

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК ГЕЛЬМИНТОВ ИЗ
РОДОВ *FASCIOLA*, *ECHINOCOCCUS* И *TRICHINELLA*

Р.Г. МАНГАСАРЯН¹, А.М. АСАТРЯН¹, С.К. СЕМЕНОВА²

¹Армянский государственный педагогический университет
им. Х. Абовяна, 0010, Ереван, пр. Тигран Меци 17
e-mail: *fiziologia2009@mail.ru*

² Институт гена РАН, 117011, Москва, ул. Вернадского, 10
e-mail: *simagen@mail.ru*

Поступила в редакцию 15 октября 2013г.

*В работе применен метод полимеразной реакции (ПЦР) для идентификации родов *Fasciola*, *Echinococcus* и *Trichinella*. Доказано, что метод можно использовать в филогенезе и систематике гельминтов.*

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *Fasciola*, *Echinococcus*, *Trichinella*.

В продолжение изучение исследований по генетического полиморфизма ДНК гельминтов, используя сравнительно новый молекулярно генетический метод полимеразной цепной реакции (PCR) со случайными праймерами (RAPD-PCR). Он основан на взаимодействии синтетических олигонуклеотидных праймеров со случайными участками ДНК, которые присутствуют в геноме гельминтов. Распределение таких участков может быть специфичным для данного вида. Кроме того, в ходе полимеразной цепной реакции между случайными праймерами нарабатываются (амплифицируются) фрагменты ДНК, некоторые из которых

соответствуют полиморфным участкам генома. При электрофорезе наблюдается спектр амплифицированных ДНК-продуктов характерный для каждого генотипа. Эффективность метода, т.е. возможности дифференциаций генотипов, связана с подбором праймеров, условиями проведения реакции амплификации, электрофоретическим фракционированием и детекцией ДНК-продуктов. Метод является менее трудоемким и позволяет выявлять маркерные участки генома у исследуемого вида. При этом, наподобие ДНК-фингерпринтинга, можно решать проблемы идентификации и установление родства организмов.

Возможности метода ранее продемонстрированы на примере возбудителей ряда паразитарных заболеваний – лейшманий, споровиков, возбудителя малярии [1-5], а также болезнетворных грибов [1,2]. Имеется ряд публикаций по использованию РСР для анализа гельминтов [6-9], и лишь недавно начали применять вариант RAPD-PCR для систематики гельминтов [10-12].

Материалы и методы

В работе использована ДНК гельминтов различных штаммов, видов и родов.

В семействе Taeniidae (класс Cestoda) изучены представители родов Taenia и Echinococcus – *Cysticercus ovis* и *Echinococcus granulosus* (цистицерк и эхинококк).

В семействе Fasciolidae (класс Trematoda) исследован представитель рода Fasciola – *F. hepatica* (сосальщик печеночный).

В семействе Trichinellidae (класс Nematoda) изучены представители рода Trichinella.

В семействе Trichostrongylidae (класс Nematoda) исследован представитель рода Nematodirus – *N. spatiger*.

Сбор материала производился от разных животных - хозяев. Так, протосколексы эхинококка были собраны от свиней, цистицерка и нематодируса – от овец. Взрослые особи *Fasciola hepatica* - от крупного рогатого скота (КРС) и от кролика.

Трихинеллы получали после пассажей на мышах линии BALB/c. Мышечных личинок выделяли стандартным методом переваривания в искусственном желудочном соке. Использовались следующие изоляты трихинелл: *T. spiralis* – от свиньи,

использовались многократные пассажи на лабораторных мышах; от медведя, личинки были выделены после первого пассажа на мышах; от лисы, личинки выделялись после второго пассажа; от волка, личинки выделялись после второго пассажа. *T.pseudospiralis* – от свиньи, личинки были выделены после многократных пассажей на мышах. Гельминты *F.hepatica* собирались от крупного рогатого скота из нескольких районов Курской и Калужской областей. Были выделены из печени крупного рогатого скота половозрелые фасциолы, достигшие стадии мариты (1,1–1,9 см) и молодые особи (0,6–0,8 см) от КРС из одного района Курской области.

