

# 基于磷酸丙糖异构酶基因序列的 蓝氏贾第鞭毛虫分子系统发育的研究

李继红<sup>1\*</sup> 卢思奇<sup>2</sup> 张亚平<sup>1</sup> 王凤芸<sup>2</sup> 文建凡<sup>1</sup>

(1 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 昆明 650223;

2 首都医科大学细胞生物学系寄生虫学教研室, 北京 100054)

**摘要** [目的] 探讨蓝氏贾第鞭毛虫种内系统发育及遗传多样性。[方法] 对不同来源虫株的磷酸丙糖异构酶(tim)基因进行PCR扩增、序列测定后,用简约法和NJ法构建分子系统树进行系统学分析。[结果] 在所测序列中共有124个位点存在变异(23%),且大多数为发生在第三密码子的同义突变,两种构树方法所得两树的分枝结构相似,均将受试的16株蓝氏贾第鞭毛虫分为明显的两组。[结论] tim基因可作为研究蓝氏贾第鞭毛虫群体遗传结构一个有效的遗传标记。

**关键词:** 蓝氏贾第鞭毛虫, 磷酸丙糖异构酶, 遗传标记, 系统学, 序列分析

中图分类号:R382.213

文献标识码:A

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*, 又称 *Giardia intestinalis* 或 *Giardia duodenalis*, 以下称贾第虫)是贾第虫属中一种重要的导致腹泻的原虫,具有广泛的地理分布和多种动物宿主<sup>[1]</sup>。长期以来,由于它在医学、兽医学和生物学上的重要性而受到广泛关注。蛋白电泳和RFLP分析表明,将其从形态学上归于一个种是不够的,而应归于复合种(complex-species)<sup>[2~4]</sup>。有的系统发育研究表明贾第虫至少有5个世系<sup>[5]</sup>。以上研究从一定程度上反映了贾第虫的遗传多样性,但用更准确直观的基因序列分析方法对其进行系统学及遗传多样性研究的资料却很少。Van Keulen等比较了30个贾第虫株的SSrRNA基因片段,由于SSrRNA具有很高的保守性,结果显示它们之间的差异只有0.5%<sup>[6]</sup>。最近,Baurch等将tim基因用于贾第虫的流行病学研究,发现北美地区的虫株变异较大(18%)<sup>[7]</sup>。因此,在更大范围内提供更丰富的DNA资料,对本虫的种群结构、系统发育进行研究都是十分必要的。

磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase, 缩写为tim)为一种糖酵解酶,其催化机制已十分清楚<sup>[8]</sup>。迄今为止,已报道了38个物种的tim序列,其三维空间结构和催化特性已被用于设计抑制物和药物<sup>[9,10]</sup>,然将其基因序列分析结果用于本虫系统学研究方面的文章却尚未见报道。

本文收集了16株分离自我国和世界其他地区及不同宿主的贾第虫株,测定其tim基因序列,并与GenBank中两株(WB和GS,登记号分别为L02120和L02116)进行比较,旨在初步探讨贾第虫种内系

统发育和遗传多样性及tim基因序列的遗传变异情况,并检验tim能否作为一种有效的遗传标记来研究贾第虫的种群结构及贾第虫属的系统发育问题。

## 材料与方法

### 1 DNA样品来源

本实验所用贾第虫株来自中国、柬埔寨、美国、澳大利亚、加拿大,样品有滋养体、包囊以及脉冲场电泳凝胶中的总DNA。这些虫株寄生的宿主有人、狗、羊、猫、海狸等(表1)。所用滋养体,均于复苏后采用改良TYI-S-33培养基<sup>[11]</sup>纯培养。收集的虫体用酚:氯仿法提取总DNA。对来自患者粪便的包囊样品,采用醚醛沉淀法收集、纯化,DNA提取除裂解时间适当延长外,余同滋养体DNA提取。含有贾第虫总DNA的脉冲场电泳凝胶系由加拿大University of British Columbia的J. Isaac-Renon教授惠赠。凝胶中的总DNA用QIAEX公司生产的凝胶提取试剂盒提取、纯化。具体操作按该公司提供的程序进行。

