

文章编号: 1000-7423(2003)-04-0210-04

我国五省美洲钩虫 COI 基因序列多态性分析

李铁华¹ 郭湘荣¹ 胡铃¹ 肖树华¹ 薛海筹¹ John Hawdon²

【摘要】 目的 测定和比较四川、海南、云南、湖北、江苏五省美洲钩虫细胞色素氧化酶 I (COI) 基因序列, 分析基因序列的多态性。方法 应用 PCR 技术扩增美洲钩虫 COI 基因, 并进行 DNA 测序和分子进化分析。结果 五省的美洲钩虫 COI 基因序列相似性为 97%~99%, 但在其 PCR 扩增获得的 595 bp 的 COI 基因片段上, 共检出 19 个核苷酸位点上的变异, 变异位点上转换明显多于颠换, 基因序列差异值为 1.34%~2.18%。结论 五省的美洲钩虫 COI 基因序列具有很高的相似性, 但特定碱基位点仍存在一定差异。

【关键词】 美洲钩虫; 细胞色素 C 氧化酶; 基因差异; 序列分析

中图分类号: R383.232

文献标识码: A

Polymorphism Analysis of Cytochrome C Oxidase 1 (COI) Gene in *Necator americanus* Collected from 5 Provinces in China

LI Tie-hua¹, GUO Xiang-rong¹, HU Ling¹, XIAO Shu-hua¹, XUE Hai-chou¹, John Hawdon²

(1 Institute of Parasitic Diseases, Chinese Centre for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025; 2 Department of Microbiology and Tropical Medicine, George Washington University Medical Center)

【Abstract】 Objective To detect and compare the COI gene sequences of *Necator americanus* collected from the provinces of Sichuan, Hainan, Yunnan, Hubei and Jiangsu, and to analyze the genetic diversity of the geographic isolates. Methods COI genes of *N. americanus* were amplified from the genomic DNA by PCR and sequenced. Results The COI gene sequences of *N. americanus* from five provinces were 97%~99% identical over 595 bp, and base variation occurred in 19 nucleotide sites in which the transition was more frequent than the transversion. The difference between the sequences ranged from 1.34% to 2.18%. Conclusion The COI gene sequences show high identity among the geographic isolates of *N. americanus* with some difference at specific nucleotide sites.

【Key words】 *Necator americanus*, cytochrome C oxidase 1, genetic diversity, sequence analysis

Supported by the Project of TMRC1 (NIH, USA No. IP50 AI39461)

据 1988~1992 年全国人体寄生虫病分布调查, 我国人群的钩虫感染率高达 17.16%, 感染人数约 1.94 亿^[1]。美洲钩虫是寄生人体的两种钩虫的一种, 在我国主要流行于南方各省、区, 也是严重危害人体健康的肠道线虫之一, 积极开展钩虫病防治刻不容缓。近年来, 随着噻嘧啶、甲苯达唑和阿苯达唑等广谱驱肠道线虫药物的应用, 钩虫病的防治取得很大进展。但是, 治疗后重复感染仍是防治工作亟待解决的问题^[2-4]。重复感染反复治疗不仅增加了费用, 还可能引起钩虫对药物产生抗性。因此, 有些学者提出发展疫苗的设想^[5], 并陆续开展了研究工作, 以期通过疫苗的应用, 达到有效地防治目的。我国幅员广阔, 分布有十二指

肠钩虫和美洲钩虫, 同一虫种还包括不同地理株。研制钩虫疫苗, 了解不同种间及同一虫种不同株间是否存在遗传差异, 具有重要的指导意义。因为钩虫分布的地理及生态环境多样, 在环境选择压力下, 钩虫为适应环境产生了一些变异及进化, 这将影响筛选疫苗用的钩虫蛋白的表达。因此, 分析钩虫不同地理株之间遗传差异和系统发生, 了解钩虫基因序列的多态性, 是有针对性研制其基因工程疫苗的前提。本文选取以美洲钩虫流行为主的四川、海南、云南、湖北、江苏五省, 采集美洲钩虫, 分析不同地理株之间美洲钩虫 COI 基因序列, 研究其基因差异, 为研制钩虫疫苗提供信息^[6]。

材料与方法

1 钩虫的采集

自四川、海南、云南、湖北、江苏省钩虫病流行

基金项目: TMRC1 (NIH, USA) 资助课题 (No. IP50 AI39461)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病学重点实验室, 上海 200025; 2 华盛顿大学医学中心微生物及热带病室

