

文章编号:1002-2694(2011)01-0001-06

# 湖南省日本血吸虫线粒体 *atp6* 基因部分序列的多态性分析\*

夏英定<sup>1</sup>, 汪世平<sup>1</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 吴昌义<sup>2</sup>, 田智<sup>1</sup>, 尹铁球<sup>1</sup>, 周云飞<sup>1</sup>, 张树菊<sup>1</sup>, 冯其梅<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 研究湖南省日本血吸虫不同地域自然隔离群线粒体 ATP 合成酶 F0 亚单位 6 基因(*atp6*)部分序列的遗传多态性,为湖南不同地域自然隔离群日本血吸虫的遗传特性研究提供实验依据。**方法** 采用试剂盒抽提基因组总 DNA,以特异性引物对线粒体 *atp6* 基因进行 PCR 扩增,通过单链构象多态性技术(SSCP)筛选出差异带型并进行测序,用 DNASTar 5.0 及 Mega 4.0 软件进行比对分析。**结果** 湖南省 5 个流行区的日本血吸虫 PCR 扩增后获得了 483 bp *atp6* 部分序列,检测出 17 个变异位点,变异率为 3.52%,雌雄虫之间的差异为 0.0%~1.3%,不同地理来源虫株间的差异率为 0.0%~1.5%。聚类分析结果表明:湖南不同地域自然隔离群日本血吸虫的种系发育不能按照其来源归为相应的系统发育进化树。**结论** 湖南不同地域自然隔离群日本血吸虫的 *atp6* 基因存在明显的个体差异,是否由于生存环境的选择压力造成了同一地理来源日本血吸虫个体之间 *atp6* 基因的遗传差异,其原因尚有待于进一步研究。

**关键词:** 日本血吸虫; 线粒体 *atp6* 基因; PCR-SSCP; 序列分析**中图分类号:**R383.2 文献标识码:A

## DNA polymorphism in the partial mitochondrial *atp6* gene among *Schistosoma japonicum* isolates from Hunan Province

XIA Ying-ding, WANG Shi-ping, LI Juan, WU Chang-yi, TIAN Zhi,  
YIN Tie-qiu, ZHOU Yun-fei, ZHANG Shu-ju, FENG Qi-mei

(Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**ABSTRACT:** The aim of this study was to examine sequence variation in the partial mitochondrial ATP synthase F0 subunit *atp6* gene of *Schistosoma japonicum* and to provide foundation for studying the characterization and genetic structure of *S. japonicum* from different endemic origins of Hunan province. After extracting genomic DNA, *atp6* was amplified with specific primers and screened by SSCP technique. Representative samples with variable banding patterns were selected for sequencing. DNASTar 5.0 and Mega 4.0 were used to analyze the sequences subsequently. Results showed that partial *atp6* gene of *S. japonicum* was 483 bp, and 17 mutation sites were detected (3.52%). Sequence variations for the partial *atp6* were 0.0%~1.3% between male and female parasites, and 0.0%~1.5% among isolates from different geographical origins. Phylogenetic analysis revealed that *S. japonicum* in Hunan province could not be clustered in accordance with related geographic origins. Sequence variation in *atp6* gene among *S. japonicum* in Hunan province existed to a certain extent. An intensive study is worthy to analyze whether it was caused by the selection pressure of environment.

**KEY WORDS:** *Schistosoma japonicum*; mitochondrial *atp6* gene; PCR-SSCP; sequence analysis

日本血吸虫病是一种引起严重公共卫生问题的

人兽共患寄生虫病,是世界卫生组织确定的六大重点热带病之一<sup>[1-2]</sup>,也是我国政府高度重视并重点防治的四大传染病之一。目前,我国仍有 173 个县 1 579 个乡镇(镇)处于血吸虫病的流行状态,估计患者 56.60 万<sup>[3]</sup>。

线粒体 DNA(mtDNA)结构简单、稳定、以母系方式遗传,核苷酸歧异度大、进化速度快于或等于核 DNA<sup>[4-5]</sup>,在种间、种内、群体间和群体内均具有广

\* 国家科技支撑计划重点项目(2009BAI78B05),国家重点基础研究发展(973)计划(No. 2007CB513108),湖南省血吸虫病免疫与传播控制重点实验室、湖南省重点学科建设专项经费(No. 07-985-2)资助

通讯作者:汪世平, Email: spwang@126.com

作者单位:1. 中南大学湘雅基础医学院医学寄生虫学系,长沙 410078;

