

· 论著 ·

湖北钉螺基因组 5 种抽提方法的比较^{*}

马琳^{1,2}, 李石柱^{1*}, 杨频¹, 尤平², 周晓农¹

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025; 2. 陕西师范大学生命科学院)

【摘要】 目的 5种方法提取湖北钉螺基因组 DNA, PCR 扩增线粒体基因组的 COII 基因以比较其扩增效果, 从而选择适合湖北钉螺大样本基因组抽提的最佳方法。方法 将 50 只钉螺分为 5 组, 每组 10 只, 分别用 OMEGA 基因组 DNA 抽提试剂盒、天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、简化基因组抽提方法、CTAB 法和饱和酚抽提法抽提单只湖北钉螺基因组 DNA, 从消化、抽提时间、抽提浓度、成本等方面评价各种方法的优劣; PCR 扩增线粒体基因组 COII 基因, 测定目的条带相对浓度以衡量扩增效果。结果 5 种方法均能提取基因组 DNA, 消化时间最短的为饱和酚法, 其余均为 3 h; 抽提时间最短的为两种试剂盒和 CTAB, 最长的为简化法; 抽提成本最高的为 OMEGA 试剂盒法, 最低的为 CTAB 法。5 种方法 PCR 均扩增出 COII 基因, 但目的条带浓度有一定差异, 其中 OMEGA 公司和天根公司试剂盒及实验室简化法提纯的模板 PCR 扩增浓度较高。结论 用 OMEGA 公司生产的基因组 DNA 抽提试剂盒抽提湖北钉螺基因组 DNA 效果好, 但成本较高, 适用于对小样本的抽提; 简化法从提纯效果、成本等方面评价, 较适用于大样本抽提。

【关键词】 湖北钉螺; 基因组 DNA; 抽提方法

【中图分类号】 R38 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2011)02-0129-04

[Journal of Pathogen Biology. 2011 Feb; 6(2): 129-132, 141.]

Comparison of five different methods of extracting genomic DNA from *Oncomelania hupensis*

MA Lin^{1,2}, LI Shi-zhu¹, YANG Pin¹, YOU Ping², ZHOU Xiao-nong¹ (1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 2. College of Life Science, Shaanxi Normal University)

【Abstract】 Objective To use 5 methods to extract genomic DNA from *Oncomelania hupensis* in order to determine the best method of extracting DNA from bulk samples and to compare their effectiveness using mt-COII amplification.

Methods Fifty specimens of *Oncomelania hupensis* were divided into 5 groups that were subjected to DNA extraction with commercial OMEGA and TianGen kits, simple DNA extraction, DNA extraction with CTAB, and DNA extraction with phenol-chloroform. The extraction time, the extraction concentration, and the cost of the methods were compared. COII was amplified by PCR and the concentration of PCR products relative to markers was determined in order to evaluate the effectiveness of each method.

Results Each method extracted genomic DNA. DNA extraction with phenol-chloroform had the fastest digestion while DNA extraction with the OMEGA and TianGen kits and with CTAB took 3 h.

DNA extraction with the OMEGA kit was the most expensive method of extraction. The concentration of PCR products differed but each method was effective at extracting DNA for PCR. DNA extraction with the OMEGA and TianGen kits and simple DNA extraction resulted in higher concentrations of PCR products. **Conclusion** DNA extraction with the OMEGA and TianGen kits is suitable for a small number of samples. In terms of efficiency and cost, simple DNA extraction is feasible on a large scale.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; genomic DNA; extracting

湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫唯一的中间宿主, 其地理分布与日本血吸虫病流行区具有严格的一致性^[1]。湖北钉螺主要分布在东南亚地区, 在我国以长江以南为主, 此外在日本、菲律宾和印度尼西亚苏拉威西等地也有分布^[2]。研究表明, 由于湖北钉螺分布广泛, 受地理隔离的影响, 不同地理群体的湖北钉螺发生了显著的遗传分化和变异, 即使同域分布的钉螺群体也存在不同的表型, 表现为多个不同的种型^[3~5]。由于各个种群的湖北钉螺对日本血吸虫的易感性也不尽相同, 因此其种群遗传多样性的研究