### 2 DNA序列的PCR扩增

用多聚酶链反应(PCR)从贾第虫总DNA中扩增磷酸丙糖异构酶基因片段。参照文献引物L4131(5'-ATGCTGCTCGTCGCCCTTC-3', 1~21bp)和H5945(5'-ATGTCTCCGAGCTCCTTCTGG-3', 1004~984bp)<sup>[4]</sup>对tim基因进行全序列扩增(图1)。PCR反应总体积为50 μl,运行40个循环。每一循环包括:94℃变性45 s,52~56℃退火50 s,72℃延伸50 s。第一循环启动前于94℃预变性3 min,最后一次循环后于72℃延伸8 min(图1)。

\* 本文通讯作者,工作单位:首都医科大学细胞生物学系寄生虫学教研室

**表 1 贾第虫分离株的地理来源、宿主及样本形式**  
**Table 1 *Giardia lamblia* isolates used in this study with their geographic locations, hosts and sample forms**

分离株 Isolate	地理位置 Geographic location	宿主 Host	样本形式 Sample form
CH3	中国河北 Hebei, China	人 Human	包囊 Cyst
CH4	中国河北 Hebei, China	人 Human	包囊 Cyst
C1	中国北京 Beijing, China	人 Human	滋养体 Trophozoite
C2	中国四川 Sichuan, China	人 Human	滋养体 Trophozoite
CAM	柬埔寨 Cambodia	人 Human	滋养体 Trophozoite
A1	澳大利亚 Australia	人 Human	滋养体 Trophozoite
A2	澳大利亚 Australia	人 Human	滋养体 Trophozoite
CDC	美国 USA	人 Human	滋养体 Trophozoite
BP	美国 USA	海狸 Beaver	滋养体 Trophozoite
G3M	加拿大 Canada	豚鼠 Guinea pig	PFGE 凝胶 PFGE gel
DG	加拿大 Canada	狗 Dog	PFGE 凝胶 PFGE gel
4883	加拿大 Canada	海狸 Beaver	PFGE 凝胶 PFGE gel
BE	加拿大 Canada	海狸 Beaver	PFGE 凝胶 PFGE gel
S1	加拿大 Canada	羊 Sheep	PFGE 凝胶 PFGE gel
S2	加拿大 Canada	羊 Sheep	PFGE 凝胶 PFGE gel
GR	加拿大 Canada	人 Human	PFGE 凝胶 PFGE gel

\* 脉冲场电泳凝胶,内含虫体总DNA,余同。  
 \* Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) gel containing the total DNA of *Giardia lamblia*

### 3 DNA 序列的测定

用小量胶回收试剂盒(上海华顺生物工程有限公)纯化 PCR 产物,所得 DNA 作为序列分析的模板。反向引物 H5945 换为 H7976 (5'-CAAAC-CTTCTCCGCAAACCA-3', 650~630 bp),使所测片段由扩增的 1 004 bp 缩短为 605 bp。根据用上述引物所测得的各虫株序列用 DNASTAR (DNASTAR, INC) 软件设计一对中间引物, H296 (5'-CCAT-GATTCTGCGTCTTTCAG-3' 296 bp~275 bp) 和 L227 (5'-GTTGAGATGCTTCAGGACAT-3' 227 bp~251 bp),再次对所有虫株进行序列测定。用 PE 公司 ABI377

全自动测序仪进行正反链双向测序(至少两次以保证序列的准确性)。测序试剂采用 DycDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer 公司)。

### 4 DNA 序列分析

将测序仪记录的 DNA 序列人工核查后用 DNASTAR 软件进行同源序列排序,再用 MEGA1.02 计算转换与颠换以及变异位点数目。在分析过程中,调取 GenBank 中标准株 WB 和 GS tim 基因序列与所测得的各虫株序列逐一进行比较。

