Митохондрийн баркод ашиглан туузан хорхойн халдварын тархалтыг тогтоосон үр дүн

Ж.Тэмүүжин[1], Ө.Баярсайхан[1], Г.Өлзийжаргал[2], Ж.Хулан[1], Б.Очирхуяг[1], М.Наранхажид[2]

[1]МУИС, ШУС, Биологийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Сувилахуйн Сургууль, Ерөнхий эрдмийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-АС, Биологийн тэнхим
Цахим шуудан: narankhajid@mnums.edu.mn, Утас: 99132428

Түлхүүр үг:

Taenia multiceps
cox1 ген
12S rRNA ген
Секвенс

Товч утга: Митохондрийн дезоксирибонуклейн хүчлийн дарааллыг филогенетикийн шинжилгээ болон ангилал зүйд төрөл зүйлийг тодорхойлоход түгээмэл ашигладаг. Митохондрийн геном дахь цитохром С оксидазын дэд нэгж 1 (cox1) генийг баркод болгон ашиглахыг эрдэмтэд санал болгож байна. Митохондрийн геномын cox1 генийг ДНХ-ийн баркод болгон ашиглах болсон нь бусад генүүдтэй харьцуулахад универсал праймерууд болон илүү филогенетикийн мэдээлэл агуулдаг учраас хамгийн тохиромжтой гэж үздэг. Иймд нохойн популяцид орчих туузан хорхойн халдварлалтыг митохондрийн cox1 генийн ДНХ-ийн баркод болгон ашиглан тодорхойлох зорилгоор энэхүү судалгааг хийж гүйцэтгэлээ. Нэг агшингийн тохиолдлын сонголтоор Монгол орны 21 аймгаас нийт 1242 ялгадсыг цуглуулав. Нохойны ялгадаснаас ДНХ–ийг ялгахдаа ялгадаснаас ДНХ ялгах цомог (Stool kit; - Qiagen, Germany) -ийг ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ялган цэвэршүүлэн сангерийн аргаар нуклеотидын дарааллыг тогтоосон. Судалгаанд хамрагдсан нийт дээжүүдийн *cox*1, 12S rRNA генийн нуклеотидийн дарааллыг тогтоон Genbank-нд хадгалагдаж буй жишиг дараалалтай харьцуулан судлахад 5.2% (64/1242)-д *Taenia multiceps*-ийн халдвар илэрсэн. *T. multiceps*-ийн халдварын тархалтыг байгалийн бүс бүслүүрээр авч үзвэл тайга (12.5%), ойт хээр (6.6%), хээр (4.7%), цөлөрхөг хээр (3.4%), цөлийн (2.3%) бүсэд тус тус илрэв. *T. multiceps* халдварын хамгийн өндөр хувь *Хөвсгөл аймагт* 13.2% (7/53) тодорхойлогдлоо. *T. multiceps* болон *T. hydatigena* зүйлүүдийн хооронд генетик зай харьцангуй хол буюу 1.140-1.168; *T. hydatigena*-ийн AB792722 гаплотип нь T. *hydatigena*-н AB792721, AB792724 гаплотипүүдтэй генетик зай харьцангуй ойр буюу 0.002 байна.