对于开展血吸虫病流行病学、血吸虫病低感染率情况下的监测工作具有重要意义。

DNA 是遗传分化最直接的证据, 它可以避免地理

【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 30590373); 科技部重大支撑专项(No. 2003DIA6N009, No. 2005DKA21104, No. 2007BAC03A02); 国家传染病重大专项(No. 2008ZX10004-011)。

【通讯作者】 李石柱, E-mail: stonelicdc@sh163.net

【作者简介】 马琳(1985—), 女, 在读硕士研究生。研究方向: 分子遗传学和景观遗传学。

环境的影响和生物体内蛋白质合成转录后水平修饰带来的干扰,因此,DNA标记及其检测技术已经成为遗传多样性研究的主要方法^[6]。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,湖北钉螺DNA分子标记库得到广泛应用,如RAPD技术^[7,8]、AFLP技术^[9]、SSR技术^[10]、线粒体基因(COI^[11~14]、Cytb^[15~17]、16S^[18,19])和核糖体基因间隔区(ITS)^[18,19]广泛用于检测湖北钉螺不同地理群体的遗传多样性。此外,微卫星文库构建^[20]和线粒体全基因组序列测定^[21]亦极大地丰富了湖北钉螺遗传多样性检测的分子标记资源。基因组DNA提取是钉螺遗传多样性研究的重要步骤之一,由于钉螺常年在阴暗、潮湿的环境中生存,以硅藻为食,体内外存在大量的藻类和微生物,且组织内含有丰富的多糖,在DNA提取过程中很难除去,常常干扰基因组DNA的抽提并影响PCR反应。杨鹏华等^[22]比较了SDS法和CTAB 2种方法抽提钉螺总DNA的效果,认为CTAB法提取的纯度较高,PCR扩增效果较好。本研究通过比较5种方法抽提钉螺总DNA效率及相应扩增效果,旨在寻求一种简便、易行且适合钉螺大样本基因组抽提的方法。

材料与方法

1 材料

1.1 钉螺 湖北钉螺采集于安徽省芜湖市三山区保定镇新胜村(118°27'96"E和31°24'67"N)。钉螺置室内饲养1周后,用逸蚴法鉴定是否感染日本血吸虫,阴性钉螺用75%乙醇浸泡,4℃保存待用。

1.2 主要试剂 eZNA Mollusc DNA Kit 购自美国OMEGA公司;海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒,marker II,2×Taq Master Mix 购自上海天根化工有限公司(简称天根);蛋白酶K,SDS和EDTA购自华美生物工程公司(Sino-American Biotechnology Company);Tris-Cl 购自美国BIO BASIC INC公司。

1.3 主要仪器 PCR仪(C1000™ Thermal Cycler),电泳仪(PowerPac Basic),凝胶成像分析系统(Molecular Imager Gel Doc XR System)均为美国BIO-RAD公司产品;JA1203型电子天平,上海市天平仪器厂生产;XW-80A型旋涡混匀混合器,上海医科大学仪器厂生产。

2 基因组DNA的提取

2.1 eZNA Mollusc DNA Kit(OMEGA)抽提钉螺基因组DNA 单只钉螺去除螺壳和消化系统组织,取腹足肌肉组织,置于1.5 ml的离心管中。加入350 μl ML1匀浆液(试剂盒自带),25 μl蛋白酶K(20 mg/ml),充分混匀,置60℃水浴消化至溶液变清亮,然后按说明书方法提取基因组DNA。

2.2 天根海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒法

抽提钉螺基因组DNA 单只钉螺去壳和消化系统组织,取腹足肌肉,放入装有200 μl GA匀浆液(试剂盒自带)的1.5 ml离心管中,涡旋振荡15 s。加入20 μl蛋白酶K(20 mg/ml),充分混匀后于56℃水浴消化至溶液变清亮,按说明书方法提取基因组DNA。

