

广西两地旋毛虫分离株 5S rDNA 序列分析

杨益超*, 黎学铭, 欧阳颐, 谢祖英

【摘要】 目的 应用 5S rDNA 序列分析, 鉴定广西德保、南丹两地旋毛虫分离株。方法 PCR 扩增 2 个分离株 5S rDNA 片段, 并对扩增产物进行测序; 用相关软件分析序列的同源性、遗传距离, 同时构建系统发生树, 并与 GenBank 中旋毛虫相应基因序列进行比较。结果 广西德保、南丹 2 地旋毛虫分离株和 GenBank 中 *Trichinella spiralis* 的 5S rDNA 碱基序列长度相同, 为 695 bp; 变异位点 4 个, 与 *T. spiralis* 的相似度分别为 99.0% 和 99.1%, 与 GenBank 中其他相应基因的相似度低于 94.2%, 2 个分离株之间的相似度为 98.8%。2 个分离株之间及与 *T. spiralis* 间的遗传距离最小, 均为 0.014; 而与其他旋毛虫的遗传距离均大于 0.056; 用邻接法 (N-J 法) 和最大简约法 (MP 法) 构建的 2 个系统发生树中, 2 个分离株与 *T. spiralis* 位于同一分支, 自引导值分别为 96 及 99。结论 初步鉴定广西德保和南丹旋毛虫分离株均为 *T. spiralis*。

【关键词】 旋毛虫; 5S rDNA 基因; 分离株

中图分类号:R383.15

文献标识码:A

Study on 5S rDNA Sequence of Two Isolates of *Trichinella* from Guangxi

YANG Yi-chao*, LI Xue-ming, OU-YANG Yi, XIE Zu-ying

(Guangxi Zhuang Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To analyze 5S ribosomal DNA (5S rDNA) sequences of two *Trichinella* isolates from Guangxi. **Methods** The fragments of 5S rDNA were obtained by PCR from the isolates of Debao and Nandan, and sequencing was made for the PCR products. Homogeneity, genetic distance matrix and phylogenetic tree were analyzed by related software. 5S rDNA sequences of the two isolates were compared separately with those of *Trichinella* species in GenBank. **Results** 5S rDNA sequences of three *Trichinella* isolates (Debao, Nandan and *T. spiralis*) showed the same length at 695 bp. There were 4 variable positions. The homogeneities of Debao and Nandan isolates with *T. spiralis* were 99.0% and 99.1% respectively. The homogeneities between Debao isolate and Nandan isolate was 98.8%. Compared with other *Trichinella* isolates in GenBank, they were all less than 94.2%. The evolutionary distance among isolates of Debao and Nandan and *T. spiralis* was 0.014. Meanwhile, the evolutionary distances between the Guangxi isolates and other *Trichinella* isolates in GenBank were more than 0.056. Phylogenetic tree analysis revealed that two isolates of Guangxi and *T. spiralis* located at the same node, revealing a close relationship. Bootstrap confidence values in two phylogenetic trees were 96 and 99, respectively. **Conclusion** The two *Trichinella* isolates of Guangxi show a high homogeneity with *T. spiralis*, locate at the same nodes in phylogenetic tree, suggesting that the Debao and Nandan *Trichinella* isolates be identified as *T. spiralis*.

【Key words】 *Trichinella spiralis*; 5S rDNA gene; Isolate

Supported by Guangxi Health Department (No. 96112), * Corresponding author, E-mail: yyichao@tom.com

近十年来, 广西不同地区先后发生了数起旋毛虫病暴发, 病死率高达 7.14%^[1], 文献报道广西德保旋毛虫与河南旋毛虫在形态上有一定差异^[2], 这些差异是否为虫种间或地理株间的差异, 尚不清楚。鉴于虫种鉴定对追溯旋毛虫病流行病学的病原、探究暴发原

因和特征有重要意义, 本研究对广西南丹、德保两县的旋毛虫分离株进行基因测序, 通过与已知旋毛虫各种相应基因序列进行比较, 构建系统发生树, 分析其亲缘关系等, 对广西旋毛虫虫种加以鉴定。

