTCTCCACCTGATAAATCTTGCTCCAGGT	60
C. # zzca	GTAGATAATGGAAGAGATTGTG	TAGCGTTTTCTCCACCTGATAAATCTTGCTCCAGGT	59
XZ-BOV	TTTACATTTTCAGGGAAGCAGTGTGTACAGTCTGATCTGCACCTCCCAACCTGAATGT		120
C. # zzca	TTTACATTTTCAGGGAAGCAGTGTGTACAGTCTGATCTGCACCTCCCAACCTGAATGT		119
XZ-BOV	CCTCCTGGGACTGTATTGGAGAATGGAACATGCAAACTCATTGAGCAAGTAGACTATA		180
C. # zzca	CCTCCTGGGACTGTATTGGAGAATGGAACATGCAAACTCATTGAGCAAGTAGACTATA		179
XZ-BOV	TGCCACCTGGGTTTGTGAGGAGGGAATAGATGTGTCAGTATTTGCCAGCAAAACA		240
C. # zzca	TGCCACCTGGGTTTGTGAGGAGGGAATAGATGTGTCAGTATTTGCCAGCAAAACA		239
XZ-BOV	ATATGTCCACCAAGTTTAAATCTATCTGGCAGCAATGTATGGCAGCTGAATCAGCAGAA		300
C. # zzca	ATATGTCCACCAAGTTTAAATCTATCTGGCAGCAATGTATGGCAGCTGAATCAGCAGAA		299
XZ-BOV	TTAGAATCAACTTGTCTCCAAATACAATATTGGAGAATGGAAGGTGAAGTGCATTAA		360
C. # zzca	TTAGAATCAACTTGTCTCCAAATACAATATTGGAGAATGGAAGGTGAAGTGCATTAA		359
XZ-BOV	AATGTAGATATGGTGTGTCCTCCAGGTTATACAGACTCTGGAGATGAATGTGTACTTTAT		420
C. # zzca	AATGTAGATATGGTGTGTCCTCCAGGTTATACAGACTCTGGAGATGAATGTGTACTTTAT		419
XZ-BOV	GTGGCTCAGCTAAGGAGTGGCCGCCAAATTTTACACTGCAAGGGTTGCAATGTGTTCAA		480
C. # zzca	GTGGCTCAGCTAAGGAGTGGCCGCCAAATTTTACACTGCAAGGGTTGCAATGTGTTCAA		479
XZ-BOV	ACGAACACCGCATCAACACACCAAGTATGTCCACGGAAGTGTGCTACAGATAATGCC		540
C. # zzca	ACGAACACCGCATCAACACACCAAGTATGTCCACGGAAGTGTGCTACAGATAATGCC		539
XZ-BOV	TGTATTTTCAGT	551	
C. # zzca	TGTATTTTCAGT	550	

□插入碱基。□:Insert nucleotide.

图 6 XZ-BOV 与安氏隐孢子虫 zzca 株 COWP 基因核苷酸序列同源性分析

Fig.6 Homology analysis of the COWP gene of XZ-BOV and *Cryptosporidium andersoni* zzca strain

