

# 旋毛虫 ITS II 区基因的克隆及其在分类学上的应用

董晓波, 李冬梅, 花丽茹, 路义鑫, 宋铭忻\*

(东北农业大学动物医学院寄生虫学教研室, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 克隆了 6 个不同旋毛虫隔离种的核糖体 RNA ITS II 区的基因片段, 序列分析结果表明, 黑龙江省猪旋毛虫和猫旋毛虫为旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*); 犬旋毛虫为本地毛形线虫 (*Trichinella nativa*), 与传统的分类结果基本一致, 为传统的分类学方法提供了基础依据。

**关键词:** 旋毛虫; 隔离种; ITS II 区基因

中图分类号: S852.73<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)02-0173-03

## Cloning and Application of ITS II Gene of Six *Trichinella* Isolates on Taxonomy

DONG Xiao-bo, LI Dong-mei, HUA Li-ru, LU Yi-xin, SONG Ming-xin\*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The gene segment in ribosome RNA ITS II section of six *Trichinella* isolates were cloned and sequenced. The sequence analysis indicated that the isolates of swine and cat belong to *Trichinella spiralis*; the isolate of dog belongs to *Trichinella nativa*. The result was consistent in some extent with traditional classification and offered a base for the traditional taxonomy.

**Key words:** *Trichinella*; isolates; internal transcribed spacer II

旋毛虫病 (Trichinellosis) 是一种重要的人畜共患寄生虫病, 主要因生食或半生食含旋毛虫幼虫的肉类所致。过去的 20 年内, 世界上许多地区又出现了该病的暴发, 国际兽疫局 (Office International des Epizooties, OIE) 和国际旋毛虫病委员会 (International Commission on Trichinellosis, ICT) 已将其列为再次出现的疾病 (Re-emerging disease)<sup>[1~3]</sup>, 目前全世界大约有 1 100 万人体感染者, 仅在 1995—1997 年即报道了 1 万多例病人<sup>[4,5]</sup>。旋毛虫虫体很纤细, 在形态学的鉴别上有一定的难度, 旋毛虫种株的鉴定对旋毛虫病的预防、诊断和治疗有很重要的意义。本研究对旋毛虫 6 个隔离种 (Isolates) 的 rRNA ITS II 区基因进行克隆和序列分析, 以确定旋毛虫各隔离种的分类地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 虫种

试验用旋毛虫各隔离种均为东北农业大学寄生虫学教研室保种的虫体, 详情见表 1。

将 6 个旋毛虫隔离种肌幼虫各经口感染 5 只成年健康小鼠, 感染剂量为每只小鼠 200 条活幼虫, 于感染 40 d 后将含旋毛虫肌幼虫的小鼠剖杀。人工胃液消化法收集虫体, 用蒸馏水反复洗涤干净, 备用。

### 1.2 引物的设计

参考 GenBank 中发表的旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) ITS II 序列, 用 Oligo4 软件设计引物, UP: 5'-CTGTCTGAGGGTCGTTACTATTTA -3', LOW: 5'-

收稿日期: 2004-12-30

基金项目: 霍英东青年教师基金 (91034); 中国博士后科学基金 (2004035160)

作者简介: 董晓波 (1972-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 主要从事寄生虫病及寄生虫分子生物学研究。Tel: 0451-55190729; E-mail: dongxiaobo7210@163.com

\* 通讯作者: 宋铭忻, E-mail: songmx@neau.edu.cn

TCGTTTCTTTTCCACCGCTTATT -3'。引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。

表 1 试验用旋毛虫各分离种

Table 1 Origin of reference samples of *Trichinella* isolates

| 编号<br>Numbers | 分离种<br>Isolates                   | 宿主<br>Host | 来源国家和地区<br>Country and district of origin |
|---------------|-----------------------------------|------------|---|
| ISS3          | 旋毛形线虫 <i>T. spiralis</i>          | 家猪         | 波兰  |
| ISS10         | 本地毛形线虫 <i>T. nativa</i>           | 北极熊        | 挪威冷岸群岛                                    |
| HC            | 犬旋毛虫隔离种 Dog isolate               | 犬          | 哈尔滨五常                                     |
| HH            | 猪旋毛虫隔离种 Swine isolate             | 猪          | 黑龙江逊克                                     |
| SW            | 猫旋毛虫隔离种 Cat isolate               | 猫          | 黑龙江孙吴                                     |
| MP            | 美国猪隔离种 Swine isolate from America | 美国家猪       | 美国  |