### 5 分子系统树的构建

简约法分析采用 PAUP 3.1.1<sup>[12]</sup> 中的“Branch and Bound”软件,所有变异视为无序特征。将 MEGA1.02<sup>[13]</sup> 中 Kimura 2 parameter distance 转换成距离后用 NJ 法构树。与此同时用“bootstrap”进行 1 000 次渐启式复制以检验枝的置信度。

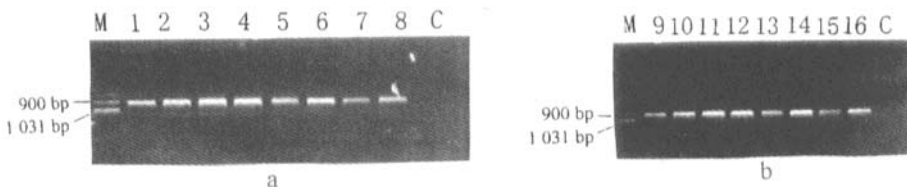
## 结 果

### 1 DNA 序列的差异

对于每一测定的序列,我们选用长度为 534 bp 的片段(相当于该基因编码区 30 bp~564 bp)进行比较分析(图 2),发现有 124 个位点(23%)存在变异。它们大多为发生在第三密码子的同义突变。将所测定 DNA 序列内各虫株间转换和颠换发生的次数列于表 2,从表中可以看出,转换的频率高于颠换。

### 2 分子系统树

对所有 tim 基因序列变异同等加权(见讨论),应用 PAUP 简约法及 MEGA 中 Kimura 2 parameter distance 法将 DNA 序列数据转换成距离数据后用 NJ 法构树,得到相同的分枝结构(图 3a, b)。对



**图 1 以引物 L4131、H5945 PCR 扩增的贾第虫 tim 基因片段**

a M λ-DNA Hand III, 1 CH3, 2 CH4, 3 C1, 4 C2, 5 CAM, 6 A1, 7 A2, 8 CDC, C 对照  
 b M λ-DNA Hand III, 9 BP, 10 G3M, 11 DG, 12 4883, 13 BE, 14 S1, 15 S2, 16 GR, C 对照

**Fig 1 *G. lamblia* tim gene fragments amplified by PCR using primer L4131, H5945**

a M λ-DNA Hand III, 1 CH3, 2 CH4, 3 C1, 4 C2, 5 CAM, 6 A1, 7 A2, 8 CDC, C control  
 b M λ-DNA Hand III, 9 BP, 10 G3M, 11 DG, 12 4883, 13 BE, 14 S1, 15 S2, 16 GR, CDC, C control

Majority	AAC1TCACGFGTACGGCTCTCTGACTTTATCAAGAGCCACGTCGGCAATTGCTGCCATAAGATCC	
A1. seq	.....	70
A2. seq	.....	70
BE. seq	.....	70
CAM. seq	.....	70
CH3. seq	..... C.....	70
CH4. seq	.....	70
DG. seq	.....	70
G3M. seq	.....	70
GR. seq	.....	70
S1. seq	.....	70
S2. seq	.....	70
WB. seq	.....	70
4883. seq	.....	70
BP. seq	..... A..C..T..A..G..C.....C..T.....A...T..C..C..CT..T.....	70
C1. seq	..... A..C..T..A.....C.....C..T.....A...T..C..C..CT..T.....	70
C2. seq	..... A..C..T..A..G..C.....C..T.....A...T..C..C..CT..T.....	70
CDC. seq	..... A..C..T..A..G..C.....C..T.....A...T..C..C..CT..A.....	70
GS. seq	..... A..C..T..A..G..C.....C..T.....A...T..C..C..CT..T.....	70
Majority	CTGATCCCGTGGACGTGGTCAATGCCCCTTCCGCCGTACACTGTGCAACAGCCATTGGCGCAACACGTC	
A1. seq	.....	140
A2. seq	.....	140
BE. seq	.....	140
CAM. seq	.....	140
CH3. seq	..... C.....	140
CH4. seq	.....	140
DG. seq	.....	140
G3M. seq	.....	140
GR. seq	.....	140
S1. seq	.....	140
S2. seq	.....	140
WB. seq	.....	140
4883. seq	.....	140
BP. seq	..... C..G.....T..TG.....T..C...TTT..G.....T..T.....T.....G..T..T..	140
C1. seq	..... C..G.....T..TG.....T..C...TTT..G.....T..T.....T.....G..T..T..	140
C2. seq	..... C..G.....T..TG.....T..C...TTT..G.....T..T.....T.....G..T..T..	140
CDC. seq	..... C..G.....T..TG.....T..C...TTT..G.....T..T.....T.....G..T..T..	140
GS. seq	..... C..G.....T..TG.....T..C...TTT..G.....T..T.....T.....G..T..T..	140

