

文章编号:1000-7423(2007)-06-0474-04

【实验研究】

三地钉螺线粒体 DNA 两个分子的遗传变异研究

胡缨¹, 黎学铭², 林睿², 牛安欧³, 胡文庆⁴

【摘要】 目的 分析广西、云南、湖南三地钉螺线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶 I (COI) 基因和细胞色素氧化酶 b (Cytb) 基因的遗传变异。方法 收集广西靖西、云南洱源和湖南岳阳三地钉螺, 提取其基因组 DNA, PCR 法扩增线粒体 COI 和 Cytb 基因并测序。用 Clustal W (1.82) 软件对所测基因序列排序, 用 MEGA (3.1) 计算其碱基组成、转换及颠换; 用 Kimura 双参数法计算遗传距离, 用非加权组平均法 (UPGMA) 和最大简约法 (MP) 构建系统发生树。结果 PCR 扩增获得 COI 和 Cytb 基因大小分别约为 700 及 600 bp (含两侧引物)。三地钉螺 COI 基因中共检测到 106 个多态性位点, 约占核苷酸总数的 15.9%, Cytb 基因中多态性位点为 165 个, 约占核苷酸总数的 28.5%。广西靖西与湖南岳阳、广西靖西与云南洱源的钉螺 COI 基因和 Cytb 基因的遗传距离分别为 0.051、0.158 和 0.031、0.405。根据 COI 和 Cytb 的基因序列, 用上述两种方法构建的系统发生树结果均一致。广西靖西与湖南岳阳的钉螺同属一个支系, 云南洱源钉螺单独形成另一支系。结论 广西、湖南和云南的钉螺 COI 和 Cytb 基因总体上具有相对丰富的多态性。

【关键词】 钉螺; 细胞色素 C 氧化酶 I 基因; 细胞色素氧化酶 b 基因; 遗传变异

中图分类号: R383.241, R392.13 文献标识码: A

Genetic Variation of Two Mitochondrial DNA Molecules from Three Isolates of *Oncomelania hupensis*

HU Ying¹, LI Xue-ming², LIN Rui², NIU An-ou³, HU Wen-qing⁴

(1 *The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;* 2 *Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China;* 3 *Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China;* 4 *Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China*)

【Abstract】 **Objective** To study the genetic variation of two mitochondrial DNA molecules (COI and Cytb gene) of *Oncomelania hupensis* isolated from different areas. **Methods** Snails were collected from Jingxi of Guangxi, Yueyang of Hunan and Eryuan of Yunnan. Genomic DNA was extracted from the snails, CoI and Cytb gene fragments were amplified by PCR, then purified and sequenced. Sequences of each isolates were edited by using Clustal W (1.82) software, and the nucleotide composition, transition and transversion were accounted by using MEGA (3.1) software. The genetic distances were computed with Kimura method and phylogenetic trees were constructed with UPGMA and MP method respectively. **Results** COI and Cytb gene fragments were about 700 bp and 600 bp (including 2 primers) respectively. A total of 106 mutation spots (15.9%) were tested in COI homological nucleotides, and 165 mutation spots (28.5%) were tested in Cytb homological nucleotides. The distance matrix between Guangxi isolate and Hunan isolate was 0.051 and 0.031 for COI gene and Cytb gene respectively; while that between Guangxi and Yunnan isolates was 0.158 and 0.405 respectively. Phylogenetic trees constructed by UPGMA and MP took on the similar topo-structure: isolates of Guangxi and Hunan clustered into one group, while the Yunnan isolate exhibited as another group. **Conclusion** *Oncomelania hupensis* in Guangxi, Hunan and Yunnan are of relatively rich polymorphism in COI and Cytb genes in general.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; COI gene; Cytb gene; Gene variation

Supported by the Medical and Hygienic Research Grant of Guangxi CDC (No. 20030005)

* Corresponding author, E-mail: gxykhyy@163.com

基金项目: 广西 CDC 医药卫生科研基金 (No. 20030005)

作者单位: 1 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021; 2 广西疾病预防控制中心, 南宁 530021; 3 华中科技大学同济医学院寄生虫教研室, 武汉 430030; 4 广西医科大学寄生虫教研室, 南宁 530021

* 通讯作者, E-mail: gxykhyy@163.com

长期以来国内外研究者对湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 的分类和命名作了大量研究, 同时也引起较大争议。随着分子生物学技术的发展, 用分子标记法研究分析钉螺遗传变异已成为主要研究方法之一,