区各选取一流行村试点, 对当地居民进行粪检, 钩虫卵阳性者给予双羟萘酸噻嘧啶 10 mg/kg 顿服, 并留取药后 48 h 内的粪使用滤筛法淘虫, 随即挑取美洲钩虫保存于 100% 甲醇中备用。

2 钩虫采集地点及地理位置

从上述 5 省的 5 个点共采集美洲钩虫成虫 513 条, 均经 PCR 扩增后测序所得, 采集钩虫的各个试点及其地理位置列于表 1。

表 1 钩虫采集地点及地理位置
Table 1 Hookworm collection sites and their geographical positions

编号 Code	样本数 No. samples	采集地 Field site	地理位置 Geographical location	
			经度 Longitude	纬度 Latitude
741902	207	四川省绵阳市三台县新建乡 Xinjian village, Santai, Mianyang, Sichuan	104°23'	30°42'
882905	67	海南省陵水县五一村 Wuyi village, Lingshui, Hainan	109°88'	18°52'
863803	76	云南省普洱县新民村 Xinmin village, Puer, Yunnan	100°42'	22°40'
832001	110	湖北省阳新县三溪乡 Sanxi village, Yangxin, Hubei	115°30'	30°00'
722801	53	江苏省邳州煎庙村 Jianmiao village, Pizhou, Jiangsu	118°02'	34°21'

3 美洲钩虫成虫基因组 DNA 的提取

取单条成虫用 500 μ l TE 溶液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 洗涤 3 次, 每次 3 min。用消毒刀片切碎虫体, 加入 100 μ l 含蛋白酶 K (100 μ g/ml) GNT 缓冲液 (由 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris pH8.5, 0.01% 明胶, 0.45% NP40 和 0.45% 聚山梨酸 20 组成), 55 $^{\circ}$ C 消化过夜后经 95 $^{\circ}$ C 15 min 灭活蛋白酶 K, 12 000 g 离心 2 min, 取上清液备用^[7]。

4 PCR 扩增 COI 基因片段

用 COF14 (5'-GGTCAACAAATCATAAAG ATATTGG-3') 及 COR722 (5'-TAAACTTCA GGGTGACCAAAAAC-3') 引物^[8], PCR 扩增美洲钩虫 COI 基因。反应条件为: 模版 DNA 0.5 μ l, 10 \times 反应缓冲液 2.5 μ l, 2.5 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 2.0 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 引物各 100 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U, 加水至总体积为 25 μ l, 再用石蜡油覆盖液面。在 PCR 仪 (Perkin Elmer 480 型) 上按以下程序扩增: 95 $^{\circ}$ C 2 min 变性, 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min 及 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 次循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后取反应产物 5 μ l, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Polaroid 一次成像照相机摄影。

5 PCR 产物的提纯与测序

用 Promega 公司提供的 Wizard PCR Preps 快速 PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 用 Licor auto-sequencer-400L (美国) 测序仪测序, 测序反应体系为 T7 DNA polymerase sequencing kit (Pharmacia Biotech)。

6 基因序列比较及相似性分析

将测序结果, 经 DNA Esee3S, Bioedit 和 MEGA 2.1 分子进化遗传分析软件, 对所得基因序列进行分析, 采用邻接法 (neighbor-joining method) 和最大简约法 (maximum parsimony) 推演系统发生关系^[9,10]。

结 果

1 DNA 序列的差异

五省美洲钩虫 COI 基因序列相似性为 97%~99% (表 2), 有很高的同源性。但各地理株间仍存在特定的碱基差异 (图 1)。测序结果显示, 在 PCR 扩增获得的长度为 595 bp 的 COI 基因片段中, 共有 20 个核苷酸位点发生了变异, 差异为 3.36%, 其中发生转换 (transition) 的核苷酸位点 17 个, 分别在第 131、184 位点上发生了颠换。有 3 个省的钩虫分别在第 111,

表 2 五省的美洲钩虫 COI 基因序列的相似性
Table 2 Identity of COI genes of *Necator americanus* from 5 provinces

编号 Code no.	882905	741902	863803	722801	832001
882905	595	97%	98%	98%	98%
	0	97%	98%	98%	98%
	0	0	0	0	0
741902	582	595	99%	97%	98%
	582	0	99%	97%	98%
	0	0	0	0	0
863803	585	592	595	97%	99%
	585	592	0	97%	99%
	0	0	0	0	0
722801	585	582	583	595	97%
	585	582	583	0	97%
	0	0	0	0	0
832001	584	587	590	580	595
	584	587	590	580	0
	0	0	0	0	0

