

日本血吸虫线粒体 DNA 两个分子的遗传变异

郭凯文, 牛安欧

【摘要】 目的 从线粒体 DNA 的 2 个分子,探讨我国日本血吸虫的遗传变异。方法 试剂盒抽提基因组 DNA 后,以特异性引物对线粒体还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶 1(ND1)和细胞色素 c 氧化酶 I(COI)进行 PCR 扩增,将 PCR 产物分别测序,并以生物信息学方法加以比较,构建系统进化树。结果 序列系统进化树显示日本血吸虫中国大陆株与中国台湾株之间差异较大,在树状图中可归为 2 类;中国大陆山区型地域株,即云南洱源和四川天全在树状图中归为 1 类;中国大陆湖沼洲滩型地域株,即湖南岳阳、江西新建和安徽贵池 3 个地域株在树状图中处于并列位置;湖北省境内不同地域株在树状图中归为 1 类。结论 我国各地日本血吸虫存在不同程度的遗传变异,各地域株间亲缘关系密切,存在共同的起源。

【关键词】 日本血吸虫;地域株;线粒体 NADH 脱氢酶 1;细胞色素 c 氧化酶 I;遗传变异;系统进化树

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Studies on the Genetic Variation of Two Mitochondrial DNA Molecules of *Schistosoma japonicum*

GUO Kai-wen, NIU An-ou

(Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Technology and Science, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Objective To study the variation of *Schistosoma japonicum* through two mitochondrial DNA molecules. **Methods** Genomic DNA was isolated with kit, and the mitochondrial NADH dehydrogenase 1 (ND1) and cytochrome c oxidase I (COI) gene fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. The gene trees were constructed and the acquired data were analyzed with the help of bioinformatics. **Results** The gene trees showed that the Taiwan isolate and the mainland isolates can be divided in two groups: a group from the hilly region (Yunnan and Sichuan), another group from the lake region (Hunan, Jiangxi and Anhui); isolates from Hubei are at a different position on the gene trees. **Conclusion** There are variations among the geographic isolates of *Schistosoma japonicum* in China, nevertheless, they have close kinship.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Geographic isolate; Mitochondrial NADH dehydrogenase 1; Cytochrome c oxidase I; Genetic variation; Gene trees

Supported by the Hubei Provincial Office of Schistosomiasis and Endemic Disease Control (No. 2002-03)

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,传统的分类方法已无法解释日本血吸虫各地域株的遗传分化。线粒体 DNA 演化速度快于或等于核 DNA^[1],其中脱氢酶 1(ND1)是线粒体基因组中进化速率较快的,而细胞色素 c 氧化酶 I(COI)是进化速率较慢的^[2]。因此,线粒体一个基因就可以代表整个线粒体 DNA 的大致变异情况^[2]。本研究在既往研究日本血吸虫种株遗传变异的基础上,进一步采用 PCR-序列测定技术对我国 7 省 11 地不同自然隔离区的日本血吸虫线粒体 DNA 中这两个片段的多态性进行研究,并用生物信息学方法比较各序列的同源性,构建序列系统进化树。

材料与方 法

1 日本血吸虫的采集

标本来源见文献[3]。成虫收集方法见文献[4]。

2 方 法

基因组 DNA 抽提方法见文献[3]。PCR 扩增线粒体 DNA 片段 ND1 和 COI,见文献[5]。产物纯化、测序及相似性比较见文献[3]。

3 中国大陆株日本血吸虫线粒体 DNA 序列进化树的构建

利用 Neighbor-Joining 法对序列进行系统发生分析^[6]。用 200 次 Bootstrap 重抽样法评估系统发生分析的置信度。

结 果

1 线粒体 DNA 多序列相似性比较

我国各地日本血吸虫线粒体 DNA 片段序列存在不同程度的遗传差异,比例为 0.3%~6.7%。其中湖北省内 5 地域株亦存在微小差异,其比例约为 0.3%。ND1 和 COI 序列比对结果如图 1 和图 2。在单反应测序情况下出现了少数不能识别的碱基 N,与该位点核

