

湖北钉螺 CO I 序列差异的扩展研究

关飞 牛安欧* 韩庆霞 陈琼荣

【摘要】 目的 研究中国 21 株湖北钉螺细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase I, CO I) 基因序列差异和各地域株的亚种分化。方法 收集中国 4 省 7 地湖北钉螺标本,提取基因组 DNA 后,PCR 扩增 CO I 基因部分片段并进行序列测定。加入原有 14 株钉螺 CO I 序列,用 Clustal X 进行序列比对后输入 MEGA 软件计算遗传距离,并分析序列集变异情况。采用距离法构建系统进化树。结果 所有 21 株标本经过序列比对得到一致性长度为 611 bp。序列集中变异位点为 19.3%。编码的 203 个氨基酸中仅有 1 个氨基酸的差异。21 株钉螺平均遗传距离为 0.0526,其中四川、云南株与其他地域株之间差异较大,为 0.1296~0.1572,其余两两之间的距离均 <0.06。采用邻接法和非加权组平均法两种方法构建系统进化树,拓朴结构基本一致,四川、云南株聚为一支,其余株位于另外分支,且湖北赤壁株及湖北远安、钟祥株显示出特异性。结论 中国湖北钉螺 CO I 基因存在差异。原有分类中滇川、福建、指名、广西亚种成立。湖北赤壁株似为独立亚种。

【关键词】 湖北钉螺;细胞色素氧化酶 I;系统发育

Extended study on CO I sequence variation of *Oncomelania hupensis* GUAN Fei, NIU An-ou*, HAN Qing-xia, CHEN Qiong-rong. Department of Pathogenic Biology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

* Corresponding author: NIU An-ou, Email: anouniu@mails.tjmu.edu.cn

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities(2010QN020)

【Abstract】 Objective To study the cytochrome oxidase I sequence difference and subspecies evolution of 21 strains of *Oncomelania hupensis* in China. **Methods** Samples were collected from 7 sites in 4 provinces. Genomic DNAs were extracted from each strain and then used as template for CO I fragment amplification by PCR. The amplified product was sequenced with primers in two directions respectively. The 7 sequences, together with other 14 CO I sequences were aligned with Clustal X and then pair-wise distances were accounted using MEGA software. Phylogenetic trees were reconstructed based on distance methods. **Results**

The CO I sequences of all 21 strains had a length of 611 bp after a global alignment, 118 bp (19.3%) of which were variable sites. The DNA sequence was translated into 203 amino acids with 1 different amino acid. Among the 21 strains, mean evolutionary distance was 0.0526. The distance between Sichuan, Yunnan and other strains was 0.1296~0.1572, much more than others. The phylogenetic trees constructed with neighbour-joining(NJ) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) showed similar topological structure, strains of Sichuan and Yunnan clustered in one clade, while others were in another clade. There were some differences among the strains of Chibi, Yuan'an and Zhongxiang from Hubei Province. **Conclusion** The CO I sequences of *O. hupensis* in China showed significant variation. Hubei-Chibi seemed to be an independent subspecies, except 4 existent subspecies of *O. hupensis robertsoni*, *O. hupensis guangxiensis*, *O. hupensis tangi*, *O. hupensis hupensis*.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Cytochrome oxidase I; Phylogeny

湖北钉螺是日本血吸虫的惟一中间宿主,主要分布于中国、日本、菲律宾和印度尼西亚等国,其中在中国主要分布于长江流域。关于中国大陆湖北钉螺的亚种分化一直存在着争议。在以往的研究中,我们发现位于湖北省钟祥大口林场的钉螺在分子水平上显示出特殊性^[1],为进一步明确其特殊性,我们选取钟祥大口和冷水镇的湖北钉螺,利用序列分析进行遗传差异研究。同时广西西部局部地区的某

地域株也具有一定的特殊性,关于其是否为独立亚种尚无明确定论。为进一步明确上述问题,我们选取湖北钟祥、湖南临湘、广西、浙江等地钉螺进行分析,以期对湖北钉螺的遗传差异研究提供更多依据。

1 材料和方法

1.1 标本收集

收集湖北省远安、钟祥冷水镇和大口林场,湖南临湘、浙江开化、广西横县、云南永胜等 7 地钉螺标本,带回实验室短期饲养并经逸蚴筛选后,阴性钉螺晾干置于 -30℃ 冰箱冻存。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定

各地选取 3 个标本,按照参考文献[2]中的方法提取基因组 DNA,并参照文献[3]中特异性引物扩增细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase I, CO I) 基因片段,所得产物用扩增引物进行上下游双向测序。测得序列经 BioEdit 软件拼接得到引物间片段。

