

# 基于线粒体基因分析的中华血吸虫分子种系发生研究

张广军<sup>1</sup> 邱持平<sup>1</sup> 邱东川<sup>2</sup> 夏明仪<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 测定中华血吸虫线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1(CO1)和 NADH 脱氢酶亚基 1(ND1)基因序列,并根据这些序列构建分子系统发生树,探讨中华血吸虫在裂体属内的系统发生位置。方法 以 GNT-K 法抽提虫体基因组 DNA,用特异引物 PCR 扩增目的基因,PCR 扩增产物经纯化后克隆于质粒载体,以纯化后的阳性质粒 DNA 作为模板,M13(F/R)为引物于 Licor 测序仪测序。检索 GenBank,查找曼氏血吸虫等相关血吸虫两线粒体基因序列,作基因排序及比较分析后,用 PHYLIP 和 MEGA 以邻接法和最大简约法绘制系统发生树。结果 克隆了中华血吸虫的 CO1 和 ND1 基因片段,并测定了两基因片段的核苷酸序列,根据这些序列构建了系统发生树。结论 中华血吸虫 CO1 和 ND1 基因的系统发生树结果一致。提示中华血吸虫归属于亚洲血吸虫组。

**【关键词】** 中华血吸虫; CO1; ND1; 系统发生分析

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

## Study on Molecular Phylogeny of *Schistosoma sinensium* Based on Mitochondrial Genes

ZHANG Guang-jun<sup>1</sup>, QIU Chi-ping<sup>1</sup>, QIU Dong-chuan<sup>2</sup>, XIA Ming-yi<sup>1\*</sup>

(1 Institute for Parasitic Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025; 2 Institute of Parasitic diseases of Sichuan Province, Chengdu 610041)

**【Abstract】 Objective** To determine the phylogenetic position of *Schistosoma sinensium* in the genus *Schistosoma* using mitochondrial cytochrome C oxidase 1 (CO1) and NADH dehydrogenase 1(ND1) as molecular markers. **Methods** The genomic DNA of adult worms were extracted by the GNT-K method. The target regions were amplified by PCR using specific primers. The PCR products were purified before ligation into the plasmid Zero-Blunt. Recombinant plasmids were amplified in *E. coli*, extracted and purified using routine methods and then sequenced using M13 primers (F/R) on a Licor long-read auto-sequencer. Sequences of related schistosomes were retrieved from GenBank and aligned with our data in the sequence editor ESEE. Gene trees were constructed in PHYLIP and MEGA using both maximum parsimony and neighbor-joining methods. For parsimony analysis, all characters were treated as unordered and with equal weights. At least 3 000 cycles of bootstrapping were carried out. For analysis in MEGA, all gap columns were deleted. The third position of codon was included. **Results** The nucleotide and amino acid sequences of CO1 and ND1 of *S. sinensium* were obtained. **Conclusion** The phylogenetic trees from these molecular data suggested that *S. sinensium* belongs to the Asian schistosome group, and the results coincided with the previous rDNA (ITS2 & LSU) analysis results.

**【Key words】** *Schistosoma sinensium*, cytochrome C oxidase 1(CO1), NADH dehydrogenase 1(ND1), phylogenetic analysis

Supported by the Scientific Research Funds of the Ministry of Health, P. R. China (No. 97-1-023)

\* To whom correspondence should be addressed

\*\* WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis; Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, P. R. China

中华血吸虫 (*Schistosoma sinensium*) 寄生于啮齿动

物<sup>[1]</sup>,其虫卵具有类似曼氏血吸虫种群的长侧刺,而其成虫体表类似日本血吸虫,其染色体核型的研究发现中华血吸虫 I 号染色体为嵌合型,可能是由亚非血吸虫种杂交而成<sup>[2]</sup>。这些生物学特性提示该虫对裂体属血吸虫系统发生研究可能具有较重要的意义<sup>[3,4]</sup>。裂体属血吸虫通常分为 3 组:非洲组(曼氏和埃及血吸

基金项目:卫生部科学研究基金资助项目(No. 97-1-023)

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,卫生部病原与媒介生物学重点实验室,上海 200025; 2 四川省寄生虫病研究所,成都 610041; \* 单行本索阅寄夏明仪