基金项目:湖北省血吸虫病地方病防治办公室资助(No. 2002-03)
作者单位:华中科技大学同济医学院病原生物学系,武汉 430030

```

AGATGATTG GGTGTCTAT ATTATTAATA TGTTCTTCTA TTGGTGTATT TATTTATGCT A-GTGACTGT GGGGGTTTGT ATTATAAGTT TATGATGTTG TACATTTTAA TTTTGTCTAC TTTTACTGGT
.....G.....T.....A.....C.....T.....A.....
TC.....A.....G.....T.....G.....T.....G.....A.....G.....TGA.....G.....C.....GA.....T.....TT.....AAA.....T.....TA.....CA.....T.....A.....G.....GTT.....T.....AT.....AGT.....G.....T.....T.....CT.....TGG.....
TATGGTTT-G -TTGATGTTA GGTGAGGTT CTTGGAAAAA GTATAGATTG ATT-AGTGCT GTTCGTGTGG CTTTGTCTAG AATAAGGTTT GAAGCTACTT TTATGTGTTT AGTATTAGTA TTGGGTGTAA
.....CA.....C.....A.....N.....C.....C.....N.....N.....
ATG.....A.....-AC.....-GT.....AG.....GAT.....T.....C.....A.....G.....T.....G.....T.....AG.....T.....AA.....T.....G.....TA.....T.....CG.....GT.....TC.....T.....CTA.....A.....GTG.....T.....T.....G.....A.....TGATA.....AT.....A.....T.....A.....C.....GT.....T.....A.....TT
TATATAATGA TTA-TGGTAA ATT-GGATA- TTACTTATTT GATT-GTTAT TGCTCCATT- -AAATTATTT TGCTTGGTCT GTTCTTTTGC TT-GCTGAAA GAAAACGTTTCC CATTGTTGAT TATGGTGA--
.....C.....A.....T.....CC.....A.....C.....A.....A.....A.....A.....T.....T.....T.....CT.....A.....TT
AT.....TTG.....T.....AT.....G.....C.....G.....TA.....G.....GA.....G.....T.....A.....-G.....GTT.....T.....GTT.....AG.....GTT.....TA.....G.....TGA.....GTA.....T.....TAG.....G.....AG.....T.....CGT.....C.....TT.....GA.....T.....GGG.....A.....G
    
```

图 1 日本血吸虫和曼氏血吸虫 ND1 序列
Fig. 1 ND1 sequences of *S. japonicum* and *S. mansoni*

```

CCCAGGATTG GGATTGGTA TAGTTAGTCA TATATGTATG TCTTTAAGTA ATAATAATTC TTCGTTTGA TATTAT-GGT TAGTTTGTGC TATGGTTTCT ATTGTGTGTT TGGGGAGAGT TGTGGGGCT
.....A.....C.....A.....AC.....A.....AG.....ATC.....ATC.....
G.....A.....G.....N.....AG.....C.....G.....AG.....G.....N.....T.....G.....GA.....C.....C.....A.....A.....C.....A.....T.....A.....A.....G.....
CACCATATGT TTATGGTTGG TATGGATGTA AAGACTTCTG TTTTITTTAG TTCTGTAACA ATGATTATAG GTATACCAAC AGGTATTAAG GTGTTTCTT GATTAT-TAT GTTAGGGAGT AGTGGGTTGC
.....N.....T.....AC.....AC.....N.....CA.....CA.....
T.....GCT.....CT.....T.....TCG.....TTA.....ACG.....GGA.....G.....AT.....T.....N.....A.....G.....T.....T.....CG.....A.....C.....T.....GAAT.....T.....TA.....
GTGCGGCTGA TCCAATAGTA TGGTGAATTG TTGGTTTTAT ATTTTTGTTT ACAGTTGGTG GTGTTACTGG GATAGTTTTA TCTGCTTCTG CTTTGGATAG ATTATTTTAC GATACTTGAT -ACCA
.....C.....CC.....CC.....G.....TTTA.....G.....C.....C.....T.....A.....C.....AC.....A.....G.....T.....C.....A.....G.....G.....C.....A.....A.....A.....T.....C.....GT.....T.....T.....G.....TTGC
    
```