材料与方法

1 标本来源

德保(Debao)分离株、南丹(Nandan)分离株分别

基金项目: 广西卫生厅医药卫生科研项目 (No. 96112)

作者单位: 广西疾病预防控制中心, 南宁 530021

* 通讯作者, E-mail: yyichao@tom.com

收集于广西德保和南丹两县自然感染的野鼠。

2 DNA 提取

分别提取上述两地旋毛虫分离株的 DNA, 按 DNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司) 说明书操作。

3 目的片段的扩增

根据参考文献[3]设计 5S rDNA 基因扩增引物, 上游引物为: 5'-GCG AAT TCT TGG ATC GGA GAC GGC CTG-3', 下游引物为: 5'-GCT CTA GAC GAG ATG TCG TGC TTT CAA CG-3'。PCR 反应体系及反应条件: 扩增体系 (总体积 50 μ l): 10 \times 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ 3 μ l (终浓度 1.5 mmol/L), dNTP 1 μ l (终浓度 200 μ mol/L), 模板 DNA 1 μ l, 上、下游引物各 1 μ l (终浓度 0.2 μ mol/L), Taq DNA 酶 0.3 μ l (终浓度 1.5 U), 最后用三蒸水补至 50 μ l; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 42 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

4 PCR 产物的鉴定

分别取 PCR 产物 9 μ l 与 1 μ l 10 \times 上样缓冲液混匀, 取混合液 6 μ l 加于 1% 的琼脂糖凝胶, 50 V 恒压下电泳 50 min。紫外灯下观察电泳结果。

5 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物的克隆与测序由上海博亚公司完成, 采用双向测序, 四色荧光标记法, 一次能够保证 800 bp 的测序结果。

6 数据分析

从 GenBank 检索旋毛虫株 5S rDNA 基因序列, 登录号为: AY009946 (荷兰株旋毛虫, *T. spiralis*), AY009949 (T. T8), AY009947 (米氏旋毛虫, *T. murrelli*), AY009948 (T. T6), AY009943 (布氏旋毛虫, *T. britovi*), AY009944 (乡土旋毛虫, *T. nativa*), AY009945 (纳氏旋毛虫, *T. nelsoni*), AY845861 (巴布亚旋毛虫, *T. papuae*), AY845862 (津巴布韦旋毛虫, *T. zimbabwensis*), DRE-242967 (种外对照, *Dirofilaria repens*)。采用 Dnastar 软件包中的 Megalign 和 Editseq 软件对所有 5S rDNA 基因序列进行数据处理, 采用 Clustal X (1.81) 软件结合手工排序方法, 对 2 地旋毛虫 5S rDNA 基因序列及 GenBank 中相应登录基因进行序列比较, 分别应用 Megalign 和 Mega3.1 比较上述 2 地旋毛虫 5S rDNA 基因的相似度和遗传距离, 分析各旋毛虫株间的同源性。

7 构建系统进化树

采用 Kimura 双参数法计算遗传距离。以 GenBank 中与旋毛虫 5S rDNA 相似度最大的基因登录序列为种外对照序列, 并以之确定树根位置。分别应用邻接法 (neighbor-joining, N-J) 和最大简约法 (maximum parsimony methods, MP) 对 5S rDNA 基因序列数据构建系统发生树并进行聚类分析。对系统发生树进行自举检验 (bootstrap test) 1000 次。

结 果

1 碱基序列比对

广西 2 个旋毛虫分离株与 GenBank 基因库中 *T. spiralis* 比较, 5S rDNA 碱基序列长度相同, 为 695 bp, 南丹和德保两分离株的变异位点均为 4 个, 占同源序列的 0.57%; *T. spiralis* 5S rDNA 序列中的 T25、A187、A326 和 A641 分别被德保株 C25、G187、G326 和 T641 所替代, G19、C352、T443 和 A551 分别被南丹株的 A19、T352、G443 和 G551 所替代。