注: 相似性和碱基数分别列于对角线右上和左下
Note: Identity and the number of bases are shown above and below diagonal, respectively

882905	GGtaggtAcTAGTTTGTCTTAATTATTGGTTGGAGTGGCTAAACCTGGTTTGTGTT	60
741902	1
863803	1
722801G.....	1
832001	1
882905	GGGAAATGGTCAGTTGTATAAATCTGTATTACGGGGCATGCTATTTGATGATTTTTT	120
741902A.....A	2
863803A.....A	2
722801A.....A	2
832001A.....A	2
882905	TATGGTAATACTAGTATAAATGGTGGTTTGGTAATTGAATGTTAOCCTTAAATGTTGGG	180
741902G..C.....A..	5
863803G.....A..	4
722801GA.C.....	5
832001G.....A.....A..	5
882905	GGCTCCGGATATAAGTTTTCTCGTTTAAATAATTTAAGTTTTGGTTGTTACCTACTGC	240
741902A..A.....A...8	
863803A..A.....A...7	
722801A.....A...6	
832001A.....A...7	
882905	TATGTTTTTAATTTAGATTCTGTGTTTGTGATATAGTTGGAACTAGTTGAACGT	300
741902G.....	9
863803G.....	8
722801G.....	6
832001G.....	8
882905	TTATCCACCTTAAGTACGTTGGGACATCCAGGTAGAAGTGTGATTGGCTATTTTTAG	360
741902	9
863803	8
722801	6
832001G.....C.....	10
882905	TTTACATTGCTGCTGTTTAAAGTCTATTTTAGGGTATTAATTTTATATGTACAACAAA	420
741902	9
863803	8
722801	6
832001	10
882905	AAATTTGGGTAGTAGATCTATTTCTTTAGAGCATATAAGTTATTGTGTGAACGTGTT	480
741902G.....	10
863803G.....	9
722801C.....	7
832001	10
882905	TGTTACCGTTTTTTTGTGGTGTATCTTTACCAGTTTTGGCTGGAGCTAATCTATGTT	540
741902	10
863803	9
722801	7
832001	10
882905	GTTAACTGATCGTAATTTAAATCTCTTTTTTGTGATCCAAGTACTGGTGGTAAT	595
741902G.....G..	13
863803	10
722801A..A.....	10
832001	11

图 1 五省美洲钩虫 COI 部分基因序列 (595 bp)
Fig. 1 Partial aligned COI gene sequence of *Necator americanus* (595 bp)

178, 184, 187, 229 和 250 位核苷酸位点发生了变异, 有 4 个省在 97 和 130 位点发生了核苷酸变异, 而其他变异位点只有 1 省被检测到。此外, 不同地区的美洲钩虫种群核苷酸变异位点数量不同: 以海南为基准, 四川、云南、江苏、湖北样本依次有 12、9、9、10 个核苷酸位点发生变异。

2 系统进化树

应用 MEGA 中的邻接法和最大简约法构建 NJ 和 MP 系统进化树, 得到如图 2 的分枝结构。表明 NJ 和 MP 系统进化树的结果相一致。来自五省的美洲钩虫可以分为两种基因型, 其中云南美洲钩虫 (863803) 和四川美洲钩虫 (741902) 十分相似, 这两省以及湖南省的美洲钩虫 (832001) 同为另一基因型; 海南 (882905) 和江苏 (722801) 为另一基因型^[11,12]。

