

# 湖北钉螺多态微卫星 DNA位点筛选和特征初步分析

李石柱<sup>1</sup>, 王艺秀<sup>1,2</sup>, 马雅军<sup>3</sup>, 王强<sup>1</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 吴纓<sup>1</sup>, 吕山<sup>1</sup>, 张仪<sup>1</sup>, 周晓农<sup>1\*</sup>

[摘要] 目的 分离湖北钉螺的微卫星 DNA序列, 筛选多态的微卫星 DNA位点并分析其特征。方法 应用湖北钉螺基因组 DNA的酶切片段与生物素标记的 (AAT)<sub>17</sub>, (GA)<sub>25</sub>, (CCT)<sub>17</sub>, (CA)<sub>25</sub> 等 10个寡核苷酸探针杂交, 富集、浓缩、克隆并测序, 构建微卫星 DNA库。挑选合适的微卫星 DNA位点设计并合成引物, 扩增钉螺样本经聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选多态性。结果 获得湖北钉螺微卫星 DNA序列 205条, GenBank注册登记号 GU204044 ~ GU204248, 其中完整重复序列 74条, 占 36.10%; 非完整重复序列 102条, 占 49.76%; 复合重复序列 29条, 占 14.15%。设计合成的 20对微卫星 DNA位点引物中, 经鉴定显示 13个位点具有多态性。结论 分离建立了湖北钉螺微卫星 DNA序列库, 为湖北钉螺群体遗传、种群溯源等相关研究提供了分子标志。

[关键词] 湖北钉螺; 微卫星 DNA; 多态性

[中图分类号] R383.24 [文献标识码] A

## Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers of *Oncomelania hupensis*

Li Shi-zhu<sup>1</sup>, Wang Yi-xiu<sup>1,2</sup>, Ma Ya-jun<sup>3</sup>, Wang Qiang<sup>1</sup>, Liu Qin<sup>1</sup>, Wu Ying<sup>1</sup>, Lv Shan<sup>1</sup>, Zhang Yi<sup>1</sup>, Zhou Xiaonong<sup>1\*</sup>

1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 2 Life Science College, Shaanxi Normal University, China; 3 Department of Etologic Biology, Second Military Medical University, China

\* Corresponding author

[Abstract] Objective To isolate the microsatellite DNA sequences of *Oncomelania hupensis* and analyze the polymorphic microsatellite loci. Methods The digested genomic fragments were hybridized with biotinylated oligonucleotide probes. The target fragments/molecules were captured and enriched. Then these fragments were cloned and sequenced. The suitable microsatellite loci were chosen and the polymorphism was screened by PAGE gel electrophoresis. Results A total of 205 microsatellite DNA sequences were obtained (GenBank accession numbers: GU204044 ~ GU204248). The percentage of perfect microsatellite DNA sequence was 36.10% (74/205), with imperfect sequence as 49.76% (102/205) and compound sequence as 14.15% (29/205). Twenty typical microsatellite sequences were selected to design amplifying primers, and 13 microsatellite loci were found to be polymorphic. Conclusion A total of 205 microsatellite DNA sequences of *Oncomelania hupensis* are isolated and first reported, which will be useful for population genetic and mapping studies of *Oncomelania hupensis*.

[Key Words] *Oncomelania hupensis*; Microsatellite DNA; Polymorphism

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫的唯一中间宿主, 其地理分布与日本血吸虫病流行区具有严格的一致性<sup>[1]</sup>。湖北钉螺的分布区按其孳生地的生态、环境类型可划分为 4 类, 即: 以湖南、湖北、江西、安徽、江苏和浙江等省为主的湖沼和山丘型地区, 以云南和四川两省为主的高山型地区, 以福建省的沿海山丘型地区和广西壮族自治区的内陆型山丘型地区<sup>[2]</sup>,

其中长江中下游已形成片状分布的江河湖沼地区是湖北钉螺主要分布区<sup>[3-6]</sup>。研究表明, 湖北钉螺不同地理种群发生了显著的遗传分化<sup>[7]</sup>, 各个种群的湖北钉螺对日本血吸虫的易感性也不尽相同<sup>[8]</sup>, 因此, 其种群遗传多样性的深入研究对于血吸虫病流行病学、血吸虫病低感染率情况下的监测工作具有重要意义。