Во всех случаях (за исключением фасциол) ДНК выделяли из смеси личинок, полученных от одного животного. У фасциол можно было выделить ДНК отдельной особи, по этому мы провели сравнение ДНК единичной фасциолы и смеси нескольких фасциол из одной и той же печени.

Выделение и очистку ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом, с использованием протеиназы К и последующим осаждением этанолом.

Реакцию амплификации проводили по стандартной методике [13], в объеме 25 мкл, содержащем 60 мМ Трис-НCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Твин 20, 100 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 0,1 мкМ праймера, 25 ng геномной ДНК, 0,5 единиц Taq-полимеразы. В качестве контроля использовали пробу, содержащую полную амплификационную смесь, но без добавления ДНК.

В работе использовали несколько олигопраймеров следующего состава:

П 1 - 5' - ACCGGGAGACGG (AG) GTCTCGCT,

П 2 - 5' - CCGGCCTTAC,

П 3 - 5' - CGCCCATGGTTAGACTTAGT,

П 4 - 5' - GCTTAGCCGAATTGGC,

П 5 - 5' - GTAAAAGGACGGCCAGT.

Амплификацию проводили на амплификаторах НПО г. Санкт-Петербург и "MJ Research" в течение 35 циклов.

Использовали следующие циклы амплификации: 2 минуты при 42-55⁰С (отжиг), 2 минуты при 72⁰С (синтез), 1 минута при 94⁰С (денатурация).

В пробирку с амплифицированным образцом вносили 50 мкл

хлороформа, перемешивали, центрифугировали на микроцентрифуге 30 сек. Водную фазу, содержащую амплифицированную ДНК анализировали в 1,5-2% агарозном геле с добавлением бромистого этила. В качестве маркеров молекулярного веса использовали ДНК фага лямбда, гидролизованную рестриктазой Hind III, и ДНК плазмиды pBR 322, гидролизованную рестриктазой Mva I.

Результаты и обсуждение

Спектры ДНК продуктов печеночного сосальщика (*Fasciola hepatica*), полученных с помощью PCR и фракционированных электрофорезом в агарозном геле, с использованием пяти различных праймеров показали, что основная зона разделения лежит в области от 2 до 0,5 тысяч пар нуклеотидов. Видно, что из пяти использованных праймеров лишь п1, п2 и п5 были достаточно эффективны – о чем свидетельствует большое количество интенсивных полос.

Идентичные спектры получены для амплифицированных ДНК гельминтов, с использованием п5, ДНК изолята *T.pseudospiralis* (от свиньи), амплифицированная в двух независимых реакциях. Несмотря на отсутствие в средней зоне ряда фрагментов у *T.spiralis* (по – видимому, реакция не прошла полностью) видны отличия спектров *T.spiralis* и *T.pseudospiralis*.

Для *Echinococcus granulosus* наблюдаемый спектр состоит из большего, по сравнению с *T.pseudospiralis* числа фрагментов. Помимо этого отдельные фрагменты у этих видов отличаются по интенсивности окрашивания (основная зона разделения фрагментов 2-0,2 т.п.н.).

Результаты анализа ДНК представителей родов *Taenia*, *Echinococcus* и *Trichinella* получали используя в качестве случайного праймера п2. *Echinococcus granulosus* и *Cisticercus ovis* резко отличаются между собой по ДНК – спектрам, полученным с помощью п2, очевидны их отличия и от распределения фрагментов у *F.hepatica*. Следует отметить, что для каждой из изученных ДНК, мы проводили неоднократные амплификации, и в работе приведены результаты, подтверждающиеся в разных экспериментах. Мы также анализировали фасциол, выделенных из печени и экспериментально

зараженного кролика. О региональной изменчивости ДНК фасциол можно судить при сравнении ДНК – спектров фасциол, выделенных из печени двух коров из Курской и одной коровы из Калужской областей. Помимо этого, сравнивали спектры ДНК единичной фасциолы и смеси ДНК пяти фасциол, выделенных из печени одного и того же животного. Возрастная изменчивость продемонстрирована при сравнении спектров ДНК половозрелых и неполовозрелых фасциол, выделенных из печени КРС одной и той же области (Курской).