1.3 序列分析

引用文献[1-2]中的 14 株湖北钉螺 CO I 序列(分别来自台湾彰化、台北、福建福清、浙江常山、江西新建、湖南岳阳、安徽铜陵、广西靖西、四川天全、云南洱源以及湖北的松滋、赤壁大田畈、武汉、阳新)与本实验测序得到的序列一并组成钉螺 CO I 序列集。得到的序列输入 Clustal X 软件进行比对,参数默认设置。比对结果用 MEGA3.1 软件进行序列差异分析,用 Kimura 双参数法计算两两之间的遗传距离。分别用邻接法(NJ)和非加权平均法(UP-GMA)构建系统发生树。所得进化树采用自展法(Bootstrap = 1 000 次)进行统计分析。

2 结果

2.1 标本形态

各地标本形态描述见表 1。

2.2 CO I 片段扩增和序列分析

经 PCR 扩增得到大小约 700 bp 的片段,将所测序列去掉两端引物后为 638 bp。将所得序列提交

GenBank 获得登录号,所有检索号见表 1。加入其余 14 株本室已测得的序列后共得到 21 株标本。因湖北武汉、福建福清等地湖北钉螺 CO I 片段长度为 611 bp,遂将所有序列长度调整一致。所有序列经 Clustal X 软件比对结合手工校正后得到 611 bp 的序列集。各碱基组成为: T 36.7%, C 19.5%, A 21.9%, G 22.0%。其中变异位点为 118(19.3%),简约信息位点有 95 bp,变异位点中 15 个位于第 1 密码子,其余 103 个均位于第 3 密码子。将核酸序列翻译成氨基酸,203 个氨基酸中仅有 1 个氨基酸的变异。

采用 Kimura 双参数法计算两两之间的遗传距离,结果见表 2。21 株钉螺平均遗传距离为 0.0526,其中四川天全及云南永胜、洱源株与其他 18 株之间的差异较大,为 0.1296 ~ 0.1572,而其余两两之间的距离均 < 0.06,以湖北松滋和阳新,浙江常山和福建福清之间的距离最小(均为 0),序列间无差异。

2.3 进化树重建

分别用 NJ 和 UP-GMA 法构建系统发生树见图 1。其中四川、云南 3 株钉螺在两种方法构建的进化树中均聚为一支,与其余 18 株独立开来(分支支持值为 100%)。而其余 18 株中,湖北远安、冷水及大口三株在两种方法构建的进化树中位置有较大变化,除此之外,其余 15 株结构较稳定。进一步去除湖北远安、冷水及大口 3 个地域株后得到进化树结果见图 2。两种方法得到的结果基本一致,分支支持值也较高。

表 1 7 株标本采集地、形态及登录号

Table 1 Collection sites, morphology and accession numbers of the 7 samples

株名 Isolates	采集地及经纬度 Collection sites & coordinates	形态特征 Morphology	登录号 Accession number
大口 Dakou	湖北钟祥市大口林场 31°6' N, 112°48' E	壳高 6.1 ~ 7.1 mm, 壳质厚而坚固。5 ~ 6 个螺层, 壳顶钝圆, 壳顶磨损明显。各螺层缓慢均匀增长, 壳面上有纵行排列的粗的或细的肋。壳口类圆形, 周缘完整 ^[1]	EU333402
冷水 Lengshui	湖北钟祥市冷水镇 31°6' N, 112°26' E	壳高 6.1 ~ 8.5 mm, 壳质较厚而坚固。6 ~ 7 个螺层, 各螺层缓慢均匀增长, 壳顶尖细, 壳面平坦。壳面光滑, 壳口呈喇叭形, 周缘完整 ^[1]	EU333403
远安 Yuan'an	湖北省远安县鸣凤镇 31°3' N, 111°38' E	壳高 6.7 ~ 7.7 mm, 壳质薄而坚固。6 ~ 7 个螺层, 各螺层缓慢均匀增长, 壳顶尖细, 壳面略膨出, 体螺层略膨大。壳面上有稀疏纵行排列的细肋。壳口呈泪滴形, 周缘完整 ^[1]	GU367392
临湘 Linxiang	湖南省临湘市白云镇 29°29' N, 113°24' E	壳高 6 ~ 7 mm, 螺壳黄褐色, 质薄而坚固。6 ~ 7 个螺层, 各螺层均匀增长, 表面有细肋。壳口卵圆形, 边缘完整。唇峰明显	GU367390
横县 Heng County	广西横县陶圩镇 22°49' N, 109°7' E	壳高 5.5 ~ 6.5 mm, 螺壳黑褐色, 质厚。5 ~ 6 个螺层, 各层缓慢增长, 表面有细肋。壳口斜卵圆形, 边缘完整	GU367391
开化 Kaihua	浙江省开化县张湾乡 29°7' N, 118°12' E	壳高 6 ~ 7 mm, 螺壳褐色。6 个螺层, 体螺层略膨大, 表面光滑无纵肋。壳口斜卵圆形, 周缘完整	GU367393
永胜 Yongsheng	云南省永胜县新民村 26°41' N, 100°45' E	壳高 5 ~ 6 mm, 螺壳黑色, 质薄。5 个螺层, 表面光滑无纵肋。壳口卵圆形, 周缘完整	GU367389

