

文章编号:1000-7423(2009)-04-0291-06

【论著】

湖北钉螺线粒体基因组全序列测定研究

李石柱¹, 王艺秀^{1,2}, 刘琴¹, 吕山¹, 王强¹, 吴纛¹, 张仪¹, 周晓农^{1*}

【摘要】 目的 测定并分析湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 线粒体基因组全序列。方法 利用特异引物和通用引物分别扩增湖北钉螺线粒体细胞色素 C 氧化酶 (CO₁)、细胞色素 b (Cytb)、16S rRNA (16S) 和细胞色素 C 氧化酶 (CO₃) 基因片段, 在此基础上利用长 PCR 技术扩增上述 4 个基因间的长片段, 纯化克隆后采用引物步移法测序。结果 湖北钉螺线粒体基因组全序列为 15 182 bp (GenBank 登记号为 FJ997214), 为闭合环状分子, A+T 含量为 67.3%; 包括 13 个蛋白基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和一段 72 bp 的 A+T 富集区; 蛋白质编码基因均以 ATG 为启动子, 除呼吸链 NADH 脱氢酶的第一亚单位 (ND1) 基因以潜在的 T 作为终止密码子外, 其余基因均以典型的 TAA 或 TAG 为终止子; 基因重叠区有 2 处, 分别为 4 bp 和 7 bp; 基因间隔区共 21 处合计 145 bp, 长度范围为 1~30 bp; 22 个 tRNA 中, 除 2 个 tRNA^{Ser} 和 tRNA^{Gln}、tRNA^{Leu} 以外均能形成典型的二级结构。结论 获得了湖北钉螺的线粒体基因组全序列。

【关键词】 湖北钉螺; 线粒体基因组; 引物步移法; 序列分析

中图分类号: R383.241

文献标识码: A

Complete Mitochondrial Genome Sequence of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssoidea)

LI Shi-zhu¹, WANG Yi-xiu^{1,2}, LIU Qin¹, LV Shan¹, WANG Qiang¹,
WU Ying¹, ZHANG Yi¹, ZHOU Xiao-nong^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Life Science College, Shaanxi Normal University, Xi'an 610062, China)

【Abstract】 **Objective** To sequence and analyze the complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Oncomelania hupensis*. **Methods** Four long fragments were amplified by long PCR using the primers designed based on mtDNA-CO₁, Cytb, 16S rRNA and CO₃ gene sequences, and sequenced by conserved primer-walking. **Results** The mitochondrial genome (GenBank accession no. FJ997214) was a circular molecule of 15 182 bp with a total A+T content of 67.32%, and contained 13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes, and an A+T-rich region of 72 bp. All 13 protein-coding genes of the *O. hupensis* mtDNA used ATG as start codon. Canonical TAA and TAG termination codons were found in 12 protein-coding genes, and the remaining one (ND1) had an incomplete termination codon (T). Two short gene overlaps were found with a length of 4 bp and 7 bp, respectively. The length of 21 total intergenic region of mtDNA was 145 bp ranging from 1–30 bp. A total of 22 transferring RNA were found, all of which were typical cloverleaf structure except for two tRNA^{Ser}, one tRNA^{Gln} and one tRNA^{Leu}. **Conclusion** The complete sequence of *O. hupensis* mitochondrial genome has been determined.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Mitochondrial genome; Primer-walking; Sequence analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30590373), the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (No. 970990), the Ministry of Science and Technology (No. 2003DIA6N009, 2005-DKA21104, 2007BAC03A02), and the National Project of Important Infectious Diseases (No. 2008-ZX10004-011)

* Corresponding author, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30590373); 联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究与培训特别规划署 (TDR) 项目 (No. 970990); 科技部重大支撑专项 (No. 2003DIA6N009, 2005-DKA21104, 2007BAC03A02); 国家传染病重大专项 (No. 2008-ZX10004-011)

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, 上海 200025;

2 陕西师范大学生命科学院, 西安 610062

* 通讯作者, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)是日本血吸虫惟一的中间宿主,在日本血吸虫病传播过程中起着重要作用^[1]。其主要分布在我国长江中下游地区,日本、菲律宾和印度尼西亚苏拉威西等地也有分布^[2]。不同地区的湖北钉螺其形态学、细胞学和遗传学等方面存在明显差异,同一钉螺种群内不同个体间也存在一定程度变异^[3],鉴于其对血吸虫病流行病学的重要意义,我国大陆湖北钉螺的亚种分型及其与日本血吸虫复杂的相容性,广为研究者所关注^[4]。