微卫星 DNA 是一类简单的短核苷酸串联重复序列, 又称简单重复序列, 广泛分布于真核生物的基因组中, 其重复次数的差异导致微卫星 DNA 具丰富的长度多态性<sup>[9]</sup>。作为第二代 DNA 分子标记, 微卫星 DNA 具有信息含量高、易于检测、呈共显性遗传等特点, 因此广泛用于遗传多样性的研究。软体动物中已分离微卫星 DNA 的动物达 128 种, 共获得了 3 284 条微卫星 DNA 序列。微卫星标记在湖北钉螺遗传多样性研究

[基金项目] 国家自然科学基金 (30590373); 世界卫生组织 TDR 项目 (970990); 科技部重大支撑专项 (2003DA6N009, 2005DKA21104, 2007BAQ3A02); 国家传染病重大专项 (2008ZX10004-011)

[作者单位] 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 (上海 200025); 2 陕西师范大学生命科学学院; 3 第二军医大学病原生物学教研室

[作者简介] 李石柱, 男, 博士, 助理研究员。研究方向: 血吸虫病流行病学

\* 通信作者 E-mail: pdzhaox@sh163.net

中的应用起步较晚,已有少量应用 SSR-PCR进行分析湖北钉螺不同群体遗传变异的研究和利用通用微卫星引物扩增微卫星 DNA片段的报道<sup>[10-12]</sup>。但至今尚无湖北钉螺微卫星 DNA位点的分离及其特征的系统报道。本研究利用生物素标记的寡核苷酸探针杂交技术,构建了湖北钉螺的微卫星 DNA库并筛选其中多态的微卫星位点,为湖北钉螺遗传多样性研究提供了新的分子标志。

## 材料与方法

### 1 样本来源

湖北钉螺采自湖南省岳阳市鹿角乡富强村(113.059 47°N, 29.086 14°E),壳型为肋壳。现场采集的钉螺样本室内饲养1周后,用逸蚴法鉴定钉螺是否感染日本血吸虫,取阴性钉螺作为实验材料,并置于75%乙醇浸泡,4℃保存待用。

### 2 方法

2.1 总 DNA的提取 取单只湖北钉螺的腹足肌肉组织30 mg,采用美国 Omega公司软体动物 DNA小量提取试剂盒(D3373-01, USA)提取基因组 DNA, -20℃保存待用。操作方法按操作说明书。

2.2 微卫星 DNA序列的分离 基因组 DNA经 *Sau*3A 酶切,回收200~800 bp的片段,连接 *SAU*I接头,参照文献设计接头序列: *SAU*I A GCGGTACCCGG-GAAGCTTGG, *SAU*I B GATCCCAAGCTTCCGGGTAC-CGC<sup>[13]</sup>。以 *SAU*I A为引物,连接产物作为模板进行PCR扩增,25 μl的反应液中含PCR缓冲液、2.5 mmol/L *Mg*Cl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTP、1.0 μmol/L引物、0.5 U *Taq*酶(上海天根生物技术有限公司)和2 μl模板,PCR仪(C1000, BioRad)上执行如下程序:94℃预变性5 min;94℃1 min;67℃45 s;72℃1 min;共35个循环,72℃延伸5 min。扩增产物经沸水变性后,与Biotin-16-dd UTP(瑞士 Roche公司)标记的寡核苷酸探针杂交,探针包括:(AAT)<sub>17</sub>、(GA)<sub>25</sub>、(CCT)<sub>17</sub>、(CA)<sub>25</sub>、(CAG)<sub>17</sub>、(CAC)<sub>5</sub>、(TC)<sub>10</sub>、(GT)<sub>8</sub>和(TG)<sub>18</sub>。用亲和素 Vectrex Avidin D(英国 Vector Labs公司)捕获并超滤离心(美国 Millipore公司)浓缩富集杂交的目的片段。以富集的核酸作为模板, *SAU*I A为引物扩增,反应体系和程序同前。随后,用PCR产物再次杂交,捕获、浓缩富集和扩增。将上述扩增产物插

入 PGEM-T载体(上海天根生物技术有限公司),转化 *E. coli* DH5α,挑选阳性克隆,用四色荧光标记双脱氧链终止法测序(PE2 AB 3770 全自动测序仪,上海生工生物工程有限公司),应用 BiEdit (Version 7.0.9)和 SSRHunter 1.3 软件分析所获得含微卫星 DNA的序列<sup>[14]</sup>。

