DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.019
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0865-03

论著

斯氏肺吸虫和华支睾吸虫基因组多态DNA的初步分析

张锡林,徐文岳,段建华,黄复生 (第三军医大学基础医学部寄生虫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 比较分析斯氏肺吸虫和华支睾吸虫基因组多态DNA的多态性和探讨两吸虫间的相似基因。方法 应用随机扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术对斯氏肺吸虫和华支睾吸虫的基因组多态DNA进行扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后分析结果。结果 引物P1和P2扩增产生斯氏肺吸虫和华支睾吸虫的成虫DNA图谱,而P3引物未扩增出产物。斯氏肺吸虫和华支睾吸虫的P1扩增片段均不相同,而P2引物对两吸虫的扩增产物有2条相同的片段,分别为400、100 bp。结论 RAPD结果显示斯氏肺吸虫和华支睾吸虫为2种独立的吸虫虫种,由于遗传的亲缘关系存在相同的基因,这些相同基因是否表达共同的抗原组分,并导致血清学诊断的交叉反应尚待进一步研究。

关键词:斯氏肺吸虫;华支睾吸虫;随机扩增多肽DNA;基因组
中图法分类号:R383.2;R394.2 文献标识码:A

Preliminary analysis of DNA polymorphism of *Paragonimus skrjabini* and *Clonorchis sinensis*

ZHANG Xi-lin, XU Wen-yue, DUAN Jian-hua, HUANG Fu-sheng (Department of Parasitology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the polymorphism of the genomic DNA extracted from *Paragonimus skrjabini* and of that from *Clonorchis sinensis* and explore the similarity of their genes. Methods The genomic DNA extracted from the 2 trematodes was amplified with random amplified polymorphic DNA (RAPD) and then was carried on agarose gel electrophoresis. Results DNA fingerprints of the 2 trematodes were obtained through the primer P1 and P2 but not through the primer P3. With the primer P1, the amplified fragments from the 2 trematodes were quite different, while with P2, 2 similar bands were found with 400 bp and 100 bp respectively. Conclusion Our results indicate that though *Paragonimus skrjabini* and *Clonorchis sinensis* were independent species, similar genes exist because of their close genetic relation. It should be further investigated whether these similar genes express common antigens resulting in cross-reaction in serodiagnosis.

Key words: *Paragonimus skrjabini*; *Clonorchis sinensis*; random amplified polymorphic DNA; genome

肺吸虫病是由一类肺吸虫引起的寄生虫病,由于其虫种不同、寄生部位各异,从而导致疾病的症状和体征也极为复杂多变。有时需依靠免疫学检测方法。由于肺吸虫与华支睾吸虫在分类上同属吸虫纲内的寄生虫,在亲缘关系比较接近,彼此间存在共同的遗传基因,导致表达共同抗原,在血清学诊断中出现交叉反应,尤其在感染早期和隐性感染时期。如该二种吸虫病同时存在一个地区时,将造成诊断和鉴别诊断的困难。本实验应用随机扩增的多态性DNA技术(Random amplified polymorphic DNA, RAPD),比较两吸虫成虫遗传多态性DNA指纹图谱,探讨斯氏肺吸虫和华支睾吸虫遗传基因的同源性和表达共同抗原的可能性。

作者简介:张锡林(1953-),男,江苏省无锡市人,硕士,副教授,主要从事寄生虫感染免疫和免疫诊断方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752243

收稿日期:2000-01-13;修回日期:2000-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 动物感染和检获斯氏肺吸虫、华支睾吸虫成虫

自兴文县和垫江县采集溪蟹、麦穗鱼。从溪蟹中分离出斯氏肺吸虫囊蚴。麦穗鱼的肌肉经胃蛋白酶-盐酸消化后，分离出华支睾吸虫囊蚴。斯氏肺吸虫囊蚴经腹腔感染、华支睾吸虫囊蚴经口感染雄性家犬(斯氏肺吸虫120囊蚴、华支睾吸虫400囊蚴)1条。在感染后70 d，动物处死，从犬的肺部和肝脏分别检获2种吸虫的成虫。用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗涤虫体3次，置低温冰箱保存备用。

1.2 斯氏肺吸虫、华支睾吸虫成虫基因组DNA的提取

取3条斯氏肺吸虫成虫和20条华支睾吸虫成虫在洁净的小型组织匀浆器中加500 μl TE缓冲液研磨，转入1.5 ml EP管中，另用100 μl TE缓冲液冲洗匀浆器，冲洗液一并转入EP管中。从其中取出200 μl，加10%SDS 50 μl混匀，加蛋白酶K(20 mg/ml)3 μl，混匀后，55℃温育3 h。加RNase A(10 mg/ml)20 μl，37℃30 min。加600 μl饱和酚，10 000 r/min离心5 min，上清转移至新EP管。加酚/氯仿(1∶1)，10 000 r/min离心后，转移上清至新EP管。加氯仿/异丙醇，10 000 r/min离心5 min后，在转移至新EP管。加60 μl NaAc，2.5倍体积冰预冷无水乙醇(沉淀过夜或3 h)。15 000 r/min离心10 min，弃上清，沉淀加75%乙醇，15 000 r/min离心10 min，吹干后，用30 μl双蒸水溶解。测定DNA的浓度，供RAPD实验用。在PCR时，首先检测不同浓度虫体DNA模板的扩增结果，以选择最佳扩增效果的DNA模板量。

