

文章编号:1003-8701(2013)01-0050-04

安徽部分地区鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊的分离与鉴定

王中宝,欧俊秀,曾明华*,阮祥春,
张伟玮,杨娜,吴丽君

(安徽农业大学动物科技学院,合肥 230036)

摘要:为获得纯种柔嫩艾美耳球虫虫株,从安徽省巢湖市、霍邱县、定远县3个地区患球虫病的鸡场采集3株混合球虫,培养至孢子化,分离单卵囊接种1~7日龄的雏鸡,感染后7~12 d,收集卵囊,然后通过生物学特性和PCR方法进行虫种鉴定。结果显示,3个地区的单卵囊感染成功率分别为50%、57%和29%,各虫株经生物学特性和PCR鉴定均为柔嫩艾美耳球虫。研究表明,1.0%琼脂单卵囊分离法简便且成功率较高,利用特异性引物PCR鉴定虫株,为纯种地方株的研究奠定了基础。

关键词:柔嫩艾美耳球虫;单卵囊;分离;PCR;鉴定

中图分类号:S831

文献标识码:A

Single-oocyst Separation and Identification of *Eimeria tenella* in Chickens in Patrs of Anhui Province

WANG Zhong- bao, OU Jun- xiu, ZENG Ming- hua*, RUAN Xiang- chun,
ZHANG Wei- wei, YANG Na, WU Li- jun

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to obtain pure *Eimeria* strain, three *Eimeria* species were collected from the poultry farms infected with coccidia in Chaohu, Huoqiu and Dingyuan of Anhui Province, and then cultured to sporulated oocysts. The 1- 7 days old chicks were vaccinated the single- oocyst by single- oocyst separation technology. The oocysts were collected after 7- 12 days, and then the coccidia oocysts were identified with biological characteristics and PCR method. The results showed that the ratio of infection were 50%, 57% and 29%, respectively in three areas. The three *Eimeria* species were all identified as *Eimeria tenella* by biological characteristics and PCR. This indicated that the single oocyst isolation technique was simply and successful. Using specific primers of PCR to identify strains could lay foundation for the study of pure local strains.

Keywords: *Eimeria tenella*; Single-oocyst; Separation; PCR; Identification.

鸡球虫病是由顶复器门孢子虫纲艾美耳属的一种或多种艾美耳球虫(单细胞寄生虫)寄生于鸡

肠道黏膜上皮内而引起的一种危害鸡生长发育的全球性家禽寄生虫病^[1],该病发病率高至50%~70%,死亡率为20%~30%,严重时高达80%^[2],特别是现代集约化养鸡场多发频发,给养鸡业带来巨大的经济损失。据报道,全世界每年由鸡球虫病给养鸡业带来的直接和间接经济损失高达80亿美元^[3-4],我国养鸡量位于世界之首(约占世界总量的10%),但因集约化程度不够、饲养管理不当

收稿日期:2012-09-06

基金项目:安徽省教育厅重点项目(KJ2012A115)

作者简介:王中宝(1986-),男,硕士研究生,从事驱虫药及其作用机理研究。

通讯作者:曾明华,男,副教授,硕士生导师,

E-mail: zmhzmh@ahau.edu.cn

等造成我国养鸡业年损失约 25 亿元人民币^[5]。鸡球虫种类繁多,我国报道的有 11 种,目前报道较多的有 7 个种^[6],且都具有致病性,其中以寄生于盲肠的 *Eimeria tenella* 致病性最强,但临床上常见于以某一种为主的混合感染,同时也有研究发现同种或不同种球虫的生物学特性均有所不同,这就给鸡球虫病的研究带来一定的困难,因此分离品种单一的球虫卵囊成为研究球虫生物学特性的必要手段,研究某一地区球虫生物学特性和球虫的纯种体系,对虫种的鉴定、球虫的流行病学、致病性、药物效应、耐药性、遗传变异、蛋白组学及球虫免疫,都具有十分重要的意义。