2. 华南农业大学兽医学院,广州 510642

泛的多态性。mtDNA 序列可以提供有效的分子标记用于种群分类、示踪个体或相关特殊种群的基因发展历史,同时还可用于构建种系发育中更细致的分支<sup>[6]</sup>,目前已在寄生虫的种类鉴定及种系发育研究中得到应用<sup>[7-8]</sup>。PCR-SSCP 是 20 世纪 80 年代末发展起来的一种 DNA 突变检测技术<sup>[9-10]</sup>,方法灵敏并具备适于大样本快速筛选等特点,是遗传变异研究常用方法之一<sup>[11]</sup>。本研究对采自湖南 5 个不同地区日本血吸虫样本的线粒体 *atp6* 基因部分序

列进行了 PCR-SSCP 筛选和遗传变异的多态性分析,旨在为湖南不同自然隔离群日本血吸虫的遗传特性研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 虫体来源** 本研究所用的日本血吸虫成虫样品,分别采自湖南长沙橘子洲、常德澧县、岳阳楼区与君山区和汨罗磊石 5 个流行区的野生阳性钉螺,经家兔感染传代而获得虫样,有关信息见表 1。

表 1 研究中使用的湖南省日本血吸虫样品来源及其 *atp6* 序列信息

Table 1 Information of *atp6* sequences of *S. japonicum* from Hunan Province used in present study

种/样品编码 Species/Sample codes	地理来源 Geographical origins	宿主 Hosts	性别 Gender	数据库登录号 GenBank™ Accession No.
<i>S. japonicum/SjHcM22</i>	Hunan(Changsha)	<i>Oncomelania hupensis</i>	male	HM242240
<i>S. japonicum/SjHcM31</i>	Hunan(Changsha)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242241
<i>S. japonicum/SjHcM33</i>	Hunan(Changsha)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242242
<i>S. japonicum/SjHdF5</i>	Hunan(Junshan)	<i>O. hupensis</i>	female	HM242222
<i>S. japonicum/SjHdF6</i>	Hunan(Junshan)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242223
<i>S. japonicum/SjHdM2</i>	Hunan(Junshan)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242224
<i>S. japonicum/SjHdM8</i>	Hunan(Junshan)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242225
<i>S. japonicum/SjHdM9</i>	Hunan(Junshan)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242226
<i>S. japonicum/SjHgF2</i>	Hunan(Changde)	<i>O. hupensis</i>	female	HM242227
<i>S. japonicum/SjHgM4</i>	Hunan(Changde)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242228
<i>S. japonicum/SjHgM5</i>	Hunan(Changde)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242229
<i>S. japonicum/SjHgM6</i>	Hunan(Changde)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242230
<i>S. japonicum/SjHlF7</i>	Hunan(Yueyanglou district)	<i>O. hupensis</i>	female	HM242231
<i>S. japonicum/SjHlM3</i>	Hunan(Yueyanglou district)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242232
<i>S. japonicum/SjHlM4</i>	Hunan(Yueyanglou district)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242233
<i>S. japonicum/SjHlM7</i>	Hunan(Yueyanglou district)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242234
<i>S. japonicum/SjHlM23</i>	Hunan(Yueyanglou district)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242235
<i>S. japonicum/SjHmF5</i>	Hunan(Miluo)	<i>O. hupensis</i>	female	HM242236
<i>S. japonicum/SjHmF6</i>	Hunan(Miluo)	<i>O. hupensis</i>	female	HM242237
<i>S. japonicum/SjHmM2</i>	Hunan(Miluo)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242238
<i>S. japonicum/SjHmM3</i>	Hunan(Miluo)	<i>O. hupensis</i>	male	HM242239

**1.2 主要仪器与试剂** DNA 提取试剂盒、ExTaq 酶、DL-2000 DNA Marker、rTaq 酶,凝胶成像系统, Bio-RAD 电泳系统, 凝胶图像分析系统, PCR 试剂。

**1.3 虫体材料的处理** 从 70% 酒精保存液中取出单个成虫(雌雄合抱的成虫用镊子轻轻分离为雌、雄两条)。将雌、雄虫分装于新的 1.5mL Eppendorf 管中,用蒸馏水反复冲洗 3 次。

**1.4 DNA 提取、鉴定** 按 Geneaid 公司 DNA 提取试剂盒(Genomic DNA mini Kit protocol-Tissue)说明书操作,抽提 DNA 样品用于下一步的扩增。

**1.5 *atp6* 部分序列扩增及鉴定** 根据 GenBank™

上已发表的 *atp6* 基因序列设计 1 对特异引物,上游引物 (*atp6u*): 5'-TATCTGGTTATGGTTTAC-TAGA-3', 下游引物 (*atp6d*): 5'-CGA-CAGAAAAT TAAGTATCTCT-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应采用 25 μL 体系: 10 × 缓冲液 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL (50 pmol/μL), rTaq 0.25 μL, gDNA 1 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min。经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析, EB 染色后于凝胶成像系统鉴定并