2.3 微卫星 DNA多态位点筛选 微卫星 DNA序列的分类标准参照 Weber的分类方法<sup>[15]</sup>,分为完整重复、非完整重复和复合重复序列;选择20条重复次数较多,且典型的微卫星 DNA序列,应用 Primer Primer 5.0软件设计引物,以单只钉螺基因组 DNA为模板,PCR扩增微卫星 DNA(反应体系和程序同前),退火温度范围在50~55℃,扩增产物经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,鉴定其多态性。

## 结 果

### 1 湖北钉螺微卫星 DNA序列

应用10个寡核苷酸探针对湖北钉螺微卫星 DNA进行分离筛选,测序获得292条有效序列,其中含有微卫星 DNA的序列共266条。在有效的微卫星 DNA序列中,去除序列较短(<100 bp)和重复序列,共获得湖北钉螺微卫星 DNA序列205条,GenBank注册号为GU204044~GU204248。分析所获的微卫星 DNA序列,显示其长度范围为150~800 bp,大多数在300 bp左右。比较分析微卫星 DNA序列的特点,其中以双核苷酸重复占多数,三核苷酸重复序列重复次之,多核苷酸重复比较少见;重复序列以(CA)<sub>n</sub>和(GT)<sub>n</sub>数量最为丰富,重复次数最多的(CA)<sub>n</sub>可达98次。根据Weber的分类标准,获得完整重复序列74条,占36.10%,非完整重复序列102条,占49.76%,复合重复序列29条,占14.15%。

### 2 湖北钉螺多态微卫星位点

设计并合成了20对微卫星 DNA扩增引物,对现场样本进行扩增,结果显示,16个位点在退火温度50℃或55℃时,可有特异性的扩增。扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染显色分析,依据凝胶上出现的条带数目确定其是否为多态位点,电泳条带为单条时即为纯合子,两条带以上为杂合子,若显示两条带以上时,通常表示为多拷贝微卫星位点。结果显示共有13个微卫星 DNA位点具有多态性(表1)。

表 1 获得的湖北钉螺 13 个多态微卫星位点特征  
Table 1 Characteristics of 13 microsatellite loci in *Oncomelania hupensis*

位点 Locus	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复单元 Repeat motif	退火温度 Ta (°C)	位点大小 Size (bp)	GenBank注册号 GenBank accession No.
T5-13	Pf TAGTGGGACTTATTTCCTG Pr AAGGCTGAGTGGTAGTTA	(GT) <sub>14</sub> (GT) <sub>6</sub>	50	245	GU204194
T5-11	Pf ACGCCAGTCTTGGTGTCA Pr TACTTGGGCAGAAAGGTT	(GT) <sub>14</sub>	55	173	GU204092
T4-22	Pf TATCCAAGAAGCCGAAAC Pr GAGGAAAGCGAGGTAAGA	(CA) <sub>10</sub>	50	244	GU204083
T6-27	Pf AATGACACCCCGAACAAA Pr CACTTCTCAACTCCAACCT	(G) <sub>13</sub> (GT) <sub>6</sub> (GT) <sub>12</sub>	55	204	GU204213
P82	Pf AAGAACTGCTCATACTGGA Pr GTGGTGCCCCTACGACCT	(GGA) <sub>4</sub> (GAA) <sub>12</sub>	51	179	GU204045
T6-47	Pf CCGAAGTGATAGAAACCG Pr AGGCAGAAATGGGCAGAC	(GT) <sub>6</sub> (GT) <sub>9</sub>	50	190	GU204215
T5-21	Pf ATAAGTTTAGCCAGTCACC Pr ACACGCAGTCCACGCACA	(GT) <sub>16</sub> (GT) <sub>7</sub>	55	199	GU204196
T4-36	Pf CGGGTTACGGGAAAGGAT Pr AGGGACGAATCACGAAG	(CA) <sub>17</sub>	52	252	GU204088
E3	Pf CCAAACCTCTTCAACAC Pr GCCGAAAGAAATTCTACG	(CA) <sub>15</sub>	55	190	GU204069
E15	Pf AAAGAACCGAATCAGGAC Pr TACCAGCCGATGAATAAA	(CA) <sub>21</sub> (CA) <sub>14</sub> (CA) <sub>8</sub>	50	189	GU204173
D17	Pf CATCGTTGACACGGGTTT Pr TGGGCTGTTGGTCTCTT	(GT) <sub>32</sub>	50	232	GU204064
C23	Pf CTGGACCTAAAGCAATAAC Pr GAGCCAATCACCTAAACTA	(GT) <sub>14</sub>	55	172	GU204058
B14	Pf AGAAAGCAGCATGACCCA Pr AGGTGGCATTATCGAATT	(CT) <sub>9</sub>	50	337	GU204050

