

文章编号:1000-7423(2008)-02-0152-02

日本血吸虫线粒体 *nad4* 基因部分序列的多态性研究

刘伟^{1,2}, 刘毅¹, 林瑞庆², 戴荣四¹, 程天印¹, 朱兴全^{2*}

【摘要】 采用 PCR 技术及 DNA 序列分析技术对采自湖南省 4 个不同地区的日本血吸虫的线粒体 NADH 脱氢酶基因亚基 IV (*nad4*) 部分片段 (pnad4) 进行克隆及序列分析, 获得 480 bp 的 p*nad4* 序列。与 GenBank 上的日本血吸虫相应基因序列进行比对, 发现 p*nad4* 序列有一定的种内差异 (0.4%~1.3%)。

【关键词】 日本血吸虫; 线粒体 NADH 脱氢酶 4; 序列分析

中图分类号: R383.24

文献标识码: B

Polymorphism in the Partial Mitochondrial *nad4* Gene of *Schistosoma japonicum*

LIU Wei^{1,2}, LIU Yi¹, LIN Rui-qing², DAI Rong-si¹, CHENG Tian-yin¹, ZHU Xing-quan^{2*}

(1 College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

【Abstract】 The partial NADH dehydrogenase subunit 4 (pnad4) fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *Schistosoma japonicum* collected from 4 areas in Hunan province, and the amplicons were cloned and sequenced. A 480 bp sequence was obtained and the nucleotide difference between samples from the four locations were 0.4%-1.3%. Low level of sequence variability between and within different populations of *S.japonicum* was detected. The results are worthwhile for further study on the population genetic structures of *S.japonicum*.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; NADH dehydrogenase subunit 4; Sequence analysis

Supported by the National Basic Research and Development Program(No. 2007CB513104); Young Reserchers' fund of Hunan Agricultural University (No. 07QN08)

* Corresponding author, E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

日本血吸虫主要寄生于人、畜的门静脉、肠系膜静脉和(或)盆腔静脉, 造成急性或慢性肠炎、肝硬化, 并导致腹泻、消瘦、贫血与营养障碍等疾患^[1]。

由于自然环境的长期阻隔, 各地日本血吸虫存在不同程度的遗传变异, 传统方法已无法解释日本血吸虫各地理株的遗传分化。线粒体 DNA (mtDNA) 是一种核外遗传物质, 与核 DNA 相比, 具有分子较小、同质性、拷贝数多、编码效率高、进化速率高和母性遗传等特性, 且在种间和种内具有广泛的多态性, 因此被许多研究者用来研究种间和种内的遗传变异^[2-8]。本研究对采自湖南省 4 个不同地区的日本血吸虫线粒体 *nad4* 基因部分片段进行多态性研究, 以便为血吸虫分类及鉴别奠定基础。

1 材料与方法

1.1 虫体来源 日本血吸虫成虫采自湖南长沙 (SjCS)、岳阳钱粮湖农场 (SjQLH)、岳阳君山 (SjJS) 和岳阳汨罗

(SjML) 等地的水牛肝脏, 用棉线结扎后腔静脉, 另一端用自来水管冲洗, 收集血吸虫, 用生理盐水将虫体洗涤干净, 70% 乙醇保存。

1.2 主要试剂 蛋白酶 K 为美国 Merck 公司产品, DNA 提取试剂盒 (Wizard™ DNA Clear-UP System)、pGEM-T Easy 载体试剂盒均为美国 Promega 公司产品, Ex *Taq* 酶 (具有扩增效率高、错配率低的优良性能)、限制性内切酶 *EcoR* I、DNA 标志物、异丙基-B-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚-B-D-半乳糖苷 (X-gal) 为宝生物工程(大连)有限公司产品, DNA 胶回收试剂盒为上海生物工程技术服务有限公司产品。