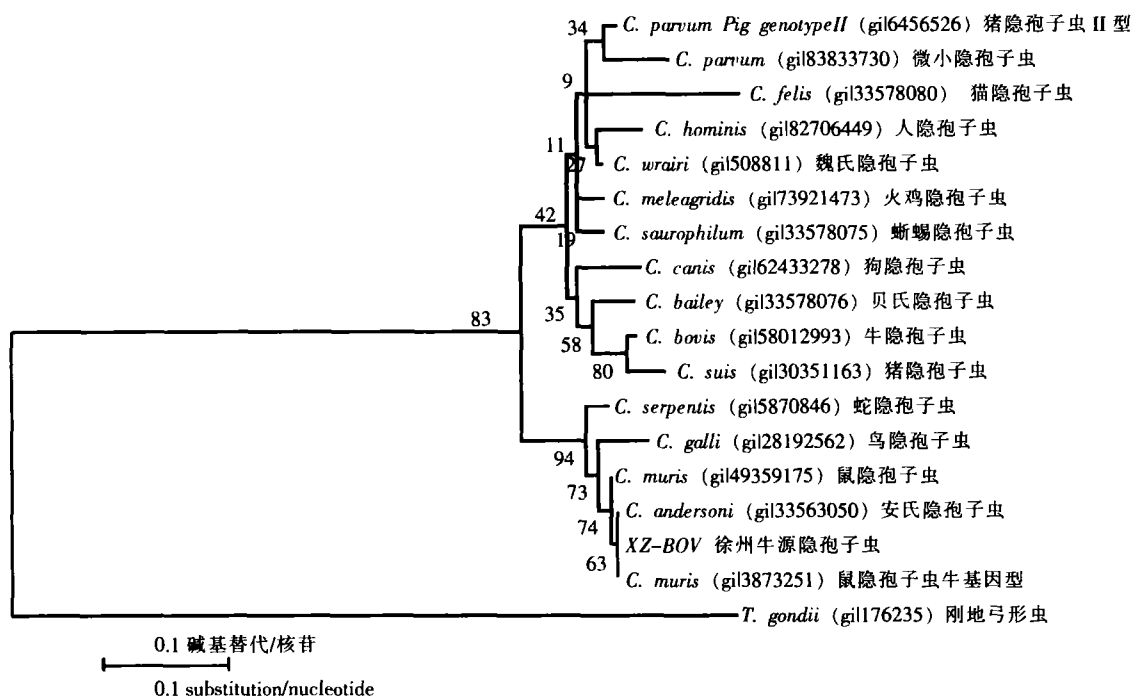
### 3 SSU rRNA 和 COWP 基因的核苷酸序列分析结果

基于 SSU rRNA 和 COWP 基因序列的种系发生分析结果显示, XZ-BOV 与安氏隐孢子虫进化关系较近, 处于同一分支。经自展法评估, 当采样大小为 1 000 时, 支持度分别为 63%和 99% (图 7, 图 8)。其中, 基于 SSU rRNA 基因进行种系发生分析时以刚地弓形虫 SSU rRNA 基因为外类群 (outgroup)。基于不同基因构建的种系发生树均将隐孢子虫分为两类, 徐州牛源隐孢子虫与鼠隐孢子虫、安氏隐孢子虫、蛇隐孢子虫处于同一类, 其中鼠隐孢子虫的不同基因型被明显分为两支, 而微小隐孢子虫等则处于另一类。

### 讨 论

粪便中的隐孢子虫主要以卵囊的形式存在。卵囊对环境的抵抗力强, 囊壁较厚, 常规的处理方法 (如蛋白酶 K 消化、液氮冻融法等) 不易破坏囊壁而影响其 DNA 的释放。经蛋白酶 K 处理、酚-氯仿抽提隐孢子虫 DNA 的方法过程繁杂, 提取过程中 DNA 损失较大, 而且容易污染 [6]。李培英等 [10] 报道在含有二硫苏糖醇 (DTT) 和 TE 缓冲液的消化液中冻融裂解释放虫体 DNA, 直接用作 PCR 反应模板。但是该方法获得的 DNA 纯度较低, PCR 反应抑制物较多, 限制了 PCR 检测的敏感性。沈玉娟等 [11] 等运用 Chelex-100 树脂抽提隐孢子虫卵囊 DNA, 发现 Chelex-100 树脂颗粒可以防止 DNA 降解, 通过结合 PCR 反应抑制物增加 PCR 反应敏感性, 而且整个提取过程仅在一个管内进行, 既减少损失又避免污染。本研究还发现, 通过改变 Chelex-100 水溶液浓度可以获得优于利用特定缓冲液配制的 Chelex-100 溶液提取的 DNA 模板, 而且初步纯化的或粪便中的卵囊只需经 Chelex-100 水溶液煮沸 15~20 min 便可以完全释放卵囊 DNA, 离心后的上清可以直接用于 PCR 检测, 无需反复冻融加热处理, 提取过程大为简化, 使该方法更加快速、高效。