### 1.3 基因组 DNA 的提取

参考文献[3]的方法,稍作改动。首先,虫体在裂解液中研磨(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH8.0, 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% SDS)。然后加 100  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K, 37  $^{\circ}$ C 水浴 3 h。然后加等体积的异丙醇和 1/10 体积的 NaAc(pH5.2), -20  $^{\circ}$ C 沉淀 30 min 或者过夜, 12 000 r/min 离心, 去上清, 用 75% 的乙醇洗沉淀, 真空抽干或者烘干, 加 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 悬浮沉淀, 备用。

### 1.4 目的基因的扩增和测序

在 50  $\mu$ L 的反应体系中加 6  $\mu$ L 10 $\times$ buffer 缓冲液、2  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTP、1  $\mu$ L 上游引物(20 pmol)、1  $\mu$ L 下游引物(20 pmol)、1  $\mu$ L rTaq(5 U/ $\mu$ L)、2  $\mu$ L 模板 DNA。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 52  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 在 DNA 扩增仪上进行。反应后取 5  $\mu$ L PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

### 1.5 PCR 产物的分离纯化和序列分析

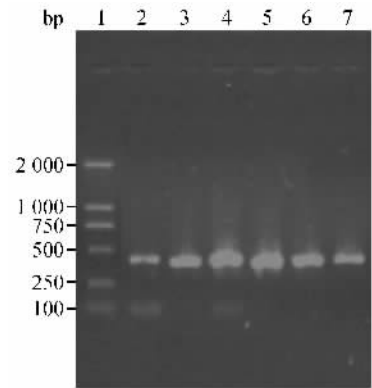
用华舜生物有限公司的小量胶回收试剂盒回收电泳后的 PCR 产物, 按试剂盒说明进行操作。将产物送上海博亚生物技术有限公司进行测序。用 DNASTAR 软件分析所测得的旋毛虫各分离种的 ITSII 基因序列。

## 2 结果

### 2.1 旋毛虫各分离种 ITSII 区电泳特征

利用参考 GenBank 中发表的 *Trichinella spiralis* ITSII 区基因序列设计的引物对猪旋毛虫、犬旋毛虫、美国猪旋毛虫、猫旋毛虫和旋毛形线虫(*Trichinella*

*spiralis*)、本地毛形线虫(*Trichinella nativa*)进行扩增均扩增出了大小为 400 bp 的目的条带(图 1)。



1. DNA 分子量标准; 2. 旋毛形线虫; 3. 本地毛形线虫;  
4. 猪旋毛虫; 5. 犬旋毛虫; 6. 美国猪旋毛虫; 7. 猫旋毛虫  
1. DNA marker; 2. *Trichinella spiralis*; 3. *Trichinella nativa*;  
4. Swine isolate; 5. Dog isolate; 6. Swine isolate from  
America; 7. Cat isolate

图 1 ITS II 区目的基因的 RT-PCR 扩增电泳

Fig. 1 Gel Electrophoresis to RT-PCR amplification of the ITS II gene

### 2.2 旋毛虫各分离种 ITS II 区序列同源性分析

用 DNASTAR 软件分析所测得的旋毛虫各分离种的 ITS II 基因序列。结果显示, 黑龙江猪旋毛虫、猫旋毛虫和美国猪旋毛虫与旋毛形线虫 ITS II 基因的同源性很高, 只有个别的碱基突变; 黑龙江犬旋毛虫与本地毛形线虫 ITS II 基因的同源性很高, 也是只有个别的碱基突变; 但是, 旋毛形线虫和本地毛形线虫的 ITS II 基因差异很大, 同源性都在 55% 左右。用 DNASTAR 和 Genedoc 软件分析的旋毛虫各分离种进化树见图 2。

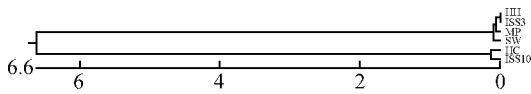


图 2 旋毛虫各隔离种基于 ITS II 区基因的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS II gene of *Tichinella* isolates