2.3 简化法抽提钉螺基因组DNA 1)单只钉螺去壳和消化系统,取腹足肌肉,加100 μl 56℃预热的匀浆液(NaCl 0.467 g,EDTA 2.333 g,SDS 0.5 g,Tris-HCl 1.121 g,蔗糖 5.476 g,加水溶解并补足至100 ml),加10 mg/ml蛋白酶K 20 μl,混匀后于56℃恒温水浴消化至溶液变清亮;2)加5 mol/L乙酸钾30 μl,4℃放置30 min;3)4℃13 200 r/min(离心半径8.3 cm)离心,10 min,取上清于1.5 ml的离心管中;4)加2~2.5倍体积的冰乙醇(-20℃存),置4℃,30 min~5 h;5)同上离心,弃上清,用75%冰乙醇(4℃),洗涤沉淀2次,室温干燥后用双蒸灭菌水溶解(约30 μl),4℃保存备用。

2.4 CTAB法抽提钉螺基因组DNA 1)单只钉螺去壳和消化系统组织,取腹足肌肉,放入装有500 μl裂解液(2%CTAB,0.25 mmol/L EDTA,0.1 mol/L Tris-HCl,1.4 mol/L NaCl),8 μl巯基乙醇,5 μl蛋白酶K的1.5 ml离心管中,60℃水浴至溶液清亮;2)加入500 μl饱和酚,颠倒混匀,10 000 r/min离心10 min,移取上层含核酸的水相至新管;3)加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀,10 000 r/min,离心10 min,取上清;4)加2.5倍体积-20℃预冷的无水乙醇沉淀DNA;5)12 000 r/min离心10 min,弃乙醇;6)用-20℃保存的75%乙醇洗涤DNA沉淀,10 000 r/min,离心5 min,去乙醇,55℃干燥DNA;7)加入30 μl双蒸水溶解DNA,-20℃保存备用。

2.5 饱和酚抽提钉螺基因组DNA 1)单只钉螺去壳和消化系统组织,取腹足肌肉,放入装有200 μl裂解液(1 mol/L Tris-HCl,0.5 mol/L EDTA,0.1 g SDS)和5 μl RNase的1.5 ml离心管中,37℃水浴1 h后加入20 μl蛋白酶K,56℃水浴消化至溶液清亮;2)加入225 μl的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合液,缓慢震荡混匀,4℃13 200 r/min离心10 min;3)移取上清至新的无菌1.5 ml离心管,重复酚抽提步骤,直至中间无白色的蛋白质层出现;4)取上清,加入400 μl(-20℃预冷)无水乙醇,缓慢振荡混匀,4℃13 200 r/min离心10 min,去上清;5)加入1 ml 75%预冷(-20℃)乙醇洗涤DNA,4℃或室温条件下13 200 r/min,离心10 min,重复2次;6)室温干燥DNA沉淀,加入30 μl灭菌水,小心吹打使其溶解,-20℃保存备用。

3 基因组DNA提取物电泳检测

各取 6 μl 提取的 DNA 溶液, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶(含 3 μl EB)、电压 100 V、室温下电泳 15 min, 用凝胶成像系统拍照。

4 DNA 浓度和纯度测定

取 99 μl 双蒸水做空白对照, 加入 1 μl DNA 提取物, 充分混匀后用分光光度计检测样品的 A₂₆₀ 值和 A₂₈₀ 值浓度, 计算 DNA 浓度和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀)。

5 PCR 扩增 COII 基因

参照本实验室获得的线粒体全基因组序列, 用 primer5.0 设计引物, DNA_{sp} 对引物进行评估, 获得 CO II 基因上游引物(CO II F) 序列为 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3', 下游引物(CO II R) 序列为 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系(25 μl): 2× Taq Master Mix 12.5 μl, 正反引物各 0.5 μl, 模板 2 μl, 加灭菌超纯水至总体积为 25 μl。PCR 反应: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 10 min。产物用含 EB 的 1% 琼脂糖电泳凝胶检测, 并用凝胶成像系统拍照。

6 PCR 产物拷贝数测定

取 10 μl PCR 反应产物及等体积 marker II 做 1% 凝胶电泳结果, 在凝胶成像分析仪器上观察电泳结果。将 marker II 中 700 bp 条带作为基准条带, 其灰度定为 1, 通过与基准条带比较读取扩增条带灰度的相对值, 此相对值作为扩增条带的相对浓度。