拍照。

**1.6 SSCP<sup>[12]</sup>筛选及鉴定** 取3μL阳性PCR产物和5μL变性载样缓冲液混匀,94℃变性10 min后,立即置于冰浴中骤冷5 min后上样,6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。12~20℃,90 V电泳约300 min。电泳结束后,取下凝胶,双蒸水漂洗2次;将凝胶放入浓度0.25 mg/L EB染色液中染色30 min后于凝胶成像系统观察结果并拍照。

**1.7 测序** 根据SSCP分析结果,选择SSCP带型不同的代表性样品(筛选时,将特异条带的相邻条带的样品一并测序,以作比较),共筛选出13个具有代

表性的 *atp6* 部分基因样品,PCR扩增后,将PCR产物直接送华大基因科技股份有限公司有限公司测序。

**1.8 变异分析** 将21份样品的测序结果用DNAStar 5.0和Mega 4.0软件进行多态性分析和系统发育研究。

## 2 结果

**2.1 *atp6* 部分基因 SSCP 筛选及 PCR 扩增结果** *atp6* 部分基因经SSCP筛选后,通过6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,结果见图1。

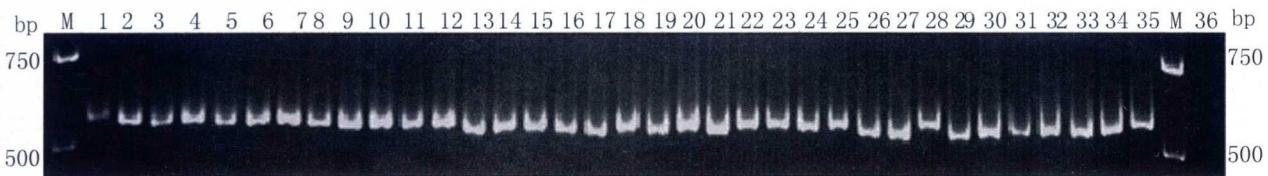


图1 *atp6* 部分基因 SSCP 筛选后聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 SSCP selection results of *atp6* by PAGE

M: DL2000 DNA Marker; 1-36: *SjHgF2*, *SjHgF3*, *SjHgF4*, *SjHgF5*, *SjHgF6*, *SjHgM2*, *SjHgM3*, *SjHgM4*, *SjHgM5*, *SjHgM6*, *SjHmM6*, *SjHmM5*, *SjHmM4*, *SjHmM3*, *SjHmM2*, *SjHmF3*, *SjHmF4*, *SjHmF5*, *SjHmF6*, *SjHdF2*, *SjHdF3*, *SjHdF4*, *SjHdF5*, *SjHdF6*, *SjHdF7*, *SjHdF8*, *SjHdF9*, *SjHdM2*, *SjHdM3*, *SjHdM4*, *SjHdM5*, *SjHdM6*, *SjHdM7*, *SjHdM8*, *SjHdM9*, negative control

从35份样品中筛选出具有代表性的 *atp6* 部分基因13份,以及长沙橘子洲和岳阳楼区样品8份,对此21份样品进行了PCR扩增。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,在约500 bp处呈现1条特异性

条带(见图2),与预期的片段大小吻合,且无非特异性条带,说明本研究设计的PCR引物及反应条件具有较好的特异性。

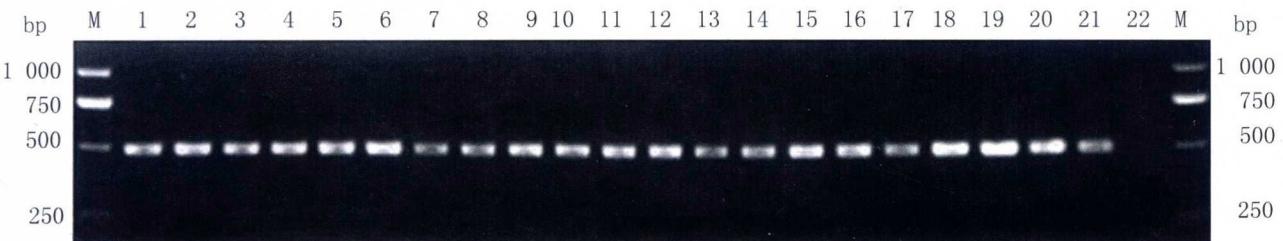


图2 *atp6* 部分基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR results of *atp6*

