

华支睾吸虫病患者粪便虫卵核糖体 DNA 内转录间隔区序列分析

储言红 艾琳 钱门宝 刘妮 卢艳 陈韶红*

【摘要】目的 通过 PCR 方法扩增华支睾吸虫病患者粪便虫卵核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列进行分析, 探讨其用于华支睾吸虫感染检测的价值。 **方法** 提取 2 例华支睾吸虫患者粪便中的虫卵 DNA 作模板, 以 rDNA ITS 基因片段为目的片段进行 PCR 扩增, 对扩增片段进行测序分析。 **结果** 从 2 例患者粪便虫卵样本中均扩增出 1 123 bp 的条带, 经序列比对确定患者粪便中的虫卵为华支睾吸虫卵。测序分析发现本研究的两个样本与中国黑龙江分离株 (KF740425) 相似性为 100%。 **结论** 本研究从 2 例华支睾吸虫病患者粪便虫卵中成功扩增出 rDNA ITS 基因, 为从分子生物学角度检测华支睾吸虫病提供了资料。

【关键词】 华支睾吸虫; 虫卵; 核糖体 DNA; 内转录间隔区

Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequencing for identification of *Clonorchis sinensis* eggs in stool from human cases Chu Yanhong, Ai Lin, Qian Menbao, Liu Ni, Lu Yan, Chen Shaohong*. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasitic and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China

*Corresponding author: Chen Shaohong, Email: chensh637@163.com

Supported by National Science and Technology Major Program (2008ZX10004-011, 2012ZX100004220) and the National Key Technology Research and Development Program(2008BA156B03)

【Abstract】 Objective To amplify and analyse the internal transcribed spacer(ITS) of ribosomal DNA of *Clonorchis sinensis* eggs from patients by PCR method so as to identify the infection and explore the detective value of the method. **Methods** ITS sequence was chosen as target fragment and PCR was used to amplify the DNA of eggs from two patients, and then sequencing was done. **Results** The length of the ITS sequences was 1 123 bp from the egg samples of two patients. The eggs was confirmed as *C. sinensis*. The two isolated samples showed 100% similarity with the specimen from Heilongjiang (KF740425). **Conclusion** In this study, the rDNA ITS of egg samples from two clonorchiasis cases was identified by PCR successfully thus to provide information for detecting human clonorchiasis.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; Egg; Ribosomal DNA; Internal transcribed spacer

华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 是后睾科 (Opisthorchiidae) 支睾属 (*Clonorchis*) 吸虫, 主要寄生于人、猫、犬等动物的肝脏、胆囊和胆管, 引起华支睾吸虫病。华支睾吸虫病患者剖检可见胆囊肿大, 胆汁浓稠, 胆管及胆囊壁增厚, 肝出现脂肪变性或肝硬化^[1]。最新研究表明, 华支睾吸虫感染

也可导致胆管癌的发生^[2-3]。在我国, 除青海、宁夏、内蒙古、新疆及西藏外, 其余省份及香港均有该病传播或流行^[4]。我国华支睾吸虫病的感染呈东高西低趋势。华南地区、华东地区是我国华支睾吸虫病感染最严重的两个地区^[5]。在我国广西地区, 政府设立了华支睾吸虫病监测点, 当地疾控部门对该病的防控非常重视。

在寄生虫的分子检测中, 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 是常用的基因靶标。它位于核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 18S 和 28S 之间, 包括第一、第二内转录间隔区 (ITS-1 和 ITS-2) 两段序列, 在种内具有高度保守性, 在不同种间有不同程度的变异^[7-8], 为设计特异 PCR 引

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4122.2014.03.007

基金项目: 国家科技重大专项 (2008ZX10004011, 2012ZX10004220); 国家科技支撑计划项目 (2008BA156B03)。

作者单位: 200025 上海, 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫与病原生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