线粒体(mitochondrion)在新陈代谢、细胞程序性死亡、疾病和衰老等过程中起着重要作用,它拥有自身的遗传物质即线粒体基因组(mtDNA),典型的后生动物 mtDNA 为环形双链 DNA,大小为 14~39 kb,编码 13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 基因和 22 个 tRNA 基因^[5]。mtDNA 具有结构简单、母系遗传、缺少重组和进化速率快等特点,广泛用于分子系统地理学、分子系统进化分析、比较和功能基因组等方面的研究。

湖北钉螺线粒体基因的相关研究多集中在应用细胞色素 C 氧化酶 (CO) 或细胞色素 b(Cytb)基因作为分子标记对其种下差异的分析^[4,6-8],偶有 16S rRNA 基因序列的报道^[9]。截至目前,GenBank 数据库内已发布了 15 种腹足类动物线粒体全基因组序列,但尚无湖北钉螺线粒体基因组全序列的报告^[10]。本研究应用长 PCR 技术结合引物步移测序的方法测定并分析湖北钉螺线粒体基因组全序列。

材料与方法

1 钉螺来源

湖北钉螺采自湖南省岳阳市鹿角乡富强村(经度 113.059,纬度 29.086),饲养约 1 周后,逸蚋法鉴定钉螺是否感染血吸虫,取阴性钉螺作为实验材料。75%乙醇浸泡,4℃保存。

2 方法

2.1 钉螺总 DNA 的提取 取单只湖北钉螺的腹足肌肉组织,采用软体动物 DNA 小量提取试剂盒(D3373-01,美国 Omega 公司)提取基因组 DNA,操作方法按说明书进行。

2.2 引物设计和 PCR 扩增 参照文献方法分别扩增湖北钉螺已知的 mtDNA-CO^[2]、16S rRNA^[9]和 Cytb^[8]基因序列,参照文献的通用引物扩增 mtDNA-CO 片段^[11]。根据已发布线粒体基因组全序列的脉红螺(*Rapana venosa*)、织纹螺(*Ilyanassa obsoleta*)、疣荔枝螺(*Thais clavigera*)、织锦芋螺(*Conus textile*)和 *Lophiotoma cerithiformis* 等 5 种螺类的 mtDNA-CO、16S rRNA、Cytb 和 CO 基因序列^[10],设计上述 4 个基因片段区

间、首尾相叠长片段扩增引物,长度为 25~30 bp,序列组成见表 1。使用引物设计软件 DNA Club 对引物作全面的分析评价,确保这些引物不会形成非常稳定的引物间或引物内二聚体及发夹结构。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成并纯化。

利用上述 4 对引物,使用长片段高保真扩增试剂盒(TaKaRa LA PCR Kit Ver.2.1,日本 TaKaRa 公司)扩增长片段,在梯度 PCR 仪(C1000,美国 Bio-RAD 公司)上扩增湖北钉螺的线粒体全基因组。反应体系参照试剂盒说明书,反应条件略有改进,通过对模板浓度、引物浓度、退火温度和时间等进行梯度分析后,确定适合模板和引物的退火温度和时间(表 1)。PCR 反应所需的试剂准备均置于冰上操作,反复吹吸混匀反应液。PCR 反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶电泳成像分析系统(Gel Doc 2000,美国 Bio-RAD 公司)内观察,并记录电泳结果。

表 1 湖北钉螺 mtDNA 的长片段扩增引物序列
Table 1 The long PCR primers for mitochondrial genome of *Oncomelania hupensis*

