

Использование некоторых праймеров, разработанных для близкородственных видов паразитов семейства *Ascarididae* в отношении к *Toxocara tanuki* (Yamaguti, 1941)

А.О. Уманец, аспирант, Приморская ГСХА

Определение видовой принадлежности близкородственных видов паразитов, основываясь только на их морфологических признаках, весьма затруднительная задача, так как взрослые особи и личинки нематод разных видов, но одного рода практически лишены ярких межвидовых морфологических отличий [1]. В таких случаях одним из вариантов решения проблемы детерминации

вида является поллимеразная цепная реакция (ПЦР). Данную технику успешно используют при решении таксономических вопросов для многих видов паразитических червей, включая цестод [2], трематод [3] и нематод [4].

Исследователями было разработано множество видоспецифичных праймеров для таксономического определения паразитов. Однако в связи с исключительным биоразнообразием паразитических червей не для всех видов были найдены

специфические праймеры и адаптированы методы ПЦР-диагностики.

Цель данного исследования — возможность видовой детерминации *Toxocara tanuki* методом ПЦР с использованием шести пар праймеров.

Материалы и методы. Взрослые особи *T. tanuki* были извлечены из тонкого отдела кишечника при вскрытии енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*). Исследования проводили на базе Национального университета Чонбук, Республика Корея (Chonbuk National University).

Паразиты были промыты в физиологическом растворе и заморожены при температуре -80°C для дальнейшего исследования. ДНК извлекалась из фрагментов нематод длиной 1–2 мм от четырёх разных особей. Для этой цели использовался «GeneAll Exgene™ Tissue SV min kit» по протоколу «Rodent Tail».

Для осуществления ПЦР были использованы амплификатор «TaKaRa PCR Thermo Cycler» и набор реактивов «2X Master Mix».

Последовательность праймеров, выбранных нами, их видоспецифичность, размер ожидаемых продуктов реакции и разработчики праймеров указаны в таблице. Все шесть пар праймеров таргетированы на участки митохондриальной ДНК. Параметры амплификации для каждого сета реакций были установлены в соответствии с авторскими указаниями. В качестве негативного контроля использовалась ДНК нематод (*Trichinella spiralis*; *T. nativa*; *Ascuris suum*; *T. cati*) и дистиллированная вода.

Визуализацию результатов проводили в 2-процентном агаровом геле. В качестве окрашивающего элемента использовали Save view classic, который добавляли непосредственно в ТАЕ буферный раствор при электрофорезе. Электрофорез осуществляли в течение 40–45 мин. при 110В и 20А. Для получения фотографий ПЦР-продуктов использовали Digital image system при максимальных настройках яркости ультрафиолетовой подсветки.

Результаты исследований. При использовании пар праймеров № 2, 3, 4, 6, разработанных для

видовой идентификации *T. cati*, *B. transfuga* и *B. procyonis*, были получены отрицательные результаты. После электрофореза и визуализации в агаровом геле не было обнаружено видимых ПЦР-продуктов.

При использовании сета праймеров № 6 для *T. canis* были получены множественные ПЦР-продукты длиной от 380 пар нуклеотидов (пн) до 900. Наибольшее количество амплификантов (наиболее яркие скопления) было размером 380 и 500 пн (рис. 1).

Праймеры, предложенные S. Dangoudoubiyam [5] для идентификации *B. procyonis* и *B. columnaris* (сет №1), стабильно позволяли получить ПЦР-продукты размером 146 пн. (рис. 2).

Сеты праймеров № 2, 3, 4, 6 показали отрицательные результаты со всеми образцами *T. tanuki*, поэтому они могут быть применены для исследования методом исключения.

Разработанный для *T. canis* сет праймеров № 6 не подходит для детерминации *T. tanuki*. В оригинальном исследовании D.E. Jacobs [8] данная пара праймеров при реакции с ДНК *T. canis* давала ПЦР-продукты размером только 380 пн. Наш опыт показал, что при использовании данного сета с ДНК *T. tanuki* образуются множественные продукты разного размера. Такие результаты, вероятно, вызваны неспецифическими связываниями праймеров. Причиной этого явления может быть несоответствие протокола реакции имеющимся условиям или наличие в матричной ДНК множественных участков, схожих с таргетными [9]. Полученные продукты величиной 380 пн говорят о наличии участка ДНК *T. tanuki*, схожего с таковым у *T. cati*, что может быть связано с близким родством этих паразитов и наличием генетических вариаций внутри вида [10].

Опыт применения пары праймеров № 1 показал возможность использовать её как дифференциальную для *T. tanuki*. В оригинальном исследовании в качестве негативного контроля использовались образцы ДНК *T. canis* и *T. cati*, что свидетельствует о том, что только *T. tanuki* имеет сходный таргет-