图 2 日本血吸虫和曼氏血吸虫 COI 序列
Fig. 2 COI sequences of *S. japonicum* and *S. mansoni*

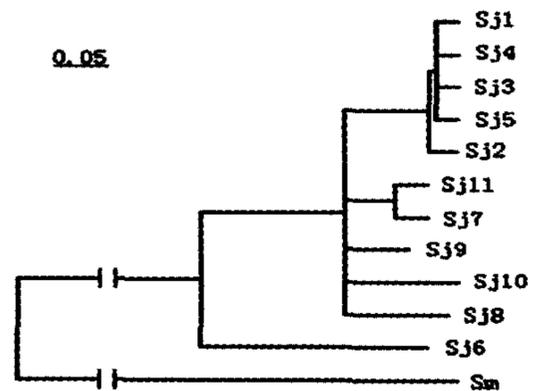
苷酸信号复杂有关。

2 中国日本血吸虫 ND1 和 COI 序列进化树的构建

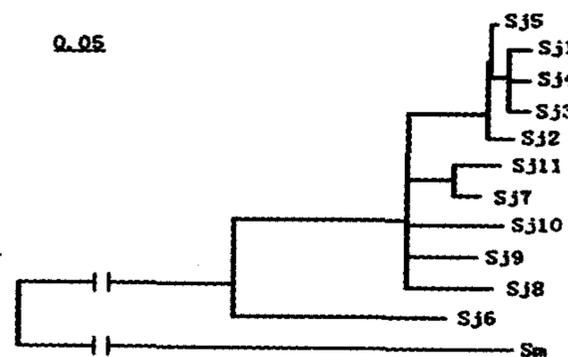
中国日本血吸虫各地域株差异明显小于与曼氏血吸虫之间差异;中国大陆株与中国台湾株日本血吸虫之间有较大差异,在树状图中可归为 2 类;中国大陆山区型日本血吸虫,即云南洱源和四川天全在树状图中归为 1 类;中国大陆湖沼洲滩型日本血吸虫株,即湖南岳阳、江西新建和安徽贵池 3 个地域株在树状图中处于并列位置;湖北省境内不同地域株在树状图中归为 1 类。以最大简约法对序列进行系统发生分析,构建的系统树的拓扑结构与邻接法所构建的基本一致。见图 3。

讨 论

多数学者认为中国日本血吸虫是一超种复合体 (superspecies complex), 存在明显的种和株间变异^[7]。邱持平^[8]对中国 5 省地域株线粒体 DNA 中 ND1 和 COI 片段的研究表明它们存在两个不同的基因型,这两个基因型分别存在不同程度的核苷酸碱基对差异。本文结果与其一致。



ND1 序列系统发生树 ND1 gene phylogenetic system tree



COI 序列系统发生树 COI gene phylogenetic system tree

图 3 基于 ND1 序列和 COI 序列构建的生物系统发生树
Fig. 3 Phylogenetic system tree based on ND1 gene and COI gene

Davis 等^[9,10]根据生物学家的追踪研究结果推论亚洲大陆的日本血吸虫是在印度板块与中国大陆发生碰撞的第三纪末期由非洲漂移至亚洲。本研究以线粒体 DNA 序列构建的邻接树(NJ)形成了一个基支模式,其深支经统计学分析(NJ 引导程序 = 100),证实它们之间存在密切的亲缘关系,可以认为这 11 个地域株的日本血吸虫线粒体 DNA 具有同一祖先。

血吸虫基因组的研究对于评价其种系关系、判断种内变异等具有重要意义。众多学者运用 rRNA 基因家族及其间隔的序列同源性比较和限制性片段长度多态的分析方法进行种系分类研究。张广军等^[11]即通过测定细胞核核糖体基因 rDNA-ITS2 和 LSU 序列探讨中华血吸虫在裂体属内的系统发生位置。线粒体 DNA 在遗传学上具有某些与核 DNA 不同的特性,其以母系遗传为主,基因重组发生率极低;其进化速率等于或较快于核 DNA,故其序列的变化可同时反映生物种群内以及群体间的遗传变异。本研究结果不仅揭示了中国各地域株日本血吸虫之间遗传变异及亲缘关系的状况,同时还清楚地显示出日本血吸虫和曼氏血吸虫之间的基因差异,进一步证实了线粒体 DNA 在寄生虫学研究领域中的应用价值。

参 考 文 献

[1] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA [J]. *Science*, 1991, 251:1488-1490.