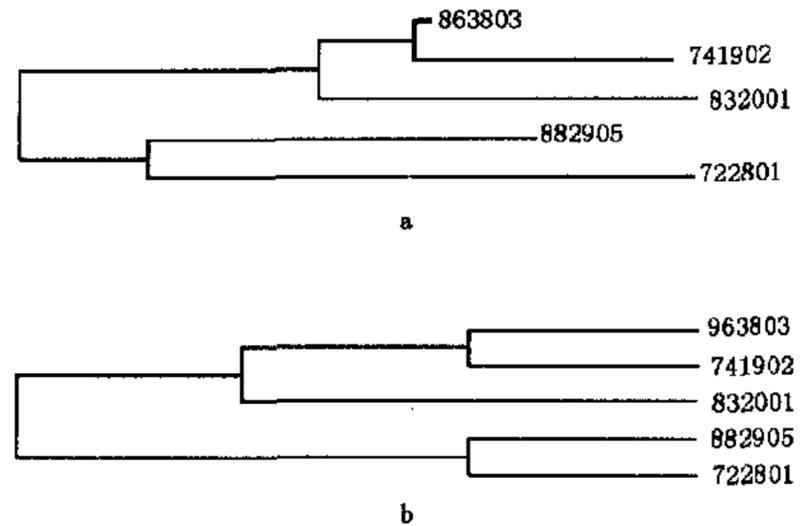


图 2 COI 基因系统进化树 a 基于 COI 基因序列构建的美洲钩虫 NJ 系统进化树 b 基于 COI 基因序列构建的美洲钩虫 MP 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Necator americanus* based on COI gene sequences a Neighbor-joining phylogram constructed using MEGA (2.1) b Maximum parsimony phylogram constructed using MEGA (2.1)

讨 论

DNA 序列分析易于定量, 是目前进行分类、分子进化和种系发生, 鉴定生物种、亚种和地理株最直接、有效、可靠的方法。COI 基因属线粒体基因, 其编码的 COI 为呼吸链的重要组分, 普遍存在于原核生物和真核生物细胞的线粒体中, 其进化速度比核基因快 10 倍以上, 故易受环境的影响及诱导而体现进化过程。此外, 由于线粒体独特的遗传特性, 依据线粒体数据进行系统发育分析也可验证变异的可靠性。对十二指肠钩虫及美洲钩虫 COI 基因序列的测定和比较发现两种人体钩虫间 COI 基因的相似性高达 89.7%^[8]。

本项研究结果表明, 在同一省钩虫样本所测结果一致的前提下, 可以推断来自同一省的样本即代表了该省的种群结构。由于核苷酸变异的位点不同, 不同地区的美洲钩虫种群间存在着丰富的遗传多态性。来自五省的美洲钩虫个体基因序列变异位点上转换明显多于颠换, 基因序列差异值在 1.34%~18% 之间。核酸分子在进化的历程中转换和颠换记载着不同的生物进化信息, 转换在进化中易于饱和, 颠换则反映物种进化^[11,12]。本文构建的 COI 基因序列 NJ 系统进化树显示, 在 COI 基因片段上云南美洲钩虫 (863803) 和四川美洲钩虫 (741902) 十分相似, 有 3 个碱基位点的变异, 而在图 2 的 NJ 系统进化树中这两个省以及湖北省的美洲钩虫 (832001) 为一个单系支, 即一个基因型。这一点可能是上述 3 省均为长江水系地理环境所致。海南 (882905) 和江苏 (722801) 两省钩虫

则组成另一分支,为另一个基因型。两个系支合并为一个姐妹群^[3]。图2的MP系统进化树也有相似的结果。提示美洲钩虫在进化过程中可能是单系发生。地理株间基因差异的大小与种内基因漂移水平的高低有密切关系。在种内杂交频繁的种群中,基因漂移的速度快,地理株间基因差异减少,而基因漂移速度慢的种群,地理株间基因差异大。基因漂移导致钩虫各地理株间基因差异的减少,同时也可能导致钩虫抗药性基因在种群中的快速传播。研究钩虫不同地理株间的基因差异从一个侧面反映了钩虫种群内基因漂移的速度和系统发生。根据本项研究,来自五省的美洲钩虫基因序列相似性为97%~99%,基因序列差异值在1.34%~2.18%之间,可能是地理株之间的基因漂移速度较快所致。

参 考 文 献

[1] 许隆祺,蒋则孝,余森海,等. 寄生虫病防治在预防保健中的地位和策略[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 20: 86-89.
[2] Hotez P, Pritchard DI. Hookworm infection[J]. Sci Am, 1995, 272: 68-75.
[3] Maizele RM, Bundy DAP, Selkirk ME, et al. Immunological modu-