M: DL2000 DNA Marker; 1-22: *SjHcM22*, *SjHcM31*, *SjHcM33*, *SjHf7*, *SjHlM3*, *SjHlM4*, *SjHlM7*, *SjHlM23*, *SjHgF2*, *SjHgM4*, *SjHgM5*, *SjHgM6*, *SjHdF5*, *SjHdF6*, *SjHdM2*, *SjHdM8*, *SjHdM9*, *SjHmF5*, *SjHmF6*, *SjHmM2*, *SjHmM3*, negative control

**2.2 *atp6* 序列测定及其变异与发育分析** 将测序获得的21份样品 *atp6* 部分序列用DNAStar5.0软件比对(结果见图3)分析发现,湖南省日本血吸虫各分离株的483 bp *atp6* 基因序列中有17个变异位点(3.52%),其中16处发生了转换(G-T转换有3次、C-T转换有7次、A-G转换有5次、C-A转化1次),其中C-T转换频率最高,C-A转换频率最低

(见表2)。所得的 *atp6* 序列中 A, G, T, C 碱基平均含量分别为 20.91%, 21.33%, 48.24%, 9.52%, 其中 A+T 平均含量为 69.15% 明显高于 C+G 平均含量 30.85%。遗传差异分析表明雌雄虫之间的差异为 0.0%~1.3%, 各个虫株间的差异 0.0%~1.5%, 不同地理来源虫株间的差异率为 0.0%~1.5% (表3)。

表 2 *atp6* 部分序列的变异情况

**Table 2** Variation of nucleotide acids sequences of each *atp6*

样品 Sample	位点 Position																	
	44	57	84	96	120	140	189	208	209	230	253	297	299	311	423	429	438	
SjHcM22	G	A	C	T	G	G	C	C	G	G	T	G	T	C	C	G	A	
SjHcM31	G	A	C	T	G	G	C	C	G	G	T	G	T	C	C	G	A	
SjHcM33	T	A	T	T	G	G	T	C	G	G	T	G	C	C	C	G	G	
SjHdF5	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHdF6	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	T	G	A	
SjHdM2	G	A	C	T	A	G	T	C	T	A	T	A	C	C	C	G	A	
SjHdM8	G	—	T	T	G	T	T	C	G	G	T	G	C	C	C	G	A	
SjHdM9	T	—	T	C	G	G	T	C	G	G	T	G	C	C	C	G	A	
SjHgF2	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHgM4	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHgM5	G	A	C	T	G	T	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHgM6	G	A	C	T	G	T	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHf7	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHlM3	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHlM4	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHlM7	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHlM23	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	G	A	
SjHmF5	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	A	A	
SjHmF6	G	A	T	T	G	G	T	A	G	G	C	G	C	C	C	G	A	
SjHmM2	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	T	C	G	A	
SjHmM3	G	A	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	C	T	C	G	A	
变异类型 (mutation type)	G-T 转换	缺失	C-T 转换	T-C 转换	G-A 转换	G-T 转换	C-T 转换	C-A 转换	G-T 转换	G-A 转换	T-C 转换	G-A 转换	T-C 转换	C-T 转换	C-T 转换	G-A 转换	A-G-G 转换	