图2 贾第虫磷酸丙糖异构酶基因部分序列(本图所示序列相当于 tim 基因 30~170 bp)  
Fig. 2 Aligned partial tim gene sequences of *G. lamblia* (30~170 bp)

表2 贾第虫 tim 基因序列上的差异  
(共 534 个碱基对。转换和颠换数分别列于对角线以下和以上)

Table 1 Sequence variations of tim gene from *G. lamblia*  
(Transitions and transversions are shown above and below diagonal, respectively)

分离株 (Isolate)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 A1		1	1	0	4	0	0	0	2	0	0	1	0	31	30	32	35	32
2 4883	2		2	1	4	1	1	1	3	1	1	1	1	32	31	33	36	33
3 A2	0	2		1	5	1	1	1	3	1	1	2	1	30	29	31	34	31
4 BE	0	2	0		4	0	0	0	2	0	0	1	0	31	30	32	35	32
5 CH3	2	4	2	2		4	4	4	6	4	4	5	4	35	34	36	39	36
6 CH4	1	3	1	1	1		0	0	2	0	0	1	0	31	30	32	35	32
7 CAM	0	2	0	0	2	1		0	2	0	0	1	0	31	30	32	35	32
8 DG	0	2	0	0	2	1	0		2	0	0	1	0	31	30	32	35	32
9 G3M	0	2	0	0	2	1	0	0		2	2	3	2	33	32	34	37	34
10 GR	0	2	0	0	2	1	0	0	0		0	1	0	31	30	32	35	32
11 S1	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0		1	0	31	30	32	35	32
12 S2	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0		1	32	31	33	36	33
13 WB**	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0		31	30	32	35	32
14 BP	79	81	79	79	77	78	79	79	79	79	79	79	79		3	1	4	1
15 C1	70	71	70	70	68	69	70	70	70	70	70	70	70	11		2	5	2
16 C2	77	78	77	77	75	76	77	77	77	77	77	77	77	4	9		3	0
17 CDC	77	79	77	77	75	76	77	77	77	77	77	77	77	3	10	3		3
18 GS**	78	80	78	78	76	77	78	78	78	78	78	78	78	1	12	3	4	

\* tim 基因编码区长度为 774 bp \* The length of the coding region of tim gene is 774 bp.  
\*\* GenBank 登记虫株, 登记号, WB.L02120; GS.L02116. \*\* The GenBank accession numbers of the used isolates are, WB.L02120; GS.L02116.