其中线粒体 DNA 被公认为理想的研究指标^[1]。本研究同时选取作为线粒体重要蛋白编码基因的细胞色素 C 氧化酶 I (COI) 和细胞色素氧化酶 b (Cytb)^[2, 3] 对广西与其周边血吸虫病重流行区湖南和云南钉螺进行多态性研究, 并构建系统发生树, 探讨三地钉螺的遗传分化。

材料与方法

1 钉螺

光壳钉螺分别来自广西靖西的广西亚种 (*Oncomelania hupensis guangxiensis*, 以下简称广西株)、云南洱源的滇川亚种 (*O.h.robertsoni*, 以下简称云南株), 肋壳钉螺来自湖南岳阳的指名亚种 (*O.h.hupensis*, 以下简称湖南株)。选取阴性钉螺置 -20 °C 保存备用。

2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、DNA 标志物购自上海博亚生物公司, 蛋白酶 K 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 为立陶宛 MBI Fermentas 公司产品。蛋白核酸分析仪为美国 Beckman 公司产品, PCR 扩增仪为美国 Perkin-Elmer 公司产品。

3 基因组 DNA 提取

按照参考文献[4]方法进行。

4 PCR 扩增及产物鉴定

COI 及 Cytb 基因扩增引物, 按照参考文献[2, 3] 方法设计, 由上海博亚生物公司合成。COI 基因上游引物: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', 下游引物: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAYCA-3'; Cytb 基因上游引物: 5'-CATTTAGGTCTGCGGTCCAC-3', 下游引物: 5'-GGCGTAACTAGTGGGTTAGCTGG-3'。COI 基因扩增条件: 95 °C 10 min 预变性; 94 °C 1 min, 51 °C 1 min 30 s, 72 °C 1 min 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。Cytb 基因扩增条件: 95 °C 6 min 预变性; 94 °C 45 s, 43 °C 1 min, 72 °C 1 min 20 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察结果。

5 扩增产物纯化及序列测定

扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 切下含目的 DNA 条带进行回收和纯化。分别以上、下游引物作测序引物进行双反应测序, 由上海博亚生物公司完成。

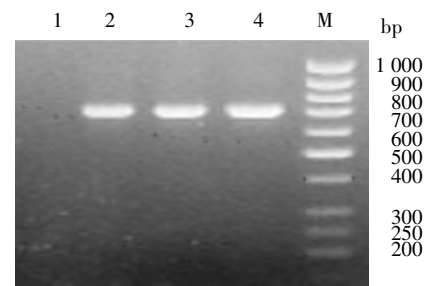
6 基因序列分析

将所测正反向序列用 BioEdit 软件拼接和双向对准, 所得序列读入 Clustal W(1.82) 软件进行多序列比对, 生成可供分析的序列矩阵。再用 MEGA(3.1) 软件计算其碱基组成、转换及颠换; 用 Kimura 双参数法计算遗传距离, 用非加权组平均法 (UPGMA) 和最大简约法 (MP) 构建系统发生树, 再用 Bootstrap 法进行检验。

结 果

1 目的基因体外扩增

获得的 COI 基因大小约为 700 bp (含两侧引物) (图 1), Cytb 约为 600 bp (含两侧引物) (图 2)。

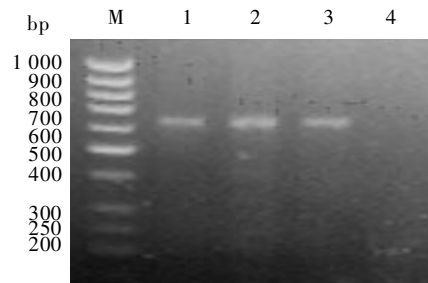


M: DNA 标志物, 1: 空白对照, 2: 广西株, 3: 云南株, 4: 湖南株。

M: DNA marker, 1: Control, 2: GX, 3: YN, 4: HN.

图 1 三地钉螺 COI 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of COI gene of *O.hupensis* isolates



M: DNA 标志物, 1: 广西株, 2: 云南株, 3: 湖南株, 4: 空白对照。

M: DNA marker, 1: GX, 2: YN, 3: HN, 4: Control.

