

人蛔虫和猪蛔虫线粒体 *nad5* 基因的序列分析

吴昌义¹, 林瑞庆², 朱艳平³, 刘国华^{4*}

(1.重庆市璧山县养殖业技术服务中心, 重庆 璧山 402760; 2.华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3.新乡学院生命科学与技术系, 河南 新乡 453003; 4.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:以来自中国不同地方的人蛔虫与猪蛔虫为研究对象, PCR 扩增其线粒体烟酰胺脱氢酶亚基 V 基因(*nad5*)的部分序列(*pnad5*)并进行序列测定, 应用 ClustalX 1.81 程序对序列进行比对。结果显示: 所获得的 *pnad5* 序列长度一致, 均为 556 bp; 人蛔虫和猪蛔虫的 *pnad5* 序列差异仅为 0.0%~2.6%, 本研究结果支持人蛔虫与猪蛔虫是同一个种的结论。

关键词:人蛔虫; 猪蛔虫; 线粒体 DNA; 烟酰胺脱氢酶亚基 V 基因(*nad5*); 序列分析

中图分类号: Q958.9; Q959.17.2⁺.6 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2014)01-0060-04

Ascaris lumbricoides and *Ascaris suum* represent the same species based on sequence analysis of mitochondrial *nad5* gene

WU Chang-yi¹, LIN Rui-qin², ZHU Yan-ping³, LIU Guo-hua^{4*}

(1.Cultivation Industry Technical Service Center of Bishan County, Bishan, Chongqing 402760, China; 2.College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3.Xinxiang College, Department of Life Sciences and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China; 4.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) and *Ascaris suum* (*A. suum*) were collected from different areas in China to examine the sequence variation of mitochondrial NAPH dehydrogenase subunit 5 gene (*nad5*) by amplifying partial *nad5* (*pnad5*) followed by sequence analysis. The results showed that the length of *pnad5* sequences was 556 bp, sequence differences in the *pnad5* was 0.0%~2.6% between the *A. lumbricoides* and *A. suum* samples. These results support that the *A. lumbricoides* and *A. suum* represent the same species.

Key words: *Ascaris lumbricoides*; *Ascaris suum*; mitochondrial DNA; *nad5*; sequence analysis

人蛔虫(*Ascaris lumbricoides*)与猪蛔虫(*Ascaris suum*)属于大型寄生线虫, 分别寄生于人和猪的小肠内。人感染蛔虫可引起重大的公共卫生问题。据估计, 全球大约有 1.2 亿人感染蛔虫, 在热带和亚热带地区蛔虫感染十分普遍^[1]。猪感染蛔虫, 可导致精神沉郁、消瘦、贫血、黄疸、腹泻、生长不良等, 甚至可引起仔猪死亡, 严重危害养猪业的发展,

同时也给国民经济带来巨大损失^[1]。许多国家已将人蛔虫和猪蛔虫纳入公共卫生学范畴^[2-3]。长久以来, 关于人蛔虫与猪蛔虫的分类一直存有争议。一些学者认为人蛔虫和猪蛔虫是同一个种, 而另外一些学者则认为是 2 个不同的种。为此, 许多国内外学者从形态学、生理生化、免疫学和分子生物学等方面对这 2 种线虫进行了比较研究, 但得到的结果

收稿日期: 2013-07-31

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0723)

作者简介: 吴昌义(1984—), 女, 重庆荣昌人, 硕士, 主要从事分子寄生虫研究, wucy198499@126.com; *通信作者, liuguohua5202008@163.com

也不尽相同^[4-6]。

许多后生动物拥有紧凑的环形的线粒体基因组,大约 14~20 kb。线粒体 DNA(mtDNA)具有分子较小,结构简单、进化速度快、基因间不发生重组和母性遗传等特点,非常适合用于群体遗传学和生物进化学研究^[7]。mtDNA 作为一种可靠的遗传标记,已被广泛应用于寄生虫的种类鉴定及种系发育研究^[8-12]。本研究利用来自中国 3 个省的人蛔虫和中国广东 4 个不同地方的猪蛔虫,分析其线粒体烟酰胺脱氢酶亚基 V 基因(*nad5*)的部分序列的特征,旨在为判断人蛔虫与猪蛔虫是否为同一个种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 虫体来源

