

文章编号:1000-7423(2004)-05-0274-03

子一代实验室钉螺细胞色素 c 氧化酶 I、 细胞色素 b 基因序列分析

张仪¹, Yamasaki Hiroshi², 刘和香¹, 冯婷¹, 冯正¹

【摘要】 目的 了解钉螺子一代(F1)实验室钉螺群(湖北钉螺湖北亚种)内的遗传变异。方法 实验室饲养的 F1 钉螺,单个抽提基因组 DNA,PCR 扩增细胞色素 c 氧化酶 I(COI)、细胞色素 b(Cytb)基因并测序,用 GENETYX-MAC ver. 9 软件进行同源排序、DNA 和氨基酸序列分析,同时与 GenBank 相同基因序列比较。结果 实验室螺群内,COI 基因差异为 12.2%,94 个氨基酸发生变化。Cytb 基因差异 6.4%,有 25 个氨基酸发生变化。湖北亚种与滇川亚种 COI 基因序列差异率为 13.5%。与 GenBank 中湖北钉螺滇川亚种 Cytb 基因序列比较,差异为 13.6%,在 203 个氨基酸中 6 个氨基酸发生变化。结论 F1 实验室钉螺群内核苷酸与氨基酸序列均发生变异。

【关键词】 螺;子代;基因;遗传变异

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Analysis of Cytochrome c Oxidase I and Cytochrome b Genes of F1 in Laboratory Line *Oncomelania hupensis hupensis*

ZHANG Yi, Yamasaki Hiroshi, LIU He-xiang, FENG Ting, FENG Zheng

(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention*, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze the diversity of F1 in laboratory line *Oncomelania hupensis hupensis*. **Methods** Genomic DNA was isolated, and cytochrome c oxidase I (COI) and cytochrome b (Cytb) genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The nucleotide sequences of the PCR products were analyzed by GENETYX-MAC software package (ver. 9). **Results** Pairwise divergences among six F1 individuals were found in 12.2% nucleotides in COI gene fragments. 13.5% of genetic divergences between *O. h. hupensis* and *O. h. robertsoni* were identified. 94 amino acids were observed in difference. In Cytb gene fragments, 6.4% of divergence was observed among four F1 samples. 25 amino acids were observed differently. The divergence of Cytb genes from *O. h. robertsoni* and *O. h. hupensis* were 13.6%, included 6 amino acids. **Conclusion** Diversities were found in both COI and Cytb gene sequences of F1 in laboratory line *O. h. hupensis*.

【Key words】 Snails; F1 filial generation; Genes; Genetic variation

Supported by Sasakawa Memorial Health Foundation Japan(2001)

* WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis

由于宿主与寄生虫具有共进化关系,钉螺的变异可影响到血吸虫的变异。研究钉螺的遗传变异无疑对血吸虫病的控制和疫苗的研制具有重要意义。另一方面,许多研究表明,吸虫可通过对螺的生长率、生殖类型的影响而改变螺的生活史特性。最大限度地用实验室感染的螺类进行现场研究^[1],是进一步了解其中的影响和完善实验必不可少的一步。实验室钉螺保种难度相对较大,因而对日本血吸虫与其中间宿主关系的研究比曼氏血吸虫与光滑双脐螺基本特征的研究要少得多。因此,有必要增加对钉螺实验室保种螺群的深入了解。

为获得同株血吸虫,实验室内通常用同株血吸虫毛蚴感染人工培养的同龄钉螺。此人工培养的钉螺螺

群自身是否存在遗传变异至关重要。本文利用直接检测 DNA 序列的方法,对一实验室湖北钉螺湖北亚种螺群 2 个适合种群结构及遗传变异研究的细胞色素 c 氧化酶 I(cytochrome c oxidase subunit I, COI)、细胞色素 b(cytochrome b, Cytb)基因和氨基酸序列^[2-4]进行了分析,以提高对血吸虫宿主钉螺与血吸虫共进化过程中遗传变异的认识,同时,为开展钉螺-血吸虫系统分子分析提供基础资料。