结 果

1 5 种抽提方法所需的抽提成本及时耗

5 种抽提方法中, 以 OMEGA 试剂盒和天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒抽提成本较高, 分别为 157.2 元/10 个样本和 99.1 元/10 个样品; CTAB 法抽提成本最低, 为 4.75 元/10 个样品。5 种抽提方法耗时略有差别, 总体消耗时间在 4.3 h ~ 5 h 之间(表 1)。

2 钉螺基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测

从图 1 可知, 5 种方法均能提取 DNA, 大小约为 10 kb, 但也有小片段的 DNA 和 RNA 存在, 说明抽提的 DNA 有不同程度的降解。

表 1 5 种抽提方法所需的抽提时间及成本

方法 Extraction method	抽提成本 (元/10 个样品) Cost (Yuan/10samples)	耗时(h/10 个样品) Time(hour/10 samples)		
		消化 Digestion	抽提 Extraction	合计 Total
eZNA Mollusc DNA Kit (OMEGA) 法	157.2	3	1.5	4.5
天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法	99.1	3	1.5	4.5
简化抽提法	9.05	3	2	5.0
CTAB 抽提法	4.75	3	1.5	4.5
饱和酚抽提法	12.5	2.5	1.8	4.3

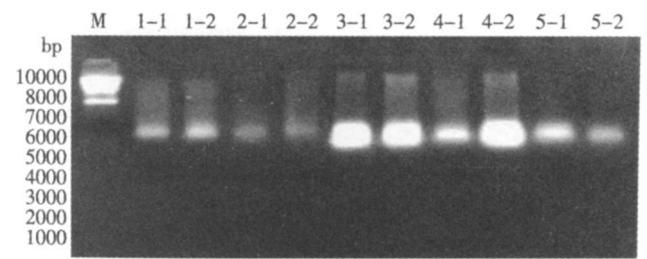


图 1 湖北钉螺基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

M DNA marker II 1-1, 1-2 PCR analysis of each method of OMEGA 2-1, 2-2 PCR analysis of each method of tiangen 3-1, 3-2 PCR analysis of each method of simple method 4-1, 4-2 PCR analysis of each method of CTAB method 5-1, 5-2 PCR analysis of each method of phenol-chloroform

Fig. 1 agarose gel electrophoresis of Oncomelania hupensis

3 基因组 DNA 提取物的浓度和纯度

5 种方法抽提的钉螺基因组 DNA 中 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.608 ~ 2.038 之间(表 2), 与 Miller 等^[23] 首次用高盐法提取 DNA 时的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值(1.8 ~ 2.0) 相近, 浓度在 205 ~ 410 ng/μl 之间。

表 2 5 种方法抽提的湖北钉螺基因组 DNA 的浓度和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀)

方法 Method	A 值 (A value)	DNA 浓度(ng/μl) DNA concentration(ng/μl)
OMEGA 试剂盒法	1.724	250
天根试剂盒法	1.818	213
简化法	1.608	410
CTAB 法	2.038	205
饱和酚法	1.848	305

DNA 浓度(ng/μl) = A₂₆₀值 × 稀释倍数 ÷ 0.02; 纯净 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ ≈ 1.8

4 PCR 扩增验证

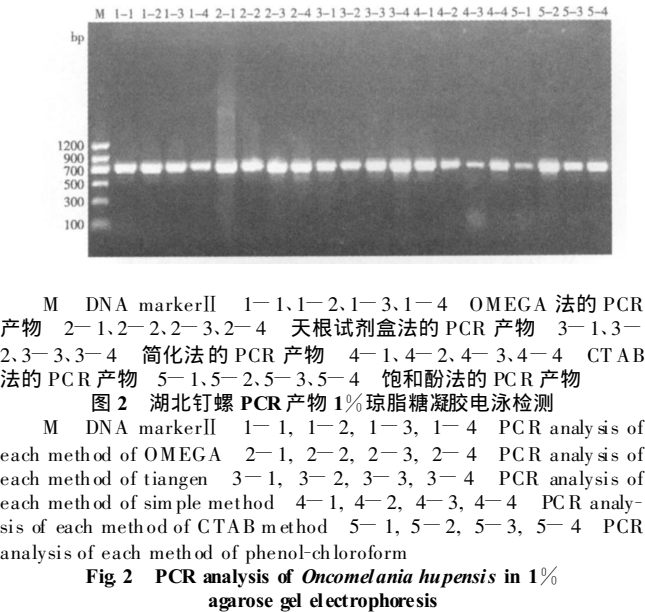
以 5 种方法抽提的 DNA 为模板, PCR 扩增 mtD-NA-CO II 基因片段, 1% 质量浓度的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 结果见图 2。CO II 基因片段长度均为约 700 bp, 与预期结果一致, 且条带单一、整齐, 没有拖带, 引物二聚体也很少。