3 个人蛔虫虫体分别来自中国山东、宁夏、广东湛江;12 个猪蛔虫虫体分别来自广东广州(5 个)、深圳(4 个)、湛江(2 个)、阳江(1 个),详见表 1。

表 1 本研究所用的人蛔虫及猪蛔虫样品及其 *nad5* 序列的 GenBank 登录号

Table 1 Geographical origins of *Ascaris* samples and their GenBank accession numbers for sequences of *nad5* gene

虫种	样品编号	地理来源	宿主来源	GenBank 登录号
<i>A. lumbricoides</i>	HA	广东	人	HQ912079
	NX	宁夏	人	HQ912077
	SD	山东	人	HQ912078
<i>A. suum</i>	GZ1	广州	猪	HQ912080
	GZ3	广州	猪	HQ912081
	GZ6	广州	猪	HQ912082
	GZ9	广州	猪	HQ912083
	GZ10	广州	猪	HQ912084
	SZ1	深圳	猪	HQ912085
	SZ2	深圳	猪	HQ912086
	SZ6	深圳	猪	HQ912087
	SZ8	深圳	猪	HQ912088
ZJ3	湛江	猪	HQ912090	
ZJ4	湛江	猪	HQ912091	
YJ1	阳江	猪	HQ912094	

1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒 Wizard DNA Clean-up System

为 Promega 公司产品;蛋白酶 K 为 Merk 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂(Buffer、MgCl₂、dNTPs 等)、DL2000 DNA Marker 为大连宝生物公司产品。

1.3 虫体总 DNA 的提取

每个成虫取一小段(1~2 cm),分别放入不同的平皿中,用双蒸水反复冲洗后,分别放在已灭菌的 1.5 mL 离心管中,剪碎并研磨,分别加入 30 μL 蛋白酶 K(50 μg/μL)和 270 μL SDS 裂解液,置于 37 °C 恒温培养箱中过夜消化。用 Promega 公司的 DNA 抽提试剂盒提取虫体 DNA。提取的 DNA 样品置于 -20 °C 的冰箱保存、备用。

1.4 目的基因片段的扩增

根据 GenBank 上已发表的猪蛔虫 mtDNA 序列^[13],设计了用于扩增人蛔虫和猪蛔虫线粒体 *nad5* 基因部分序列(*pnad5*)的引物(*nad5*-FS1:5'-TAGAGGGGCTATGAATACTG-3'; *nad5*-RA1:5'-ACGGCCATCTTGTGACCTA-3'),由上海生工生物技术有限公司合成。扩增体系为 25 μL : ddH₂O 15.75 μL ; 10× *r-Taq* PCR Buffer(Mg²⁺ free) 2.5 μL ; MgCl₂(25 mmol/L) 3.0 μL ; dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL ; 引物 *nad5*-FS1 (50 mmol/L) 0.25 μL ; 引物 *nad5*-RA1(50 mmol/L) 0.25 μL ; *r-Taq* 酶(5 U/μL) 0.25 μL ; 模板 DNA 1.0 μL。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 35 个循环,72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物用 1%TBE 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

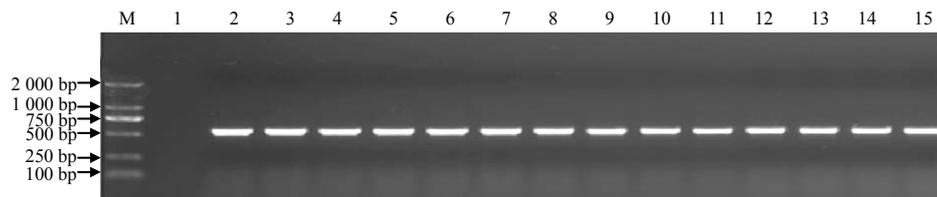
1.5 序列的分析测定

将 PCR 产物送北京华大技术有限公司测序;利用 DNAStar5.01 软件对测序结果进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 *nad5* 基因的 PCR 扩增结果