目前, 国内尚无系统的隐孢子虫种株分类和基因分型研究。由于隐孢子虫寄生宿主众多, 且分类标准不尽相同, 因此迄今我国存在的隐孢子虫的种类不很明确。Xiao 等 [12] 提出隐孢子虫虫种的命名需要考虑 4 个基本条件: ①卵囊的形态学特征; ②遗传特征; ③宿主特异性, 包括自然宿主和 (或) 实验感染宿主; ④符合国际动物学分类准则 (ICZN)。Lindsay 等 [13] (2000) 通过对鼠隐孢子虫牛基因型的宿主特异性和遗传学特征分析, 证实其为一种新种, Sreter 等 [14] 以最初发现者的名字命名为安氏隐孢子虫。安氏隐孢子虫主要寄生于牛的皱胃中, 椭圆形, 无孢子囊结构, 略小

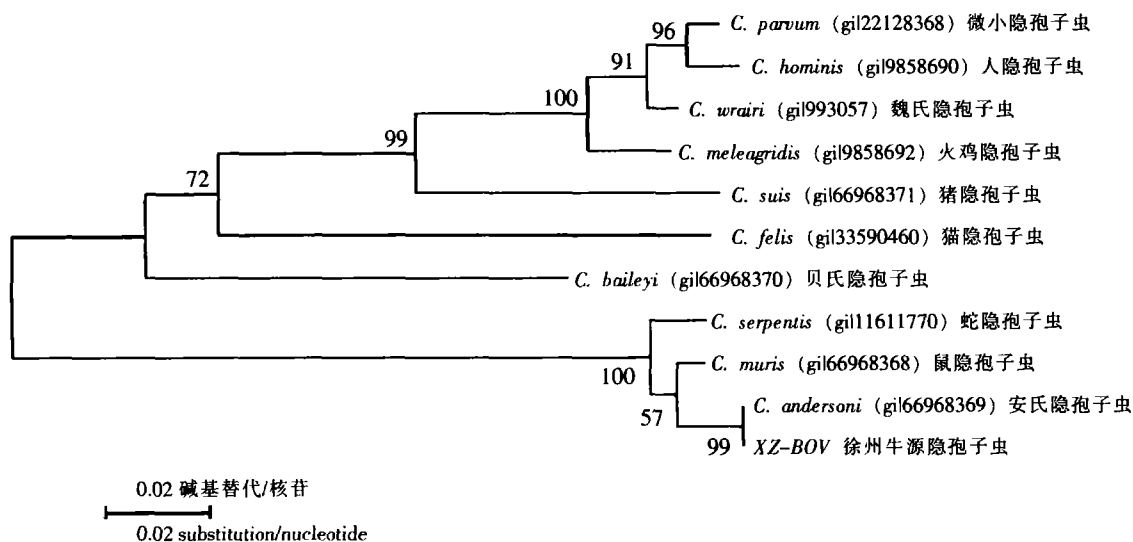


注：采样大小为 1 000，自展法评估的支持度在节点标注。

Note: The reliabilities assessed by the bootstrap method with 1 000 pseudoreplicates labeled on the node.

图 7 邻接法分析 SSU rRNA 基因核苷酸序列推断 XZ-BOV 与其它隐孢子虫的种系发生关系

Fig.7 Phylogenetic relationship of XZ-BOV to other *Cryptosporidium* parasites inferred from neighbor-joining analysis of SSU rRNA gene nucleotide sequence



注：采样大小为 1 000，自展法评估的支持度在节点标注。

Note: The reliabilities assessed by the bootstrap method with 1 000 pseudoreplicates labeled on the node.

图 8 邻接法分析 COWP 基因核苷酸序列推断 XZ-BOV 与其它隐孢子虫的种系发生关系

Fig.8 Phylogenetic relationship of XZ-BOV to other *Cryptosporidium* parasites inferred from neighbor-joining analysis of COWP gene nucleotide sequence

于鼠隐孢子虫，大小为(6.0~8.1)  $\mu\text{m}$ ×(5.0~6.5)  $\mu\text{m}$  (平均为 7.4  $\mu\text{m}$ ×5.5  $\mu\text{m}$ )，长宽比为 1.07 : 1.50 (平均为 1.35)<sup>[13]</sup>，本研究获得的隐孢子虫卵囊的形态学参数与其相符。