### 3 讨 论

**3.1 旋毛虫的分类一直是众多学者关注的问题,对于寄生虫的分类方法,还限于形态学、生物学、生物化学、免疫学、遗传学,这些传统的分类方法不仅繁琐,费时费力,而且对于像旋毛虫这样细小的虫体在分辨上有一定难度。徐克成(1993—1997)先后对所收集到的中国 7 省市 8 地区不同动物来源的旋毛虫隔离种的形态学、生物学、分子生物学、遗传学等方面做了系统研究,结果表明,在旋毛虫不同发育阶段,虫体各阶段之间与各地旋毛虫隔离种之间缺乏一定规律性变化,因此旋毛虫形态学指标在分类研究中缺乏一定的说服力<sup>[6~8]</sup>。1993 年,在第 8 次国际旋毛虫会议中,有些学者也提出旋毛虫形态不能作为种鉴定的依据<sup>[9]</sup>。**

**3.2 核糖体 RNA 内转录间隔区 ITS II (Internal Transcribed Spacer),在形成 rRNA 时,ITS 区被剪切,由于 ITS 区最终不参加核糖体的形成,所以受到的选择压力小,进化速率较编码区快,人们可以从不长的序列中获得较多的信息。研究发现,rRNA 内转录间隔区基因(ITS)的多态性可用于鉴定种间的甚至在形态上难以鉴别的寄生虫<sup>[10]</sup>。本研究利用 rRNA 基因的特点,对旋毛虫不同隔离种 ITS II 区序列的同源性进行分析,从分子遗传的角度为旋毛虫的分类提供了依据。**

**3.3 本研究克隆并分析了 6 个旋毛虫隔离种的 rRNA ITS II 区基因序列,序列分析结果显示,分离自黑龙江地区猪旋毛虫隔离种与标准隔离种旋毛形线虫十分相似;黑龙江犬旋毛虫和标准隔离种本地毛形线虫非常接近;分离自美国国家猪的旋毛虫的确与家猪毛形线虫病的病原 *T. spiralis* 的基因序列基本没有差异。这些结果与传统的分类方法的结果相一致<sup>[11,12]</sup>,但是值得关注的是黑龙江猫旋毛虫隔**

离种的 ITS II 区基因序列的分析显示与旋毛形线虫的同源性在 99.9%,而与本地毛形线虫的同源性只有 57.8%,这与传统的分类结果相悖<sup>[12,13]</sup>。关于猫旋毛虫的分类地位还需进一步地证实。

### 参考文献:

- [1] Cui J, Wang Z Q, Wu F, *et al.* Epidemiological and clinical studies on an outbreak of trichinosis in central China [J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 1997, 91(5): 481~488.
- [2] Wang Z Q, Cui J. Epidemiology of swine Trichinellosis in China[J]. *Parasite*, 2001, 8(2 Suppl): 67~70.
- [3] Rodiuez-Osorio M, Abad J M, de Harp T, *et al.* Human trichinellosis in southern Spain: serologic and epidemiologic study[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61(5): 834~837.
- [4] Dupouy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis [J]. *Vet Parasitol*, 2000, 93(3-4):191~200.
- [5] Murrell K D, Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly[J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30(12-13): 1 339~1 349.
- [6] 徐克成,刘明远,宋铭忻,等.应用 PCR 方法对中国旋毛虫虫株的鉴定[J]. *中国兽医学报*, 1997, 17(5): 467~469.
- [7] 徐克成,刘明远,王 嵘,等.中国旋毛虫形态度量学分析[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(4): 363~366.
- [8] 徐克成,王 嵘,王 凌,等.中国旋毛虫形态度量学分析[J]. *中国兽医寄生虫病*, 1998, 6(2): 15~20.
- [9] 朱兴全.第八次国际旋毛虫会议[J]. *中国兽医科技*, 1994, 24(9): 45~46.
- [10] 翁亚彪,谢德华,林瑞庆,等.弓形虫 ITS 及 5.8S 序列的 PCR 扩增、克隆及分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(1):70~73.
- [11] 诸欣平,刘明远,王风云,等.用 DNA 限制性片段长度多态性鉴定中国旋毛虫 3 个分离株[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 1998, 5(2): 101~106.
- [12] 刘明远,宋铭忻,杨瑞馥,等.用随意扩增的 DNA 多态性鉴定中国分离的部分旋毛虫虫株[J]. *中国兽医科技*, 1997, 27(2):18~20.
- [13] 刘明远,徐克成,宋铭忻,等.中国旋毛虫猫分离株 SW 种类归属的进一步鉴定[J]. *中国兽医科技*, 1998, 28(7): 8~10.