本试验以安徽 3 个地区鸡柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 为研究对象,开展了卵囊的分离、纯化及鉴定工作,为耐药性分析和药物疗效试验奠定基础,并为研发新型球虫药和制定安徽地区球虫病的防治方法提供理论和实践依据。

1 材料

1.1 试验动物

42 只 1 日龄罗曼蛋公雏购于安徽长丰安禽业有限公司,饲养前实验室经 10% 氨水彻底消毒,雏鸡饲养于经氨水消毒和 70℃ 烘干的纸箱中,自由采食和饮水。

1.2 试验虫株

取来自于巢湖市、霍邱县、定远县鸡场的垫料与病鸡及病死鸡盲肠内容物,分离培养,获得混合卵囊,再通过单卵囊技术进行纯化。

1.3 试验试剂

重铬酸钾、氯化钠均为国产分析纯购于西陇化工股份有限公司;琼脂粉购于北京奥博星生物技术有限责任公司;DL2000、premix Taq (Loading dye mix)、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、RNA 酶、蛋白酶 K、10% SDS 等基因组 DNA 的提取试剂购于大连宝生物公司。

1.4 实验仪器

PCR 扩增仪、冷冻离心机、高速和低速离心机、凝胶图像处理系统、显微镜、移液器、PCR 管、分析天平、烧杯、组织匀浆机、恒温培养箱、血球计数板等。

2 方法

2.1 混合卵囊的分离与培养

取安徽巢湖市、霍邱县、定远县 3 地病鸡及病死鸡的盲肠内容物置于 50 mL 离心管中,用饱和

盐水反复洗涤盲肠黏膜,洗涤液转移至上述离心管中,用组织匀浆机进行匀浆。用饱和盐水漂浮法收集卵囊,匀浆液中加入适量饱和盐水,以 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液,沉淀中再加饱和盐水,重复上述操作 3 次;上清液中加入 5~10 倍体积的水混匀,以 3500 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀中加入 2.5% 重铬酸钾适量后倒入培养皿中置于 28~30℃ 的恒温箱中培养 48~72 h,待孢子化率达到 90% 以上时收集卵囊,置 4℃ 冰箱中备用。

2.2 单卵囊的感染试验

2.2.1 琼脂薄片的制作

称 1 g 琼脂粉倒入 100 mL 的烧杯中,加单蒸水(dH₂O)100 mL,混匀,加热至完全溶解。溶解后用滴管吸取适量琼脂液滴于载玻片上,不宜太厚,冷却凝固。

2.2.2 混合卵囊液准备

取备用的重铬酸钾保存的混合虫种,3 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加水重复离心直至完全去除重铬酸钾,然后取 10 μL 混合卵囊液,加入 40 μL 的 dH₂O 稀释摇匀,显微镜下观察,直至一个视野范围内只有一个卵囊为止,若含有多个卵囊,倍比稀释观察,直至符合条件为止。

2.2.3 单卵囊分离

取稀释好的卵囊液一滴滴在琼脂薄片上,10×10 的低倍镜下找到卵囊,10×40 的高倍镜下观察,确定一个视野中只有卵囊且上下左右的每个视野中均无卵囊时,静置干燥片刻,再次镜检,确定卵囊仍在原来位置后,用盖玻片切下含有单个卵囊的琼脂块。不符合要求的弃之。

2.2.4 单卵囊的感染

取含有单个卵囊的琼脂块,左手抓住雏鸡,用拇指与食指分开鸡上下喙,右手将准备好的球虫单卵囊小心的灌服,待其吞咽后,用移液器吸取 50 μL 的 dH₂O 送服。

2.3 卵囊鉴定

2.3.1 单卵囊的收集

试验鸡只接种单卵囊后每日观察鸡的精神状况,从第四天开始检查粪便中是否含有卵囊,发现有的鸡只第二天将其剖杀刮取盲肠内容物置于 2.5% 的重铬酸钾溶液中,29℃ 的生化培养箱中培养,待孢子化率达到 90% 以上时收集卵囊,收集后置 4℃ 冰箱中保存备用。