1.3 随机引物

本实验使用的随机引物由苏州医学院兰明扬教授赠送，所用的3条随机引物，见表1。

表1 随机引物及其序列

Tab 1 Random oligonucleotide primers and their sequences

Code No.	Sequences	(G+C)%
P1	5'-CGGCCCCTGT-3'	80
P2	5'-GTAGTCACAC-3'	50
P3	5'-TAATCACTGT-3'	30

1.4 PCR反应条件

反应总体积为50 μl，其中含5× PCR缓冲液5 μl、dNTP(2.5 mmol/L)4 μl、引物(200 ng)2 μl、模板5 μl、ddH_2O补足至48 μl、DNA聚合酶(2 U)2 μl。加完样混均后，用液体石蜡20 μl覆盖在反应体系表面。将反应体系先在94℃变性5 min，然后以94℃30 s、36℃30 s、72℃90 s循环45次，最后在70℃延伸5 min。

1.5 结果分析

斯氏肺吸虫、华支睾吸虫成虫基因组DNA扩增产物20 μl，用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离，电泳液为1× TAE，电压为120 V(恒压)，时间2 h。电泳结束，凝胶经溴化乙锭染色，在紫外凝胶分析仪上观察，并拍照记录结果。DNA扩增产物的分子大小测定，以标准分子大小的对数为纵坐标，以相应的迁移距离为横坐标绘制标准曲线。各图谱区带根据迁移距离，从标准曲线上查出相应分子大小的对数值，再求出反对数，即可得到该DNA区带的分子大小。扩增片段共享度计算，根据Nei的公式[1]：$F=2Nxy/(Nx+Ny)$，其中Nx、Ny分别为物种X和物种Y的扩增片段总数。Nxy为物种X和物种Y之间共享的片段数。经计算分别获得斯氏肺吸虫、华支睾吸虫成虫基因组DNA扩增片段共享度F值。

2 结果

2.1 斯氏肺吸虫和华支睾吸虫不同浓度虫体DNA模板的扩增结果

先以虫体的DNA模板量每50 μl分别为25、50、100和150 μg，引物为P1进行随机扩增。检测结果表明不同浓度模板DNA量的扩增结果基本相同。50 μg的模板DNA量即可达到较好的扩增效果，因此选择该模板DNA的量进行RAPD-PCR反应。

2.2 斯氏肺吸虫和华支睾吸虫成虫基因组DNA随机扩增反应的结果

选用3条随机引物分别对斯氏肺吸虫、华支睾吸虫成虫基因组DNA进行随机扩增反应。反复试验，扩增的结果都相同。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离，能分辨较清晰的条带。结果显示P1和P2引物都能扩增产生清晰的虫体DNA图谱，而P3引物未扩增出产物，见图1，表2。这是由于P3引物的碱基比(G+C)%小于40%的原因。由P1引物扩增的斯氏肺吸虫和华支睾吸虫DNA图谱种间差异明显，但P2引物扩增的DNA图谱的区带数为7和8条。有2条相同的DNA区带，大小分别为400、100 bp。经计算P1引物对两吸虫虫体DNA扩增片段共享度F值为0；而P2引物对两吸虫虫体DNA扩增片段共享度F值为0.133；两吸虫虫体总DNA扩增片段共享度F值为0.076。

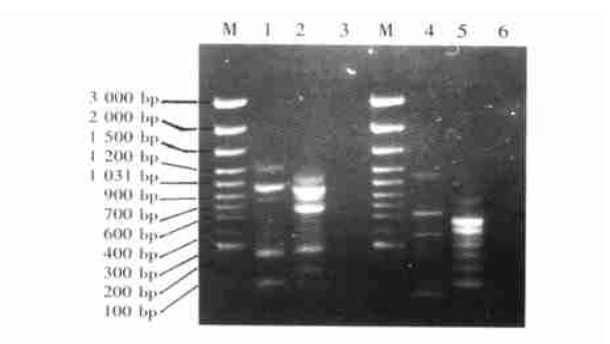


图1 斯氏肺吸虫和华支睾吸虫成虫DNA随机扩增的结果

Fig 1 Results of RAPD from DNA of adult *Paragonimus skrjabini* and *Clonorchis sinensis*

M: The DNA marker; Lane 1～3: PCR product amplified by *Clonorchis sinensis*; Lane 4～6: PCR product amplified by *Paragonimus skrjabini*; P1: Lane 1, 4; P2: Lane 2, 5; P3: Lane 3, 6

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　引物 P1、P2 和 P3 对各虫体 DNA 模板随机扩增片段的长度

Tab 2　Length of DNA fragments of two tremotodes amplified by primers P1, P2 and P3