*通信作者: 陈韶红, Email: chensh637@163.com

物进行寄生虫虫种鉴别提供了可能。此外，虽然 ITS 序列以多拷贝形式存在，但其进化方式一致，从而使分类分析简化^[9-10]。

近年来，已有许多国内外学者对华支睾吸虫的 ITS 进行了研究。例如：Lee 等^[11]对来自韩国和中国广西、沈阳的华支睾吸虫 ITS 序列进行了测序与比较，发现来自这 3 个地方的华支睾吸虫 ITS-1 和 ITS-2 没有明显的差别，只有个别碱基间多态性，且无地域差异。

目前，对华支睾吸虫的研究主要集中在形态学、流行病学和病原学鉴定等方面^[12]，而对虫卵的分子生物学研究较少。本研究采用 PCR 扩增来自患者粪便中虫卵的 ITS 序列，以确定人是否感染华支睾吸虫病，为分子生物学方法在华支睾吸虫病诊断中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 华支睾吸虫病患者粪便样本

2 例患者粪便采自广西省横县肝吸虫病流行区的村民，粪检虫卵阳性。

1.2 主要试剂

Taq 酶、PCR 试剂（缓冲液、MgCl₂、dNTPs）为宝生物工程（大连）有限公司产品，蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司。Wizard® SV 基因组 DNA 纯化试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 粪便收集

患者粪便采用生理盐水涂片法，显微镜镜检。对每个粪样重复 3 次镜检，若发现华支睾吸虫虫卵，即为阳性。收集阳性粪便 4 °C 保存备用。

1.3.2 粪便虫卵的收集

每份阳性粪便样本单独收集虫卵。阳性粪便样本中加入 1 000 ml 生理盐水充分搅拌溶解，采用 40 目筛过滤掉大的粪渣，再向滤液中再加入 500 ml 生理盐水进行溶解，用 260 目筛子进行过滤，在滤液中再加入 300 ml 蒸馏水进行溶解。待样本充分沉淀后，去上清液，留取沉淀，于 4 °C 保存备用。

1.3.3 虫卵 DNA 的提取

分别吸取每个患者粪便虫卵约 50~70 个，加 300 μl 消化液（包括 NaCl 100 mmol/L；Tris_HCl (pH 8.0) 10 mmol/L；EDTA (pH 8.0) 25 mmol/L；

1% SDS；蛋白酶 K 5 g/L），再加入 1/3 体积的灭菌玻璃珠在漩涡震荡器上震荡 10 min。56 °C 充分消化后，用 Wizard® SV 基因组 DNA 纯化试剂盒提取 DNA，于 -20 °C 保存。

1.3.4 PCR 扩增

扩增 ITS 部分序列的引物是 Gasser 等^[13]所发表的引物：NC5：5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3'，NC2：5'-TTA GTT TCTT TTC CTC CGC T-3'。

反应体系总体积为 25 μl，其中蒸馏水 15.25 μl；10×PCR 缓冲液 2.50 μl；MgCl₂ 3.50 μl；dNTPs (25 mmol/l) 2.00 μl；正向、反向引物各 (50 pmol/μl) 0.25 μl；Taq 聚合酶 (5 U/μl) 0.25 μl；模板 DNA 1.00 μl。扩增条件为：94 °C 5 min；94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s，共 35 个循环；72 °C 5 min。取 5 μl PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，经紫外透射仪观察并记录结果，预期片段大小为约 1 200 bp。

1.3.5 DNA 片段序列测定及分析

将 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果用 ClustalX 1.81 软件进行分析。运用 NCBI 中的 BLAST 工具将测序结果与基因库内的基因序列进行比对并进行基因相似性分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

2 例患者的虫卵样本均成功扩增出约 1 200 bp 的目的片段，与预期 ITS 目的片段长度相符，且无非特异性条带，空白对照为阴性（图 1）。

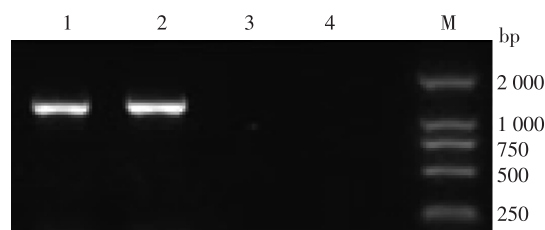


图 1 华支睾吸虫患者粪便虫卵 rDNA ITS PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析

M：DNA 标志物，1~2：患者虫卵样本，3~4：阴性对照

Fig. 1 Analysis of PCR-amplified rDNA ITS from 2 patients with *Clonorchis sinensis* by agarose gel electrophoresis
M: DNA marker, 1-2: Egg samples from the two patients, respectively, 3-4: Negative control