虫种群)、亚洲组(日本血吸虫种群)和印地血吸虫组<sup>[3]</sup>。作者曾对该虫的细胞核核糖体基因(rDNA)进行研究,结果提示该虫归属于亚洲血吸虫组,且是该组血吸虫中较古老的虫种<sup>[5]</sup>。为进一步证实以上结果,本次选取了另一类研究系统发生常用的分子标记——线粒体基因进行研究。

## 材料与方 法

### 1 血吸虫成虫的采集和基因组 DNA 抽提

同文献[5]。

### 2 目的基因体外扩增

为扩增 CO1 基因,选用引物 JB3 和 JB4.5<sup>[6]</sup>,两引物的序列分别为:

JB3 (forward): 5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3';

JB4.5 (reverse): 5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3'。

ND1 基因扩增选用引物 JB11 和 JB12<sup>[7]</sup>,两引物的序列分别为:

JB11 (forward): 5'-AGA TTC GTA AGG GGC CTA ATA-3';

JB12 (reverse): 5'-ACC ACT AAC TAA TTC ACT TTC-3'。

PCR 反应体系:模板 DNA 5 μl, 10× 缓冲液 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 4 μl, 100 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 1 μl, 引物各 20 μmol, Vent (Biolab) 热聚合酶 1 U,加水至总体积 50 μl,最后用 50 μl 石蜡油覆盖。CO1 基因的扩增条件:95 ℃ 变性 2 min, 94 ℃ 1 min, 48 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.75 min, 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

ND1 基因扩增条件:95 ℃ 变性 2 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.75 min, 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

反应完毕,取反应产物 5 μl,加入 1 μl 6× 溴酚蓝,混匀后于 1% 琼脂糖凝胶 (EB 浓度为 5 μg/ml) 100 V 电泳 15 min,检查目的基因。

### 3 PCR 产物纯化

用 Qiagen 公司 QIAquick™ Gel Extraction Kit 割胶纯化 PCR 产物,所有操作均按产品说明书进行。

### 4 PCR 产物克隆及测序

用 Zero-Blunt™ PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen 公司) 将纯化后的 PCR 产物克隆入质粒载体 pCR-Blunt,每个样本取 3 个阳性重组体,再用标准方法提取质粒 DNA, EcoR I 酶切检查阳性后纯化质粒 DNA<sup>[8]</sup>。用 Licor auto-sequencer-400L 测序仪测序,测序反应系统为 Thermo sequenase fluorescent labelled

primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP RPN2538 (Amersham Pharmacia Biotech)。使用 GeneDoc 将测得的核苷酸序列根据曼氏血吸虫遗传密码子<sup>[9]</sup>翻译成氨基酸序列。

### 5 相关血吸虫基因序列的比较及进化树的构建

检索 GenBank 找出相关血吸虫的 CO1 和 ND1 序列。CO1 的各序列号分别为:马来血吸虫 (*S. malayensis*) AC: U 82262, 湄公血吸虫 (*S. mekongensis*) AC: U 22163, 曼氏血吸虫 (*S. mansoni*) AC: U 82265, 埃及血吸虫 (*S. haematobium*) AC: U 22159, 麦氏血吸虫 (*S. mattheei*) AC: Z 21718, 间插血吸虫 (*S. intercalatum*) AC: U 22160, 肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) AC: M 93388, 卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) AC: AF 219379。ND1 各序列号分别为:曼氏血吸虫 AC: AF 216698, 马来血吸虫 AF 295106, 湄公血吸虫 AC: AF 217449, 肝片吸虫 AC: M 93388, 卫氏并殖吸虫 AC: AF 219379。使用 GeneDoc 和 ES-EE 软件包对所得基因进行排列比较 (alignment), 使用 PHYLIP (Version 3.6 alpha, July, 2000) 和 MEGA (Version 2.0 beta build 3) 计算遗传距离并绘制系统发生树。每个基因树均进行自举检验 (bootstrap) 分析,邻接法 (NJ) 构建进化树时自举检验次数为 3 000, 最大简约法 (MP) 构建进化树时自举检验次数为 500。建树时将空格删除,以减少引入可疑数据的可能。建树过程中将遗传密码子的第 3 位碱基计算在内。