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence	退火温度和时间 Annealing temperature and time
LP1COIF	5'-ACTGCCCTTAGATTATTAATTCGTGCAGAG-3'	59℃, 30 s
LP216SR	5'-ATATCCTAGTCCAACATCGAGGTCTAC-3'	
LP316SF	5'-TACTCTGACCGTGCAGGAGGTAGCATAATC-3'	55℃, 30 s
LP4CytbR	5'-TGGCGTAAGTACTGGGTTAGCTGGAATG-3'	
LP5CytbF	5'-TTGCACCCCAATACTAACAGACCCAGAA-3'	48℃, 30 s
LP6COIIR	5'-ATTCATCCGGCTAATCCCGAGGTCA-3'	
LP7COIIF	5'-GAATTTAGTCTTGGCCTCTAACTGG-3'	55℃, 30 s
LP8COIR	5'-GGAGCCCTAGTATAAGAGGAAGTAG-3'	

2.3 克隆测序 PCR 扩增产物采用割胶回收试剂盒(上海天根生物技术有限公司)切胶回收,经转入 pMD18-T(D101A,日本 TaKaRa 公司)后,挑取阳性克隆采用双向引物步移测序法,测定两端已知序列和内侧的未知序列,经 Clustal X 软件进行序列比对和 Blast 远程检索确定为目的片段后,分步设计步移引物,直至测通。步移测序工作在上海达安医学检测中心完成。

2.4 序列拼接、注释和分析 所得序列片段经 Chromas v2.3 和 Clustal X 1.83 软件^[12]进行校正和比对,用 DNASTAR 软件包的 Editseq 进行序列编辑,去除两端载体和引物序列,用 Seqman 程序利用序列间的重复区域进行拼接和组装。组装后的全序列输出成 Fasta 格式文件,用以进行线粒体基因的注释。

利用 DNASTAR 软件包的 Editseq 程序分析线粒体基因组全序列核酸组成,用 Clustal X 1.83 软件并结合远程 Blast 搜索分析,确定蛋白质、tRNA、rRNA、srRNA 和 A+T 富集区在线粒体基因组序列中的位置,

tRNA 基因的确定还参考 tRNAscan-SE web Server^[13]对线粒体 DNA 序列的搜索结果,以验证 tRNA 的结构。用 Mega4.0 软件^[14]统计线粒体基因组 DNA 序列的核酸组成、A+T 含量及使用偏好和蛋白编码基因密码子使用频率等。

结 果

1 基因组组成和排列

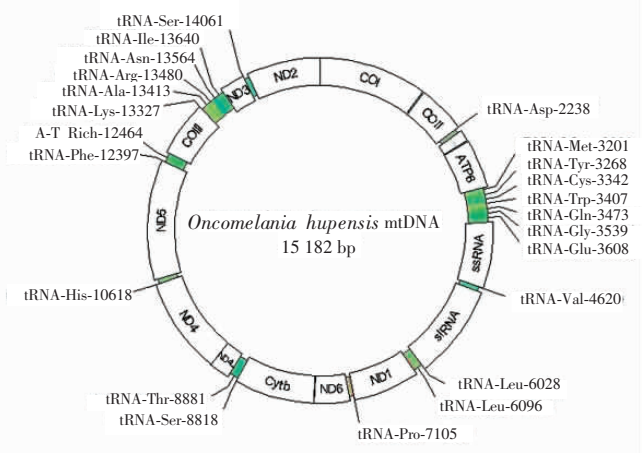
PCR 扩增片段经克隆后双向步移测序获得 4 个序列片段,经 DNASTAR 软件包的 Editseq 和 Seqman 程序编辑和拼接,获得的湖北钉螺线粒体基因组序列全长为 15 182 bp (GenBank 登录号为 FJ997214),A+T 含量为 67.3%,共编码 37 个基因,包括 13 个蛋白质编码基因,2 个 rRNA 基因,22 个 tRNA 基因和一段富含 A+T 的非编码区域,所有基因无内含子。其中 8 个

tRNA 基因 (tRNA^{Met}、tRNA^{Tyr}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Trp}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Gly}、tRNA^{Glu} 和 tRNA^{Thr}) 由反义链编码,其余基因由正义链编码。湖北钉螺线粒体基因组基因间重叠区较少,有 2 处共 11 bp,分别在 tRNA^{Ser}、tRNA^{Thr} 之间 (4 bp) 和 ND4L、ND4 基因之间 (7 bp)。各基因的排列顺序与 Hypsogastropoda 亚目的螺类相似 (图 1)。