Үндэслэл: Митохондрийн геном нь интронгүй, гаплоид бүтэцгүй, рекомбинаци хязгаарлагдмал, эхийн дамжуулалтаар хязгаарлагддаг[1]. Бөөмийн геномтой харьцуулахад ДНХ-ийн бар кодлох судалгаанд илүү тохиромжтой гэж судлаачид үздэг[2-4]. Митохондрийн cox1 генийг ангилал зүйд зүйлийг тодорхойлох эсвэл өөр зүйлээс ялгахад түгээмэл ашигладаг[5-7]. Учир нь cox1 генийн дарааллын хувьслын өөрчлөлтийн хурд юм[8]. Энэ хурд нь ижил төрлийн хувьд хангалттай удаан боловч өөр өөр зүйлүүдийг ялгахад хангалттай хурдан байдаг[9-15]. Тиймээс cox1 ген нь гаплотипийн шинжилгээ, генетикийн олон янз байдлыг илрүүлэхэд маш тохиромжтой. Энэхүү судалгааны зорилго нь өөр өөр улсаас GenBank-д ирүүлсэн *T. multiceps*–ийн гаплотипийн олон янз байдал, генетикийн өөрчлөлт, популяцийн генетик бүтцийг cox1 генийн нуклеотидын дарааллаар дүн шинжилгээ хийсэн судалгааны ажлууд нилээдгүй бий[12-16]. *Taenia multiceps*-ээр өвчилсөн малын хөдөлгөөн алдагдаж, уйланхайтай тал руугаа эргэх, толгойгоо юманд тулж зогсох, татаж унах, хөлөө алцайж зогсох, эрүүл тал руугаа унах зэрэг шинж тэмдэг үзүүлэх ба барилж үзэхэд уйланхайтай хэсгийн гавлын яс нимгэрч зөөлөрсөн, уулинхайн эсрэг талын нүдний харааны мэдрэлийн хөхөнцөрт цус хурсан, харааны рефлексгүй болох буюу сохорно[11]. Сэмжний уйланхайн халдварын үед малд тодорхой шинж тэмдэг

үзэгдэхгүй боловч турж эцнэ. Цочмог халдварын үед төл мал тайван байдлаа алдаж, идэш тэжээлд дургүй болох, хэвлийн хөндийг барилж үзэхэд эмзэглэлтэй байх, чацга алдах, зарим тохиолдолд биеийн халуун нэмэгдсээр үхэлд хүргэдэг учраас эдийн засагт ихээхэн хохирол учруулдаг.

Манай оронд *T. multiceps*-ийг ялгадаст туузан хорхойн өндөг хөвүүлэх шинжилгээ, саркоцистоз, нейрофиброматоз, буглаа, *C. tenuicollis*, тунгалагийн зангилааны үрэвсэл эргүүгийн гаралт, тархалтын байдал, шинж тэмдэг зэргийг харгалзан нүдний угийг харах, харшил сорил, ийлдэс судлалын шинжилгээ (цус наалдуулах шууд бус урвал)-гээр оношилно. Морфологийн (тархины цус хуралт, буглаа, тархины хавдрын эхний шатууд, тархины үрэвсэл, галзуугийн үеийн тархины гэмтэл) аргаар, задлан (нарийн гэдэсний агуулагдахууныг дараалан угаах аргаар бие гүйцсэн хорхой илрүүлэх) шинжилгээ зэргээр ялгаварлан оношлоно. Гэвч эдгээр аргуудаар туузан хорхойг халдварыг илрүүлж болох боловч туузан хорхойнуудын төрөл зүйл ялангуяа зүйлийн доторх генетекийн олон янз байдал, гаплотипийг тодорхойлох боломжгүй тул ялгадаснаас ДНХ ялгаж, полимеразын гинжин урвал тавьж, нуклеотидын дараалыг тогтоон ямар төрөл зүйл, гаплотип болохыг ялгаварлан оношилж болно. Иймд туузан хорхойн үүсгэгчийг мэдрэг болон өвөрмөц чанар 98%-аас дээш молекул генетикийн арга болох митохондрийн cox1 генийн баркодыг ашиглан судлах шаардлагатай хэмээн энэхүү судалгааг хийхийг зорилоо.