表 3 各 *atp6* 部分序列的差异性比较

**Table 3** Differences nucleotide sequence among each *atp6*

Sample codes	<i>SjHc</i>	<i>SjHc</i>	<i>SjHc</i>	<i>SjHd</i>	<i>SjHd</i>	<i>SjHd</i>	<i>SjHg</i>	<i>SjHg</i>	<i>SjHg</i>	<i>SjHl</i>	<i>SjHl</i>	<i>SjHl</i>	<i>SjHl</i>	<i>SjHm</i>	<i>SjHm</i>	<i>SjHm</i>				
	M22	M31	M33	F5	F6	M2	M8	M9	F2	M4	M5	M6	F7	M3	M4	M7	F5	F6	M2	M3
<i>SjHeM22</i>	—																			
<i>SjHeM31</i>	0.0	—																		
<i>SjHeM33</i>	1.0	1.0	—																	
<i>SjHdF5</i>	0.8	0.8	1.0	—																
<i>SjHdF6</i>	1.0	1.0	1.3	0.2	—															
<i>SjHdM2</i>	1.3	1.3	1.5	0.4	0.6	—														
<i>SjHdM8</i>	0.8	0.8	0.6	0.8	1.0	1.3	—													
<i>SjHdM9</i>	1.0	1.0	0.4	1.0	0.2	1.5	0.6	—												
<i>SjHgF2</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	—											
<i>SjHgM4</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.4	0.4	0.8	1.0	0.0	—										
<i>SjHgM5</i>	1.0	1.0	1.3	0.2	0.4	0.6	0.6	1.3	0.2	0.2	—									
<i>SjHgM6</i>	1.0	1.0	1.3	0.2	0.2	0.6	0.6	1.3	0.2	0.2	0.0	—								
<i>SjHlF7</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	0.00	0.0	0.2	0.2	—							
<i>SjHlM3</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	—						
<i>SjHlM4</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	—					
<i>SjHlM7</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	—				
<i>SjHlM23</i>	0.8	0.8	1.0	0.0	0.2	0.4	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	—			
<i>SjHmF5</i>	1.0	1.0	1.3	0.2	0.4	0.6	1.0	1.3	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—		
<i>SjHmF6</i>	1.0	1.0	0.8	1.0	1.3	1.5	0.6	0.8	1.0	1.0	1.3	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	—	
<i>SjHmM2</i>	1.0	1.0	1.0	0.2	0.4	0.6	1.0	1.3	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	1.3	—
<i>SjHmM3</i>	1.0	1.0	1.3	0.2	0.4	0.6	1.0	1.3	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	1.3	0.0

SjHcM22	GTTTACTAGTTGGTTAACGCTGCTAGTTAAAGGTATGAAAGATTGAAATGTTAGCTTATCTTGTAA	81
SjHcM31	T.....	81
SjHcM33	.....	81
SjHdF5	.....	81
SjHdF6	.....	81
SjHdM2	.....	81
SjHdM8	.....	80
SjHdM9	T.....	80
SjHg2	.....	81
SjHgM4	.....	81
SjHgM5	.....	81
SjHgM6	.....	81
SjHgF7	.....	81
SjH1M23	.....	81
SjH1M3	.....	81
SjH1M4	.....	81
SjH1M7	.....	81
SjHmF5	.....	81
SjHmF6	.....	81
SjHmM2	.....	81
SjHmM3	.....	81
SjHcM22	TACTGATTGTTATTTGCCATAGTCGTTCCATATGTTACGGGATGTTGATTATGGGTTATGTTAATAGTGTAA	162
SjHcM31	.....	162
SjHcM33	T.....	162
SjHdF5	.....	162
SjHdF6	.....	162
SjHdM2	.....	162
SjHdM8	T.....	162
SjHdM9	T.....C.....	161
SjHgF2	.....	161
SjHgM4	.....	162
SjHgM5	.....	162
SjHgM6	.....	162
SjHgF7	.....	162
SjH1M23	.....	162
SjH1M3	.....	162
SjH1M4	.....	162
SjH1M7	.....	162
SjHmF5	.....	162
SjHmF6	.....	162
SjHmM2	.....	162
SjHmM3	.....	162
SjHcM22	TTATGCCATTGTTATCTCTTGTCTTAGCGGATTGTTGTGCCTTGGTTGTTCAAGGTTTACCAAGTGG	243
SjHcM31	.....	243
SjHcM33	T.....	243
SjHdF5	.....	243
SjHdF6	.....	243
SjHdM2	.....	243
SjHdM8	.....	243
SjHdM9	.....	242
SjHgF2	.....	242
SjHgM4	.....	243
SjHgM5	.....	243
SjHgM6	.....	243
SjHgF7	.....	243
SjH1M23	.....	243
SjH1M3	.....	243
SjH1M4	.....	243
SjH1M7	.....	243
SjHmF5	.....	243
SjHmF6	.....	243
SjHmM2	.....	243
SjHmM3	.....	243
SjHcM22	GTTGTCGATATACTAGCACCGTTGTTGATAATAGAGTTAACAGGTTGTTACGTCAGTCGTTTATTGGTCC	324
SjHcM31	.....	324
SjHcM33	.....	324
SjHdF5	.....	324
SjHdF6	.....	324
SjHdM2	.....	324
SjHdM8	.....	323
SjHdM9	.....	323
SjHgF2	.....	324
SjHgM4	.....	324
SjHgM5	.....	324
SjHgM6	.....	324
SjHgF7	.....	324
SjH1M23	.....	324
SjH1M3	.....	324
SjH1M4	.....	324
SjH1M7	.....	324
SjHmF5	.....	324
SjHmF6	.....	324
SjHmM2	.....	324
SjHmM3	.....	324
SjHcM22	GTCCGTTGAAAAATAAGTGCTGGTATATTGGTGTATTGTTGTAATTGCTTTGCTATTAAATTATTTATT	405
SjHcM31	.....	405
SjHcM33	.....	405
SjHdF5	.....	405
SjHdF6	.....	405
SjHdM2	.....	405
SjHdM8	.....	404
SjHdM9	.....	405
SjHgF2	.....	405
SjHgM4	.....	405
SjHgM5	.....	405
SjHgM6	.....	405
SjHgF7	.....	405
SjH1M23	.....	405
SjH1M3	.....	405
SjH1M4	.....	405
SjH1M7	.....	405
SjHmF5	.....	405
SjHmF6	.....	405
SjHmM2	.....	405
SjHmM3	.....	405
SjHcM22	TTGTAATTGTTGTGCTGGTATGAGATTTGTTGATTAATGATTGATTAGTACAAGAGATACTTA	483
SjHcM31	.....	483
SjHcM33	G.....	483
SjHdF5	.....	483
SjHdF6	.....	483
SjHdM2	.....	483
SjHdM8	.....	482
SjHdM9	.....	482
SjHgF2	.....	483
SjHgM4	.....	483
SjHgM5	.....	483
SjHgM6	.....	483
SjHgF7	.....	483
SjH1M23	.....	483
SjH1M3	.....	483
SjH1M4	.....	483
SjH1M7	.....	483
SjHmF5	.....	483
SjHmF6	.....	483
SjHmM2	.....	483
SjHmM3	.....	483