讨 论

微卫星 DNA核心序列在基因组中呈串联重复排列,其重复序列和长度表现较高的多态性,对于揭示物种遗传多态性具有重要意义。微卫星 DNA的分离主要有 3 种方法。一是构建目标生物基因组 DNA小片段 DNA文库,通过杂交筛选出含有微卫星 DNA序列的阳性克隆。这种传统的构建 DNA文库再筛选阳性克隆的方法获得阳性克隆的比例较低,仅为 0.025%~12.000%<sup>[16]</sup>。二是用生物素、地高辛或放射性同位素等标记的探针先将富含微卫星的 DNA片段富集,经 PCR扩增后,再建立 DNA文库<sup>[13-17]</sup>。此种方法通常获得阳性克隆的比例较高。此外,从 GenBank公布的基因组资源中筛选微卫星 DNA也是便捷的途径。由于缺少湖北钉螺基因组的数据,本研究参照文献使用 2 次亲和素富集和超滤离心浓缩的方法,通过生物素标记的探针杂交,用亲和素和超滤离心进行 2 次富集

和筛选,获得了 205 个微卫星 DNA序列,初步构建了湖北钉螺微卫星 DNA库,为湖北钉螺的分子遗传结构和种群溯源研究提供了丰富的分子标志。

尽管微卫星 DNA的功能尚不明了,其进化模式和选择压力还未完全确定,但仍被看作是接近于中性的标志,可以测定哈迪-温伯格平衡、连锁不平衡和遗传漂变等群体遗传结构参数<sup>[18]</sup>。牛安欧等<sup>[10]</sup>应用 (CA)<sub>8</sub>RY 单个位点的锚定 SSR-PCR 检测 15 个湖北钉螺地理种群的遗传变异,显示出较好的多态性,而本研究获得的微卫星 DNA序列中 (CA)<sub>n</sub> 重复亦较为普遍,且重复次数最多。周艺彪等<sup>[11]</sup>应用微卫星锚定 PCR 分析了中国大陆 19 个湖北钉螺种群,可以明显将不同的地理种群聚为 4 类,与 DNA 序列分析结果趋于一致<sup>[2]</sup>,初步显示了微卫星标记在湖北钉螺群体遗传多样性研究中的有效性。

目前,应用 SSR-PCR 技术可以对湖北钉螺群体遗传多样性加以检测,但利用微卫星 DNA 通用引物 PCR 扩增产物的序列分析显示,所获得的序列不完全具有

重复单元的多态性,尚不能十分有效体现微卫星作为分子标记的优势<sup>[12]</sup>,因此应当根据微卫星 DNA的侧翼序列设计针对微卫星的引物,对微卫星进行 PCR扩增并进行多态性分析。而本研究首次获得了湖北钉螺微卫星 DNA库,并已经设计合成了 20对微卫星 DNA扩增引物,筛选出有 13个位点具有多态性,多态性比例为 65%,为其后续相关研究提供了新的分子标志。