Зорилго: Монгол орны нохойн популяцид орчих *T. multiceps*-ийг митохондрийн cox1 генийн баркодоор илрүүлэн оношлох, халдварын тархалтыг тогтоох

Зорилт:

1. Монгол орны нохойн популяцид халдварласан *T. multiceps*-ийн 12S rRNA болон *cox*1 нуклеотидын дараалыг тогтоох
2. Монгол орны нохойн популяцид халдварласан *T. multiceps*-ийн *cox*1генийн нуклеотидын дараалыг баркодыг ашиглан филогенетикийн шинжилгээ хийх
3. Монгол орны нохойн популяцид халдварласан *T. multiceps*-ийн 12S rRNA генийн нуклеотидын дараалыг баркодыг ашиглан филогенетикийн шинжилгээ хийх

Арга, аргачлал: Монгол орны 21 аймгаас нийт 1242 ялгадсыг санамсаргүй түүврийн аргаар цуглуулан судалгаанд хамрууллаа. Нохойны ялгадаснаас ДНХ–ийг ялгахдаа ялгадаснаас ДНХ ялгах цомог (Stool kit; - Qiagen, Germany) -ийг ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ялган цэвэршүүлэв.

Полимеразын гинжин урвал: T. multiceps-ийн мтДНХ – н 12S rRNA (рибосомын РНХ) кодлогч генийн дараалыг олшруулахын тулд хөтлөгч гинжний cestoda-specific 60 праймер (5′-TTAAGATATATGTGG-TACAGGATTAGATACCC-3′) хоцрогч гинжний 375 праймер (5’-AACCGAGGGTGACGGGCGGGTGTG-TACC-3’) (Nickisch-Rosenegk et al., 1990), цитохром *c* оксидазийн 1-р жижиг хэсгийг кодолсон cox1 генийн нуклеотидийн дараалыг тогтоохын тулд Bowles (1993) нарын боловсруулсан хөтлөгч гинжний *cox1* JB3 праймер (5′-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3′) cox1 хоцрогч гинжний *cox1* JB4.5 праймер (5’-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3’) – ийг тус тус ашигласан. *ПГУ- ын мастер холимогийн 1 дээжинд нийт хэмжээ* 25 мкл байхаар бэлтгэв.

ПГУ-аар ДНХ-ийн олшруулалтыг Biometra® TGradient Thermal Cycler (PE Applied Biometra, German) машинд тохируулан олшруулсан. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг *Exosap-IT* урвалжаар цэвэрлэсэн. Цэвэршүүлэгч *Exosap-IT* урвалжийг 100 хос нуклеотидуудаас дээд хязгаар нь 20 кило хос нуклеотид хүртэл уртын хэмжээтэй ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг илүүдэл нуклеотид ба праймераас цэвэршүүлэх зорилгоор хэрэглэсэн.

Нуклеотидын дараалуудыг “Sanger”-ийн аргаар тогтоон, нуклеотидын дараалуудын статистик боловсруулалтыг BioEdit, ClustalW программаар боловсруулсан.

Үр дүн: Судалгаанд хамрагдсан нийт дээжүүдийн *cox*1, 12S rRNA генийн нуклеотидийн дараалыг тогтоон Genbank-нд хадгалагдаж буй жишиг дараалалтай харьцуулан судлахад 5.2% (64/1242)-д *Taenia multiceps*-ийн халдвар илэрсэн. *T. multiceps*-ийн халдварын тархалтыг байгалийн бүс бүслүүрээр авч үзвэл тайга (12.5%), ойт хээр (6.6%), хээр (4.7%), цөлөрхөг хээр (3.4%), цөлийн (2.3%) бүсэд тус тус илрэв. *T. multiceps* –ийн халдварын тархалтыг эдийн засгийн бүсээр авч үзвэл Баруун 5.0% (16/322), Хангай 7.4% (28/376), Төвийн 4.3% (16/372), Зүүн бүсэд 2.3% (4/172) илэрсэн. *T. multiceps* –ийн халдварын тархалтыг аймгуудаар авч үзвэл *Хөвсгөл аймаг хамгийн* халдварлалт (13.2%, 7/53) тодорхойлогдов.