При таком подходе нам не удалось обнаружить достоверных отличий в спектрах ДНК единичной особи и смеси ДНК от пяти особей. Также не найдены изменения в спектре у фасциол от двух коров из Курской области. Между фасциолами от КРС из двух разных областей выявлены небольшие достоверные отличия, заключающиеся в изменении взаиморасположения 3-4-х фрагментов.

Наибольшие различия среди фасциол найдены при сравнении ДНК фасциол из печени КРС и кролика. В спектре фасциол кролика заметно не только явное уменьшение числа амплифицированных фрагментов (8 вместо 11-14 у КРС), но и появление двух специфичных фрагментов (в области 380 п.н. и 1060 п.н.).

Различия между *F.hepatica* и *C.ovis* представителей Trematoda и Cestoda спектры амплифицированной ДНК представителей класса Nematoda: трех изолятов *T.spiralis* и *Nematodirus*. Как и при использовании $p1$, наибольшие различия обнаружены между спектрами представителей четырех родов – *Trichinella*, *Nematodirus*, *Fasciola*, *Taenia*. Изоляты трихинелл, отличались между собой значительно меньше, т.к. для всех трихинелл число совпадающих фрагментов ДНК весьма значительно.

Сравнительно нового молекулярно-генетического метода для идентификации и дифференциации представителей разных семейств, родов, видов и внутривидовых изолятов гельминтов. Перед нами стояла задача продемонстрировать возможности его применения для геномной идентификации гельминтов, полученных из различных регионов, а также подобрать олигонуклеотидные праймеры и провести оптимизацию условий проведения полимеразной цепной реакции. Предполагалось, что полученная информация может быть использована не только для

идентификации, но и таксонами гельминтов. Подбор праймеров осуществляли для выявления наиболее информативных (полиморфных) маркеров. Исходя из картин разделения амплифицированных фрагментов ДНК, мы остановились на праймерах п1, п2, п5, по которым обнаружена наибольшая вариабельность ДНК.

Для целей идентификации родов нами были взяты гельминты *Trichinella*, *Nematodirus*, *Fasciola*, *Echinococcus* и *Custicercus*. Между представителями трех классов гельминтов - Cestoda, Nematoda и Trematoda найдены весьма значительные различия, заключающиеся в отсутствии общих, одинаковых по электрофоретической подвижности фрагментов. Различия между представителями пяти изученных родов также весьма очевидны, хотя у некоторых видов можно обнаружить в спектрах незначительное число идентичных фрагментов. Так, по 2-3 общих фрагмента можно выявить при сравнении *Trichinella* и *Custicercus*, *Trichinella* и *Nematodirus*, *Fasciola* и *Echinococcus*.

Идентификация представителей различных видов с помощью RAPD-PCR сейчас довольно широко используется в исследованиях, где таксономический ранг представителей еще не достаточно ясен, или возникло множество неоднозначных данных. Это, в частности, относится к паразитологии и гельминтологии. Так, достаточно хорошо изучены с помощью RAPD-PCR, например представители рода *Shistosoma* [14] и фитопатогенные грибы рода *Rugophora* [1,2]. Среди данных, посвященных видоидентификации гельминтов этим методом, можно отметить ряд зарубежных публикаций. В них изложены данные по PCR-идентификации представителей рода *Trichinella*. В частности, в публикациях [10,11,12] отмечается различная степень дифференциации между изолятами трихинелл. В результате, в одну группу включены - *T.spiralis*, *T.britovi*, *T. nativa*, а *T.pseudospiralis* и *T.nelsoni* выделены в другую группу.

Согласно нашим данным, полученные различия по RAPD-PCR между *T.spiralis* и *T.pseudospiralis*, позволяют рассматривать их как самостоятельные группы (виды). Эти результаты совпадают с нашими предыдущими работами по изучению ДНК этих гельминтов [15,16]. Различия, обнаруженные нами между представителями группы *Trichinella*: *T.spiralis*, *T.spiralis* var. *nativa*, *T.spiralis* var.

nelsoni: не столь очевидны, как для *T.spiralis* и *T.pseudospiralis*. При сравнении спектров ДНК изолятов *Trichinella* мы обнаружили по 3-5 идентичных фрагментов, что свидетельствует о значительном сходстве их геномов, т.е. о значительном родстве. Однако, полученных нами данных пока еще недостаточно для объединения отдельных изолятов в группы. Этот вопрос требует дополнительного изучения с привлечением большего числа праймеров.