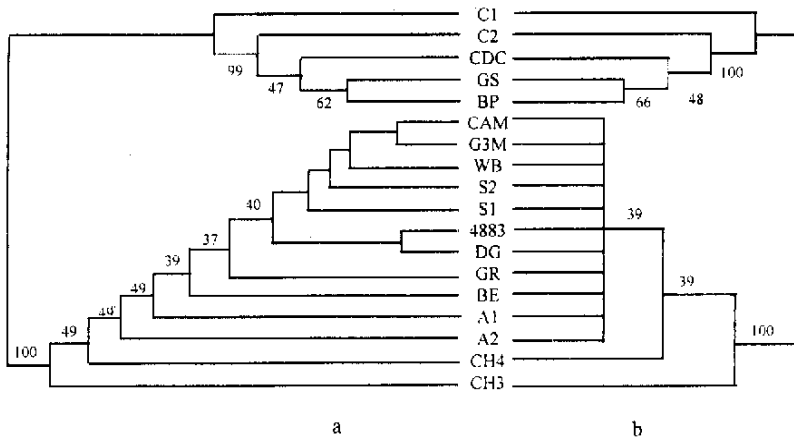


图3 贾第虫磷酸丙糖异构酶基因分子系统树

- a 基于 Kimura 双因子参数校正的距离值构建的 NJ 树
- b 基于 PAUP 构建的合意简约树枝上的数值为 1000 次自助法统计得到的对该枝的置信度

Fig. 3 Phylogenetic tree(unrooted)of *G. lamblia* based on *tim* gene sequences

- a Neighbor-joining phylogram constructed using the Kimura 2-parameter in MEGA(1.02)
  - b The consensus parsimony tree derived from heuristic search in PAUP ver 3.1
- Numberals on the branches are percentages of 1000 bootstrap replicates

这两种方法均进行了 1 000 次渐启式复制的 bootstrap 以分析枝的置信度。分子系统树显示,贾第虫可分为明显的两组。第 1 组有 13 株,以 WB 为代表;第 2 组有 5 株,以 GS 为代表。

## 讨 论

### 1 DNA 序列的加权

对近缘物种的比较,由于转换一般尚未趋于饱和,不包含很多进化杂音。因此,可以赋予转换和颠换相同的加权值<sup>[14]</sup>。由于我们是对同一物种作序列比较,因此,在对贾第虫 *tim* 基因序列比较过程中,赋予了转换和颠换相同的加权值。

### 2 宿主及地理因素对贾第虫遗传多样性的影响

对 *tim* 基因序列分析结果显示,有 23% 的位点发生变异,说明贾第虫具有丰富的种内遗传多样性。进一步证明贾第虫非单一物种,为复合种假说提供了强有力佐证。分析结果还显示,来源于人和动物宿主的虫株既有 WB 型也有 GS 型;中国和美国的地理位置虽相隔甚远,但分离自这两个国家的虫株同样有 WB 和 GS 型。来自加拿大、柬埔寨和澳大利亚的虫株则均为 WB 型。这些事实表明,宿主及地理因素对贾第虫群体的遗传多样性影响可能不大。

### 3 *tim* 基因序列的进化

一般而言,在某一基因的蛋白质编码区,同义突变因所受自然选择压力较小而易被固定下来。因此,如果自然选择在 DNA 水平上起显著作用,那末在编码区序列进化未达饱和之前,同义突变位点的进化速率应高于异义突变位点的。从我们所测得的贾第虫 *tim* 基因序列来看,密码子第三位点的转换均为同义突变,该位点的部分颠换和第一位点的部分转换也是同义的;而密码子第一位点的颠换以及第二位点的所有转换和颠换则是异义的。这些结果表明,第三位点的进化速率远远高于第一和第二位点,而第一位点的仅稍高于第二位点。总的来说,转换发生的频率约为颠换的 2.5 倍。

由此可见,由于贾第虫的生殖方式属无性繁殖,并不存在因配子随机结合而造成的遗传漂变的可能性<sup>[15]</sup>。加之,本虫群体遗传多样性几不受地理因素的影响。因而,在 DNA 分子进化水平上,自然选择的作用则是十分显著的。

总之,通过对 *tim* 基因序列分析,使我们了解了贾第虫种内丰富的遗传多样性和群体间的进化关系。用其序列构建的系统树主干分枝与最近报道的贾第虫属系统发育关系相符<sup>[16,17]</sup>。因此我们认为,在生物学上,*tim* 基因可作为贾第虫群体遗传结构