2 5S rDNA 序列同源性的比较

广西德保、南丹 2 个分离株与 GenBank 中相应基因相比, 与 *T. spiralis* 相似性分别为 99.0% 和 99.1%, 与 GenBank 其他旋毛虫相比相似性分别低于 94.1% 和 94.2%, 与非成囊旋毛虫巴布亚旋毛虫的相似性均为 61.4%, 与津巴布韦旋毛虫的相似性分别为 64.3% 和 64.4%, 与种外对照的相似性均为 13.2%, 广西德保、南丹 2 个分离株之间的相似度为 98.8%。

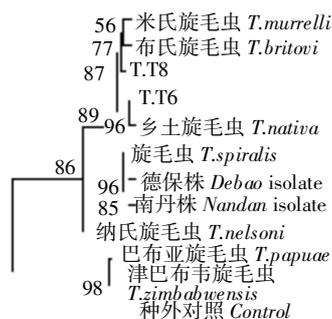
3 5S rDNA 序列遗传距离比较

广西德保、南丹 2 个分离株与 *T. spiralis* 遗传距离最小, 均为 0.014。2 个分离株与其他旋毛虫的遗传距离均大于 0.056, 与非成囊旋毛虫巴布亚旋毛虫的遗传距离最大, 均为 0.235, 与津巴布韦旋毛虫遗传距离均为 0.249, 2 个分离株之间的遗传距离为 0.014, 与种外对照的遗传距离分别达到 1.038 和 1.003, 显见广西德保、南丹 2 个旋毛虫分离株与 *T. spiralis* 遗传距离小于与其他旋毛虫种的遗传距离。

4 5S rDNA 基因序列系统发生树

采用 neighbor-joining (N-J) 法和 maximum-parsimony (MP) 法, 对广西德保、南丹 2 个分离株 5S rDNA 基因序列及 GenBank 中相应的登录序列分别绘制系统发生树 (图 1, 图 2)。2 种方法构建的系统发

生树相似, 广西德保、南丹 2 个分离株与 GenBank 中的 *T.spiralis* 均位于同一分支, 亲缘关系较近, 这一结果在 2 个系统发生树中的自引导值分别为 96、99。从系统发生树还可以看出, 广西德保、南丹 2 个分离株与 *T.papuae* 和 *T.zimbabwensis* 两种无囊包旋毛虫亲缘关系最远。



0.1

图 1 N-J 法绘制的 5S rDNA 序列系统发生树

Fig.1 Phylogenetic tree of 5S rDNA sequences by N-J method.

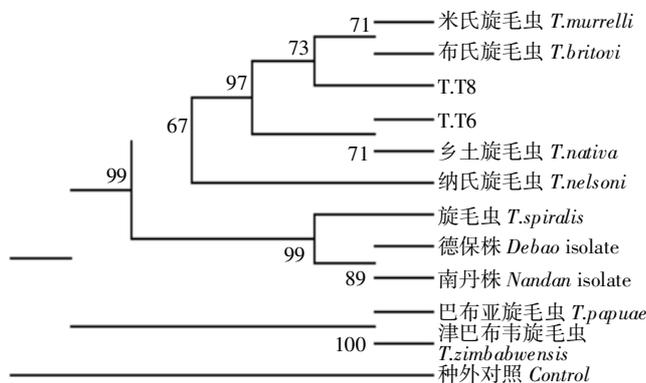


图 2 M-P 法绘制的 5S rDNA 序列系统发生树

Fig.2 Phylogenetic tree of 5S rDNA sequences by M-P method.