### [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] 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): 221-231.
- [3] Zhou XN, Wang LX, Chen MG, et al. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now [J]. Acta Trop, 2005, 96(2/3): 97-105.
- [4] 周晓农,姜庆五,汪天平,等.我国血吸虫病防治现状与发展战略思考 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17(1): 1-3.
- [5] 周晓农,姜庆五,孙乐平,等.我国血吸虫病防治与监测 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17(3): 161-165.
- [6] 周晓农.我国血吸虫病的监测与预警 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(5): 341-344.
- [7] 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(2): 150-151.
- [8] Shi CH, Wilke T, Davis M, et al. Population genetics, micro-phylo-geography, ecology and infectivity of Chinese *Oncomelania hupensis* *hupensis* (Gastropoda: Rissoiidae: Pomatiopsidae) in the Miao River system: is there a relationship to shell sculpture? [J]. Malacologia, 2002, 44(1): 333-347.
- [9] Christian S, Amos R, Tauze D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species [J]. Nature, 1991, 354(1): 63-65.
- [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]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(4): 230-233.
- [11] 周艺彪,赵根明,韦建国,等.微卫星锚定 PCR分析 19个湖北钉螺种群之间的遗传变异关系 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(9): 859-862.
- [12] 郭俊涛,周艺彪,韦建国,等.湖北钉螺微卫星锚定 PCR产物序列分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(11): 1119-1122.
- [13] Ma YJ, Fan Y. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from Asian malaria mosquito *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. Mol Ecol Resources, 2008, 8: 1059-1061.
- [14] Hall TA. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Res Symp Ser, 1999, 41: 95-98.
- [15] Weber JL. Information of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [16] Zane L, Bargeron L, Patenaude T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11(1): 1-16.
- [17] 马雅军,樊勇,吴静.雷氏按蚊多态微卫星 DNA位点的筛选和特征 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2008, 15(3): 150-153.
- [18] 樊勇,马雅军.应用微卫星 DNA技术研究蚊虫群体遗传的现状 [J]. 国外医学:寄生虫病分册, 2005, 32(6): 262-264.

[收稿日期] 2009-11-30 [编辑] 杭盘宇

(上接第 121页)

2.2 螺点面积逐年增加 在 15个复现螺点中,1992年前的 8个螺点面积均较小。其中罗城龙屯螺点及玉林龟棒岭屯螺点有螺面积 < 20 m<sup>2</sup>;玉林市吉进屯螺点面积为 40 m<sup>2</sup>。8个螺点的面积只占 1.26% (1 887/149 235)。2000年后发现的螺点面积均 > 4 000 m<sup>2</sup>。

2.3 近年螺点复现间隔年限长 2002年以后靖西由利村发现的 6个螺点,复现年限均 > 20年,横县公塘垌螺点达 38年。

2.4 复现螺点环境复杂 广西属喀斯特地形地貌,溶洞和地下河流众多。2002年靖西由利村螺点与一个山脚下出水口相连;2005年宜州京口螺点的钉螺沿水流方向分布,水系上游为地下河出水口,密度较高,向下逐渐减少;罗城火煌屯发现的螺点为阴暗潮湿的季节性水沟,下雨时上段有地下河水冒出,中段最低处有一个消水洞与地下水系相通。

### 3 讨论

血吸虫病传播阻断地区的巩固监测在我国受到了极大的关注<sup>[1-5]</sup>,并时有报道<sup>[6-7]</sup>。我国 5个血吸虫病传播阻断省(市、区)中,浙江省、福建省和上海市均有钉螺存在。广西 1989年以来的监测发现残存钉螺 15处,并且残存钉螺面积逐年增加,复现间隔年限长,螺点环境复杂。说明广西的血防工作形势仍然严峻。

随着西部大开发战略的实施,北部湾经济区的开发和东盟各国把广西作为出入的门户,广西的流动人口日益增加,2000

年跨省区迁移流动人口已达 280.74万人,约占广西户籍人口的 6%,户籍在外省但在广西常住和暂住的人口为 48.52万人。近 20年广西共发现 30例输入性血吸虫病病例,其中急性血吸虫病 2例,广西籍务工返乡病例 2例。在残存钉螺面积逐年扩大的情况下,外来传染源的输入,给血吸虫病在广西的再流行造成了潜在的威胁,必须引起高度重视。

### [参考文献]

- [1] 黎学铭,黄铿凌,商少明,等.广西消灭血吸虫病后螺情监测结果分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7(4): 223-224.
- [2] 郭源华.对当前我国血吸虫病防治目标及防治对策的看法 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1992, 4(2): 74-77.
- [3] 林金祥.关于达标地区血吸虫病的监测管理及今后我国防治血吸虫病策略的建议 [J]. 海峡预防医学杂志, 1999, 5(4): 37.
- [4] 张鸿满,黎学铭,谭裕光,等.2004—2007年广西壮族自治区血吸虫病疫情分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(6): 415-417.
- [5] 洪飞翎,冯秋雅.山丘型历史有螺地区血吸虫病监测方法探讨 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(2): 插页 5.
- [6] 林金祥,李友松,陈宝健,等.福建省 10年来残存钉螺监测 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1998, 10(1): 17-20.
- [7] 艾冬云,程响亮.余江县血吸虫病传播阻断后 50年监测 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(2): 145-146.

[收稿日期] 2009-11-30 [编辑] 杭盘宇