5 DNA 提取物的 PCR 拷贝数(浓度相对值)

5 种提取物 PCR 扩增的 DNA 拷贝数(相对浓度)以两种试剂盒法较高, 均在 7.6 以上, 简化法为 7.5, 饱和酚法为 5.6(表 3)。

讨 论

基因组 DNA 提取和纯化方法的灵敏度、特异性直接影响遗传多样性分析的结果。生物种群遗传多样性研究往往需要大样本, 这不仅要求基因组 DNA 具有足够高的浓度、纯度和结构的完整性^[24], 而且操作步骤需简便易行, 成本低廉, 适合大批量样品的抽提。



M DNA markerII 1—1, 1—2, 1—3, 1—4 OMEGA 法的 PCR 产物 2—1, 2—2, 2—3, 2—4 天根试剂盒法的 PCR 产物 3—1, 3—2, 3—3, 3—4 简化法的 PCR 产物 4—1, 4—2, 4—3, 4—4 CTAB 法的 PCR 产物 5—1, 5—2, 5—3, 5—4 饱和酚法的 PCR 产物

图 2 湖北钉螺 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

M DNA markerII 1—1, 1—2, 1—3, 1—4 PCR analysis of each method of OMEGA 2—1, 2—2, 2—3, 2—4 PCR analysis of each method of tiangen 3—1, 3—2, 3—3, 3—4 PCR analysis of each method of simple method 4—1, 4—2, 4—3, 4—4 PCR analysis of each method of CTAB method 5—1, 5—2, 5—3, 5—4 PCR analysis of each method of phenol-chloroform

Fig 2 PCR analysis of *Oncomelania hupensis* in 1% agarose gel electrophoresis

表 3 5 种方法提取的 DNA PCR 拷贝数(浓度相对值)

Table 3 PCR products concentration of each sample relative to marker

方法 Method	DNA 拷贝数(相对浓度值) DNA copy number(Relative concentration)				平均值 average
	1	2	3	4	
OMEGA 试剂盒法	7.678	7.993	7.602	7.161	7.609
天根试剂盒法	7.412	7.526	8.102	7.452	7.605
简化法	7.323	7.420	7.752	7.540	7.508
CTAB 法	7.430	6.723	4.671	7.481	6.578
饱和酚法	4.574	5.960	5.730	5.952	5.554

注: 1~4 对应每种方法抽提的 DNA 扩增后选取的 4 个样品。
No.1 to No.4 in column refers to 4 samples by different extraction method.

本研究选取 5 种常用的基因组抽提方法抽提湖北钉螺基因组 DNA 均获得成功, 提取物经 PCR 扩增出线粒体 DNA 的 CO II 基因, 但抽提和扩增效果存在不同程度的差异。抽提所需时间以饱和酚法最短, 简化方法最长。抽提成本以试剂盒法最高, 每个样品约需 100 元或 100 元以上, 其余 3 种方法接近, 约为 10 元/10 个样品。不同方法抽提的基因组 DNA A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.608~2.038 之间, 两种试剂盒法和饱和酚法的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值最接近 1.80, 而 CTAB 方法和简化方法提取物分别有 RNA、蛋白质或苯酚的污染。PCR 结果亦显示, 两种试剂盒法和简化法抽提的基因组 DNA 扩增的平均拷贝数(相对浓度值)在 7.5~7.6 之间, 而饱和酚法仅为 5.6。

研究表明, 两种试剂盒法抽提的基因组 DNA 浓度较高, 耗时较短, 扩增效果较好, 但成本高, 且步骤相对繁琐, 仅适用于小样本抽提且精度要求较高的实验。CTAB 是一种阳离子去污剂, 在高离子强度的溶液中, CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物, 通过有机溶剂抽提, 去除蛋白质、多糖、酚类等杂质后加入乙醇

