

浙江天台、宁海县并殖吸虫 DNA 序列研究

柳建发¹, 廖 奇¹, 蒋雯雯¹, 陈韶红²

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025)

摘要: 为了解浙江各地肺吸虫的遗传背景, 对天台县和宁海县并殖吸虫的虫种进行了 DNA 序列分析, 以期探讨并殖吸虫的虫种命名和其与临床致病的联系。采用 DNA 测序技术, 对两地并殖吸虫囊蚴的核糖体 DNA 第二间区(ITS2)的基因序列进行测定, 并观察囊蚴形态。通过 ITS2 的基因序列与从 GenBank 检索到的卫氏并殖吸虫序列比较, 结合形态观察, 确定天台、宁海县的肺吸虫为卫氏并殖吸虫; 而宁海县的并殖吸虫 ITS2 序列与卫氏并殖吸虫相似, 但囊蚴的形态却存在大小之分。

关键词: 浙江省; 并殖吸虫; DNA 序列

中图分类号: R383.2⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 02-0109-04

并殖吸虫病是由并殖吸虫引起的一种疾病, 流行于亚洲、非洲和美洲 25 个国家。并殖吸虫通过淡水螺、螃蟹或小龙虾感染人类及其他动物(如猫、狗等), 因此, 并殖吸虫引起的并殖吸虫病是一种人兽共患疾病^[1]。在我国并殖吸虫病的患病率达 1.17%^[2], 全球有 293.8 万人受到并殖吸虫的威胁, 其中 195 万人居住在中国^[3], 且并殖吸虫病在中国的患病率有逐年上升的趋势^[2]。并殖吸虫的种群有很多, 目前全球报道的有 50 多种, 其中有 38 个种群在中国发现, 并且以卫氏并殖吸虫和斯氏并殖吸虫最为盛行。卫氏并殖吸虫发现早, 分布广泛, 而且其是人的最主要的致病虫种, 已在除新疆、宁夏、青海、西藏、内蒙古等外的中国大部分省份中发现, 而斯氏并殖吸虫则主要分布在中国的南部地区, 如云南、广西、贵州、四川、浙江、江西等地^[4]。此外, 20 世纪 70 年代, 日本学者对并殖吸虫检测时, 发现卫氏并殖吸虫存在二、三倍体 ($2n=22$, $3n=33$) 两种类型, 经著名寄生虫学家 Miyazaki(宫崎一郎)收集全球标本检测比较, 发现这两型虽然在囊蚴、虫体和虫卵形态上极为相似, 但在大小上差别明显, 加上二倍体型虫体具精子, 三倍体型无; 二倍体型行交配生殖, 而三倍体型为

孤雌生殖; 对人体致病性存在三倍体型明显强于二倍体型; 在数量上二倍体型广泛分布, 而三倍体型仅发现于日本、韩国、中国的台湾、东北、安徽、浙江和福建。因此, Miyazaki 将二倍体型定名为卫氏并殖吸虫(*P. Westermani*), 将三倍体型定为肺生并殖吸虫(*P. Pulmonalis*)。近几年来, 浙江多地都有并殖吸虫虫种鉴别的报道^[5], 如金华、温州、绍兴、丽水和衢州, 但是对台州和宁波的并殖吸虫的虫种报道却很少。

浙江台州天台县和宁波宁海县气候均属亚热带季风气候, 温暖湿润, 但地形却有明显差别。天台地处浙江东部丘陵地带, 主要为山地和盆地, 而宁海位于我国大陆海岸线中段, 这两个地方均有并殖吸虫的流行, 但是到底流行哪类并殖吸虫却尚不明确。因此, 笔者拟利用并殖吸虫 ITS2 基因序列的测定, 对台州天台县雷马坑村和宁波宁海县俞山村两个流行区的并殖吸虫虫种进行鉴别, 得到这两县可能流行的并殖吸虫的虫种类别。

1 材料与方法

1.1 虫种来源

从天台县街头镇雷马坑村和宁海县深圳镇俞

山村流行区捕捉溪蟹,以捣碎、过滤、沉淀法分离卫氏并殖吸虫囊蚴,用配有测微计的显微镜测量其大小。

1.2 DNA 测序

将分离的并殖吸虫囊蚴保存于 80%的乙醇中,用 GNT 缓冲液洗 3 遍,将样本放入新离心管中,加 50 μL GNT 缓冲液和 1 μL 蛋白酶 k, 56 $^{\circ}\text{C}$ 过夜消化,然后 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min 后,取上清液得到囊蚴的基因组 DNA,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。设计 ITS2 基因在卫氏并殖吸虫的特异引物序列,上游: GGTACCG GTGGATCACTCGGCTCGTG, 下游: ACATACGT AGGTCAGCATCGAAAGCAG, 以 ITS2 基因在各个并殖吸虫种属中通用引物作为对照,引物序列为,上游: GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG, 下游: GGGATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC, 均以囊蚴基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增的反应体系为: 总体积为 25 μL 。模板 DNA 2 μL , 上下游引物 (10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , dNTPs 2 μL , MgCl_2 2.5 μL , 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , Taq 酶 (5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 补充 ddH₂O 至 25 μL 。而 PCR 扩增的条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。然后将纯化后的 PCR 产物,用 ABI PRISM 377-96 测序仪, BigDye terminatorv 2.0 为测试试剂进行测序,最后采用 ESEE 软件进行分析,得到 ITS2 的 DNA 序列。