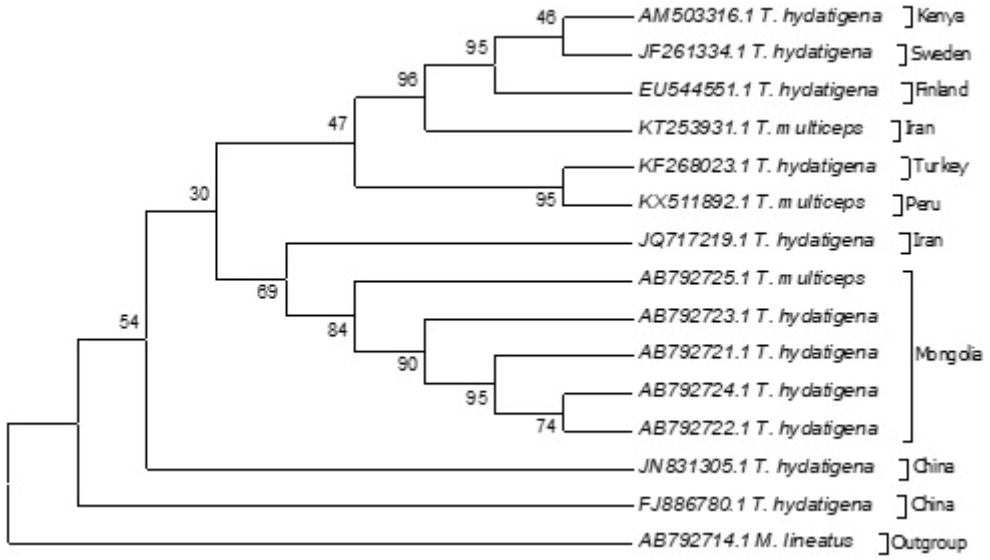
***Cox*1 генийн филогенетикийн шинжилгээ:** *Cox*1 генийн гаплотипүүд хоорондын генетик зайг үнэлэхэд *T. multiceps* болон *T. hydatigena* зүйлүүдийн хооронд генетик зай харьцангуй хол буюу 1.140-1.168; *T. hydatigena*-ийн AB792722 гаплотип нь T. *hydatigena*-н AB792721, AB792724 гаплотипүүдтэй генетик зай харьцангуй ойр буюу 0.002 байна (1-р хүснэгт).

Хүснэгт 1. **Cox1 генийн гаплотипууд хоорондын генетик зайн үнэлгээ**

№	Зүйл	1	2	3	4	5
1	AB792725.1 *T. multiceps*					
2	AB792724.1 *T. hydatigena*	0.142				
3	AB792723.1 *T. hydatigena*	*0.168*	0.028			
4	AB792722.1 T. *hydatigena*	0.140	**0.002**	0.025		
5	AB792721.1 T. *hydatigena*	0.142	0.005	0.028	**0.002**	

Тайлбар: *Генетик зайн хамгийн бага утгыг тодоор, хамгийн их утгыг ташуугаар тэмдэглэв.*

Манай оронд бүртгэгдсэн cox1 генийн шинээр бүртгэгдсэн AB792721, AB792722, AB792724, AB792725 гаплотипуудын *cox*1 генийн нуклеотидуудын дарааллыг үндэслэн удам төрлийн модыг Bootstrap replication 1000 байхаар тооцоолж, Tamura-Nei загвар ашиглан *Maximum Likelihood* аргаар байгуулахад Монголд ялгасан гаплотипууд биеэ даасан нэг мөчир болон зурагдаж байна (1-р зураг).



Зураг 1. Cox1 генийн филогенетикийн модыг Bootstrap replication 1000 байхаар тооцоолж, Tamura-Nei загвар ашиглан *Maximum Likelihood* аргаар байгуулсан бөгөөд босго утга 50 болно.