Species	Primer	Number of DNA bands	Length of DNA fragments amplified (bp)
	P1	5	1 100　620　370　300　60
P. skrjabini	P2	7	860　580　400　320　250　180　100
	P3	0	
	P1	6	1 220　980　820　400　380　100
C. sinensis	P2	8	1 100　1 020　900　700　600　400　160　100
	P3	0	

3　讨论

RAPD 技术是以一个单一的、由 10～20 个碱基组成的随机核苷酸序列作为引物, 对生物标本进行 PCR 扩增。该引物可在一个和多个位点与基因组 DNA 结合, 造成中间未知区域的扩增, 并能产生某些 DNA 片段。这些片段或为种内所有个体所共有, 显示种间多态性; 或为某些个体所独具而显示出种内多态性。不同的引物, 即使一个碱基对的差异也将导致扩增产物带型的改变, 从而显示新的多态性。一种生物标本如果采用多个引物的扩增则可导致种间的最大差异。因此, RAPD 多态性资料对于生物种间的区分鉴定, 反映亲缘关系及系统发育情况, 显示出一定的优势。文献[2, 3] 首先应用该技术对物种作鉴定和遗传图谱的构建。由于 RAPD 具有常规 PCR 的快速、安全和简便等优点外, 还有其引物的通用性以及无需事先了解基因组序列等优点, 大大地缩短了研究周期, 提高了研究效率。在寄生虫学研究中的应用主要集中于寄生虫的遗传多态性分析、群体遗传学研究、种属及株、种群及个体的分类和鉴定; 亲缘关系分析以及系统发育研究等[4]。

在吸虫方面的研究主要集中于血吸虫种间与虫株的分类研究工作。最先研究曼氏血吸虫的种株多态性, 结果显示 8 种不同的血吸虫种间存在明显的差异。引物 3301 对曼氏血吸虫 5 个虫株的扩增产物显现多态性, 但另一引物在虫株间的扩增产物则一致。Barral 等[5] 对 10 个自然感染曼氏血吸虫的大鼠体内检获的 212 条虫体, RAPD-PCR 结果显示有 78 种基因型, 在同一宿主体内检获的虫体之间最大变异高达 28 种基因型。最近国内在肺吸虫方面的研究, 如钱宝珍等[6] 应用随机扩增多态 DNA(PCR-RAPD)技术, 对浙江宁海小汀、宁海西溪、遂昌、临安等地卫氏并殖吸虫囊蚴进行遗传变异研究, 通过 8 条寡核苷酸随机引物扩增, B17-2 400 bp 为浙江宁海小汀肺吸虫种群特异性 DNA 片段, A9-680 bp 为浙江宁海西溪、遂昌、临安三地肺吸虫种群共有特异性 DNA 片段, 结果提示 B17-2 400 bp, A9-680 bp, 可作为卫氏并殖吸虫不同致病品系的分子标记。我们采用 RAPD-PCR 技术分析斯氏肺吸虫和华支睾吸虫的 DNA 指纹图谱, 比较二者之间的亲缘关系, 探讨两吸虫之间相同基因而导致血清学诊断的交叉反应的可能性。结果表明该两种吸虫成虫 DNA 的 RAPD 扩增片段共享度 F 值较低($F=0.076$)。由此可见作为两种独立的吸虫虫种, 在遗传学上存在较大的差异。由于它们同属吸虫纲的亲缘关系, 又存在近缘基因, 因此 P2 引物扩增的 DNA 片段存在相同的带型为 400、100 bp。另外, P3 引物因其 (G＋C)% 小于 40%, 故未扩增出产物。因此在设计引物时应注意三个基本原则[7]: 一是核苷酸的数目一般为 10～20 个, 最少不能小于 9 个; 其次核苷酸序列中(G＋C)%不小于 40%, 可根据需要在 40%～90%之间; 最后随机引物核苷酸序列中不得含有回文结构。在扩增试验中, 首先应检测不同 DNA 模板量对 RAPD 扩增效果的影响。通过试验选择一个适宜的 DNA 模板浓度, 再进行不同引物的扩增试验。以便试验结果的稳定, 也便于结果的比较。本研究仅仅是对斯氏肺吸虫和华支睾吸虫进行 RAPD 基因比较分析的初步实验。探讨两吸虫之间亲缘关系的相似基因以及它的表达而导致血清学诊断的交叉反应。进一步可采用更多的引物对该两吸虫的近缘关系展开更深入的研究, 可望从分子水平阐明血清学诊断的交叉反应机制。

参考文献:

[1] Nei M, Li W H. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction[J]. Proc Natl Acad Sei USA, 1979, 17(8): 5 267－5 273.

[2] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6 531－6 535.

[3] McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7 213－7 218.

[4] 俞小宗, 吴观陵. 随机引物扩增多态性 DNA 技术及其在寄生虫学中的应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(2): 66－67.

[5] Barral V, Morand S, Pointier P J, *et al*. Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers[J]. Parasitology, 1996, 113(4): 511－515.

[6] 钱宝珍, 钱　俊, 朱兴全. 浙江省卫氏并殖吸虫致病品系分子标记的研究[J]. 浙江省医学科学院学报, 1999, 10(2): 11－13.

[7] Schierwater B. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(7): 4 647－4 649.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net