1.3 并殖吸虫物种的确定方法

利用 BLAST 工具,将测序所得的 ITS2 序列与 NCBI 上的核苷酸数据库进行比对,得到 ITS2 最为相似的序列,将最相似序列所对应的物种作为该地方采集的并殖吸虫的种类。

2 结果

2.1 天台、宁海县并殖吸虫形态学比较

对采集的溪蟹囊蚴用显微镜观察其形态,发现天台并殖吸虫的囊蚴呈球形,平均直径为 265.54 μm , 外壁较薄,内壁较厚。从形态上看可能来自卫氏并殖吸虫(图 1(a))。而宁海采集的囊蚴按大小可分为 2 类:一类囊蚴较大(图 1(b)),另一类囊蚴较小(图 1(c))。小囊蚴平均直径为 286.69 μm ,与天台并殖吸虫囊蚴直径差别不大,可能是卫氏并殖吸虫的二倍体,而大囊蚴直径 530.094 μm ,是小囊蚴近 2 倍,可能是卫氏并殖吸虫的三倍体。

2.2 天台、宁海县囊蚴 ITS2 基因序列比较

ITS2 为核糖体内部第二转录区域,该基因序列常作为并殖吸虫物种确定以及物种进化的标记。从测序的 PCR 凝胶电泳(图 2)可以看出,利用 ITS2 基因的通用引物序列所得的天台、宁海县的 ITS 基因长度为 500 bp 左右,而利用 ITS2 基因在并殖吸虫的特异引物序列所得的 ITS 基因长度为 400 bp 左右。经测序,发现用通用引物扩增所得的两县小囊蚴的并殖吸虫 ITS 基因长度均为 520 bp,而用特异引物扩增所得的两县小囊蚴的并殖吸虫 ITS 基因长度均为 423 bp,宁海县的大囊蚴由于未分离出 DNA,没有进行测序。

利用 BLAST 软件,将两县所测的 ITS2 基因序列与 NCBI 上的 nucleotide 数据库进行比对,发现宁海县小囊蚴和天台县的 ITS2 序列与卫氏并殖吸虫的基因序列最为相似(表 1 和表 2),且无论是采用通用引物还是特异引物扩增,所得的宁海县小囊蚴的 ITS2 序列与天台县均一样,从而判定天台县和宁海县小囊蚴的并殖吸虫均为卫氏并殖吸虫。