图 2 三地钉螺 Cytb 基因 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of Cytb gene of *O.hupensis* isolates

2 三地钉螺的基因序列变异分析和遗传距离

将软件拼接所得序列排序比对, 剪掉引物部分并去除两端不齐的碱基, 得到 COI 基因的靶序列 (665 bp) 及 Cytb 基因的靶序列 (578 bp)。应用 MEGA(3.1) 软件分析, 三地钉螺 COI 基因 665 个同源序列位点中有 106 个碱基存在变异, 约占 15.9%, A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 22.6%、37.2%、19.2% 及 21.1%, 其中 A+T 含量 (59.8%) 明显高于 G+C 含量 (40.2%); 57 处发生了转换, 14 处发生了颠换, 转换与颠换比值 (R) 为 4.1。三地钉螺 Cytb 基因 578 个同源序列位

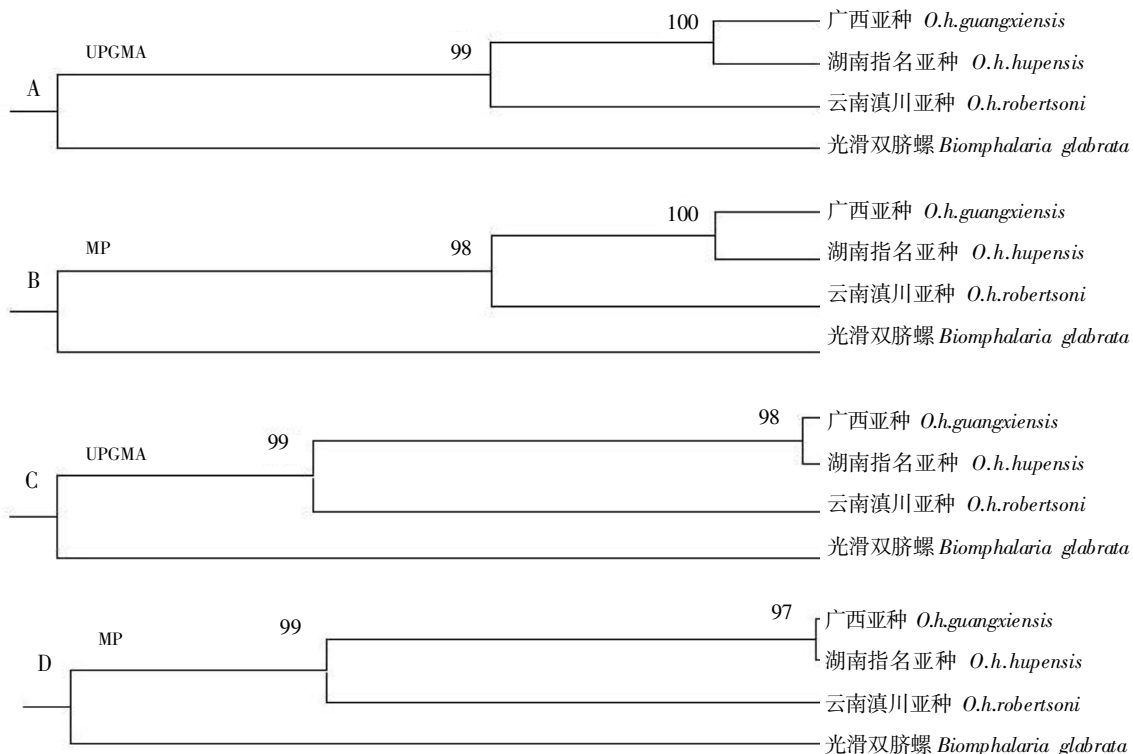
点中有 165 个碱基存在变异, 约占 28.5%, A、T、C、G 碱基的平均含量分别为: 29.6%、31.6%、20.3% 及 18.5%, 其中 A+T 含量 (61.2%) 明显高于 G+C 含量 (38.8%); 96 处发生了转换, 15 处发生了颠换, 转换与颠换比值 (R) 为 6.5。

应用 Clustal W 软件的 Kimura 双参数法, 计算 CO1 基因及 Cytb 基因遗传距离。结果表明, 广西靖西与湖南岳阳、广西靖西与云南洱源、湖南岳阳与云南洱源的钉螺 CO1 基因的遗传距离分别为 0.051、0.158 和 0.153; 广西靖西与湖南岳阳、广西靖西与云南洱源、湖南岳阳与云南洱源的钉螺 Cytb 基因的遗传距离分