材料与方 法

1 钉螺

实验室培养的子一代(F1)成年活钉螺,去螺壳,软体置液氮保存备用。

2 钉螺基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

按德国 Qiagen 公司 Dneasy Tissue Kit 操作步骤提取单个钉螺的基因组 DNA。COI 和 Cytb 基因的 PCR

基金项目:日本笹川纪念保健协力财团资助(2001)

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,卫生部寄生虫病重点实验室,上海 200025; 2 日本顺天堂大学医学院,寄生虫分子和细胞系,现在日本旭川医学院寄生虫系。

扩增方法按文献[2,3]进行。

3 PCR 扩增产物的纯化与测序

PCR 扩增产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,用 GenElute™ Agarose Spin Columns (美国 Sigma 公司)过柱再次回收备用。按 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (美国 PE Biosystems 公司)步骤处理样品,在 ABI Prism 377 DNA 测序仪(美国 Applied Biosystem 公司)测序。测序结果经人工校对后用于分析。

4 数据分析

用 GENETYX-MAC ver. 9 软件进行同源排序、DNA 和氨基酸序列分析。同时与 GenBank 的相同基因序列进行比较。

结 果

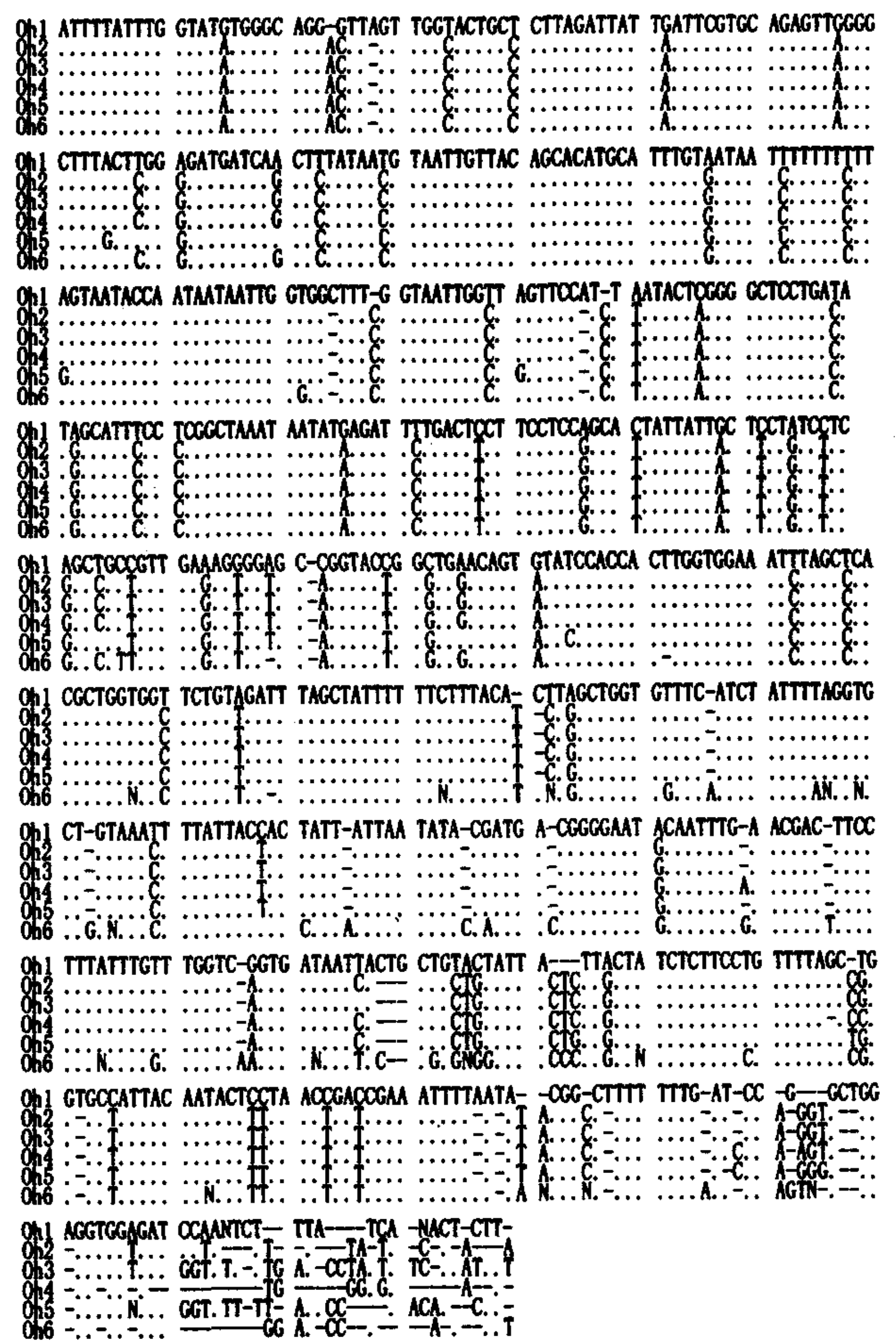
实验室钉螺 COI 基因序列和氨基酸序列分析结果(图 1、2)显示:COI 基因有 645 bp,214 个氨基酸。实验室螺群内 12.2% 核苷酸有差异,94 个氨基酸发生变化。实验室钉螺螺群与 GenBank 中湖北钉螺湖北亚种 COI 基因序列比较,17.7% 核苷酸有差异,214 个氨基酸序列中有 10 个氨基酸不同。文献报道现场钉螺螺群间核苷酸序列变异率仅为 1.6%^[2,5]。湖北亚种与滇川亚种 COI 基因序列差异率为 13.5%,此实验室钉螺螺群核苷酸差异率与此相近。