表 2 21 株钉螺两两之间的遗传距离
Table 2 Pair-wise distances among 21 strain snails

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 湖北临湘																				
2 湖南岳阳	0.0066																			
3 浙江开化	0.0149	0.0082																		
4 江西新建	0.0132	0.0066	0.0016																	
5 湖北武汉	0.0099	0.0033	0.0066	0.0049																
6 广西横县	0.0149	0.0082	0.0116	0.0099	0.0083															
7 安徽铜陵	0.0116	0.0049	0.0116	0.0099	0.0049	0.0116														
8 湖北松滋	0.0132	0.0066	0.0082	0.0066	0.0082	0.0116	0.0033													
9 湖北阳新	0.0132	0.0066	0.0082	0.0066	0.0082	0.0116	0.0033	0.0000												
10 浙江常山	0.0235	0.0166	0.0217	0.0200	0.0200	0.0251	0.0149	0.0132	0.0132											
11 福建福清	0.0235	0.0166	0.0217	0.0200	0.0200	0.0251	0.0149	0.0132	0.0132	0.0000										
12 台湾彰化	0.0217	0.0149	0.0234	0.0217	0.0183	0.0234	0.0132	0.0149	0.0149	0.0183	0.0183									
13 湖北延安	0.0234	0.0166	0.0183	0.0166	0.0183	0.0217	0.0133	0.0099	0.0099	0.0166	0.0166	0.0217								
14 湖北大口	0.0251	0.0183	0.0234	0.0217	0.0200	0.0234	0.0150	0.0150	0.0150	0.0251	0.0251	0.0234	0.0150							
15 湖北冷水	0.0183	0.0116	0.0166	0.0149	0.0132	0.0166	0.0083	0.0083	0.0083	0.0183	0.0183	0.0166	0.0116	0.0133						
16 湖北赤壁	0.0252	0.0183	0.0268	0.0251	0.0217	0.0268	0.0166	0.0183	0.0183	0.0252	0.0252	0.0234	0.0251	0.0234	0.0166					
17 台湾邱氏	0.0321	0.0251	0.0286	0.0269	0.0251	0.0251	0.0217	0.0217	0.0217	0.0355	0.0355	0.0337	0.0286	0.0304	0.0235	0.0338				
18 广西靖西	0.0480	0.0444	0.0496	0.0478	0.0478	0.0496	0.0426	0.0443	0.0443	0.0516	0.0516	0.0497	0.0443	0.0497	0.0426	0.0444	0.0461			
19 云南永胜	0.1528	0.1528	0.1528	0.1506	0.1528	0.1442	0.1530	0.1487	0.1487	0.1550	0.1550	0.1526	0.1423	0.1530	0.1423	0.1572	0.1465	0.1509		
20 云南洱源	0.1526	0.1504	0.1526	0.1504	0.1526	0.1440	0.1506	0.1463	0.1463	0.1526	0.1526	0.1502	0.1399	0.1506	0.1399	0.1548	0.1485	0.1442	0.0234	
21 四川天全	0.1378	0.1378	0.1421	0.1399	0.1378	0.1336	0.1359	0.1359	0.1359	0.1399	0.1399	0.1376	0.1296	0.1444	0.1296	0.1421	0.1423	0.1401	0.0268	0.0337