讨 论

DNA 是生物主要遗传物质,也是生物进化史的忠实记录者。将未知基因序列同 GenBank 中的已知序列进行比较分析,用以研究寄生虫种系发生关系十分有效^[4]。5S rDNA 片段为编码 5S rRNA 的核基因片段,属高度保守序列,不同旋毛虫种的 5S rDNA 间隔区大小及核苷酸组成有所不同,能有效区分多种旋毛虫,该基因的序列已被多数研究者用于旋毛虫虫种分析^[3,5,6]。同时,相似度和遗传距离从不同角度对不同基因进化关系进行量化表达,为探讨各旋毛虫种株间的同源程度提供了依据。

广西南丹和德保两个分离株采自广西的北部邻贵州边界和西南近越南边境,均为山区,直线距离约 400 km,其间有河流和城市分隔,没有直达的交通通道,在动物间自然传播和人为传播的可能性较小,

GenBank 中的 *T.spiralis* 为荷兰株。为鉴定广西德保和南丹两个分离株虫种,本研究选用 5S rDNA 为分子标记,首次对这两个旋毛虫分离株进行测序,并与 GenBank 中旋毛虫相应序列进行比对分析。结果显示,这两个分离株与 *T.spiralis* 比较,基因序列长度相等,变异位点仅占同源序列的 0.57%,具有相当高的同源性,相似度分别达到 99.0%和 99.1%;而与其他旋毛虫株的同源性较差,相似度均小于 94.2%;两个分离株之间的相似度为 98.8%,较 *T.spiralis* 的相似度分别小 0.2%和 0.3%,这一现象尚待进一步研究。该两个分离株与 *T.spiralis* 的遗传距离较小(均<0.014),而与其他旋毛虫的遗传距离较大(>0.056)。从而认为,该两个分离株均与 *T.spiralis* 高度同源,为同一虫种的可能性高。本研究在分析同源性及其遗传距离时采用不同的软件进行分析,减少了因软件本身可能对同源关系分析带来的误差。

构建的两个进化树具有一致性,均显示出这两个分离株与 *T.spiralis* 高度同源,位于同一分支,与非成囊的巴布亚旋毛虫和津巴布韦旋毛虫所在分支距离最远,说明广西 2 个分离株与这两种无囊包旋毛虫亲缘关系最远。建立 2 个系统发生树过程中,均从 GenBank 中找出最邻近的物种相应基因作为外围物种,精确了各分支的位置。为评价抽样误差,所有的进化树均进行了自举检验 1 000 次,确保基因树的可信度。

基于上述对 5S rDNA 基因序列分析,初步认为广西南丹和德保旋毛虫分离株均为 *T.spiralis*。

参 考 文 献

[1] Gan YC, Chen ZQ, Yang L, et al. Epidemiological survey on *Trichinella* in Baizhan, Debao, Guangxi[J]. Guangxi Prev Med, 1995, 1: 163-165. (in Chinese)
(甘耀成, 陈正清, 杨兰, 等. 广西德保县百站屯旋毛虫病流行病学调查[J]. 广西预防医学, 1995, 1: 163-165)

[2] He WT, Yang YC, Lu XG, et al. Morphological study on two *Trichinella* isolates in China [J]. Guangxi J Prev Med, 2000, 6: 121. (in Chinese)
(何为涛, 杨益超, 吕先纲等. 我国两地区旋毛虫形态学比较[J]. 广西预防医学. 2000, 6: 121)

[3] Bruyne AD, Helene Y, Guerhier FL, et al. Simple species identification of *Trichinella* isolates by amplification and sequencing of the 5S ribosomal DNA intergenic spacer region[J]. Vet Parasitol, 2005, 132(1-2): 57-61.

[4] Liu LX, Blaxter ML, Shi A. The 5S ribosomal RNA intergenic region of parasitic nematodes: variation in size and presence of L1 RNA[J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 83:2 35-239.

[5] Rombout YB, Bosch S, Van Der Giessen JW, et al. Detection and identification of eight *Trichinella* genotypes by reverse line blot hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 642-646.

[6] Van Der Giessen JW, Fonville M, Briels I, et al. Phylogenetic analysis of encapsulated and non-encapsulated *Trichinella* species by studying the 5S rDNA tandemly repeated intergenic region[J]. Vet Parasitol, 2005, 132(1-2): 51-55.

(收稿日期:2006-06-29 编辑:高石)