动物线粒体基因组虽然是没有内含子的紧密排列结构,但除 AT 富集区外的部分基因之间仍然存在多处基因间隔序列 (intergenic spacer sequence)。湖北钉螺线粒体基因组存在 21 处总计 145 bp 的基因间隔区,间隔长度从 1 bp 到 30 bp 不等,间隔区最大处位于 ATP6 和 rRNA^{Met} 之间 (30 bp)。线粒体基因组的基因组成和分布见表 2。

表 2 湖北钉螺线粒体基因组基因和间隔区顺序和分布
Table 2 The gene contents of *Oncomelania hupensis* mitochondrial genome

基因 Genes	位置 Location	大小(bp) Length(bp)	起始/终止密码子 Start/Stop codon	AT含量(%) AT content (%)	间隔区(bp) Spacer length(bp)
CO	1~1 536	1 536	ATG/TAG	62.43	
CO	1 553~2 239	687	ATG/TAA	64.48	16
tRNA ^{Asp}	2 242~2 308	67		77.61	2
ATP8	2 309~2 467	159	ATG/TAA	72.33	0
ATP6	2 475~3 170	696	ATG/TAG	68.25	7
tRNA ^{Met}	3 201~3 266	66		69.70	30
tRNA ^{Tyr}	3 268~3 332	65		56.92	1
tRNA ^{Cys}	3 342~3 405	64		76.56	9
tRNA ^{Trp}	3 407~3 472	66		72.73	1
tRNA ^{Gln}	3 473~3 538	66		60.61	0
tRNA ^{Gly}	3 539~3 604	66		68.18	0
tRNA ^{Glu}	3 608~3 674	67		67.16	3
ssRNA	3 676~4 618	943		68.72	1
tRNA ^{Val}	4 620~4 686	67		68.66	1
lsRNA	4 689~6 027	1 339		72.07	2
tRNA ^{Leu}	6 028~6 095	68		73.53	0
tRNA ^{Leu}	6 096~6 164	69		75.36	0
ND1	6 165~7 101	937	ATG/T	68.69	0
tRNA ^{Phe}	7 105~7 171	67		62.69	3
ND6	7 172~7 672	501	ATG/TAA	69.26	0
Cytb	7 677~8 816	1 140	ATG/TAA	64.30	4
tRNA ^{Ser}	8 818~8 884	67		55.22	1
tRNA ^{Thr}	8 881~8 946	66		75.76	-4
ND4L	8 955~9 251	297	ATG/TAG	67.68	8
ND4	9 245~10 615	1 371	ATG/TAA	68.49	-7
tRNA ^{His}	10 618~10 682	65		69.23	2
ND5	10 683~12 395	1 713	ATG/TAA	67.37	0
tRNA ^{Phe}	12 397~12 463	67		65.67	1
AT-Rich	12 464~12 535	72		70.83	0
CO	12 536~13 315	780	ATG/TAA	60.00	0
tRNA ^{Lys}	13 327~13 395	69		73.91	11
tRNA ^{Ala}	13 413~13 479	67		73.13	17
tRNA ^{Arg}	13 480~13 548	69		57.97	0
tRNA ^{Asn}	13 564~13 630	67		65.67	15
tRNA ^{Ile}	13 640~13 707	67		62.69	10
ND3	13 708~14 061	354	ATG/TAA	66.95	0
tRNA ^{Ser}	14 062~14 129	68		58.82	0
ND2	14 130~15 182	1 053	ATG/TAA	69.71	0



注 (Note): Ser 为丝氨酸, Ile 为异亮氨酸, Asn 为天冬酰胺, Arg 为精氨酸, Ala 为丙氨酸, Lys 为赖氨酸, A+T Rich 为 A+T 富集区, Phe 为 苯丙氨酸, His 为组氨酸, Thr 为苏氨酸, Asp 为天冬氨酸, Met 为蛋氨酸, Tyr 为酪氨酸, Cys 为半胱氨酸, Trp 为色氨酸, Gln 为谷氨酰胺, Gly 为甘氨酸, Glu 为谷氨酸, Val 为缬氨酸, Leu 为亮氨酸, Pro 为脯氨酸。