1.3 虫体 DNA 提取 分别取每个地区收集的 5 条成虫, 用双蒸水反复吹打冲洗 2 次, 再用超纯水反复冲洗 2~3 次, 置于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中。将虫体剪碎, 加入十二烷基磺酸钠 (SDS) 裂解缓冲液 270 μl 和 30 μl 蛋白酶 K 消化过夜, 按试剂盒说明书提取虫体基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.4 基因扩增 根据日本血吸虫和肝片吸虫 *nad4* 基因序列 (GenBank 登录号为 NC002544 和 NC002546) 设计一对简并引物。上游引物 SJFH1 序列为 5'-AGTAGTKTKCKKWTGCT-3', 下游引物 SJFH2 为 5'-TACGASWACCASWAAYC-3', 由上海联合基因有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s,

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (No. 2007CB513104); 湖南农业大学校青年基金项目 (No. 07QN08)

作者单位: 1 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128;
2 华南农业大学兽医学院, 广州 510642

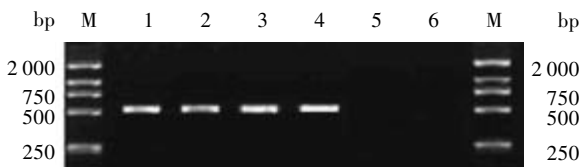
* 通讯作者, E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 38 个循环; 最后 72 °C 5 min。同时设不加 DNA 模板的阴性对照以及宿主 (牛) 基因组 DNA 为模板的宿主对照。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外投影仪 (广州深华生物技术有限公司) 观察结果。

1.5 目的基因的克隆、筛选及鉴定 上述 PCR 产物经 DNA 凝胶纯化试剂盒回收后, 与 pGEM-T 载体在 4 °C 条件下连接过夜。连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α , 接种于含 IPTG 和 X-gal 及氨苄青霉素的 LB 平板, 37 °C 培养过夜。挑取 8 个白色单菌落, 分别接种于含氨苄青霉素的液体培养基中, 提取质粒, 进行 *EcoR* I 酶切鉴定。将 PCR 及酶切鉴定均为阳性的重组菌送上海博亚生物技术有限公司测序, 结果用 DNASTAR (5.01 版) 软件进行分析, 并与 GenBank 收录的序列进行比较。

2 结果

2.1 目的基因克隆 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 可见约 500 bp 的条带, 与预期目的片段长度相符; 阴性对照和宿主对照无条带 (图 1)。将克隆到的片段转化至大肠埃希菌 DH5 α 中, 经菌落 PCR 鉴定与酶切鉴定, 表明克隆到目的基因。



M: DNA 标志物 (DL2000), 1: SJC51, 2: SjqLH1, 3: SjsJ1, 4: SjML1, 5: 宿主对照, 6: 阴性对照。

图 1 日本血吸虫 *pnad4* 基因片段 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析

2.2 测序结果及分析 测序获得代表性样品 SJC51、SjqLH1、SjqLH2、SJML3、SJML4 及 SjsJ1 的部分 *nad4* 序列, 长度均为 480 bp (GenBank 登录号为 AM689525~AM689530)。将样品序列与 GenBank 收录的日本血吸虫的相应序列 (登录号为 NC_002544) 进行比较, 经 DNASTAR5.01 软件分析显示, SJC51、SjqLH1、SjqLH2、SjsJ1、SJML3 及 SJML4 之间的碱基差异为 0.4%~1.3% (表 1)。用 Clustal W 方法进行对比, 通过相似性分析发现 SJC51 与 SJML3 之间相似性最高, 为 99.6%, 而 SjsJ1 与 NC_002544 的相似性也最高, 为 99.6%。

表 1 日本血吸虫 6 个 *pnad4* 序列差异性比较 [% (碱基个数)]