## 结 果

本次研究得到了中华血吸虫的 CO1 和 ND1 基因序列,两者的长度分别为 402 bp 和 476 bp。DNA 序列以及参考血吸虫线粒体密码子预测的氨基酸序列见图 1、图 2。根据 CO1 推算的中华血吸虫与日本血吸虫、马来血吸虫、湄公血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、间插血吸虫、华支睾吸虫的奈氏 (Tajima-Nci) 遗传距离分别为:0.225、0.216、0.194、0.308、0.286、0.298、0.324。根据 ND1 推算的中华血吸虫与日本血吸虫、湄公血吸虫、马来血吸虫、曼氏血吸虫、卫氏并殖吸虫及肝片吸虫的奈氏遗传距离分别为:0.433、0.424、0.425、0.736、1.199、1.002。在两基因排列比较的基础上,用邻接法和最大简约法构建的系统发生树结果基本一致, NJ 树见图 3、图 4。CO1 和 ND1 基因系统发生树提示的各血吸虫间的系统发生关系一致,亚洲和非洲血吸虫各形成一支系,中华血吸虫归属于亚洲血吸虫组(日本血吸虫种群),且是该组血吸虫中较早的分支。

```

TTT TTT GGG CAT GCT GAG GTT TAT GTT TTA ATA GTT CCG GGG TTT GGT ATG GTA AGA CAT 80
A F F G H P E V Y V L L L P G F G V S 20
ATA TGT ATG ACG TTG AGC AAA AAA AAT TCT TCT TTC GGT TAT TAT GGT TTA GTT TGT GCT 120
M C M T L S N N N S S F G Y Y G L V C A 40
ATG GGC TGA ATA GTC TGT TTA GGT AGT GTA GTT TGA GCT CAT CAT ATG TTT ATG GGT GGT 180
M G S M V C L G S V V W A H H M F M Y G 80
ATG GAT GTT AAG ACT GCT GTT TTC TTT AGG TCT GTT ACT ATG ATT ATT GGC ATA CCG ACT 240
M D V K T A V F F S S V T M I I G M P T 80
GGT ATA AAG GTA TTT TCT TGA TTA TTT ATG TTA AGT AGA AGA GGC TTA CAT GTA ATG GAC 300
G M K V F S W L F M L S S S G L H V M D 100
CCG GTT GTA TGG TGG GTT ATT GGT TTT ATT TTT TTA TTT ACA GTT GGT GGT GTG ACT GGT 360
P V V W W V I G F I F L F T V G G V T G 120
TTA GTA TTA TGA GCT TCT GCA GTG GAT AAC TTG TTT CAC GAT ACT TGA TTT GTA ATA GCA 420
L V L S A S A L D M L F H D T W F V M A 140
CAT TTT CAT TAT GTT GTT TCT TTA 444
H F H Y V L S I 148
    
```