Нами выявлена внутривидовая изменчивость RAPD-маркеров при сравнении спектров ДНК печеночного сосальщика от коров из разных регионов России. Так, найдены отличия по 2-3 фрагментам в спектрах ДНК *Fasciola hepatica* из Курской и Калужской областей. Сходную картину мы наблюдали ранее при сравнении геномно - дактилоскопических отпечатков фасциол из Московской области, из Мордовии [15,16]. О внутривидовой гетерогенности свидетельствуют также белковые спектры *F.hepatica* [16]. Наличие региональной, межпопуляционной изменчивости по RAPD - маркерам характерно и для других видов гельминтов *Shistosoma* [14], *Taenia* [7]. Помимо региональных, нам удалось обнаружить различия в спектре амплифицированной ДНК у фасциол, находящихся на разных стадиях жизненного цикла. Эти различия заключались не только в изменении интенсивности окрашивания отдельных фрагментов, но и в изменении спектра распределения фрагментов в области 250-900 п.н. В качестве объяснения полученного результата можно предположить наличие онтогенетических модификаций ДНК, влияющих на параметры полимеразной цепной реакции и приводящих к изменению спектра амплифицированных ДНК-продуктов. Очевидно, что этот вопрос требует отдельного изучения.

Интересным представляется вопрос об изменчивости, наблюдаемой при смене хозяина гельминта. Отношения паразит-хозяин являются центральными в гельминтологии, т.к. именно они определяют особенности инвазионного процесса и многие вопросы ликвидации гельминтозов. До сих пор актуален вопрос влияния хозяина гельминта, на структуру генома паразита. По полученным данным трудно объяснить причины, лежащие в основе изменения амплификационного спектра у фасциол при смене хозяина-кролика

или крупного рогатого скота. Однако можно лишь утверждать, что уровень изменений в спектрах фасциол от кролика и КРС сопоставим с уровнем изменений в спектрах изолятов рода *Trichinella*, которые различаются по виду животного-хозяина (лиса, волк, медведь, свинья). Однако, эта сложная проблема может быть решена лишь при комплексном подходе с участием специалистов гельминтологов и молекулярных биологов.

Таким образом, оптимизированы условия и проведен RAPD-PCR-анализ представителей разных семейств, родов, видов и изолятов гельминтов. Описана генетическая изменчивость гельминтов разных таксономических рангов. Показано, что RAPD-PCR позволяет проводить идентификацию гельминтов, и при использовании широкого набора праймеров может дать полезную информацию для их таксономии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булат С.А. Мироненко Н.В. Видовая идентичность фитопатогенных грибов *Pyrenophora teres* Drechsler и *P. graminea* Ito et Kuribayashi // Микология и фитопатология. 1990, вып.5, т.24, с. 435-441.
2. Булат С.А., Стрелкова М.В., Сысоев В.В. Идентификация маркерных штаммов *Leishmania major*, *L. Turanica*, *L. Gerbilli* методом полимеразной цепной реакции с универсальным праймером // Мед. паразитология и паразитарные болезни. 1992. N 1, с. 21-22.
3. Ellenberger D.L., Pieniazek n.J., Mian I.S., Eberhard M.L., Lammie P.J. Cloning and characterization of the *Wuchereria bancrofti* S15 ribosomal protein // Molecular and Biochemical Parasitology. 1992, v.52. N.1, p. 131-135.
4. Hancock V., Christodoulou C., Jackson H.C. Exploitation of A 650 bp probe for quantification of *pneumocystis carini* // Eur. J. Parazitol. 1992. V.28. N.3, p. 342.
5. Bishop R., Sohanpal B., Karinki D.P., Young A.S. Detection of carrier State in *Thelaria parva* – infected cattle by the polymerase chain reaction // Parasitology. 1992, v.104, N2, p. 215-232.
6. Gotstein B., Deplazes P., Tanner I., Skaggs J.S. Diagnostic Identification of *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction //

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.
1991, v.82. N.2, p. 248-249.