2.3.2 生物学特性鉴定

观察鸡球虫寄生部位、典型临床症状、最短潜

在期、最短孢子化时间、卵囊形态、大小等生物学特性,对所增殖的单卵囊进行初步鉴定。

2.3.2.1 寄生部位及典型临床症状

雏鸡感染后每日观察雏鸡的采食及精神情况,感染后第四天开始粪检,发现卵囊后剖杀鸡只,观察肠道病变并记录。

2.3.2.2 最短潜在期

即虫株接种后最早出现卵囊时间,一般在接种后第四天起每隔 1 h 观察 1 次。

2.3.2.3 最短孢子化时间

将卵囊收集于培养皿中,加入适量重铬酸钾至 29℃ 培养箱中培养,期间每隔 1 h 镜检一次,自开始培养到最早出现 4 个孢子囊的时间即为最短孢子化时间。

2.3.2.4 卵囊形态及大小

随机选择 50 个孢子化卵囊,显微镜下测量其大小,取其平均值。

2.3.3 PCR 鉴定

球虫基因组 DNA 的提取:取纯化好的单卵囊 10^8 , 3 500 r/min 离心 15 min,重复 3~5 次洗去重铬酸钾,加入适量的 10%SDS 和等体积的玻璃珠在振荡仪上破碎 3~5 min 后镜检,直至 90% 以上孢子化卵囊破碎为止,加入蛋白酶 K (100 μg/mL),摇匀后 55℃ 条件下水浴 3h,然后再加入 RNA 酶 (200 μg/mL),摇匀后 37℃ 条件下水浴 30 min,30 min 后酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 重复抽提 2 次,氯仿抽提 1 次,2~2.5 倍体积无水乙醇冰浴 30 min,最后用 70% 乙醇洗涤 2 次,风干后 TE 溶解, -20℃ 备用。

PCR 扩增组:根据 S.Fernandez 等^[7]的报道,合成柔嫩艾美耳球虫的特异性引物序列:上游引物序列: 5'-CCGCCCAAACCAGGTGT-CACG-3'; 下游引物序列: 5'-CCGCCCAAACAT

GCAAGATGGC-3'。扩增体系为:模板 DNA 1.0 μL, 50 μmol/L 上下游引物各 0.25 μL, Loading dye mix 12.5 μL, 加灭菌后的双蒸水 11.0 μL 至 25 μL。反应条件为:96℃ 预变性 6 min, 然后进入循环体系 (94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环), 72℃ 再延伸 7 min。

PCR 扩增组:根据 Yao-Chi Su 等^[8]的报道,合成毒害艾美耳球虫 (*E. necatrix*) 的特异性引物序列:上游引物序列为 5'-GTCACGTTTTTGC-CTGGGTG-3' 下游引物序列为 5'-ACA GAC-CGCTACACAACACG-3'。扩增体系为:模板 DNA 1.0 μL, 50 μmol/L 上下游引物各 0.25 μL, Loading dye mix 12.5 μL, 加灭菌后的双蒸水 11.0 μL 至 25 μL。反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 然后进入循环体系 (94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 50s, 共 35 个循环), 72℃ 再延伸 5 min。

以上两个 PCR 产物均经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,再用紫外凝胶成像系统观察并拍照。

3 结果

3.1 单卵囊感染效果

运用琼脂玻片单卵囊技术分离安徽 3 个不同地区的鸡柔嫩艾美耳球虫,得到的单卵囊分别感染 42 只 1~7 日龄经粪检后无球虫的罗曼蛋雏,感染后 9~12 d 粪检发现球虫卵囊,发现卵囊后剖杀鸡只,巢湖、霍邱、定远 3 地球虫虫株感染后各有 7、8、4 只感染成功,感染成功率分别为 50%、57% 和 29%,说明感染效果较好。收集卵囊,分离培养,4℃ 备用。