Cytb 基因序列和氨基酸序列分析结果见图 3、4。Cytb 基因的核苷酸大小及氨基酸数目与文献报道基本相同^[3]。实验室螺群内 6.4% 核苷酸彼此间有差异,涉及 25 个氨基酸的变化。与 GenBank 中湖北钉螺滇川亚种 Cytb 基因序列比较,13.6% 核苷酸有差异,在 203 个氨基酸中 6 个氨基酸发生变化。

讨 论

COI 基因是核基因组以外的线粒体基因组基因,也是不带重组遗传的基因,因此,每一个序列都是个单模标本^[4]。在钉螺属中,COI 基因是蛋白编码基因,适合用于同源性分析。而 Cytb 基因同样是核基因组以外的线粒体基因组基因,并被许多分类研究证实,适合用于区分种间及种下分类^[3]。

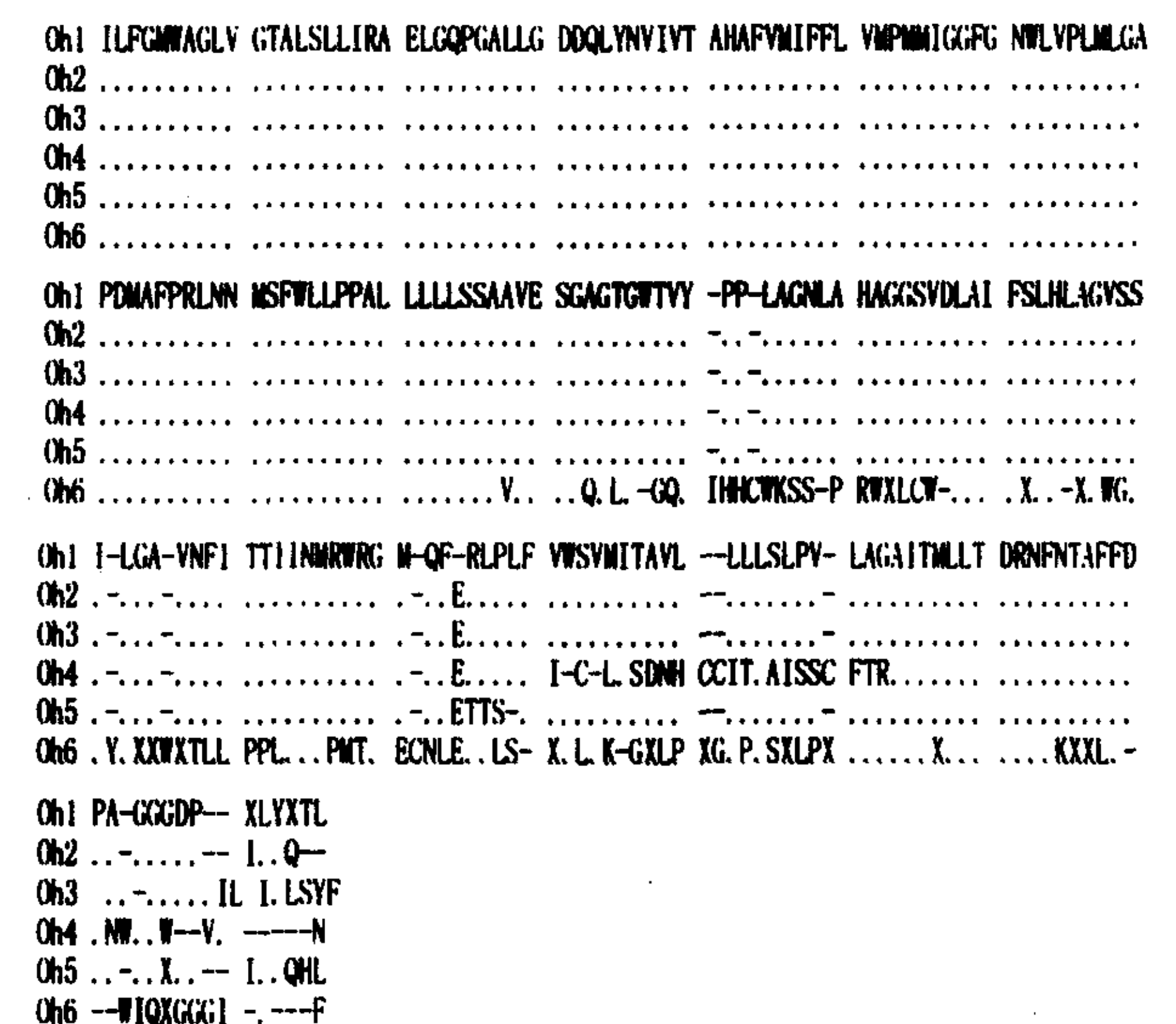
在对湖北钉螺遗传变异的研究中,如:在对湖北钉螺各亚种的遗传分化研究中,Cytb 基因序列与等位基因位点及比较解剖分析作为遗传分化的指标进行研究^[3];在沿长江 5 省不同地区的湖北钉螺光壳与肋壳种群遗传变异中,基于 COI 序列分析认为两者



oh1 ~ oh6 钉螺序号 Code of snails

图 1 实验室钉螺 COI 基因核苷酸序列

Fig. 1 COI sequences of F1 in laboratory line *O. h. hupensis*



oh1 ~ oh6 钉螺序号 Code of snails

图 2 实验室钉螺 COI 基因氨基酸序列

Fig. 2 COI amino acid sequences of F1 in laboratory line *O. h. hupensis*

H10 CATTTAGGTC TG-CGGTCCA-C ATCTCTCGTG A--TGTAACCTA TGGTTGACT-T T-TACGG-GCAC TTCATGCCAA
H20 -T.....T.....C.....A.....
H30T.....C.....A.....
H40 -C.....T.....T.....-CG.....CCC.....-T.....C.....C.....G.....G.T.....