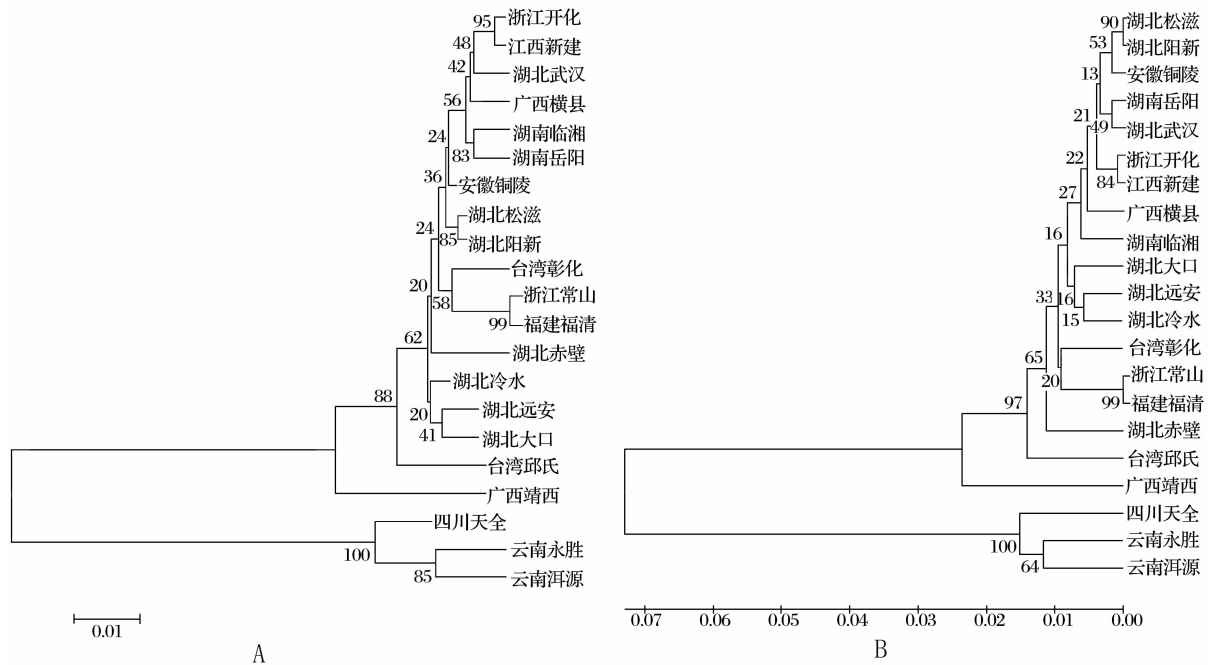


图 1 21 株钉螺构建的系统进化树 (A: NJ, B: UPGMA)
 Fig. 1 Phylogenetic trees constructed with 21 strains of *Oncomelania hupensis* using NJ and UPGMA methods

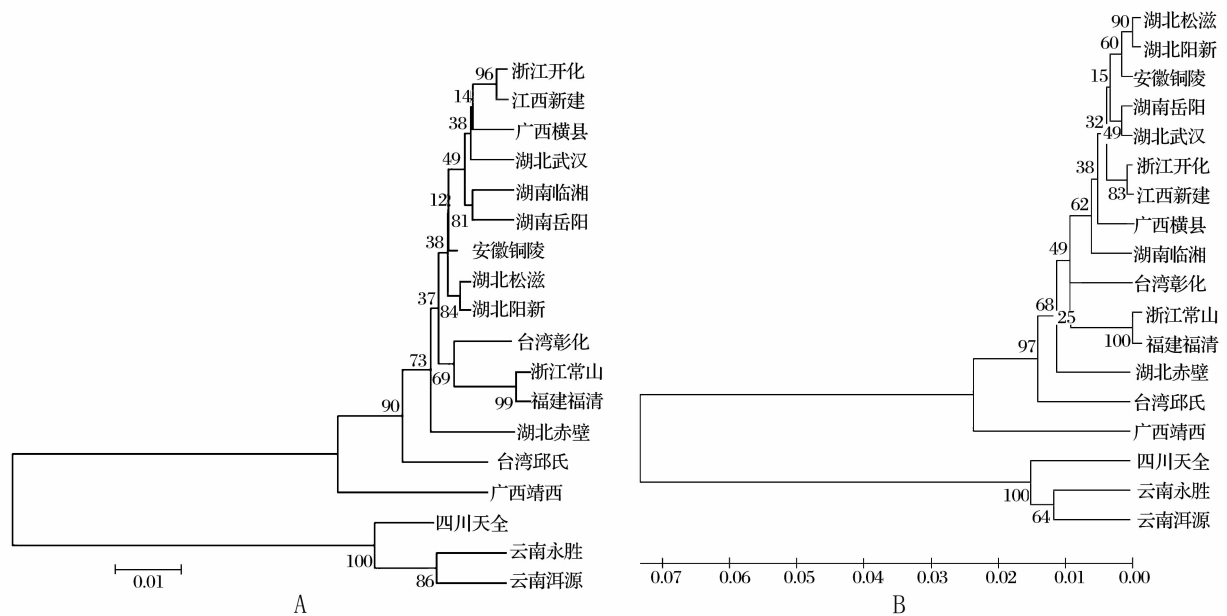


图 2 18 株钉螺构建的系统进化树 (A: NJ, B: UPGMA)
 Fig. 2 Phylogenetic trees constructed with 18 strains of snails using NJ and UPGMA methods