别为 0.031、0.405 和 0.391。

3 系统发生树

根据三地钉螺和光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*, 登录号为 NC_005439) mtDNA 的 CO1、Cytb 基因序列, 用 UPGMA 法和 MP 法分别构建系统发生树, 枝长代表分歧程度, 枝上结点数值为 1 000 次自举检验结果统计的对该枝的支持百分数。结果显示, 基于 CO1 和 Cytb 基因用这两种方法构建的系统发生树拓扑结构一致, 均显示广西靖西与湖南岳阳的钉螺同属一个支系, 而云南洱源的钉螺单独形成另一个支系 (图 3)。



A: 根据 mtDNA 的 CO1 序列应用 UPGMA 法, B: 根据 mtDNA 的 CO1 序列应用 MP 法, C: 根据 mtDNA 的 Cytb 序列应用 UPGMA 法, D: 根据 mtDNA 的 Cytb 序列应用 MP 法。

A: CO1 genes constructed with UPGMA method, B: CO1 genes constructed with MP method, C: Cytb genes constructed with UPGMA method, D: Cytb genes constructed with MP method.

图 3 三地钉螺基于 CO1 和 Cytb 基因构建的系统发生树
Fig.3 Phylogenetic tree of *Oncomelania* isolates based on CO1 and Cytb genes

讨 论

三地钉螺 CO1 基因片段 (665 bp) 中检出的多态性位点约占核苷酸总数的 1/6, Cytb 基因片段 (578 bp) 中多态位点约占核苷酸总数的 1/3。因此, 对于作为线粒体重要蛋白编码基因的 CO1 和 Cytb 基因来说, 广西、湖南和云南的钉螺在 CO1 和 Cytb 基因总体上具有相对丰富的多态性, 且各地域株间也显示出丰富程度不同的核苷酸多样性。三地钉螺两两地域株

间表现出的基因多态性可能与其孳生地的生态环境多样性有一定关系。采用 Kimura 双参数法计算三地钉螺的遗传距离, 结果显示 CO1、Cytb 基因的遗传距离, 广西靖西与湖南岳阳的钉螺 (CO1 为 0.051, Cytb 为 0.031) 均小于广西靖西与云南洱源的钉螺 (CO1 为 0.158, Cytb 为 0.405), 说明广西与湖南钉螺的基因差异相对较小; 广西与云南钉螺存在较大的基因差异。用非加权组平均法 (UPGMA) 和最大简约法 (MP) 分别对基于 CO1 和 Cytb 基因构建系统发生树, 其拓扑结

构均一致: 广西钉螺与湖南钉螺同属一个支系, 而云南钉螺独立成一枝。因此, 认为广西钉螺与湖南钉螺的亲缘关系较近, 而广西钉螺与云南钉螺的亲缘关系较远, 这可能与云贵高原地理阻隔使云南钉螺向广西钉螺蔓延的速度偏慢有关。

Wilke 等^[3]认为长江中下游地区的光壳和肋壳钉螺间有较大的相似性, 均为指名亚种。石朝辉等^[5]、许静等^[6]分别通过 CO1 序列分析和随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD) 发现同一地区光壳和肋壳钉螺有较高的基因同源性, 几乎不存在遗传变异。本研究结果表明, 光壳的广西钉螺与肋壳的湖南钉螺遗传距离, 明显小于同是光壳钉螺的广西和云南钉螺, 与文献报道相符。

广西与湖南钉螺渊源关系较近, 可能与广西同长江中、下游流域之间水系相通有关。广西河流众多, 大部分属于珠江水系, 其融江发源于湘桂边境, 汇入柳江, 而灵渠的开凿引湘江水入漓江, 沟通了长江和珠江水系, 打通了中原和岭南地区的水路交通。每年的长江洪水促使该流域钉螺沿水系迁移, 并与当地钉螺交配繁殖, 使得广西钉螺与湖南钉螺之间的遗传距离较近。

系统发生树的构建常用 3 种方法, 即最大似然法 (ML)、最大简约法 (MP) 和非加权组平均法 (UPGMA)。三者各有不同的基本假设和优缺点^[7], 同时应用多种方法构建系统发生树、尽量分析多个基因序列, 可使获得的结果更加准确可靠^[8]。本研究同时选取 mtDNA 中进化速率较慢的 CO1 和进化速度适中的 Cytb 为标记, 分别采用 UPGMA 法和 MP 法构建系统发生树, 其拓扑结构完全一致, 而且 1 000 次自举检验结果对各分支都有很高的置信度 (97%~100%),