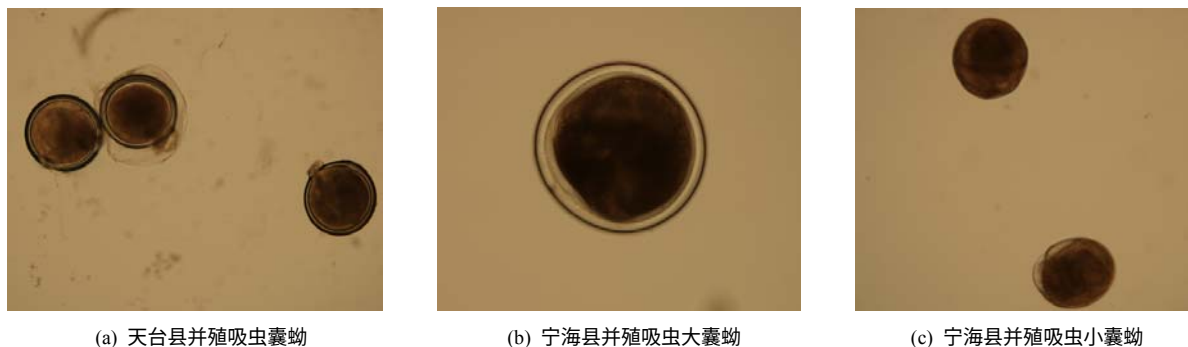


图 1 天台县和宁海县并殖吸虫囊蚴比较

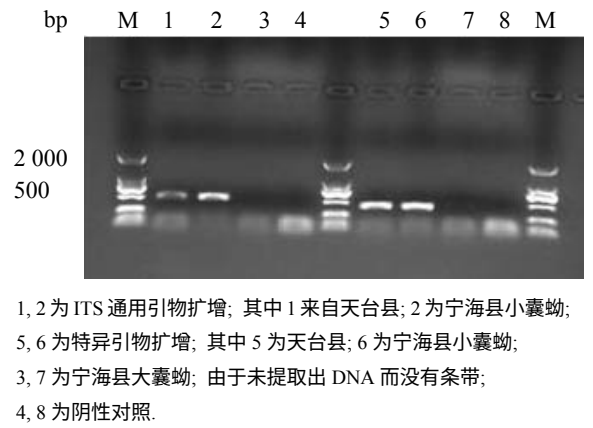


图 2 通用引物扩增产物

表 1 天台县并殖吸虫 ITS2 基因序列与核酸数据库比对

ID 号	基因描述	E 值	相似 度/%
JQ354935.1	卫氏并殖吸虫分离株遂昌 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部分序列	5.8 0.0	100
JN656186.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_34 5.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部分序列	0.0	99
JN656201.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_6 5.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部分序列	0.0	99
JN656194.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_10 5.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部分序列	0.0	99
JN656203.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_4 5.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部分序列	0.0	99

表 2 宁海县并殖吸虫 ITS2 基因序列与核酸数据库比对

ID 号	基因描述	E 值	相似 度/%
JQ354935.1	卫氏并殖吸虫分离株遂昌 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完 全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部 分序列	5.8 核 0.0	99

续表

ID 号	基因描述	E 值	相似 度/%
JN656206.1	糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完 全序列; 28S 核糖体 RNA 基因部 分序列	0.0	99
JN656194.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_105.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因 部分序列	0.0	99
JN656186.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_345.8 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因 部分序列	0.0	99
JN656201.1	卫氏并殖吸虫分离株 m_p_6 核糖体 RNA 基因部分序列; ITS2 完全序列; 28S 核糖体 RNA 基因 部分序列	5.8 0.0	99

3 讨论

20 世纪 70 年代, 日本学者发现卫氏并殖吸虫存在二、三倍体($2n=22$, $3n=33$)两种类型, 经著名寄生虫学家 Miyazaki 收集全球标本检测比较, 证实两型肺吸虫的差异^[6]。核糖体基因第二间隔区属于核基因组, 相对保守稳定, 已广泛应用于并殖吸虫种间和种内变异研究^[7]。

本研究通过囊蚴的形态以及测定 ITS2 基因序列来鉴别浙江天台、宁海县并殖吸虫的种属, 发现两县并殖吸虫的 ITS2 序列一致, 且均属于卫氏并殖吸虫。同时发现, 宁海县的并殖吸虫的囊蚴有大小之分, 小囊蚴可能为正常的二倍体卫氏并殖吸虫, 而大囊蚴则可能来自于三倍体的卫氏并殖吸虫或者新变体, 这还有待于进一步观察。

天台、宁海两县的气候均属亚热带季风气候, 但地形却有所差异, 这两地的并殖吸虫的种属一致, 说明并殖吸虫的分布可能与气候有关; 但是宁海县的并殖吸虫存在变体, 也可能与宁海县背山靠海的地形有关。本研究结果不仅为并殖吸虫在浙江省的种属分布提供了资料, 也为进一步控制并殖吸虫病在浙江省的爆发提供了依据。

参考文献:

- [1] Liu Qian. Paragonimiasis: An important food-borne zoonosis in China[J]. Trends Parasitol, 2008, 24(7):318-323.
- [2] Li Yongsong. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2005, 23(5):332-340.
- [3] Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(10):1507-1514.
- [4] Zhang Zhi, Wong Chen. Novel underfill material for wafer level packaging[J]. Encyclopedia of Smart Materials, 2005, 16(2):216-220.
- [5] Ruan Wang. Epidemiology survey of paragonimiasis in several counties of Zhejiang Province during 2000-2005[J]. Pract Prev Med, 2006, 13:14488-14489.
- [6] He Liyong. Preliminary studies on chromosomes of 9 species and subspecies of lung fluke in China[J]. Chin Med J (Engl), 1982, 95(6):404-408.
- [7] Blair D, Agatsuma T, Watanobe T. Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences[J]. Parasitology, 1997, 115:411-417.

Study on DNA Sequences of *Paragonimus* spp. in Tiantai and Ninghai Counties of Zhejiang Province

LIU Jian-fa¹, LIAO Qi¹, JIANG Wen-wen¹, CHEN Shao-hong²

(1.School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Chinese Center for Prevention and Control of Parasitic Diseases, Shanghai 200025, China)

Abstract: To analyze the DNA sequences of *Paragonimus* spp. in Tiantai and Ninghai counties of Zhejiang province and the relationship between species and clinical manifestations, the DNA sequences analysis is conducted on metacercariae of *Paragonimus* spp. in Tiantai and Ninghai counties. Using the DNA sequences and morphological observation, ITS2 sequences has shown identity of *Paragonimus* which may be considered a new species. The species of *Paragonimus* that have been identified in Tiantai county and Ninghai county might be triploid of *Paragonimus westermani* or a new species.

Key words: Zhejiang province; *Paragonimus* spp.; DNA sequences

(责任编辑 史小丽)