的一个十分有效的遗传标记。这一结论同时也为其它原生动物的进化研究提供了有益的启示;此外,在医学上它还可用于贾第虫病分子流行病学的研究。

致谢 美国 University of Arizona 的 R. D. Adam 教授和加拿大 University of British Columbia 的 J. Isaac-Renton 教授提供虫株,在此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev, 1991, 55: 706~732.  
 [2] Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzyme encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology, 1995, 111: 11~17.  
 [3] Meloni BP, Lymber AJ, Thompson RCA. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis. J Parasitol, 1995, 81: 368~383.  
 [4] Andrews RH. *Giardia intestinalis*; electrophoretic evidence for a species-complex. Int J Parasitol, 1989, 19: 183~190.  
 [5] Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Novel lineages of *Giardia intestinalis* by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitology, 1998, 116: 7~20.  
 [6] Weiss JB, Van Keulen H, Nash TE. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54: 73~86.  
 [7] Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epi-

demiology of *Giardia lamblia*; a sequence-based approach. J Infect Dis, 1996, 174: 233~2365.  
 [8] Lodi PJ, Chang CL, Knowles JR. Triose phosphate isomerase requires a positively charged active site; The role of lysine. Biochemistry, 1994, 83: 2809~2814.  
 [9] Kuntz DA, Osowski R, Scudok M. Inhibition of triose phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides. Eur J Biochem, 1992, 207: 441~447.  
 [10] Kuntz ID. Structure based strategies for drug design and discovery. Science, 1992, 257: 1078~1082.  
 [11] Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bible. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1983, 77: 487~488.  
 [12] Swofford DL. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 3. 1, Illinois Natural History Survey, Champaign. 1993.  
 [13] Kumar S, Tamura K, Nei M. 1993 MEGA; molecular evolutionary genetics analysis. version 1. 0.  
 [14] 张亚平. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究, 1996, 17: 247~252.  
 [15] 王喜忠, 杨玉华. 群体遗传学原理. 成都: 四川大学出版社, 1992.  
 [16] Andrews RH, Monis PT, Ey PL, et al. Comparison of the levels of intra-specific genetic variation with *Giardia muris* and *Giardia intestinalis*. Int J Parasitol, 1998, 28: 1179~1185.  
 [17] Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, et al. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol, 1999, 16: 1135~1144.

收稿日期: 1999-07-28  
 (编辑: 庄兆农)

MOLECULAR PHYLOGENY OF *GIARDIA LAMBLIA* BASED ON TRIOSE PHOSPHATE ISOMERASE (*tim*) GENE SEQUENCE

LI Ji-hong<sup>1\*</sup>, LU Si-qi<sup>2</sup>, ZHANG Ya-ping<sup>1</sup>, WANG Feng-yun<sup>2</sup>, WEN Jian-fan<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650233

2 Department of Cell Biology, Capital University of Medical Science, Beijing 100054)

**Abstract** [Objective] To investigate the intraspecies phylogeny and genetic diversity of *G. lamblia*. [Methods] Total genomic DNA was extracted and partial fragments of *tim* gene were amplified by PCR. All the nucleotide sequences were analyzed by means of phylogenetic analysis, which were constructed with pasimony and N-J methods. [Results] A total of 124 variable sites (23% of the total sequences detected) were defined, most of which were found at the silent sites of codons. Two similar phylogenetic trees were constructed, subdividing 16 isolates into two groups. [Conclusion] The genetic diversity of *G. lamblia* appear to be little affected by both the host and geography, while natural-selection might play an important role at the DNA molecular evolution level of *tim* gene. The *tim* gene may be considered to be a very useful genetic marker of the population genetic structure of *G. lamblia*.

**Key Words:** *Giardia lamblia*, triose phosphates isomerase, sequence analysis, phylogeny, genetic marker.

\* Present address: Department of Cell Biology, Capital University of Medical Science, Beijing 100054