3.2 生物学特性鉴定

将 3 地单卵囊感染的球虫后代进行鸡体回归试验,感染经粪检无球虫的雏鸡,感染后 8 d 剖杀并观察,观察结果见表 1。

表 1 生物学特性

虫株	寄生部位	卵形	大小(μm)	典型临床症状	最短孢子化时间(h)	最短潜在期(h)
巢湖株	盲肠	宽卵圆形	(21.79±1.47)×(18.38±1.30)	盲肠芯	18	115
霍邱株	盲肠	宽卵圆形	(22.64±1.65)×(18.49±0.95)	盲肠芯	18	118
定远株	盲肠	宽卵圆形	(22.14±1.63)×(17.94±1.37)	盲肠芯	19	117

由表 1 可知:3 地球虫虫株生物学特性与索助等^[4]描述的基本一致,可初步认定为柔嫩艾美耳球虫。

3.3 基因组 DNA 提取结果

电泳结果显示 3 株柔嫩艾美耳球虫均成功提

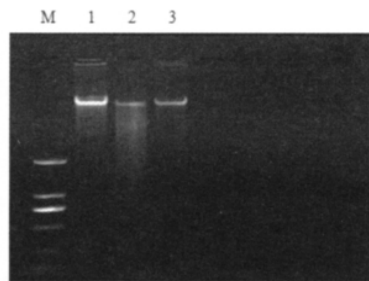
取到基因组 DNA (图 1),同时采用紫外分光光度计测定 3 株球虫基因组 DNA 的 OD 值,OD 值均在 1.80~2.00 之间,满足试验要求。

3.4 PCR 扩增结果

为确定虫株种类,采用 2 组特异性引物分别

对 3 株艾美耳球虫卵囊的基因组 DNA 进行特异性扩增,扩增结果显示扩增 组(图 2)3 株卵囊均扩增出约 530 bp 的清晰目的条带,可初步确定为柔嫩艾美耳球虫;扩增 2 组 3 株卵囊均未扩增出条带;试验也运用了初次分离株 PCR 产物作

为对照,混合株扩增出了大小不一的目的条带(图 3),这一对照也进一步确证本试验单卵囊分离株均是纯种的柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*),分别命名为巢湖(CH)株、霍邱(HQ)株和定远(DY)株。



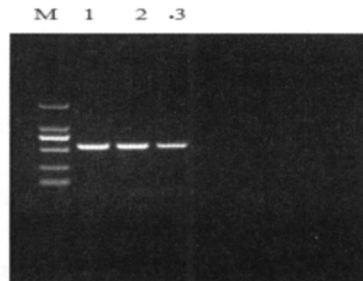
M:DL-2000 DNA Marker

1:巢湖株

2:霍邱株

3:定远株

图 1 球虫基因组 DNA 电泳图



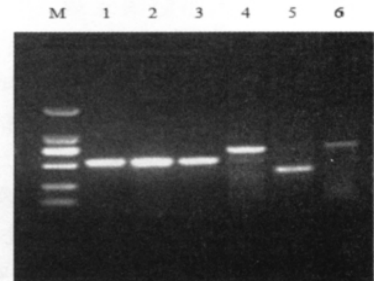
M:DL-2000 DNA Marker

1:巢湖株目的基因 DNA 条带

2:霍邱株目的基因 DNA 条带

3:定远株目的基因 DNA 条带

图 2 扩增体系 I 电泳图



M:DL-2000 Marker

1:巢湖纯种株 2:霍邱纯种株

3:定远纯种株 4:巢湖混合株

5:霍邱混合株 6:定远混合株

图 3 纯种株与混合株电泳图

4 讨论与分析

4.1 单卵囊感染

从巢湖、霍邱和定远 3 地分离到的混合艾美耳球虫虫种,经过琼脂块单卵囊分离技术均获得了纯种株,但 3 地的单卵囊感染成功率有所不同,分别为 50%、57%和 29%,这可能与雏鸡的日龄大小、饲养条件、卵囊活力及接种方法有关,雏鸡为试验过程中球虫卵囊增殖及单卵囊感染的必要,但在卵囊的纯化分离及鉴定试验中,公母雏的选择对卵囊的获得几乎没有影响,因此本试验选择了廉价的公雏。