12S rRNA генийн филогенетикийн шинжилгээ: 12S rRNA генийн гаплотипүүд хоорондын генетик зайг үнэлэхэд *T. tulticeps* болон *T. hydatigena* зүйлүүдийн хооронд генетик зай харьцангуй хол буюу 1.257-1.295; *T. hydatigena*-н AB792739 болон AB787550 гаплотипүүдийн генетик зай харьцангуй ойр буюу 0.004 байна (3-р хүснэгт). Манай орны 12S rRNA генийн шинээр бүртгэгдсэн AB793738, AB787550, AB787549, AB793739, *T. multiceps*-н AB787551 гаплотипуудыг Австрали[12], Швед[13], Египт[14], Герман[15], Хятад[16] зэрэг таван орны гаплотипуудтэй харьцуулахад Монгол орны *T.hydatigena, T. multiceps* зүйлүүд гарал үүсэл нэг болох нь харагдаж байна (Зураг 2).

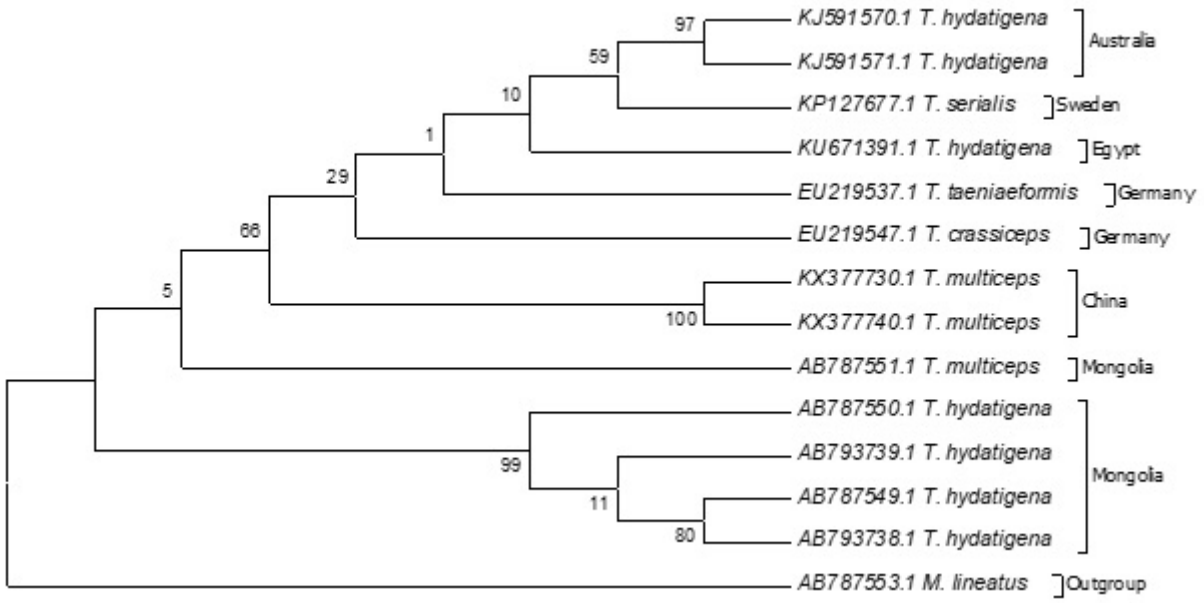
Хүснэгт 2. 12S rRNA генийн гаплотипууд хоорондын генетик зайн үнэлгээ

№	Зүйл	1	2	3	4	5
1	AB787551.1 *T. multiceps*					
2	AB793739.1 *T. hydatigena*	1.258				
3	AB793738.1 *T. hydatigena*	1.292	0.020			
4	AB787550.1 *T. hydatigena*	1.257	**0.004**	0.024		
5	AB787549.1 *T. hydatigena*	1.295	0.028	0.008	0.032	

Тайлбар: *Генетик зайн хамгийн бага утгыг тодоор, хамгийн их утгыг ташуугаар тэмдэглэв.*

Нуклеотидын дарааллыг тогтооход *T. multiceps*-ийн зүйл болохыг митохондрийн баркод болох c*ox*1 ген (AB792725); 12S rRNA генийн (AB787551) нуклеотидын дарааллаар тус тус шинээр илрүүлэн үр дүнг Genbank-нд бүртгүүлэв.