1

```

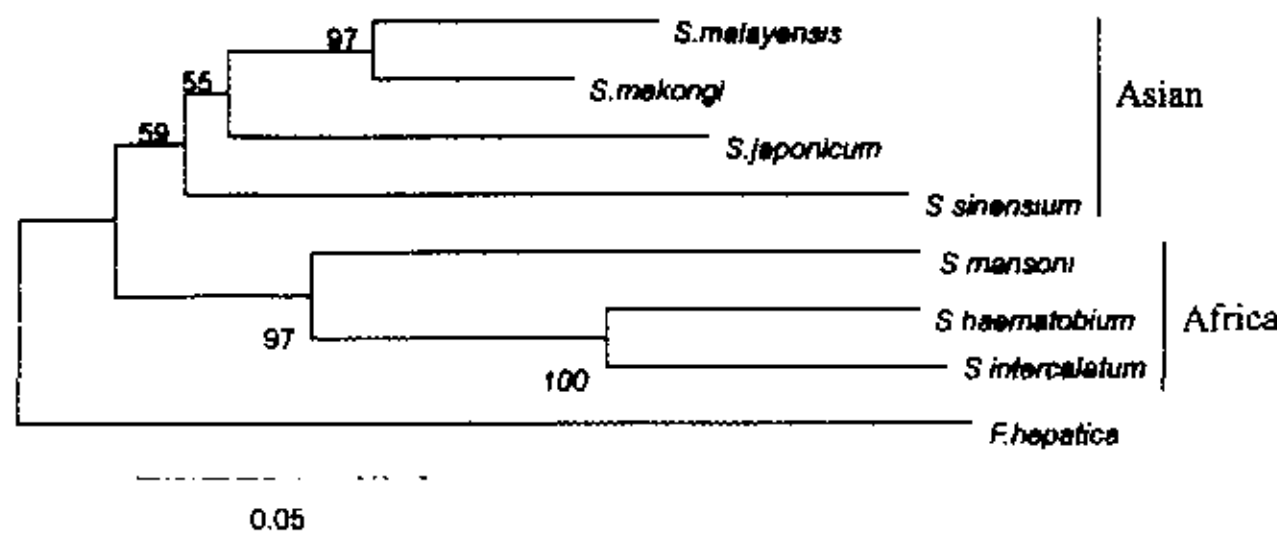
ATT CGT AAG GGG CCT AAG AAG GTT GGT TTA GCA GGT TTG ATG CAA AGA TTT TCA GAT TTT 80
I R K G P N K V G L A G L M Q S F S D F 20
ATA AAG TTG ATA GTT AAG AGT AAG GGT AAA GGA TAC GTA GTC CAT TGG TGG TTT TGT TGA 120
M K L M V K S K A N G Y V V H W W F C W 40
TTT GGT TGT TTA ATT TTG TTG AIT TGT TGT GTT ATG TGT TGT TAT TTA TAT AGA TTT GTT 180
F G C L I L L I C C V M C C Y L Y S F V 60
AGA AGT TGA ATT TAT TAT AAG TTT TGT TTA TTG TAT TTT TTA GTT TTA TCT AGA TTT ATT 240
S S W I Y Y K F C L L Y F L V L S T F I 80
GGT TAT GGT TGA TTA ATA TTA GGA TTT GGT TCT TGA AAA AAG TAT AGT TTG ATG AGA GCT 300
G Y G W L M L G F G S W M K Y S L M S A 100
GTT CGT GTG TCT TTT GCT AGC GTA AGA TTT GAG GCT GTG TTT AIG TGT GTT TTG TTA ATT 360
V R V S F A S V S F E A V F M C V L L I 120
TAT GGG TTA TTA TAT AAA GAT TAT GGT AAT CGA GTA GAT AGC TAT TTA TTT TTT GTT GTT 420
Y G L L Y M D Y G N R V D S Y L F F V V 140
GCA TTA TGT TAT TTT ATT TGA TTA ATT TCA TTA ACT AGT GAA AGT AGT AGT AGA CCG TTT 480
P L G Y F I W L I S L T S E S S R T P F 160
GAC TAT GGT GAA GCT GAA AGT GAA TTA GTT AGT GGT 516
D Y G E A E S F L V S G 172
    
```

2

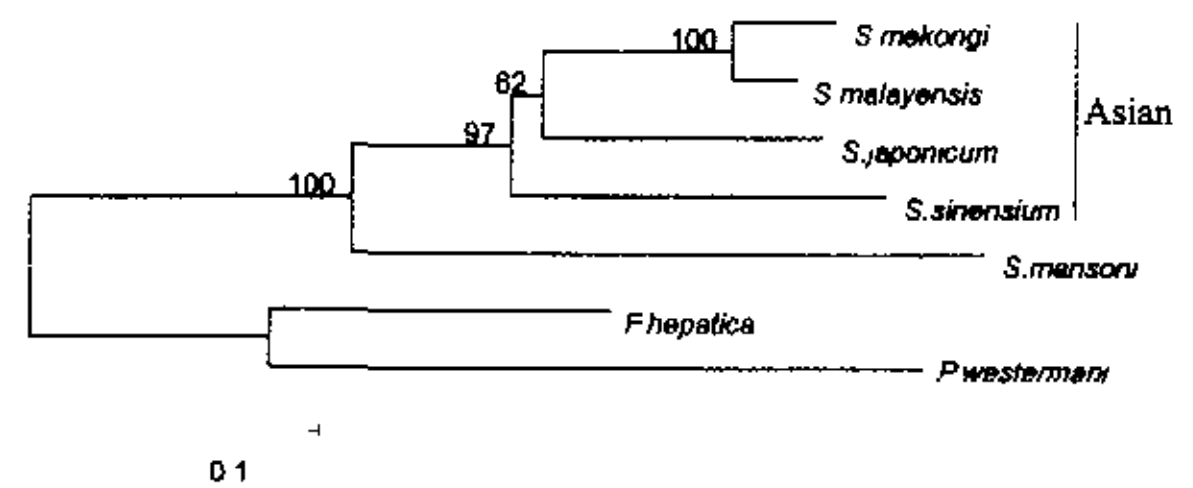
图 1 中华血吸虫 CO1 基因的核苷酸序列及氨基酸序列 图 2 中华血吸虫 ND1 基因的核苷酸序列及氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of cytochrome C oxidase 1 of *Schistosoma sinensium*