试验中 2 日龄内雏鸡未感染成功,雏鸡肌胃不发达,单卵囊进入雏鸡肌胃后,卵囊的脱囊受到抑制而可能直接影响到其感染的成功率,这与陶建平、吴昌标等^[9-10]的报道一致,说明 1~7 日龄雏鸡中较大的易感染;其次,饲养温度与湿度直接影响到雏鸡感染的可能性,温度与湿度过低则不易感染,相比而言,试验中定远株感染率为 29%,原因可能为卵囊分离时间超过 1 个月,活力下降所致;同时,安健等^[11]采用玻璃纸法接种雏鸡,其感染率较低,说明不同的单卵囊接种方法也会影响对雏鸡感染率。

4.2 特异性扩增

通过球虫生物学特性可以对球虫种类做初步鉴定,但鉴定结果不可靠,且不能鉴定其是否为纯种。试验利用两对不同的引物,用于鉴定虫种是否为纯种,弥补了生物学鉴定和单一引物鉴定的不

足。试验中所用虫株运用引物 扩增出了目的条带,引物 未扩增出目的条带,说明了试验虫株为纯种;也采用了 3 株虫株初次分离株的基因组 DNA 作为对照,引物 扩增出了目的条带,引物

也扩增出了大小不一的条带,说明初次分离株中混有其他艾美耳球虫卵囊,而单卵囊分离株中不含有,同时也说明了这两种引物结合可用于鉴定柔嫩艾美耳球虫是否被污染;试验中引物 扩增出大小不一的条带,原因可能为采集于垫料中的初次分离株混有盲肠球虫以外的其它艾美耳球虫,其中霍邱混合株中出现高于 300 bp 的条带,说明其混有毒害艾美耳球虫,与 Yao-Chi Su 等^[8]的结果一致,而巢湖与定远混合株中均出现了一条高于 530 bp 的清晰条带,且有其他较暗的条带,说明这两株混合污染程度较高,除混有少量的毒害艾美耳球虫外,可能还混有其他虫种。

高英、YANG Gui-lian 等^[12-13]也采用了 PCR 技术对单卵囊分离株作了鉴定,但只运用了一对引物,而柔嫩和毒害艾美耳球虫的配子生殖均在盲肠,因此,单一引物可能难以排除二者之间的相互污染。上述结果表明特异性 PCR 可快速有效的鉴定球虫卵囊种类,同时也为进一步研究球虫耐药性及相关性研究提供了依据。

5 结 论

试验通过单卵囊分离技术成功分离到 3 株柔嫩艾美耳球虫;同时利用分子生物学和特异性 PCR 技术,3 株虫株均被鉴定为纯种。(下转第 57 页)