图3 湖南省日本血吸虫 *atp6* 序列的比较Fig. 3 Comparison of *atp6* sequences of *S. japonicum* in Hunan Province

种系发育分析表明,湖南省不同地域自然隔离群日本血吸虫分离株线粒体 *atp6* 基因的个体遗传差异明显,尤以汨罗和岳阳君山两地分离虫株表现突出(图 4)。

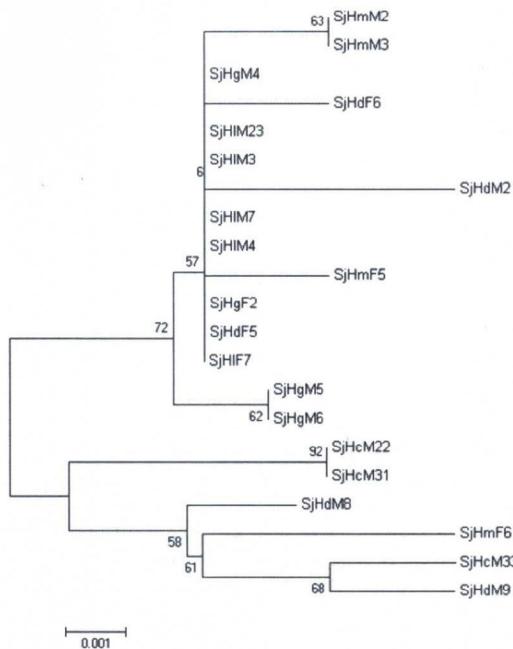


图 4 湖南不同地域自然隔离群日本血吸虫的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *S. japonicum* in Hunan Province

### 3 讨 论

日本血吸虫存在明显的种和株间变异<sup>[13]</sup>,由于自然环境的隔离,采用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的特征。mtDNA 作为遗传标记已广泛应用于寄生虫的种类鉴定、遗传多态性和种群结构及种系发育等研究。Sorensen 和 Zhao 等<sup>[14-15]</sup>分别通过不同的方法对中国大陆日本血吸虫虫线粒体 *nad 1*, *nad 4*, *nad 5*, *cox3* 基因进行了遗传多态性和种系发育以及种群内遗传变异的分析。Zarowiecki<sup>[16]</sup>等利用滑行窗口技术分析了血吸虫线粒体基因组,揭示 *atp6* 基因具有最低的变异碱基数和最丰富的信息内容。甚至还有人用线粒体 *atp6* 基因和其他线粒体基因作为分子标记来研究胡萝卜野生品种与和人工培养品种间的遗传变异情况<sup>[17-19]</sup>。Gudewar<sup>[20]</sup>等也报道了关于在印度同一地域里细粒多棘球绦虫病的两种不同基因型的线粒体基因 *atp6* 和 *nad2* 基因特性,并认为以其线粒体 *atp6* 和 *nad2* 基因分析结果可以指示该基因型的传播情况。但迄今为止,尚未见不同地域自然隔离群日本血吸虫分离株线粒体 *atp6* 基因遗传变异研究的报道。