Fig. 2 The nucleotide and amino acid sequences of NADH dehydrogenase 1 of *Schistosoma sinensium*



3



4

图 3 由 CO1 基因得到的分子系统发生树

图 4 由 ND1 基因得到的分子系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from nuclear CO1 of 7 schistosome species using Neighbor-joining method with Kimura 2-parameter distance, *Fasciola hepatica* used as outgroup. Bootstrap percentage derived from 3000 replications were indicated above branches

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from nuclear ND1 of 5 schistosome species using Neighbor-joining method with Kimura 2-parameter distance, *Fasciola hepatica* and *Paragonimus westermani* used as outgroups. Bootstrap percentage derived from 3000 replications were indicated above branches

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from nuclear CO1 of 7 schistosome species using Neighbor-joining method with Kimura 2-parameter distance, *Fasciola hepatica* used as outgroup. Bootstrap percentage derived from 3000 replications were indicated above branches

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from nuclear ND1 of 5 schistosome species using Neighbor-joining method with Kimura 2-parameter distance, *Fasciola hepatica* and *Paragonimus westermani* used as outgroups. Bootstrap percentage derived from 3000 replications were indicated above branches

## 讨 论

线粒体 DNA (mtDNA) 为双链闭环分子, 具有独立进化且速率较核 DNA 快、基因组精简等特点。另外由于线粒体为母系遗传, 线粒体基因间不发生重组, 所以可以反映出母系的进化历史, 这样线粒体一个基因就可以代表整个线粒体基因组的变异情况。线粒体基因在血吸虫分类和种系发生的研究十分成功, 尤其是适合于较近缘的物种之间 (例如种下水平) 的研究。曼氏血吸虫的线粒体基因组共编码 2 个核糖体 RNA (12S、16S)、22 个 tRNA、1 个细胞色素 b (Cytb)、3 个细胞色素氧化酶亚基 (CO1、CO2、CO3)、6 个

NADH 脱氢酶亚基 (ND1~ND6) 及 1 个 ATP 酶基因 (ATPase6)<sup>[11-13]</sup>。其中 CO1 是线粒体基因组中进化速率较慢的, 而 ND1 的进化速率则较快, 所以本次研究选取两者作为分子标记进行研究。

有关中华血吸虫的裂体属内种系发生位置, 同以前关于第 2 内转录间隔区 (ITS2) 和核糖体大亚基 (LSU/28S) 的分析结果一致<sup>[5]</sup>, 即裂体属血吸虫主要形成亚、非两个支系, 中华血吸虫同日本血吸虫、马来血吸虫和湄公血吸虫共同构成亚洲血吸虫支系。细胞核的核糖体基因 (rDNA) 同线粒体基因的分析结果一致, 更增强了其结果的可靠性。这与该虫的成虫体表结构、地理分布、中间宿主种类相一致。另外, 由

于目前尚未得到裂体属下 19 种物种的系统发生树<sup>[3]</sup>, 特别是 Snyder 和 Loker 发现土耳其斯坦东毕吸虫 (*Orientobilharzia turkestanicum*) 的系统发生位置处于裂体属内<sup>[14]</sup>, 更使得该属血吸虫扑朔迷离。这些血吸虫是否单一起源, 地理起源是非洲还是亚洲, 还需要进一步研究。