2.2 序列分析

采用ClustalX 1.81软件对测序结果进行去引物和BLAST分析。2个样本的ITS序列长度相同,剔除引物后,均得到1 123 bp的序列。

对扩增产物的测序结果应用NCBI中的BLAST工具进行比对后,发现其与中国黑龙江分离株(GenBank登录号为KF740425)相似性为100%,证实扩增产物为华支睾吸虫ITS基因。

3 讨论

华支睾吸虫病是严重危害人民身体健康的食源性寄生虫病,广泛分布于我国27省(市、自治区)。在广西地区,由于当地渔业发达,居民喜食鱼生,导致华支睾吸虫病病例逐年增多^[14],给该病的防治带来了困难和挑战。

目前,人体华支睾吸虫病的诊断以粪检虫卵阳性为金标准,也常采用ELISA方法检查血清作为辅助诊断,较少采用分子生物学方法确诊^[15]。但在该病的临床检测方面,由于人体华支睾吸虫虫卵数通常较少,虫卵形态小,常导致漏检,给该病的病原学检测带来困难。在该病的免疫学检测方面,由于抗原的特异性和敏感性不高,常与其他吸虫病的免疫检测产生交叉反应,使结果不可信^[16]。

近年来,分子生物学技术因其具有较高的敏感性和特异性在寄生虫病的诊断中展示了广阔的应用前景。本研究运用PCR技术检测自然感染华支睾吸虫病患者粪便中的虫卵,所用样本量少,反应体系稳定。目的基因的成功提取及扩增以及稳定的PCR反应体系的建立,为进一步探索分子生物学方法在华支睾吸虫病诊断中的应用研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, et al. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(1): 31-41.
- [2] Sell S. Infection, stem cells, and cancer signals [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12(2): 182-188.
- [3] 王乐旬, 徐劲. 华支睾吸虫致胆管癌的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2010, 37 (6): 366-370.
- [4] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23 (5): 332-339.
- [5] 吴德. 华支睾吸虫病的流行概况 [J]. 热带医学杂志, 2002, 2 (3): 277-279.
- [6] 梁树德. 广西贵港市299例华支睾吸虫病流行病学分析 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2012, 39 (5): 261-264.
- [7] Zhu XQ, D'Amelio S, Hu M, et al. Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Electrophoresis, 2001, 22 (10): 1930-1934.
- [8] Zhu XQ, D'Amelio S, Palm HW, et al. SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA [J]. Parasitology, 2002, 124 (Pt 6): 615-623.
- [9] 张道远, 陈之端, 孙海英, 等. 用核糖体DNA的ITS序列探讨中国怪柳科植物系统分类中的几个问题 [J]. 西北植物学报, 2000, 20 (3): 421-431.
- [10] Zhu XQ, D'Amelio S, Gasser RB, et al. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Parasitol Res, 2000, 86(8): 677-683.
- [11] Lee S, Sun H. Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of *Clonorchis sinensis* [J]. Korean J Parasitol, 2004, 42(3): 145-148.
- [12] Neil D, Young BE, Campbell D, et al. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(6): e719.
- [13] Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, et al. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(10): 2525-2526.
- [14] 莫太无, 吴明芬, 吴芬, 等. 广西三江县华支睾吸虫病流行病学调查[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2013, 40 (4): 196-198.
- [15] Sripa B, Kaewkes S, Intapan PM, et al. Food-borne trematodiasis in Southeast Asia: epidemiology, pathology, clinical manifestation and control [J]. Adv Parasitol, 2010, 72: 305-350.
- [16] 蒋守富. 重组华支睾吸虫诊断抗原研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(2): 155-158.

(收稿日期: 2014-03-10)

(本文编辑: 陈勤)