lation and evasion by helminth parasites in human population[J]. Nature, 1993, 365: 797-805.
[4] Quinnell RJ, Slater AFG, Tighe PJ, et al. Reinfection with hook worm after chemotherapy in Papua New Guinea[J]. Parasitology, 1993, 106: 379-385.
[5] Hotez P, Hawdon JM, Cappell M, et al. Molecular approaches to vaccination against hookworm disease[J]. Pediatric Research, 1996, 20: 515-521.
[6] Hawdon JM, Li TH, Zhan B, et al. Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China[J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 1433-1437.
[7] 张广军,陈勤,邱持平,等. 中国大陆两种东毕吸虫 rDNA-LSU 基因的序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 86-89.
[8] 李铁华,詹斌, Hawdon JM, 等. 美洲钩虫及十二指肠钩虫细胞色素 C 氧化酶 1 基因测序[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 81-83.
[9] 刘向华,王义权,刘忠全,等. 从 Cyt b 基因序列探讨禄亚科动物的系统发生关系[J]. 动物学研究, 2003, 24: 27-33.
[10] 张亚平. 从 DNA 序列到物种树[J]. 动物学研究, 1996, 17: 247-252.
[11] 杨学干,王义权,周开亚,等. 从细胞色素 b 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系[J]. 动物学研究, 2001, 22: 345-350.
[12] 张成岗,贺福初主编. 生物信息学方法与实践[M]. 第1版. 北京: 科学出版社, 2002: 136-178.
[13] 邱高峰,常林瑞,许巧婷,等. 中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究[J]. 动物学研究, 2000, 21: 35-40.

(收稿日期: 2003-05-16 编辑: 伯韦)

【简报】

文章编号: 1000-7423(2003)-04 0213-01

海南农垦系统流动人口疟疾发病规律的探讨

段景山 刘家敬 张宇滨 张世平 陈世裕

中图分类号: R531.3 文献标识码: D

改革开放以来,大量易感人群出入疟区,疟疾局部暴发流行的报告时有所见^[1]。作者于1991~2000年对海南农垦系统流动人口疟疾疫情进行了监测,报告如下。

1 方法

实施流动人口管理,外来人口及外出回归人员均登记造册,纳入抗疟计划工作。“四热病人”镜检厚、薄血膜,阳性者填写管理卡片,正规治疗1~2 wk后复检、随访至原虫阴转。

2 结果与讨论

1991~2000年流动人口“四热病人”共血检110 017人次,阳性6 288例,阳性率5.72%,各年依次为6.67%、8.32%、7.83%、11.70%、5.65%、4.80%、4.11%、4.44%、1.68%和1.58%。间日疟占66.25%,恶性疟占33.44%,混合感染占0.31%。流动人口监测情况:县内流动人口(包括当地外出回归人员),血检55 322人次,阳性率为6.29%;县外省内流动人口血检21 487人次,阳性率为4.73%;到省外的流动人口,血检33 208人次,阳性率为5.39%。病例季节分布,疟疾传播旺季5~11月共血检77 039人次,占血检总数的70.0%,阳性4 899例,占阳性总数的77.9%。传播淡季12~4月共血检32 978人次,占血检总数的30.0%,阳性1 389例,占阳性总数的22.1%。各月份阳性率波动在3.6%(12月)到7.4%(8月)之间。

血检阳性患者全部按海南省抗疟方案治疗,除少数间日疟病例有溶血史外均同时服用伯氨喹。居住在患者周围或外出夜宿山寮者均给予预防性服药,累计34 865人次。结果表明,流动人口疟疾发病动态及季节性高峰基本与当地人群流行规律一致,“四热病人”疟原虫阳性检出率为当地人群的3倍^[2]。所有外出回归人员无论来自高疟区或低疟区,其血检阳性率均高于外地进入本地的人口,对疟疾扩散潜在危险性较大。加强流动人口管理和监测是遏制疟疾扩散的有效措施。对进入疟区及外出回归人员登记造册,“四热病人”血检,尤其疟疾高发季节血检,是及时发现传染源的有效办法。根治及假定性治疗能快速减少传染源数量^[3]。流动人口活动范围广难以管理,居住条件较简陋,感染之后极易引起播散。应加强健康教育,增强自我防护意识,改变露宿习惯,合理使用蚊帐,有病主动就医,自觉接受及落实防疫措施^[4],从而达到有效控制疟疾传播或扩散。

参 考 文 献

[1] 唐润生. 四川省泸县输入性间日疟引起局部爆发流行[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 13: 20.
[2] 段景山,张宇滨,陈世裕,等. 海南省农垦系统6年疟疾病例调查结果[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 8: 61.
[3] 余品红,徐博利. 疟疾的检出控制预测和预防[J]. 实用预防医学, 2000, 7: 154.
[4] 陈文江,吴开琛,林明和,等. 采用加强传染源防治结合健康教育的新对策控制海南山区疟疾的试点研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 13: 1-3.

(收稿日期: 2002-08-28 编辑: 富秀兰)

作者单位: 海南省农垦卫生防疫站, 海口 570226