沉淀使核算分离, 该方法抽提成本最低, 但巯基乙醇有恶臭气味。饱和酚法以先用去垢剂(SDS)破坏细胞组份, 再用蛋白酶 K 消化以除去蛋白质, 然后用酚、氯仿去掉蛋白质和细胞膜成分, 需用酚/氯仿/异戊醇进行二次抽提, 在蛋白质含量多的情况下还要反复抽提多次, 工作量大, 而且耗费时间。另外, 在抽提过程中酚对 DNA 具有一定的剪切作用, 抽提次数越多, 对 DNA 造成的损害也越大, 且酚具有高度腐蚀性, 对人的健康也不利。简化法省去了酚氯仿法中的酚抽提步骤, 避免了操作过程中酚的危害, 抽提的基因组 DNA 浓度和纯度与传统酚氯仿法接近, 且此方法无需特殊试剂, 操作步骤少, 减少了 DNA 的损失, 保证了所提 DNA 的完整性和纯度, 对大量样品的提取更为实用。

湖北钉螺基因组 DNA 抽提以往多采用酚氯仿法, 但此法提取的 DNA 质量受酚、氯仿影响较大, 且有机溶剂的大量使用有害操作者的身体健康。本研究根据实验室的具体要求对其进行了改良和简化, 使方法更简便、快速、经济、安全。随着分子生物学技术的快速发展, 今后基因组抽提方法的改进应包括以下几方面: ①尽量用非有机溶剂取代有机溶剂; ②简化操作步骤, 省去繁琐的提取和离心过程; ③提取过程自动化, 将基因组 DNA 的提取与其他分子生物学技术(如毛细管电泳, PCR, 基因芯片技术等)结合起来, 实现从样品处理到基因分析过程的全部自动化操作, 减少人为因素造成的影响^[25]。

【参考文献】

[1] 周述龙, 林建银, 蒋明森. 血吸虫病学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001.

[2] Liu YY, Lou TK, Wang YX. Subspecific differentiation of *oncomelania* snail[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1981, 6(3): 253—66.

[3] Davis GM, Zhang Y, Spolsky C. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China[J]. Malacologia, 1995, 37(1): 133—56.

[4] 李石柱, 王强, 钱颖骏, 等. 中国大陆湖北钉螺种下分化研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(002): 150—3.

[5] 周艺彪, 姜庆 5, 赵根明, 等. 中国大陆钉螺的亚种分化[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(006): 485—7.

[6] Becker J, Vos P, Kuiper M, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1995, 249(1): 65—73.

[7] 许静, 郑江. 随机扩增多态性 DNA 技术对我国大陆光壳钉螺遗传多样性的初步探讨[J]. 热带病与寄生虫学, 2003, 1(2): 68—71.

[8] 刘蓉, 牛安欧, 李莉. 用 RAPD 技术对湖北钉螺遗传变异的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2004, 17(3): 136—9.

[9] 周艺彪, 赵根明, 韦建国, 等. 湖北钉螺种群内 AFLP 分子标记遗传变异分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(1): 27—34.

(下转 141 页)

呈时间、剂量依赖。但在培养至第9 d时,蒿甲醚高剂量组(100 μ g/ml)原头蚴死亡率达100%,抗原头蚴作用显著。

本实验初步观察到蒿甲醚具有体外抗多房棘球绦虫原头蚴作用,对药物抗泡球蚴的机理、适宜剂量,以及与经典的临床有效药物作用的安全性比较等均有待深入探讨和研究。

【参考文献】

[1] Rausch RL. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson RCA and Lymbery AJ (ed.). *Echinococcus and hydatid disease* [M]. CAB International, Wallingford, England, 1995. 89–134.

[2] 陈兴保, 吴观陵, 孙新, 等. 现代寄生虫病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 773–80.

[3] 张龙, 张示杰. 泡状棘球蚴在人宿主中的生存机制研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(9): 714–6.

[4] Leggatt GR, McManus DP. Sequence homology between two immuno-diagnostic fusion proteins from *Echinococcus multilocularis* [J]. *Int J Parasitol*, 1992, 22(6): 831–3.