关于分子系统发生树的构建常用的有 3 种方法, 即最大似然法、最大简约法和距离法。距离法中以邻接法最为常用。三者各有不同的基本假设和优缺点, 很难说哪种方法最好, 并且目前尚无统一的方法, 所以用这些方法构建系统发生树时, 如果得到的结果一致, 则较理想<sup>[15]</sup>。对于蛋白质编码基因, 是否考虑密码子的第 3 位碱基, 作者认为, 如果研究的历史事件发生的年代久远, 可不考虑第 3 位碱基, 若发生于较近的历史年代, 构建进化树时则需要将密码子的第 3 位碱基计算在内。本研究的对象是在种分化的水平上, 所以建树过程中考虑了密码子的第 3 位碱基。

参 考 文 献

[1] 张广军, 邱持平, 夏明仪. 中华血吸虫研究进展 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2): 92-97.

[2] Hirai T, Taguchi Y, Saitoh M, et al. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex [J]. Int J Parasitol, 2000, 30: 441-452.

[3] Rolliston D, Kaukas A, Johnson DA, et al. Some molecular insights into schistosome evolution [J]. Int J Parasitol, 1997, 27: 11-28.

[4] Herwerdew LV, Blair D, Agatsma T. Intra- and inter-specific variation in neuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma*

*japonicum* species complex [J]. Parasitol, 1998, 116: 311-317.

[5] 张广军, 邱持平, 邱东川, 等. 基于核糖体基因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.

[6] Bowles J, Hope M, Tiu W, et al. Neuclear and mitochondrial markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum* [J]. Acta Tropica, 1993, 55: 217-229.

[7] Bowles J, Blair D, McManus DP. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol, 1994, 109: 215-221.

[8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning; a laboratory manual [M]. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989: 1.22-1.23.

[9] Blair D, Le TH, Despres L, et al. Mitochondrial genes of *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitol, 1999, 119: 303-313.

[10] Le TH, Blair D, McManus DP. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes; the current status [J]. Int J Parasitol, 2000, 30: 283-290.

[11] Feagin, JE. Mitochondrial genome diversity in parasites [J]. Int J Parasitol, 2000, 30: 371-390.

[12] Boore JL. Animal mitochondrial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 1767-1780.

[13] Le TH, Blair D, Agatsuma TH, et al. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders — a cautionary tale from the parasitic flatworms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17: 1123-1125.

[14] Snyder S, Loker ES. Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma* [J]. J Parasitol, 2000, 86: 283-288.

[15] Hillis DM, Moritz C, Mable BK. Molecular Systematics [M]. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts USA, 1996.

(收稿日期: 2001 04 06 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2002)-01-0013-01

【读者投书】

关于对“亚洲无钩绦虫感染者在云南省首次发现”的更正意见

中国寄生虫学与寄生虫病杂志编辑部:

接读贵刊 1999 年第 17 卷第 2 期 95~96 页张莉莉等发表的论文“亚洲无钩绦虫感染者在云南省的首次发现”, 发现该文附图中 2~4 图均为猪带(猪肉/有钩)绦虫之形态特征(morphological characteristics of *Taenia solium*), 图 2. 孕节( gravid proglottid), 图 3. 囊尾蚴原头节(*Cysticercus protoscolex*)实为 *Cysticercus cellulosae*, 图 4. 囊尾蚴原头节小钩(rostellum hooks of *Cysticercus*)实为图 3 的放大。上述图 2~4 均非亚洲无钩绦虫(*Taenia saginata asiatica*)。再者, ① 该文用吡喹酮片驱绦虫非常不妥, 因为吡喹酮驱出的虫体都是碎段, 无法测量虫体的长度及计算绦虫的节片数, 如果患者已感染脑囊虫, 容易出现副反应; ② 该文报告给 2 例患者驱虫, 每例驱出 2 条, 驱出的虫体已呈碎段, 那么链体节片数是如何计算的? 链体节片约 2500 节的数字由何而来? ③ 报告的囊尾蚴测量值(2 000—35 000×1 500—25 000)μm 过大, 囊尾蚴头钩也过长过大。以上诸点望惠予更正, 实为至盼。

范秉真 阳明大学寄生虫学科 台北 112  
马云祥 河南省卫生防疫站 郑州 450003  
2002 年 1 月 14 日