[2] 张广军,邱持平,邱东川,等. 基于线粒体基因分析的中华血吸虫分子系统发生研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2002, 20:10-13.

[3] 郭凯文,牛安欧. 日本血吸虫线粒体 DNA 的遗传变异[J]. *热带医学杂志*, 2004, 8:357-360.

[4] 熊衍文,牛安欧. 微卫星锚定 PCR 研究日本血吸虫的遗传变异[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2002, 18(6):7-9.

[5] 郭凯文,牛安欧. PCR-SSCP 研究中国日本血吸虫线粒体 DNA 的遗传变异[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(6):502-505.

[6] Tang J, Bernard ME. Scaling up accurate phylogenetic reconstruction from gene-order data[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19:305-312.

[7] Weising K. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation[J]. *PCR Method Appl*, 1995, 4:249-255.

[8] 邱持平,Chris Spolsky,夏明仪,等. 中国日本血吸虫地域株基因差异的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2000, 20:79-82.

[9] Davis GM, Chen CE, Kang ZB, et al. Snail hosts of *Paragonimus* in Asia and the Americas[J]. *Biomed Environ Sci*, 1994, 7:369-382.

[10] Davis GM. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian Schistosoma; coevolution with *Schistosoma*; a review [J]. *Prog Clin Parasitol*, 1993, 3:145-204.

[11] 张广军,邱持平,邱东川,等. 基于核糖体基因分析的中华血吸虫分子种系发生研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2001, 19:201-204.

(收稿日期:2003-08-27 编辑:伯韦)

文章编号:1000-7423(2004)-05-0302-01

【病例报告】

鼻腔蝇蛆病一例报告

孔保庆,莫颂轶,雷菠,黄秉清,王凤永

中图分类号:R757. 9

文献标识码:D

鼻腔蝇蛆病在我国极为少见,自王琼芳 1958 年报道一例以来,仅龚立人(1964)、苏振忠等(1982)、王陈应(1986)、王身文等(1991)、陈小宁等(1996)等共报道有 7 例。现报道副鼻窦炎合并鼻腔蝇蛆病一例。

患者女性,65 岁,双侧鼻塞流腐臭味脓涕 1 年余,异物蠕动伴鼻腔出血 2 d,于 2003 年 8 月 8 日来本院附属医院就诊并收入耳鼻喉科治疗。述 1 年余前着凉后出现鼻塞流涕,鼻部不适,经治疗后双侧鼻腔仍反复流脓,有腐臭味。入院前两天无明显诱因下鼻腔不适加重,并有异物蠕动感,打喷嚏,且有双侧鼻流血而来院诊治。体检,鼻窦区轻度肿胀,压痛,鼻外形无畸形,鼻腔粘膜充血水肿,鼻中隔溃烂缺损,约 1.2 cm × 0.8 cm,双侧中下鼻甲溃烂,结构破坏,中鼻甲后端溃烂,并有大量虫样

蠕动,灰白色。鼻窥镜下挟出白色虫体 36 条,鼻腔清洗后可见骨暴露。诊断:副鼻窦炎、鼻腔寄生虫。

挟出虫体长 1.2 ~ 1.5 cm,直径 0.2 ~ 0.3 cm,置 95% 乙醇浸泡,转送本教研室鉴定。虫体灰白色,圆柱状,长约 1.2 ~ 1.5 cm,前端渐狭小,可见一对口钩,后端为截断状,可见一对后气门,两侧与后部无突起。虫体后气门经无水乙醇脱水,用冬青油透明,压片镜检,可见其后气门间距窄,小于气门横径的 1/2,气门环不完整,于内下处有缺失,气门钮细小模糊不清,3 个气门裂直,由内下向外上略呈扇形排列,气门裂内可见有细小横纹结构。由其形态特点,确定为大头金蝇 (*Chrysomya mega-cephala*) III 期幼虫。

(收稿日期:2004-06-17 编辑:庄兆农)