本研究对来自我国湖南省 5 个不同流行地区的 21 份日本血吸虫样品进行了 *atp6* 部分基因序列的遗传多态性分析。结果表明来自不同流行区的 21 个样品总体变异率为 3.52%, 种内各个虫株间差异在 0.0%~1.5% 之间。种系发育分析表明,湖南省不同地域自然隔离群日本血吸虫分离株线粒体 *atp6* 基因的个体遗传差异十分明显, 尤以汨罗和岳阳君山两地分离虫株表现突出, 出现这个现象的原因可能与日本血吸虫线粒体 *atp6* 基因进化活跃的遗传特征有关。同时, 或许因为湖区年年不断的涨水季节造成钉螺的迁移, 导致相邻地域之间虫株互换频繁, 故发生个体之间遗传特征的交叉现象。此外, 湖南省流行区内长期使用大量化学药物进行灭螺灭蚴工作, 也可能导致该地区日本血吸虫由于药物选择压力的加大, 以致进化速度加快。但是, 是否由于生存环境的选择压力造成了同一地理来源日本血吸虫个体之间 *atp6* 基因的遗传差异, 其原因尚有待于进一步研究。

### 参 考 文 献:

- [1] Woodruff D S, Merrelender A M, Upatham E S, et al. Genetic variation and differentiation of three *Schistosoma* species from the Philippines, Laos and Peninsular Malaysia[J]. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36(2): 345-354.
- [2] McGravey S T, Zhou X N, Willingham A L, et al. The epidemiology and host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in definitive hosts[J]. Parasitol Today, 1999, 15(6): 214-215.
- [3] 郝阳, 吴晓华, 郑浩, 等. 2007 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(6): 401-402.
- [4] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA[J]. Science, 1991, 251: 1488-1490.
- [5] McManusa D P, Lea T Hoa, Blair D. Genomics of parasitic flatworms[J]. International Journal for Parasitology, 2004, 34: 153-158.
- [6] Li M W, Lin R Q, Song H Q, et al. The complete mitochondrial genomes for three *Toxocara* species of human and animal health significance[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 224.
- [7] Hu M, Chilton N B, Gassar R B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics[J]. Adv Parasitol, 2003, 56: 134-188.
- [8] McManus DP, Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics[J]. International Journal for Parasitology, 1996, 26: 687-704.
- [9] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(8): 2766-2770.

(下转第 59 页)