图 1 湖北钉螺线粒体全基因组基因结构图
Fig.1 Mitochondrial gene map of *Oncomelania hupensis*

2 核苷酸组成

湖北钉螺线粒体 DNA 的碱基组成具有 AT 偏向性, A+T 含量为 67.3%(表 3)。4 种碱基的含量分别为 (T=37.3%, A=30.0%, G=16.7%, C=16.0%), 变化趋势与脉红螺相似, T 含量最高而 C 含量最少。蛋白质基因总共 3 742 个密码子, 不包含终止密码子; A+T 含量为 66.4%, 比全序列的 A+T 含量稍低。蛋白质基因密码子第 3 位点的 AT 偏向性最明显 (76.6%), 不

表 3 湖北钉螺线粒体 DNA 核苷酸组成
Table 3 Nucleotide composition of the mitochondrial genome of *Oncomelania hupensis*

	碱基含量(%) Content of bases(%)					长度(bp) Length(bp)
	T	C	A	G	A+T	
全基因组 Whole genome	37.3	16.0	30.0	16.7	67.3	15 182
蛋白质编码基因 Protein-coding genes	38.4	16.9	28.0	16.7	66.4	11 226
密码子第一位点 1 st codon position	31.1	17.3	27.8	23.7	58.9	3 742
密码子第二位点 2 nd codon position	43.5	21.4	20.0	15.1	63.5	3 742
密码子第三位点 3 rd codon position	40.6	12.0	36.0	11.4	76.6	3 742
tRNA 基因 tRNA genes	34.6	15.2	33.1	17.1	67.7	1 470
rRNA 基因 rRNA genes	33.0	12.6	37.6	16.7	70.6	2 282
A+T 富集区 A+T rich region	45.8	13.9	25.0	15.3	70.8	72

但高于第 1 位点和第 2 位点, 而且高于 A+T 富集区 (70.8%)。

3 蛋白编码基因及密码子使用

湖北钉螺 mtDNA 的 13 个蛋白编码基因均使用典型的 ATG 启动子, 所使用的终止密码子中, 有 9 个基因使用 TAA 作为终止密码子, 3 个基因使用 TAG 作为终止密码子, 1 个基因(ND1)使用不完整的 T 作为终止密码子。在所编码的 3 742 个氨基酸中, 与其他螺类相似, 亮氨酸(Leu, 15.49%), 苯丙氨酸(Phe, 8.62%), 丝氨酸(Ser, 8.34%)和异亮氨酸(Ile, 8.27%)使用频率最高, 占有所有氨基酸的 40.72%(表 4)。

表 4 湖北钉螺线粒体基因组密码子使用情况
Table 4 The codon usage of *Oncomelania hupensis* mitochondrial genome

密码子 (氨基酸) Codon(aa)	相对同义密码子使用频次 Relative synonymous codon usage(RSCU)	密码子 (氨基酸) Codon(aa)	相对同义密码子使用频次 Relative synonymous codon usage(RSCU)	密码子 (氨基酸) Codon(aa)	相对同义密码子使用频次 Relative synonymous codon usage(RSCU)	密码子 (氨基酸) Codon(aa)	相对同义密码子使用频次 Relative synonymous codon usage(RSCU)
UUU(F)	20.3(1.64)	UCU(S)	7.7(2.31)	UAU(Y)	7.6(1.38)	UGU(C)	2.0(1.27)
UUC(F)	4.5(0.36)	UCC(S)	1.9(0.58)	UAC(Y)	3.4(0.62)	UGC(C)	1.2(0.73)
UUA(L)	19.9(2.68)	UCA(S)	5.5(1.66)	UAA(*)	2.0(1.30)	UGA(W)	6.3(1.56)
UUG(L)	3.0(0.40)	UCG(S)	1.5(0.44)	UAG(*)	1.1(0.70)	UGG(W)	1.8(0.44)
CUU(L)	8.5(1.14)	CCU(P)	2.8(1.05)	CAU(H)	4.8(1.47)	CGU(R)	1.0(0.88)
CUC(L)	1.8(0.25)	CCC(P)	0.8(0.31)	CAC(H)	1.8(0.53)	CGC(R)	0.5(0.47)
CUA(L)	9.6(1.29)	CCA(P)	5.1(1.87)	CAA(Q)	4.2(1.35)	CGA(R)	2.1(1.83)
CUG(L)	1.8(0.24)	CCG(P)	2.1(0.77)	CAG(Q)	2.0(0.65)	CGG(R)	0.9(0.81)
AUU(I)	20.3(1.70)	ACU(T)	6.3(1.79)	AAU(N)	7.4(1.54)	AGU(S)	2.7(0.81)
AUC(I)	3.5(0.30)	ACC(T)	1.3(0.37)	AAC(N)	2.2(0.46)	AGC(S)	2.5(0.74)
AUA(M)	10.2(1.37)	ACA(T)	4.9(1.40)	AAA(K)	6.4(1.64)	AGA(S)	4.0(1.20)
AUG(M)	4.7(0.63)	ACG(T)	1.5(0.44)	AAG(K)	1.4(0.36)	AGG(S)	0.8(0.25)
GUU(V)	7.8(1.83)	GCU(A)	8.5(1.69)	GAU(D)	4.4(1.44)	GGU(G)	4.7(1.06)
GUC(V)	1.1(0.25)	GCC(A)	3.8(0.75)	GAC(D)	1.7(0.56)	GGC(G)	2.6(0.59)
GUA(V)	6.9(1.61)	GCA(A)	6.6(1.32)	GAA(E)	5.1(1.40)	GGA(G)	4.9(1.11)
GUG(V)	1.3(0.30)	GCG(A)	1.2(0.23)	GAG(E)	2.2(0.60)	GGG(G)	5.5(1.25)