基因名称	NC002544	SJC51	SjqLH1	SjqLH2	SjsJ1	SJML3	SjML4
NC002544	-						
SJC51	0.8(4)	-					
SjqLH1	0.8(4)	1.3(6)	-				
SjqLH2	0.6(3)	1.0(5)	1.0(5)	-			
SjsJ1	0.4(2)	0.8(4)	0.8(4)	0.6(3)	-		
SJML3	0.8(4)	0.4(2)	1.3(6)	1.0(5)	0.8(4)	-	
SjML4	0.6(3)	1.0(5)	1.0(5)	0.8(4)	0.6(3)	1.0(5)	-

3 讨论

有研究者认为中国的日本血吸虫是一虫株复合体 (strain complex), 存在明显的遗传变异^[9]。分子生物学的发展从基因水

平上为寄生虫的分类提供了有力的实验手段, 如核糖体 DNA (rDNA) 微卫星等被应用于日本血吸虫的基因多态性研究^[10]。线粒体 DNA 演化速度快于核 DNA^[11], 且线粒体为母系遗传, 线粒体基因间不发生重组, 可反映母系的进化历史, 因此线粒体的一个基因就可代表整个线粒体基因组的变异情况。Sørensen 等^[12]通过用 PCR-RFLP 方法研究 mtDNA 中 *nad1* 片段, 对我国 6 个不同省份流行区的日本血吸虫进行分析, 发现有一定的种群差异 (0~0.6%)。

本研究对来自我国湖南 4 个不同地区的日本血吸虫样品进行多态性分析, 筛选出 6 个代表性 *nad4* 基因。分析所测序列结果, 并对其序列的变异情况进行比较, 发现 6 个序列间存在 0.4%~1.3% 的差异, 在 GenBank 上登录的日本血吸虫 *nad4* 部分序列进行比较, 也不完全一致, 这种差异可能为不同地理株所造成的。该研究结果有助于阐明日本血吸虫的种类遗传结构。

参 考 文 献

- [1] Si J, Zhu YC. Research progress of *Schistosoma japonicum* vaccine[J]. Chin J Schisto Control, 2002, 14(2): 156-161. (in Chinese) (司进, 朱荫昌. 血吸虫病疫苗研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(2): 156-161.)
- [2] Hu M, Chilton NB, Gasser RB. The mitochondrial genomes of parasitic nematodes of socio-economic importance; recent progress, and implications for population genetics and systematics[J]. Adv Parasitol, 2004, 56: 133-212.
- [3] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucl Acids Res, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [4] McManus DP, Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics[J]. Int J Parasitol, 1996, 26(7): 687-704.
- [5] Anderson TJC, Blouin MS, Beech RN. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers[J]. Adv Parasitol, 1998, 41: 219-283.
- [6] Blouin MS. Mitochondrial DNA diversity in nematodes[J]. J Helminthol, 1998, 72(4): 285-289.
- [7] Hu M, Chilton NB, Gasser RB. The mitochondrial genomes of the two human hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea)[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(2): 145-158.
- [8] Hu M, Gasser RB, Abs EL-Osta YG, et al. Structure and organization of the mitochondrial genome of *Dirofilaria immitis* [J]. Parasitology, 2003, 127(1): 37-51.
- [9] He YX, Hu YQ, Yu QF, et al. Strain complex of *Schistosoma japonicum* in the mainland of China[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 1994, 25(2): 232-242.
- [10] Wu HW, Chen BY, Su C, et al. Preparation and cloning of *Schistosoma japonicum* (mainland China, Anhui isolate) rDNA[J]. Chin J Zoonoses, 1999, 15(2): 24-28. (in Chinese) (吴海玮, 陈丙莺, 苏川, 等. 日本血吸虫中国大陆安徽株安徽品系特异 rDNA 的制备及其基因克隆[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(2): 24-28.)
- [11] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA[J]. Science, 1991, 251(5000): 1488-1490.
- [12] Sørensen E, Drew AC, Brindley PJ, et al. Variation in the sequence of a mitochondrial NADH dehydrogenase I gene fragment among six natural populations of *Schistosoma japonicum* from China[J]. Int J Parasitol, 1998, 28(12): 1931-1934.

(收稿日期: 2007-05-28 编辑: 高石)