H10 TGGGGCCAGC TGATTTTTTA TCTGCATTTA TTTTCATATT GGGCCGGGGA TGTATTATGG GTCATTATA
H20 G.....T.....C.....A.....A.....
H30T.....T.....C.....A.....A.....
H40T.....T.....C.....A.....A.....

H10 TACCACCACA CATGAAATAT TGGCGTAATT CTTTATTTA TGACTATGGG GACAGCTTTT CTAGGGTACG
H20 ..TA.....G.....T.....C.....A.....A.....C.....A.....
H30 ..TA.....T.....C.....A.....A.....C.....
H40 ..TA.....T.....C.....A.....A.....C.....A.....

H10 TTTTACCGTG AGGTCAGATA TCTTCTGGG GTGCCACTGT AATTACTAAT TTATTATCGG CTATTCCGTA
H20A.....T.....A.....A.....C.....A.....
H30A.....T.....A.....A.....C.....A.....
H40A.....T.....A.....A.....C.....A.....

H10 TGTGGGAAAA ATATTAGTTC AATGGGTTTG AGGTGGTTTT GCTGTTGATA ATGCAACATT AACTCGATT
H20 ..T.....C.....G.....A.....C.....
H30 ..T.....A.....A.....C.....
H40 ..T.....G.....A.....C.....

H10 TTTACTCTTC ATTTGTACT ACCTTCGGC ATTGCAGCAT TGACTGTATT ACATTGGCTA TTCCTACAG
H20C.....GT.....A.....C.....A.....T.....
H30C.....T.....A.....C.....A.....T.....
H40C.....GT.....A.....C.....A.....T.....

H10 AGTCCCGCTC AAATAACCCA TTAGGATTA ATAGAGACCG AGAAAAGGTN CCATTTCAIT CTTATTACAG
H20 ..A.....T.....A.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....
H30 ..A.....T.....A.....G.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....
H40 ..A.....T.....A.....G.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....

H10 CTTTAAAGAT TTAGTTGGAT TTATTATTT ACTTTTATA CTTTCATTAC TAGTACTATT TGCACCCCAA
H20G.....G.....C.....T.....T.....T.....
H30G.....G.....C.....T.....T.....T.....
H40G.....G.....G.....C.....T.....T.....T.....

H10 ATACTAACAG ACCCAGAAAA TTTCATTCCA GCTAACCCAC TAGTTACGCCA
H20 ..G.....G.....G.....T.....C.....
H30 ..G.....G.....G.....T.....N.....C.....C.....
H40 ..G.....G.....G.....T.....A.....G.....A.....

h10 ~ h40 钉螺序号 Code of snails

图 3 实验室钉螺 Cytb 基因核苷酸序列

Fig. 3 Cytb sequences of F1 in laboratory line *O. h. hupensis*

H10 FS-SAVHISR D-VNYGWLRLR LANGASWFFI CIYFHIGRM YGGSFMYHHT WNIGVILLFM TMETAFLGVVL
H20
H30
H40 LGCRSIR-WP CLRLT-V CT SCT.....

H10 PWGQMSFWGAT VITNLLSAIP YVGKMLVEWV WGGFAVDNAT LTRFFTLHFV LPFGIAALTYL HLLFLHESGSA
H20A.....
H30
H40
H10 NPLGLNSDGE KXPFSYYSF KDLVGFIIILL FMLSLLVLEFA PQMLTDPENFI PANPLVTP
H20V.....
H30V.....
H40V.....VT.....

h10 ~ h40 钉螺序号 Code of snails

图 4 实验室钉螺 Cytb 基因氨基酸序列

Fig. 4 Cytb amino acid sequences of F1 in laboratory line *O. h. hupensis*

几乎不存在遗传变异,可以考虑同为湖北钉螺湖北亚种^[2,5]等。本次研究用此两基因来研究 F1 钉螺,虽然 COI 基因片段差异有 12.2%,但在鹿眼螺超科中,此差异低于影响变化的饱和率 18.6%^[2],提示该两基因可以作为一种遗传标记,为进一步了解钉螺-日本血吸虫的遗传学关系提供依据。