注: * 为终止密码子 Stop codon

4 tRNA 基因及 rRNA 基因

湖北钉螺线粒体基因组共有 22 个 tRNA 基因, tRNA 基因碱基长度在 64~69 bp 之间不等, tRNA 基因的种类、排序和反密码子均与已知螺类线粒体 tRNA 相同。在所预测的所有 tRNA 二级结构中, 除 2 个 tRNA^{Ser}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Ile} 以外都能形成典型的三叶草结构, 均由氨基酸接受臂、二氢尿嘧啶(DHU)臂和环、反密码子臂(和环)、T ψ C 臂(和环)以及 1 个可变环构成。tRNA^{Gln}、tRNA^{Ile} 则形成不典型的三叶草结构, 呈现出结构上较大的差异。湖北钉螺的 2 个 rRNA 基因位于 tRNA^{Glu} 和 tRNA^{Leu} 之间, 中间由 tRNA^{Val} 相隔, 12S rRNA 基因大小为 943 bp, 16S rRNA 基因大小为 1 339 bp; rRNA 基因偏向使用碱基 A 和 T (70.6%)。

5 A+T 富集区

不同物种的 AT 富集区域大小差异较大, 即使在同一个种内也是如此。亲缘关系相近物种 AT 富集区域大小的差异主要由 A+T 富集区中的串联重复数目不同造成。湖北钉螺的线粒体 AT 富集区与其他螺的明显差异表现在二者 AT 富集长度的不同, 湖北钉螺 AT 富集区域位于 tRNA^{Phe} 基因和 CO 基因之间, 大小为 72 bp, 介于脉红螺(55 bp)和 *L. cerithiformis* (127 bp) 之间, A+T 含量为 70.8%, 为各区段最高。

讨 论

由于 mtDNA 基因组小, 具有进化速度快、母系遗传、分子简单易于分析和无组织特异性等特点, 已广泛应用于群体遗传、生物进化的研究中, 对种群结构和基因流、生物系统地理学、具溯源分子鉴别和细胞膜内外蛋白质转运等研究有重要意义^[15-18]。但 mtDNA 的基因序列作为分子标记在湖北钉螺的相关研究起步较晚, 可利用的线粒体基因序列十分有限, 多以 COI 基因序列为主^[4,6,7], Cytb、16SRNA 序列的报道则较少^[8,9,19]。本研究利用长片段 PCR 扩增方法和引物步移测序技术^[20]首次获得了湖北钉螺线粒体基因组全序列。

湖北钉螺线粒体基因组全长 15 182 bp, A+T 含量为 67.3%, 是一个闭合环状分子。与其他后生动物一样, 湖北钉螺线粒体基因组共编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和一段 A+T 富集区, 其中有 8 个 tRNA 基因由反义链编码, 其余基因由正义链编码。湖北钉螺的线粒体基因组全序列的核酸组成、基因排序和 RNA 结构等与同为 Hypsogastropoda 亚目的脉红螺(15 272 bp, 68.8%)、疣荔枝螺(15 285 bp, 66.2%)、织纹螺