说明获得的系统发生树精确性较高, 进一步证明选择 CO1 和 Cytb 基因序列进行三地钉螺的遗传变异分析效果满意。

参 考 文 献

- [1] Davis GM, Wilke T, Spolsky C, et al. Cytochrome oxidase I-based phylogenetic relationships among the Pomatiopsidae, Hydrobiidae, Rissoidae and Truncatellidae (Gastropoda: Caenogastropoda: rissoacea) [J]. Malacologia, 1998, 40 (1-2): 251-266.
- [2] Spolsky C, Davis GM, Zhang Y. Sequencing methodology and phylogenetic analysis: cytochrome b gene sequence reveals significant diversity in Chinese populations of *Oncomelania* (Gastropoda: Pomatiopsidae)[J]. Malacologia, 1996, 38 (1-2): 213-221.
- [3] Wilke T, Davis GM, Chen CE, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissoidae) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology[J]. Acta Trop, 2000, 77: 215-227.
- [4] Han QX, Niu AO, Li JM. Study on CO1 gene diversity among different isolates of *Oncomelania hupensis* in China [J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21: 320-322. (in Chinese)
(韩庆霞, 牛安欧, 李金木. 不同地域株湖北钉螺 CO1 基因的差异研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21: 320-322.)
- [5] Shi CH, Qiu CP, Xia MY, et al. Preliminary study on cytochrome C oxidase I gene of *Oncomelania hupensis* from Miaohe area in Hubei Province[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19: 41-44. (in Chinese)
(石朝辉, 邱持平, 夏明仪, 等. 湖北省庙河地区钉螺细胞色素 C 氧化酶 I 基因差异的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19: 41-44.)
- [6] Xu J, Zheng J. Genetic diversity of smooth-shelled *Oncomelania hupensis* from mainland of China by using random amplified polymorphic DNA technique[J]. Chin J Schisto Control, 2002, 15: 251. (in Chinese)
(许静, 郑江. 中国大陆不同地区光壳钉螺遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 15: 251.)
- [7] Pauplin Y. Direct calculation of a tree length using a distance matrix[J]. J Mol Evol, 2000, 51: 41-47.
- [8] Kimball RT, Braun EL, Zwartjes PW, et al. A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests that these lineages are not monophyletic[J]. Mol Phylog Evol, 1999, 11: 38-54.
(收稿日期: 2006-12-04 编辑: 富秀兰)

(上接第 473 页)

定为曼氏裂头蚴^[1](*Sparganum mansoni*)。追问患者病史, 12 岁以前经常喝田间井水和溪水, 无食蛙或蛇肉史。

曼氏迭宫绦虫的成虫主要寄生于猫和犬, 人体感染少见, 至今国内报告的曼氏迭宫绦虫病仅 10 多例^[1]。裂头蚴进入人体后, 可移行寄生于各个脏器, 但以眼及皮下多见。云南省已报告的 10 例曼氏裂头蚴病例中, 就有 5 例为皮下裂头蚴病。周昆华等^[2]于 1988 年报告西双版纳 1 例右乳腺裂头蚴病, 本病例为云南省第 2 例, 该患者从 1996 年 11 月发现乳房皮下包块至 2007 年 7 月手术取出虫体, 说明虫体在患者体内存活至少有 11 年之久。

周本江等^[3]报道, 在云南人体感染裂头蚴病的方式和途径主要是通过喝生水和游泳误食感染裂头蚴的剑水蚤, 或原尾蚴直接经皮肤和黏膜侵入而获得感染。本病例也曾有喝生水的习惯, 可能为误食感染裂头蚴的剑水蚤而感染。

参 考 文 献

- [1] Zhou BJ, Zheng KY. Medical Parasitology[M]. Beijing: Science Press, 2007. 124-127. (in Chinese)
(周本江, 郑葵阳, 主编. 医学寄生虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2007. 124-127.)
- [2] Zhou KH, Deng QX, Liu JG. A case of mammary sparganosis mansoni[J]. Yunnan Med J, 1988, 9: 295-296. (in Chinese)
(周昆华, 邓其学, 刘建国. 乳腺曼氏裂头蚴病一例[J]. 云南医药, 1988, 9: 295-296.)
- [3] Zhou BJ, Wang WL, Lei L. Epidemic overview of sparganosis mansoni in Yunnan Province[J]. J Trop Med, 2005, 5: 207-208. (in Chinese)
(周本江, 王文林, 雷霖. 云南省曼氏裂头蚴病流行概况[J]. 热带医学杂志, 2005, 5: 207-208.)
(收稿日期: 2007-09-30 编辑: 盛慧锋)