Willams 等^[6]提出假设:由于螺基因对血吸虫的表现型产生了影响,它经过几代传代后,把更具竞争性的

的虫株选择出来,致使对螺的感染率一代比一代高,最终使最后一代血吸虫与自然状态的第一代血吸虫之间在基因上发生了改变。而这些钉螺在实验室经多代繁殖后,与野生种群之间也会出现遗传上的某些改变。本次研究显示,实验室 F1 钉螺螺群与现场钉螺(野生型),在核苷酸和氨基酸序列上均发生变化,为 Willams 的假设提供了分子依据。

钉螺被日本血吸虫毛蚴感染是血吸虫病流行的一个重要环节,其易感的程度,在一定意义上影响着血吸虫病的流行,其中钉螺自身的基因变化是基础和根本。F1 钉螺感染性明显低于母代钉螺^[7]的原因,可能是 F1 钉螺基因变化所致。日本血吸虫虫株,由于采用了实验室内饲养的钉螺保种,因而感染力与致病力可能直接受到 F1 钉螺本身发生遗传变化的影响^[8],导致螺与虫出现不相容,即感染力及致病力低。从钉螺与日本血吸虫之间分子遗传基础关系,即从宿主与寄生虫之间的分子遗传关系出发来研究,或许可以为一些现实问题,诸如:各地钉螺易被本地日本血吸虫感染,却难以被异地血吸虫感染问题^[9,10];不同地区的钉螺与日本血吸虫是否出现不同的“地域株”问题^[11],即血吸虫虫株与钉螺之间的相容性问题;灭螺药的适用性问题等得到解答。相关研究有待进一步进行。

参 考 文 献

[1] 邵红霞,毛佐华. 螺-吸虫在生活史中的相互作用:过去趋势和今后方向[J]. 国外医学-寄生虫病分册,2003,30:125-127.
[2] Davis GM, Wilke T, Spolsky C, et al. Cytochrome oxidase 1-based phylogenetic relationships among the Pomatiopsidae, Hydrobiidae, Rissoidae and Truncatellidae (Gastropoda: Caenogastropoda: Rissoacea) [J]. Malacologia, 1998, 40:251-266.
[3] Spolsky C, Davis GM, Zhang Y. Sequencing methodology and phylogenetic analysis: cytochrome b gene sequence reveals significant diversity in Chinese populations of *Oncomelania* (Gastropoda: Pomatiopsidae) [J]. Malacologia, 1996, 38:213-221.
[4] Avise JC. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology [J]. Oikos, 1992, 63:62-76.
[5] Wilke T, Davis GM, Chen CE, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissooidea) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology [J]. Acta Tropica, 2000, 77:215-227.
[6] Willams JE, Swanson VL. Pathology of *Schistosoma japonicum* in the Taiwanese monkey (*Macaca cyclopis*). II. Effect of passing the Formosan strain through Japanese snails [J]. Am J Trop Med Hyg, 1963, 12:753-757.
[7] 毛守白,主编. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 [M]. 北京:人民卫生出版社,1990. 278-281.
[8] 黄希宝,夏萍凤,杨丽华,等. 日本血吸虫对不同地区钉螺的感染性及其致病力的研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14:35-37.
[9] 洪青标,周晓农,孙乐平,等. 不同地区不同环境类型钉螺对日本血吸虫易感性的测定 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7:83-86.
[10] 任翠仙,盛湘玲. 不同地区钉螺对日本血吸虫易感性的实验研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2003, 14:206-207.
[11] 何毅勋,郭源华,倪传华,等. 中国大陆日本血吸虫品系的研究 I. 幼虫-钉螺的相容性 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8:92-95.

(收稿日期:2003-11-13 编辑:庄兆农)