3 讨论

在系统进化和分类学研究中,分子标志的选择至关重要。本研究采用较为通用和普遍的 CO I 基因片段作为分子标志对湖北钉螺进行进化分析。

进化树中湖北省内各地域株均位于指名亚种分支,仅赤壁大田畈株较为特殊,始终独立于湖北其余株,甚至位于台湾滨海和福建亚种之外的分支。该结果与韩庆霞等^[2]得到的结果基本一致,在其基础

上本研究增加 8 个地域株后发现其拓扑结构亦无变化,表明该结论较为可信。赤壁大田畈株与湖北其余株的遗传距离差异较大,在进化树中的位置也更为特殊,提示该地域株可能应归为一独立亚种。为进一步证实其亚种的独立性,我们选取了与该地极为接近的临湘(相距 50 km 而且生态环境相近)钉螺加入分析,发现临湘株位于指名亚种而与该株差异较大。该地域株在形态上也较为特殊,大田畈株

为光亮而同为赤壁的车埠株为肋壳,且大田畈偏离长江水系,受长江洪水的影响较小,因而与长江流域的其余株之间基因交流少,遗传距离也大。此外赤壁大田畈株在起源上是否为一独立亚种,目前尚无明确依据,还需进一步证实。

其余湖北 6 株中大口、冷水及远安株在图 1 中两种方法显示出非一致性,而在去掉该 3 株后则拓扑结构较为稳定,表明该 3 株有一定的特殊性,但具体原因还需研究。

广西靖西株在两种进化树中均位于独立分支,显示出特殊性,该结果与 Li 等^[5]采用表达序列标签分析得到的结论一致,表明靖西株可能为独立亚种(即 Li 文中的广西亚种)。而周艺彪等^[6-7]采用微卫星等方法研究发现广西宜州与其余地域的钉螺存在差异,但该株与靖西株是否为同一亚种,目前尚无相关研究。另外,广西横县株位于指名亚种分支,表明目前广西至少存在 2 个亚种即广西亚种和指名亚种。这两者在形态上也略有差异,广西靖西株为光亮而横县株为细肋,这可能是由于分布于不同的水系导致交流的隔绝而遗传差异较大所致。浙江常山株与闽亚种及台亚种距离较近,而同属浙江的开化株则位于指名亚种各株之间,相距较远,表明浙江省湖北钉螺也可能存在 2 个亚种。同时,浙江两株中常山株为细肋而开化株则为光亮,形态上也存在差

异。因此,上述各地域株钉螺除台湾省存在着台湾亚种和滨海亚种 2 个亚种外,浙江、广西、湖北也存在 2 个亚种。

参 考 文 献

- [1] 赵恺,石鑫玮,陈兴华,等. 用 RAPD 技术对湖北大口等 3 地的钉螺遗传差异初探[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(10): 978-980.
- [2] 韩庆霞,牛安欧,李金木. 不同地域株湖北钉螺 CO I 基因的差异研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(4):320-322.
- [3] 关飞,牛安欧,李友松. 中国不同种拟钉螺 CO I 基因序列差异分析及其系统学初探[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(1): 45-47.
- [4] 刘蓉,牛安欧,李莉. 用 RAPD 技术对湖北钉螺遗传变异的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志,2004,17(3):136-139.
- [5] Li SZ, Wang YX, Yang K, et al. Landscape genetics: the correlation of spatial and genetic distances of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host snail of *Schistosoma japonicum* in mainland China [J]. Geospatial Health,2009,3(2):221-231.
- [6] 周艺彪,赵根明,彭文祥,等. 日本血吸虫中间宿主湖北钉螺遗传变异的空间相关分析[J]. 复旦学报(医学版),2007,34(2):207-212.
- [7] 周艺彪,赵根明,韦建国,等. 微卫星锚定 PCR 分析 19 个湖北钉螺种群之间的遗传变异关系[J]. 中华流行病学杂志,2007,28(9):859-862.

(收稿日期:2010-07-27)

(本文编辑:姬晓云)