*Cox*1 болон 12S rRNA генүүдэд филогенетикийн шинжилгээ хийхэд Монгол оронд тархсан *T. multiceps* зүйлүүд газарзүйн хамааралтай ялгаралд орж генетикийн өвөрмөц бие даасан бүлэг үүсгэж байна. Cox1 болон 12S rRNA генүүдэд филогенетикийн шинжилгээ хийхэд манай орны нохой, чоно, үнэг зэрэг махчин амьтдад халдварласан тениагийн зүйлүүдийн гаплотипууд хоорондоо генетикийн хувь ойр байгаа нь уг эзэн амьтдын хооронд өвчин үүсгэгч дамжин халдварладаг болохыг харуулж байна.



Зураг 2. 12S rRNA генийн филогенетикийн модыг Bootstrap replication 1000 байхаар тооцоолж, Tamura-Nei загвар ашиглан Maximum Likelihood аргаар байгуулсан бөгөөд босго утга 50 болно.

Хэлцэмж: *Taenia multiceps*-ийн завсрын эзэн нь хүн, хонь[1-2] бусад хивэгч амьтад, жинхэнэ эзэнд нохой, муур, зарим зэрлэг махчин амьтад хамаарна[1-3]. Бидний судалгаагаар *Taenia multiceps*-ийн амьдралын мөчлөгт нохой жинхэнэ эзэн болдог байна.

Манай оронд бүртгэгдсэн cox1 генийн шинээр бүртгэгдсэн AB792721, AB792722, AB792724, AB792725 гаплотипуудыг Кения[5], Швед[6], Финлянд[7], Иран[8], Турк[9], Перу[10], Хятад[11] зэрэг долоон орны гаплотипуудтэй харьцуулахад Монгол оронд илэрсэн *T. multiceps* зүйл эволюцийн явцад генетикийн хувьд газарзүйн хамааралтай ялгаралд орсон байж болохыг харуулж байна (1-р зураг).

Митохондрийн 12S rRNA болон *cox*1 генүүдийг бусад түгээмэл хэрэглэгддэг генетик маркеруудтай харьцуулах замаар туузан хорхойн молекулын системд генетикийн баркод болгон ашиглах боломжтой гэсэн судлаачдын дүгнэлттэй[12-17] бидний судалгааны үр дүн дүйж байна.

Дүгнэлт:

1. Монгол орны нохойн популяцид халдварласан туузан хорхойн 12S rRNA болон *cox*1 нуклеотидын дарааллыг тогтооход *T. ulticeps*-ийн зүйл тодорхойлогдож *Хөвсгөл аймагт хамгийн* халдварлалт (13.2%, 7/53) илэрч байна.
2. *Cox*1 болон 12S rRNA генүүдэд филогенетикийн шинжилгээ хийхэд Монгол оронд тархсан *T. multiceps* зүйлүүд газарзүйн хамааралтай ялгаралд орж генетикийн өвөрмөц бие даасан бүлэг үүсгэж байна.
3. *T. multiceps* 12S rRNA генийн гаплотипүүд хоорондын генетик зайг үнэлэхэд генетик зай харьцангуй хол буюу 1.257-1.295 байна.

Ном зүй:

1. *Bowles J, McManus DP (1993) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus. International Journal for Parasitology, 23, 969–972.*
2. *Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach (ed. Hoelzel AR), pp. 225–270. IRL Press, Oxford.*
3. *Buhay JE (2009) "coI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. Journal of Crustacean Biology, 29, 96–110.*
4. *Calvete C, Lucientes J, Castillo JA et al. (1998) Gastrointestinal helminth parasites in stray cats from the mid-Ebro Valley, Spain. Veterinary Parasitology, 75, 235–240.*
5. *Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F (2010) DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. Briefings in Bioinformatics, 11, 440–453.*
6. *Lavikainen A, Haukisalmi V, Lehtinen MJ, Henttonen H, Oksanen A, Meri S (2008) A phylogeny of members of the family Taeniidae based on the mitochondrial cox1 and nad1 gene data. Parasitology, 135, 1457–1467.*
7. *Lefe'bure T, Douady CJ, Gouy M, Gibert J (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40, 435–447.*
8. *Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, Obrien SJ (1994) NUMT, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial-DNA to the nuclear genome of the domestic cat. Journal of Molecular Evolution, 39, 174–190.*
9. *McManus DP (2006) Molecular discrimination of taeniid cestodes. Parasitology International, 55, S31–S37.*
10. *Okamoto M, Bessho Y, Kamiya M, Kurosawa T, Horii T (1995) Phylogenetic relationships within Taenia taeniaeformis variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. Parasitology Research, 81, 451–458.*
11. *Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. Frontiers in Zoology, 7, 16. doi: 10.1186/1742-9994-7-16.*
12. *Priemer J, Krone O, Schuster R (2002) Taenia krabbei (Cestoda: Cyclophyllidea) in Germany and its delimitation from T. ovis. Zoologische Anzeiger, 241, 333–337.*
13. *Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species*

in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 13486–13491.

14. *Stahl P, Artois M (1994) Status and Conservation of the Wildcat (Felis silvestris) in Europe and around The Mediterranean Rim. Nature and Environment Series 69, Council of Europe Press, Strasbourg, pp. 78.*
15. *Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24, 1596–1599.*
16. *Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24, 4876–4882.*
17. *Zhang DX, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. Trends in Ecology & Evolution, 11, 247–251.*

Determination of the prevalence cestode with assignment of Mitochondrial DNA barcodes

Temuujin J[1], Bayarsaikhan U[1], Ulziisaikhan G[2], Khulan J[1], Ochirkhuyag B[1], Narankhajid M[2]

[1]Department of Biology, School of Sciences and Art - Biotechnology laboratory, National University of Mongolia
[2]Department of Biology, Mongolian National University of Medical Sciences
E-mail:narankhjajid@mnums.edu.mn, Tel: 99132428

Background: Mitochondrial deoxyribonucleic acid sequences are widely used in phylogenetic analysis and taxonomy for species identification. Scientists suggest using the cytochrome c-oxidase subunit 1 (*cox*1) gene in the mitochondrial genome as a barcode. The use of the mitochondrial genome gene *cox*1 as a DNA barcode is considered optimal because it contains universal primers and more phylogenetic information than other genes.

Aim: Therefore, this study was performed to determine the presence of tapeworm infection in a dog population using the mitochondrial *cox*1 gene DNA barcode.

Materials and Methods: A total of 1242 feces were collected from 21 provinces of Mongolia by random instant selection. Genomic DNAs from fecal samples were prepared using QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Tokto, Japan). The mitochondrial 12S ribosomal RNA genes (12S rRNA) and cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox1*) were amplified using primers as described. Template DNA samples were prepared using DyeTerminator Cycle Sequencing kit and all amplicons were sequenced in both directions on a 3100-Advant Genetic Analyzer.

Results: *Taenia multiceps* infection was detected in 5.2% (64/1242) of the cox1 and 12S rRNA gene nucleotide sequences from total samples analyzed with the sequence stored in Genbank. The prevalence of *Taenia multiceps* infection in the natural zone was found in the taiga (12.5%), forest-steppe (6.6%), steppe (4.7%), desert steppe (3.4%), and desert (2.3%). The highest frequency of *Taenia multiceps* infestation was 13.2% (7/53) in Khuvsgul province. The genetic distance between *Taenia multiceps* and *T. hydatigena* species is relatively large, 1.140-1.168; the haplotype AB792722 of *Taenia multiceps* is genetic distance with haplotypes AB792721 and AB792724 is relatively close, 0.002.

Conclusion: Our study showed that there is a high prevalence of infection with cyclophyllid cestodes in sheepdogs throughout Mongolia. Therefore, implementation of a comprehensive surveillance program, including evaluation of sheepdogs and their owners and wild animals in all ecological zones should be considered.

Keywords: *Taenia multiceps*, *cox1* gene, *12S* rRNA gene, sequence