[5] Ito A. Introduction of on going research projects on echinococcosis at asahikawa medical college and some comments on the surveillance, prevention and control of alveolar echinococcosis in Japan [J]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 2001, 76(1): 3–8.

[6] Gillespie DL, Patel A, Fileta B, et al. Varicose veins possess greater

ter quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13 [J]. *Surgical Res*, 2002, 106: 233–8.

[7] Wilson JF, Rausch RL. Alveolar hydatid diseases: A review of clinical features of 33 cases [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1980, 29: 1340.

[8] Ammann RW, Hirsbrunner R, Cotting J, et al. Recurrence rate after discontinuation of long term mebendazole therapy in *Echinococcus multilocularis* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 43: 506.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 309.

[10] Zhou HJ, Wang WQ, Wu GD, et al. Artesunate inhibits angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells [J]. *Vascular Pharmacol*, 2007, 47(2–3): 131–8.

[11] Mercer AE, Maggs JL, Sun XM, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9372–82.

[12] 李琼毅, 陈根, 包根书, 等. 泡球蚴组织的体外培养及在药物筛选中的应用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(4): 263–5.

[13] 王轶, 王琪, 陈根川, 等. 芎嗪和阿苯达唑联合治疗小鼠继发性泡球蚴病的疗效观察 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(6): 443–6.

【收稿日期】 2010-10-09 【修回日期】 2011-01-20

(上接 132 页)

[10] 牛安欧, 熊衍文. 微卫星锚定 PCR 研究湖北钉螺的遗传变异 [J]. 中国病原生物学杂志, 2002, 15(4): 230–3.

[11] Thomas W, Davis GM, Chen CE, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissooidae) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology [J]. *Acta Tropica*, 2000, 77: 215–7.

[12] 石朝辉, 邱持平, 夏明仪, 等. 湖北省庙河地区钉螺细胞色素 C 氧化酶 I 基因差异的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1): 41–4.

[13] 韩庆霞, 牛安欧, 李金木. 湖北钉螺线粒体 COI 基因序列分析差异研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 4(4): 320–5.

[14] 白洁. 云南省血吸虫病流行区湖北钉螺 COI 基因序列分析 [D]. 昆明医学院, 2008.

[15] Spolsky CM, Davis GM, Zhang Y. Sequencing methodology and phylogenetic analysis: cytochrome b gene sequence reveal significant diversity in Chinese populations of *Oncomelania* (Gastropoda: Pomatiopsidae) [J]. *Malacologia*, 1996, 38(1–2): 213–21.

[16] 林睿, 黎学铭, 胡纓, 等. 广西、湖南、云南三地钉螺 Cytb 基因序列变异和系统进化研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(2): 110–4.

[17] 胡纓, 黎学铭, 林睿, 等. 三地钉螺线粒体 DNA 两个分子的遗传变异研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(006): 474–7.

[18] Zhao QP, Jiang MS, DTimothy JL. distinct genetic diversity of *Oncomelania hupensis*: intermediate host of *Schistosoma japonicum* in Mainland China as revealed by ITS sequences [J]. *Neglected tropical diseases*, 2010, 4(3): 1–8.

[19] 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]. *Geospat Health*, 2009, 3(2): 221–31.

[20] 李石柱, 王艺秀, 马雅军, 等. 湖北钉螺多态微卫星 DNA 位点筛选和特征初步分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(1): 122–5.

[21] 李石柱, 王艺秀, 刘琴, 等. 湖北钉螺线粒体基因组全序列测定研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(004): 291–6.

[22] 杨鹏华, 黄敏. 钉螺总 DNA 提取方法的比较 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(6): 1287–9.

[23] Miller SA, Dykes DD, Polesky HFA. simple salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(3): 1215.

[24] 孟庆丽, 梁晓华, 于卫健, 等. 基因组 DNA 提取方法及试剂的对比分析 [J]. 中国输血杂志, 2006, 19(003): 201–2.

[25] 王龙武, 徐克前, 罗识奇. 基因组 DNA 提取方法及进展 [J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(6): 379–82.

【收稿日期】 2010-08-19 【修回日期】 2010-12-08