所有样品经 PCR 扩增后得到均为 516 bp(去掉上下游引物)的 *pnad5* 片段,与预期的目的片段长度相符,且无非特异性扩增条带(图 1)。



M DL2000 DNA marker ; 1 阴性对照 ; 2~15 分别代表样品 HA、NX、SD、GZ1、GZ3、GZ6、GZ9、GZ10、SZ1、SZ2、SZ6、SZ8、ZJ3、ZJ4 的 PCR 产物。

图1 人蛔虫和猪蛔虫样品 *nad5* 序列PCR扩增结果

Fig.1 PCR-amplified results of mtDNA *nad5* from representative human and pig *Ascaris* samples

2.2 序列分析

对 15 个人蛔虫、猪蛔虫样品进行核苷酸序列分析的结果显示, A+T 的含量为 68.60%~69.38%, 这与已报道的猪蛔虫线粒体基因 AT 含量(69.19%)一致。对同一地区的猪蛔虫样品 *pnad5* 序列的差异性进行比较, 广州的差异性为 0.2%~0.8%, 深圳的差异性为 0.2%~0.6%, 湛江样品的差异无统计学意义。而对这 4 个地区样品之间的序列进行比较分析, 发现存在较大的地域差异, 差异性在 0%~2.4%。对 3 个不同地区的人蛔虫核苷酸序列进行比较分析, 发现差异性在 0.2%~0.6%, 而把所有的人蛔虫和猪蛔虫样品序列进行比较分析, 它们的差异性在 0.0%~2.6%。

将所获得的人蛔虫与猪蛔虫样品分别与 GenBank 上发表的猪蛔虫(NC_001327)*pnad5* 序列进行比较, 差异性为 0.2%~2.6%, 人蛔虫和猪蛔虫与 GenBank 上发表的猫弓首蛔虫(AM411622)、犬弓首蛔虫(AM411108)、马来西亚弓首蛔虫(AM412316)相比差异性较大, 分别为 22.9%~23.4%和 22.9%~23.4%; 22.9%~23.4%和 22.6%~23.4%; 22.5%~22.8%和 21.2%~22.8%。

3 讨论

分子标记作为一种遗传标记, 为分类学提供了很好的保障, 用分子标记(特别是线粒体)来研究寄生虫的遗传进化具有其优势^[14-18]。本研究中的线粒体 *nad5* 基因, 是研究物种系统进化与分类的一种理想的分子标记^[19]。笔者对来自国内的人和猪蛔虫线粒体 *nad5* 基因序列进行了遗传变异分析, 结果表明, 人蛔虫和猪蛔虫与犬弓首蛔虫、猫弓首蛔虫、马来西亚弓首蛔虫相比差异较大, 而人蛔虫和猪蛔虫的 *nad5* 序列差异性仅为 0.0%~2.6%, 支持人蛔虫与猪蛔虫是同一个种的观点^[20-22]。

本研究中有限的样品来源和 *pnad5* 所包含的有限的信息量都不利于精确分析人蛔虫与猪蛔虫的关系, 而线粒体 DNA 受渐渗杂交和基因渗透等现象影响^[23], 这种现象也阻碍人蛔虫与猪蛔虫的准确分类; 因此, 要想更准确地推演出人蛔虫与猪蛔虫是同一个种, 还需进一步采用突变扫描测序法详细的检查来自不同地方和宿主的蛔虫线粒体和核糖体 DNA 的变异; 使用分子检测工具, 建立有效的方法去确定是否人和猪蛔虫有宿主特异性和交叉感染在流行区; 建立感染试验, 使用来源于人的蛔虫(特异性验证)去感染猪。

参考文献:

- [1] Bethony J, Brooker S, Albonico M, et al. Soil-transmitted helminth infections: Ascariasis, trichuriasis, and hookworm[J]. Lancet, 2006, 367(9521): 1521-1532.
- [2] Nejsum P, Parker E, Frydenberg J, et al. Ascariasis is a zoonosis in Denmark[J]. Journal Clinical Microbiology, 2005, 43(3): 1142-1148.
- [3] Owen I L. Parasitic zoonoses in Papua New Guinea[J]. Journal of Helminthology, 2005, 79(1): 1-14.
- [4] Anderson T C. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: Patterns of host affiliation in Guatemala[J]. Parasitology, 1993, 107(3): 319-334.
- [5] Leles D, Araujo A, Vicente A C, et al. ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil[J]. Parasitology International, 2010, 59(1): 93-96.
- [6] Arizono N, Yoshimura Y, Tohzaka N, et al. Ascariasis in Japan: Is pig-derived *Ascaris* infecting humans?[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2010, 63(6): 447-448.
- [7] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [8] Liu G H, Wang Y, Xu M J, et al. Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor*(Nematoda: Trichuridae)[J]. Infection Genetics and Evolution, 2012, 12(8): 1635-1641.

- [9] Liu G H , Gasser R B , Su A , et al . Clear genetic distinctiveness between human- and pig-derived *Trichuris* based on analyses of mitochondrial datasets[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases , 2012 , 6 : e1539 .
- [10] Liu G H , Li C , Li J Y , et al . Characterization of the complete mitochondrial genome sequence of *Spirometra erinaceieuropaei*(Cestoda :Diphyllobothriidae) from China [J] . International Journal of Biological Sciences , 2012 , 8(5) : 640-649 .
- [11] Liu G H , Shao R , Li J Y , et al . The complete mitochondrial genomes of three parasitic nematodes of birds : a unique gene order and insights into nematode phylogeny [J/OL] .BMC Genomics 2013 ,14 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/414> .
- [12] Liu G H , Chen F , Chen Y Z , et al . Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*(Acari : Ixodidae) represents a species complex[J] .International Journal of Biological Sciences , 2013 , 9(4) : 361-369 .
- [13] Okimoto R , Macfarlane , J L , Clary D O , et al . The mitochondrial genomes of two nematodes , *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*[J] . Genetics , 1992 , 130 : 471- 498 .
- [14] Liu G H , Gasser R B , Otranto D , et al . Mitochondrial genome of the eyeworm ,*Thelazia callipaeda*(Nematoda : Spirurida) , as the first representative from the family Thelaziidae[J] .PLoS Neglected Tropical Diseases ,2013 , 7 : e2029 .
- [15] Liu G H , Wang Y , Song H Q , et al . Characterization of the complete mitochondrial genome of *Spirocerca lupi* : sequence , gene organization and phylogenetic implications [J/OL] . Parasits Vectors , 2013 , 6 : <http://www.parasiteandvectors.com/content/6/1/45> .
- [16] Liu G H ,Gasser R B ,Nejsum P ,et al .Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA evidence supports the existence of a new *Trichuris* species in the endangered françois' leaf-monkey[J] . PLoS One , 2013 , 8(6) : e66249 .
- [17] 王进产 , 菅复春 , 张龙现 , 等 . 基于18 S rRNA 和HSP 70 基因序列的隐孢子虫种系发育分析[J] .畜牧兽医学报 , 2007 , 38(9) : 947-953 .
- [18] Mattiucci S , Paoletti M , Olivero-Verber J , et al . *Contraecum bioccai* n. sp . from the brown pelican pelecanus occidentalis(L) in Colombia(Nematoda : Anisakidae) : Morphology , molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds[J] . Syst Parasitol , 2008 , 6(2) : 101-121 .
- [19] Wang Y ,Liu G H ,Li J Y ,et al .Genetic variability among *Trichuris ovis* isolates from different hosts in Guangdong province , China revealed by sequences of three mitochondrial genes[J] . Mitochondrial DNA , 2013 , 24(1) : 50-54 .
- [20] Liu G H ,Wu C Y ,Song H Q ,et al .Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs[J] . Gene , 2012 , 492(1) : 110-116 .
- [21] Leles D , Gardner S L , Reinhard K , et al . Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?[J]. Parasits Vectors , 2012 , 5 : 42 .
- [22] Nejsum P , Betson M , Bendall R P , et al . Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* : Looking to the future from an analysis of the past[J] Journal of Helminthology ,2012 ,86(2) :148-155 .
- [23] Mallet J . Hybridization as an invasion of the genome[J]. Trends in Ecology Evolution , 2005 , 20 : 229-237 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维