7. Weiss H.M., Udem S.A., Salgo M., Tanowitz H.B., Wittner M. Sensitive and specific detection on Toxoplasma DNA in an experimental murine model: Use of Toxoplasma gondii-specific cDNA and the polymerase chain reaction // J.Infect. dis. 1991, v.163. N.1, p. 180-186.
8. Zurita M., Bieber D., Ringold G., Mansour T.E. cDNA cloning and gene characterization of the mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke Fasciola hepatica // Nucleic Acids Res. N.16, p. 7001-7012.
9. Arribas B., Siles M., Bolas F., Martinez A.R. Randomly amplified DNA polymorphism within Trichinella species and isolates // Eighth International Conference on Trichinellosis, Orvieto (Italy). 1993. Abstract book, p. 10.
10. Bandi C., La Rosa G., Comincini S., Tasciotti L., Damiani G., Wang G., Pozio E. Microtaxonomy of Trichinella spp.: consistency of results obtained by RAPD and isozyme analyses // Eight International Conference on Trichinellosis, Orvieto. 1993. Abstract book, p. 12.
11. Dupouy-Camet J., Robert F., Guillou J. P., Vallet C., Perret C., Soule C. Genetic analysis of Trichinella isolates with random amplified polymorphic DNA markers // Eighth International Conference on Trichinellosis, Orvieto. 1993. Abstract book, p. 51.
12. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1982, v. 239, p. 487-491.
13. Neto D.E., Souza C.P., Rolinson D., Katz N., Pena S.D., Simpson A.J. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species Schistosoma // Mo 1. Bioch. Parazitol. 1993, v.57. N.1, p. 83-88.
14. Романова Е.А. Анализ фасциол методом геномной дактилоскопии // Тезисы докл. Вс. Научн. Конф. "Методы профилактики и борьбы с трематодозами человека и животных". Сумы, 1991, с. 99.
15. Рысков А.П., Романова Е.А., Бенедиктов И.И., Пенкова Р.А. Анализ генетического полиморфизма возбудителей

гельминтозных заболеваний // Вестник сельскохозяйственной науки. 1990. N 6, с. 147-149.

16. Клименко В.В., Сазанов А.М. Возможность дифференциации некоторых видов трематод и их промежуточных хозяев методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле // Труды ВИГИС, т. 19, 1972, с. 102-105.

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

FASCIOLA, ECHINOCOCCUS և TRICHINELLA ՍԵՌԻ
ՀԵԼՄԻՆԹՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՏԱՐԲԵՐԱԿՈՒՄԸ ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ
ՇՂԹԱՅԱԿԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ
Ռ.Գ.ՄԱՆԳԱՍԱՐՅԱՆ, Ա.Մ.ԱՍԱՏՐՅԱՆ, Ս.Կ. ՍԵՄՅՈՆՈՎԱ

Աշխատանքում կիրառվել է պոլիմերազային շղթայական ռեակցիաների մեթոդը՝ *Fasciola*, *Echinococcus* և *Trichinella* սերի հելմինթների տարբերակման համար: Ապացուցված է, որ նշված մեթոդը կարելի է օգտագործել հելմինթների ֆիլոգենետիկ և կարգաբանությունում:

SUMMARY

IDENTIFICATION OF *FASCIOLA*, *ECHINOCOCCUS* AND
TRICHINELLA HELMINTHES DAA BY USING THE POLYMERASE
CHAIN REACTION

R.G. MANGASARYAN, A.M. ASATRYAN, S.K. SEMYENOVA

We have used the polymerase chain reaction (PCR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) method to identify DNA polymorphisms to characterized three classes of helminths: Cestoda and Nematoda. In this study, RAPD markers have been used to description of genetic variability between the families, genus, species and isolates of helminths. We optimised the conditions of RAPD analyses and revealed the genetic variability of helminths belonging to the same different taxonomic groups. This results show that the RAPD-PCR method can be considered as a suitable technique for helminths phylogenetic identifications. It was discussed the problems of age – and hostspecificity taxons.