(15 263 bp, 68.9%)、织锦芋螺(15 562 bp, 65.2%)^[21]和 *Lophiotoma cerithiformis* (15 380 bp, 67.9%)^[22]相似; 与上述软体动物线粒体基因组相比, 湖北钉螺线粒体基因组均存在基因重叠和基因间隔(非编码区)现象, 且位置相似, 但重叠和间隔序列均较短; 湖北钉螺线粒体基因组的重叠区仅有 2 处, 共 11 bp, 最大的间隔区为 30 bp, 较脉红螺最大间隔区(36 bp)短; 湖北钉螺线粒体基因组的 A+T 富集区较短, 仅为 72 bp, 介于 tRNA^{Phe} 基因和 CO 基因之间, AT 含量为 70.8%, 与其他几种螺线粒体基因组的 A+T 富集区相似, 但分布区域有所不同。湖北钉螺线粒体基因组的核酸组成具有强烈的碱基偏好, 各区段均较一致地偏向于使用 A 和 T, 编码蛋白的密码子第 3 位碱基由于碱基的兼并性和摇摆性, A+T 含量更高, 达到 76.6%。tRNA 基因的种类、排序和反密码子均与上述螺类线粒体 tRNA 相同; rRNA 基因具有较高的保守性, 与脉红螺等比对结果表明, rRNA 分子的 3'端含有不同长度的同源序列。

线粒体基因和结构在腹足类动物中已成为遗传多样研究的有效工具^[23]。湖北钉螺的地理群体遗传多样性广为研究者所关注, 研究手段亦日益丰富, 但应用新的线粒体基因开展群体遗传结构和种下遗传分化的研究尚不多见。本研究获得了湖北钉螺线粒体基因组的全序列, 为湖北钉螺遗传多样和不同群体系统发育进化地位的研究提供了更多可利用的分子标记。

参 考 文 献

- [1] Wang LD, Chen HG, Guo JG, et al. A strategy to control transmission of *Schistosoma japonicum* in China[J]. N Engl J Med, 2009, 360(2): 121-128.
- [2] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China[J]. Malacologia, 1995, 37(1): 133-156.
- [3] Zhou YB, Yang MX, Zhao GM, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssoidea), intermediate host of *Schistosoma japonicum* in China: genetics, molecular phylogeny based on amplified fragment length polymorphisms[J]. Malacologia, 2007, 49(2): 367-382.
- [4] Shi CH, Wilke T, Davis GM, et al. Population genetics, microphylogeography, ecology, and infectivity of Chinese *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssoidea: Pomatiopsidae) in the Miao River system: is there a relationship to shell sculpture? [J]. Malacologia, 2002, 44(1): 333-347.
- [5] Wolstenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. Int Rev Cytol, 1992, 141: 173-216.
- [6] Wilke T, Davis GM, Qiu DC, et al. Extreme mitochondrial sequence diversity in the intermediate schistosomiasis host *Oncomelania hupensis robertsoni*: another case of ancestral polymorphism? [J]. Malacologia, 2006, 48(12): 143-157.
- [7] Wilke T, Davis GM, Cui-E C, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: risssoidea) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology[J]. Acta Trop, 2000, 77(2): 215-227.