- 241-243.
- [29]赵文忠,周国林,何海怀,等.海南岛两株甲病毒基因组3'末端核苷酸序列的克隆与分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2000,14(3):213-217.
- [30]Daniela T, Ali Z, Nestor E R, et al. Ross River Virus: An Arthritogenic Alphavirus of Significant Importance in the Asia Pacific [J]. Emerging Viral Diseases of Southeast Asia, 2007, 4: 94-111.
- [31]杨火,饶颐年,陈日光,等.海南岛一株甲组虫媒病毒的分离、鉴定和血清抗体调查[J].中华微生物和免疫学杂志,1994,4: 107-111.
- [32]王焕琴,刘卫滨,杨冬荣,等.河北省虫媒病毒分离鉴定[J].中华实验和临床病毒学杂志,2006,20(1):52-55.
- [33]Zhai YG, Wang HY, Sun XH, et al. Complete sequence characterization of isolates of Getah virus (genus Alphavirus, family Togaviridae) from China [J]. J Gen Virol, 2008, 89 (6): 1446-1456.
- [34]徐春华,彭翼飞,白志军,等.海南人群及驻地官兵虫媒病毒血清流行病学调查[J].解放军预防医学杂志,2000,18(1):27-29.
- [35]Berge, Getah T O. In international catalog of Arboviruses[M]. Washington, DC: US Department of Health, Education, and Welfare, 1975:278-279.
- [36]徐普庭,王逸民,赵子江,等.云南省甲属披膜病毒的分离和鉴定[J].病毒学报,1987,3 (3):237-242.
- [37]游志勇,王逸民,赵子江,等.海南岛两个虫媒病毒分离物的初步鉴定[J].病毒学报,1988,4(1):11-16.
- [38]蒋廉华,赵春生,徐春华,等.海南省1株甲属虫媒病毒的分离鉴
- 定及其血清抗体调查[J].中国兽医学报,1999,19(6):549-551.
- [39]Anne Lavergne, Benoit de Thoisy, Vincent Lacoste, et al. Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses [J]. Virus Research, 2006, 117: 283-290.
- [40]李其平,梁国栋,谢杏初,等.从新疆首次分离出20株甲属披膜病毒[J].地方病通报,1992,7(3):28-31.
- [41]李其平,梁国栋,谢吉初,等.东方马脑炎病毒的分离和初步鉴定[J].中华实验和临床病毒学杂志,1992,6(1):8.
- [42]潘亮,潘敏楠,严延生,等.福建首次从临床病例中发现东部马脑炎病毒感染者[J].海峡预防医学杂志,2003,9(4):31-32.
- [43]Michele A. Zacks, Slobodan Paessler. Encephalitic alphaviruses. Veterinary [J]. Microbiology, 2010, 140: 281-286.
- [44]何海怀,吕新军,杨益良,等.我国分离的两株病毒为重组甲病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志,2001,15(2):120-124.
- [45]吕新军,付士红,杨益良,等.我国分离的XJ-90260病毒鉴定为西方马脑炎病毒[J].病毒学报,2001,17(4):307-312.
- [46]陈文州,丘福禧,Charles H. Calisher,等.从海南岛蚊和蜱分离出28株甲病毒属病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志,1997, 11(2):144-146.
- [47]王玉才,杨淑华,孙颖,等.从烟台地区蚊虫分离到披膜甲属虫媒病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志,2006,4(2):181-183.
- [48]方美玉,刘建伟,洪文燕,等.海南岛不明发热病人血虫媒病毒分离鉴定及抗体检测[J].解放军预防医学杂志,2006,24(3): 183-186.

收稿日期:2010-08-20;修回日期:2010-12-04

## (上接第6页)

- [10]Hayashi K, Orita M, Suzuki Y, et al. Use of labeled primers in polymerase chain reaction (LP-PCR) for a rapid detection of the product[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(9): 3605.
- [11]Gasser RB, Monti JR. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Mol. Cell. Probes, 1997, 11: 201-209.
- [12]Li M Wei, Zhu X Q, Robin B. Gasser, et al. The occurrence of *Toxocara malayensis* in cats in China, confirmed by sequence-based analyses of ribosomal DNA[J]. Parasitol Res, 2006, 99: 554-557.
- [13]Zhou X N, Guo J G, Wu X H, et al. Epidemiology of Schistosomiasis in the People's Republic of China[J]. Emerg. Infect. Dis, 2004, 13:1470-1476.
- [14]S rensen E, Drew AC, Brindley PJ, et al. Variation in the sequence of a mitochondrial NADH dehydrogenase I gene fragment among six natural populations of *Schistosoma japonicum* from China [J]. Int J Parasitol, 1998, 28: 1931-1934.
- [15]Zhao G H, Mo X H, Zou F C, et al. Genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different endemic regions in China revealed by sequences of three mitochondrial DNA genes [J]. Veterinary Parasitology, 2009, 162:67-74.
- [16]Zarowiecki M Z, Huyse T, Littlewood D T J. Making the most of mitochondrial genomes - Markers for phylogeny, molecular
- ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea) [J]. International Journal for Parasitology, 2007, 37: 1401-1418.
- [17]Yamagishi H, Terachi T. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93:325-332.
- [18]Yamagishi H, Terachi T. Molecular and biological studies on male sterile cytoplasm in the Cruciferae. I. The origin and distribution of Ogura male sterile cytoplasm in Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* L.) revealed by PCR-aided assay of their mitochondrial DNAs[J]. Theor Appl Genet, 1994, 87: 996-1000.
- [19]Hiroshi Yamagishi, Toru Terachi. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. II. The origin of Ogura male sterile cytoplasm inferred from the segregation pattern of male sterility in the F1 progeny of wild and cultivated radishes (*Raphanus sativus* L.) [J]. Euphytica, 1994, 80:201-206.
- [20]Gudewar J, Pan D, Bera A K, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* of Indian animal isolates on the basis of nuclear and mitochondrial genotype[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36:1381-1385.

收稿日期:2010-07-21;修回日期:2010-11-02