4 结论与讨论

花色苷在葡萄转色期开始合成并随浆果的成熟不断累积,含量上升,因葡萄品种、生态条件等因素影响,完全成熟时含量达最大值或有下降的趋势。野生葡萄及欧亚种葡萄赤霞珠成熟期间总花色苷含量持续上升,本研究与他人研究结果一致^[10-11]。赤霞珠成熟过程中花色苷的变化为转色期后花色苷含量迅速积累到一定程度,随后其含量保持不变,甚至到后期略有下降,而且对不同的花色苷而言,这种变化趋势略有不同,花翠素-3-葡萄糖苷和甲基花翠素-3-葡萄糖苷含量到成熟后期有所降低,而其它花色苷特别是二甲花翠素在成熟过程中所占比例一直在升高^[11]。本研究山葡萄花青素-3,5-葡萄糖苷在100%着色至成熟过程却呈下降趋势,这与赤霞珠的花色苷含量变化有所区别,这种变化趋势是否是山葡萄的品种特征,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 张金柱,戴永平,王万民. 山葡萄资源开发及利用[J]. 中国林副特产, 2002(5): 256-257.
- [2] 方 志. 山葡萄与山葡萄酒[J]. 酿酒科技, 2003(6): 93-94.
- [3] 王 军,葛玉香,包怡红. 东北山葡萄品种特性比较[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 29-31.
- [5] 王洪新,汤 坚,吴晓燕,等. 葡萄籽中抗氧化剂的精制及抗氧化活性的测定[J]. 中国油脂, 1990, 15(14): 9-14.
- [6] 吕丽爽,曹 栋. 葡萄籽中低聚原花青素的研制[J]. 中国油脂, 2001, 26(1): 38-39, 49.
- [7] 徐渊金,杜琪珍. 花色苷分离鉴定方法及其生物活性[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 67-72.
- [8] Wu X, Ronald L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common food in the United States: fruits and berries [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(7): 2589-2599.
- [9] 李 华,王 华,袁春龙,等. 葡萄酒化学[M]. 北京: 科技出版社, 2005: 106-110.
- [10] 段长青,贺普超,康靖全. 中国葡萄野生种花色素双糖苷的研究[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(5): 23-28.
- [11] José - Marí a R, Eugenio R. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tmpranillo grapes at different stages of ripening [J]. J Agric Food Chem, 2003 (51): 3372-3378.

(上接第 53 页)

为耐药性研究的开展奠定了基础。

参考文献:

- [1] 索 勋,李国清. 鸡球虫病[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 149-318.
- [2] 索 勋,汪 明,吴文学,等. 强效艾美耳牌鸡球虫苗 I 型的田间实验[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(3): 265-269.
- [3] P. C. Allen, R. H. Fetterer. Recent Advances in Biology and Immunobiology of Eimeria Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(1): 58-65.
- [4] Martin W. Shirley, Adrian L. Smith, Damer P. Blake. Challenges in the successful control of the avian coccidia [J]. Vaccine, 2007(25): 5540-5547.
- [5] 安 健,刘月繁,汪 明,等. 肉鸡球虫病和球虫抗药性的调查[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(6): 29-31.
- [6] 沈 杰,黄 兵. 中国家畜家禽寄生虫名录[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 7-19.
- [7] S Fernandez, A.H. Pagotto, M.M. Furtado, et al. A multiplex

PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven Eimeria species that infect domestic fowl[J]. Parasitology, 2003(127): 317-325.

- [8] Yao- Chi Su, Andrew Chang- Young Fei, Fang- Mei Tsai. Differential diagnosis of five avian Eimeria species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS- 1) sequence [J]. Veterinary Parasitology, 2003(117): 221-227.
- [9] 陶建平,符敖齐. 单卵囊感染的雏鸡日龄及某些生物学特性的研究[J]. 江苏农学院学报, 1997, 18(4): 77-78.
- [10] 吴昌标,郑文金,张灵玲,等. 福建三株柔嫩艾美耳球虫的分离、鉴定及致病性的初步研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2010, 17(3): 140-144.
- [11] 安 健,汪 明,王黎霞,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的建立[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(1): 5-6, 13.
- [12] 高 英,郭 莉,赵月兰,等. 艾美耳球虫单卵囊分离及 PCR 鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(12): 25-27.
- [13] YANG Gui- Lian, LI Jian- hua, ZHANG Xi- chen, et al. Isolation of E. tenella JL Strain Single- oocyst and PCR Identification [J]. Agricultural Science and Technology, 2009, 10 (3): 55-57.