- [8] Spolsky CM, 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(1-2): 213-221.
- [9] Attwood SW, Upham ES, Zhang YP, *et al.* A DNA-sequence based phylogeny for triculine snails (Gastropoda: Pomatiopsidae: Triculinae), intermediate hosts for *Schistosoma* (Trematoda: Digenea): phylogeography and the origin of *Neotricula*[J]. *J Zool Lond*, 2004, 262: 47-56.
- [10] NCBI genomes database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. (Search on 27 March, 2009).
- [11] Simon C, Buckley TR, Frati F, *et al.* Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2006, 37: 545-579.
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [13] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955-964.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [15] Parham JF, Feldman CR, Boore JL. The complete mitochondrial genome of the enigmatic bigheaded turtle (*Platysternon*): description of unusual genomic features and the reconciliation of phylogenetic hypotheses based on mitochondrial and nuclear DNA [J]. *BMC Evol Biol*, 2006, 6: 11.
- [16] Parham JF, Macey JR, Papenfuss TJ, *et al.* The phylogeny of mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38(1): 50-64.
- [17] Pombert JF, Otis C, Lemieux C, *et al.* The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudendoclonium akinetum* (Ulvophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvophyceae and Chlorophyceae [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(5): 922-935.
- [18] Walsh S, Koehler C. Gazing at translocation in the mitochondrion[J]. *Cell*, 2008, 134(3): 382-383.
- [19] Guan F, Niu AO, Attwood SW, *et al.* Molecular phylogenetics of triculine snails (Gastropoda: Pomatiopsidae) from southern China[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 48(2): 702-707.
- [20] Tonooka Y, Mizukami Y, Fujishima M. One-base excess adaptor ligation method for walking uncloned genomic DNA [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(1): 173-180.
- [21] Bandyopadhyay PK, Stevenson BJ, Ownby JP, *et al.* The mitochondrial genome of *Conus textile*, coxI-coxII intergenic sequences and Conoidean evolution [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 46(1): 215-223.
- [22] Bandyopadhyay PK, Stevenson BJ, Cady MT, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, *Lophiotoma (Xenuroturrus) cerithiformis*: gene order and gastropod phylogeny [J]. *Toxicon*, 2006, 48(1): 29-43.
- [23] Grande C, Templado J, Zardoya R. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements [J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 61.

(收稿日期: 2009-06-10 编辑: 盛慧锋)

文章编号: 1000-7423(2009)-04-0296-01

【病例报告】

黑龙江省本地感染阔节裂头绦虫 1 例

李懿宏, 文景山, 舒晶, 张唯哲*

中图分类号: R532.39 文献标识码: D

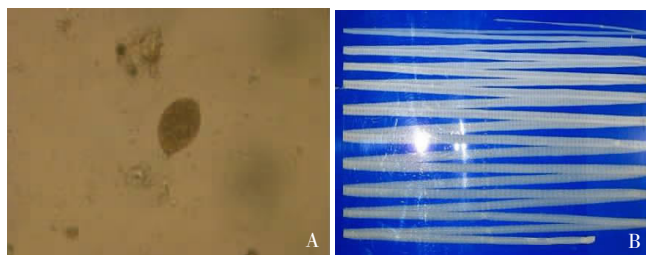
1 病例

患者, 男, 45 岁, 黑龙江省哈尔滨市人。2009 年 1 月 27 日晨排便见一长约 10 cm, 似宽面条样虫体, 至哈尔滨医科大学第一临床医学院消化内科就诊, 由寄生虫病学教研室进行病原学鉴定。

粪检查见大量虫卵, 椭圆形, 灰黄色, 大小约 60 μm \times 50 μm , 有卵盖(图 1A)。虫体检查发现节片中部有盘曲的玫瑰花状子宫, 鉴定为阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*)。询问病史, 该患者于 2006-2008 年曾 3 次在黑龙江沿岸漠河县漠河乡和达莲湖一带食用生鱼, 未到过俄罗斯和其他国家。

取 200 g 槟榔加入 500 ml 水温火煮沸, 煎至半量, 200 g 南瓜子炒熟。次日晨患者空腹服南瓜子, 1 h 后喝槟榔煎剂, 再经 30 min 后饮甘露醇 150 ml, 4 h 后排出一条完整的虫体,

长约 5 m, 宽约 1 cm, 头节细长, 呈匙状, 有深沟槽, 成节的宽度显著大于长度 (图 1B)。



A: 阔节裂头绦虫卵 ($\times 400$), B: 阔节裂头绦虫。

图 1 阔节裂头绦虫卵和成虫

2 讨论

根据该虫的长度, 以及节片中部盘曲的玫瑰花状子宫, 可鉴定为阔节裂头绦虫, 而非曼氏迭宫绦虫。

(下转第 302 页)

作者单位: 哈尔滨医科大学寄生虫学教研室, 哈尔滨 150081

* 通讯作者, E-mail: zhangweizhe526@yahoo.com.cn