遗传学研究是隐孢子虫分类或分型研究的重要手

段，其中通过进化上相对保守的基因，研究不同物种的进化关系的种系发生分析是重要的方法之一。在种系发生研究选择的基因是进化上相对保守的基因，如 HSP70 基因<sup>[2]</sup>、SSU rRNA<sup>[3]</sup>基因和肌动蛋白基因<sup>[4]</sup>等。不同的基因或分子标记的进化速率不同，同时分

析多个基因座可以提高种系发生分析结果的可靠性。COWP 基因是隐孢子虫所特有的,在不同种类或不同基因型隐孢子虫之间该基因比较保守,其序列差异可用于隐孢子虫分类和基因分型研究<sup>[15]</sup>。SSU rRNA 基因已被作为种系发生分析、病原学诊断、鉴别隐孢子虫种类及基因型的重要靶基因之一<sup>[5]</sup>。本研究利用COWP 基因进行种系发生分析,其分析结果较 SSU rRNA 基因分析结果有更高的分辨率,即自展法评估的支持度更高,提示 COWP 基因是较为理想的研究隐孢子虫种系发生的基因。基于编码蛋白的 COWP 基因构建的种系发生树中,XZ-BOV 与安氏隐孢子虫处于同一分支,支持度为 99%;基于非编码蛋白的 SSU rRNA 构建的种系发生树中,XZ-BOV 与安氏隐孢子虫和鼠隐孢子虫牛基因型处于同一分支,支持度为 63%。基于不同基因进行种系发生分析结果一致。

值得一提的是,在早先基于不同基因进行种系发生分析中,存在不同的鼠隐孢子虫进化地位不同的现象,这是由于安氏隐孢子虫被定为一个独立种的时间较晚。本研究分析和文献报道<sup>[16-18]</sup>表明,在一些早先报道的鼠隐孢子虫牛基因型[如 SSU rRNA(gi13873251)]应是安氏隐孢子虫。

本研究结合形态学特征和分子标记,对徐州牛源隐孢子虫分离株进行了鉴定,确定其为安氏隐孢子虫,研究结果及建立的隐孢子虫虫种鉴别方法为进一步开展隐孢子虫的病原生物学基础研究以及隐孢子虫病的监测奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Leoni F, Amar C, Nichols G, et al. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000[J]. J Med Microbiol, 2006, 55: 703-707.
- [2] Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RCA, et al. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilo-Dalton heat shock protein (HSP70) gene[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66:2385-2391.
- [3] Xiao L, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small rRNA gene locus [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 1578-1583.
- [4] Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus[J]. J Parasitol, 2002, 88: 388-394.
- [5] Xiao L, Alderisio K, Limor J, et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 5492-5498.
- [6] Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium* by polymerase chain reaction [J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45: 688-694.
- [7] Arrowood MJ, Donaldson K. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients[J]. J Eukaryot Microbiol, 1996, 43: 89S.
- [8] Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients[J]. J Parasitol, 1987, 73: 314-319.
- [9] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245.
- [10] Yan RF, Zhou JL, Li PY. Nested PCR for the micro-detection of *Cryptosporidium* oocyst[J]. Chin J Vet Sci, 2003, 23: 570-572. (in Chinese)  
(严若峰, 周金林, 李培英. 巢式 PCR 检测微量隐孢子虫卵囊[J]. 中国兽医学报, 2003, 23: 570-572.)
- [11] Shen YJ, Cao JP, Lu WY, et al. Preparation of DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR detection [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 228-230. (in Chinese)  
(沈玉娟, 曹建平, 卢潍媛, 等. 微小隐孢子虫卵囊 DNA 提取及用于 PCR 检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 228-230.)
- [12] Xiao L, Fayer R, Ryan U, et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 72-97.
- [13] Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, et al. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus* [J]. J Eukaryot Microbiol, 2000, 47: 91-95.
- [14] Sreter T, Egyed Z, Szell Z, et al. Morphologic, host specificity, and genetic characterization of a European *Cryptosporidium andersoni* isolate[J]. J Parasitol, 2000, 86: 1244-1249.
- [15] Xiao L, Limor, Morgan UM, et al. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 5499-5502.
- [16] Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T, et al. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 691-692.
- [17] Enemark HL, Ahrens P, Lowery CJ, et al. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization[J]. Vet Parasitol, 2002, 107: 37-49.
- [18] Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 4431-4435.

(收稿日期:2006-10-25 编辑:高石)