Праймеры, выбранные для исследования

Номер пары	Использованные праймеры	Спецификации праймеров	Размер ПЦР-продуктов	Автор
1	F: 5'-TGAGTTTAGTGATATTCCTGGA-3' R: 5'-CAGAAGTAATACAAAACCGGAT-3'	<i>B. procyonis</i> <i>B. columnaris</i>	146 пн	S. Dangoudoubiyam et al. [5]
2	F: 5'-GAGAACTGGCGGGG-3' R: 5'-CTCACACTGACTTACACACC-3'	<i>B. procyonis</i>	200 пн и 548 пн	Yue Xie et al. [6]
3	F: 5'-TCCTTAGTAATGAGTATTGCGT-3' R: 5'-TATAACGACATTTGAAAAACACC-3'			
4	F: 5'-TTATGAATTTTCAACATGGC-3' R: 5'-GTTAGATGCTTAAATTCAGC-3'	<i>B. transfuga</i>	301 пн	De Ambrogi et al. [7]
5	F: 5'-AGTATGATGGGCGCGCCAAT-3' R: 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'	<i>T. canis</i>	380 пн	D.E. Jacobs et al. [8]
6	F: 5'-GGAGAAGTAAGATCGTGGCAGCGCT-3' R: 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'	<i>T. cati</i>	370 пн	

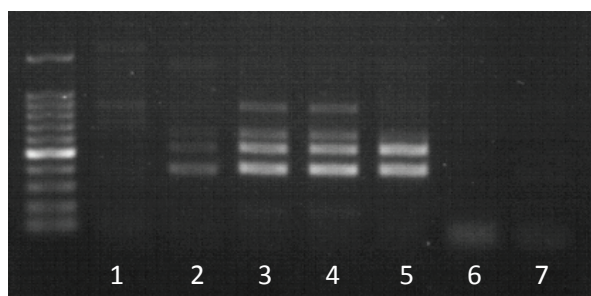


Рис. 1 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при использовании праймеров для *T. canis*:

1 – негативный контроль (DDW); 2–5 образцы ДНК *T. tanuki*; 6 – образец ДНК *T. cati*; 7 – образец ДНК *A. suus*

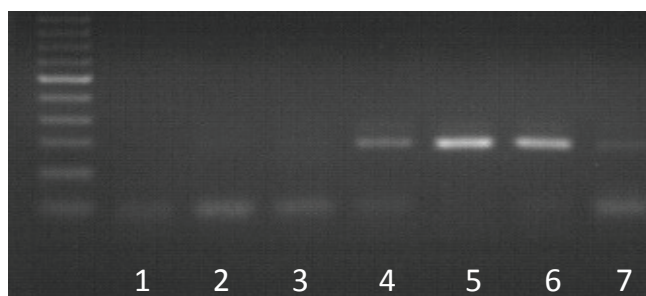


Рис. 2 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при использовании праймеров для *B. procyonis*:

1 – негативный контроль (DDW); 2 – образец ДНК *T. spiralis*; 3 – образец ДНК *T. nativa*; 4–7 – образцы ДНК *T. tanuki*

ный регион с *B. procyonis* и *B. columnaris* и может быть детерминирована среди наиболее похожих представителей рода *Toxocara*. С другой стороны, род *Porcionis*, для которого этот сет был разработан, имеет хорошо выраженные морфологические отличия, что позволяет дифференцировать взрослых особей этих двух родов без применения молекулярной техники.

В результате исследования нами был сделан вывод о том, что пара праймеров № 1, предложенная S. Dangoudoubiyam, подходит для видовой детерминации взрослых паразитов *T. tanuki*, несмотря на то что была разработана для определения другого вида. Остальные же праймеры, кроме пары № 6, могут быть использованы для исключения близких в морфологическом плане паразитов.

Литература

- Nichols R.L. The aetiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second stage *Toxocara* larvae // J. Parasitol. 1956. № 42. P. 349–362.
- Bowles J., Blair D., McManus D.P. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* // Parasitology. 1995. № 110. P. 317–328.
- Blair D., Campos A., Cummings M.P., Lacleste J.P. Evolutionary biology of the parasitic platyhelminths: the role of molecular phylogenetics // J. Parasitol. 1996. № 12. P. 66–71.
- Hoste H., Chilton N.B., Gasser R.B., Beveridge I. Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematode: Trichostrongylidae) Int. // J. Parasitol. 1995. № 25. P. 75–80.
- Dangoudoubiyam S., Vemulapalli R., Kazacos K.R. PCR assays for detection of *Baylisascaris procyonis* eggs and larvae // J. Parasitol. 2009. № 95(3). P. 571.
- Yue Xie, Zhihe Zhang, Lili Niu, Qiang Wang, Chengdong Wang, Jingchao Lan, Jiabo Deng, Yan Fu, Huaming Nie, Ning Yan, Deying Yang, Guiying Hao, Xiaobin Gu, Shuxian Wang, Xuerong Peng, Guangyou Yang. The Mitochondrial Genome of *Baylisascaris procyonis* // Plos One. 2011. Oct.
- De Ambrogia M., Aghazadeha M., Hermosilla C., Huber D., Majnaric D., Reljic S., Elson-Riggins J. Occurrence of *Baylisascaris transfuga* in wild populations of European brown bears (*Ursus arctos*) as identified by a new PCR method // Veterinary Parasitology. 2011. № 179. P. 272–276.
- Jacobs D.E., Zhu Xingquan, Gasser R.B., Chilton N.B. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat // Acta Tropica. 1997. № 68. P. 191–200.
- BIO-RAD. PCR Troubleshooting. URL: <http://www.bio-rad.com/en-nl/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel2>.
- Zhu X.Q., Jacobs D.E., Chilton N.B., Sani R.A., Cheng N.A.B.Y., Gasser R.B., Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia // Parasitology. 1998. № 117. P. 155–164.