

# 中国大陆不同地域隔离群湖北钉螺 基因组 DNA 的限制酶切长度差异\*

周晓农<sup>1</sup> 孙乐平<sup>1</sup> 徐 秋<sup>1</sup> 洪青标<sup>1</sup> 吴中兴<sup>1</sup>  
冯笑川<sup>2</sup> 陈淑贞<sup>2</sup> 吴宜琴<sup>2</sup> 吴观陵<sup>2</sup> 陆安生<sup>3</sup>  
1 江苏省血吸虫病防治研究所 (无锡 214064)  
2 南京医科大学 3 无锡市血吸虫病防治站

**摘要** 为证实中国大陆湖北钉螺不同地理株的存在,制备了各地钉螺的基因组 DNA,经限制性内切酶 Bam HI 和 Pst I 酶解后,置 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,比较分析不同地域隔离群钉螺基因组 DNA 重复序列 DNA 的限制酶切长度差异。安徽、四川、云南、湖南、湖北、江苏、上海、福建、江西等 9 地隔离群钉螺的 DNA 酶切带型,主带基本一致,次带差异明显。以四川普格、云南巍山、江苏东台之间差异较大。湖北省的汉川、洪湖、荆州、石首、咸宁的钉螺酶切图谱基本一致。提示不同隔离群钉螺存在一定的同源和亲缘关系。在基因水平上的差异程度与隔离群之间距离和自然环境关系密切。在一定区域内的钉螺 DNA 相对稳定。

**关键词** 湖北钉螺 基因组 DNA 限制性内切酶 酶切长度差异

湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)是日本血吸虫的唯一中间宿主,分布于亚洲的中国、日本、菲律宾和印度尼西亚。我国大陆长江以南 12 个省、市、自治区有钉螺分布<sup>[1]</sup>。以往研究从钉螺的外形特征,齿舌的结构,足肌蛋白成分,与血吸虫幼虫的相容性及对杀螺剂的敏感性等方面提出了不同地理株存在的可能性<sup>[2,3,4]</sup>。钉螺种株的鉴定较为困难,原因是缺少特异的形态特征以及螺壳特征随环境变化较大。应用电泳技术研究酶谱变异已有进展,但更直接比较遗传物质的方法是 DNA 分析,该方法对螺种的鉴定和多基因研究将会开辟一条新路。DNA 分析已应用于一些软体动物及曼氏血吸虫中间宿主的研究,但湖北钉螺基因组 DNA 的限制性酶切长度差异 RFLDS (Restriction Fragment Length Differences) 分析尚少报道<sup>[5,6]</sup>。为了探索钉螺 DNA 分析在其鉴定和分类上的意义,并进一步证实湖北钉螺不同地理株的存在,我们对中国大陆不同隔离群湖北钉螺基因组 DNA 的 RFLDS 进行了比较分析。

## 材料和方法

### 1 不同地域隔离群的湖北钉螺

从安徽铜陵(a)、四川普格(b)、云南巍山(c)、湖南西湖农场(d)、湖北武昌(e)、江苏东台(f)、上海金山(g)、江苏六合(h)、福建福清(i)、江西彭泽(j)、江苏高邮(k)、四川丹棱(l)、湖北咸宁(m)、湖北石首(n)、湖北荆州(o)、湖北洪湖(p)、湖南华容(q)、安徽广德(r)、湖北汉川(s)等地现场采得钉螺,饲养于室内备用。

### 2 酶及试剂

核酸限制性内切酶(Bam HI, Pst I)购自华美生物工程公司,蛋白酶 K、sPs、琼脂糖凝胶购自 Sigma 公司,其它各种生化试剂和有机试剂均为国产分析纯产品。

苯酚经重蒸后,先后用 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)及 0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)

\* 本课题得到联合国开发署/世界银行/世界卫生组织、热带病研究培训特别规划处的资助。

数次饱和,加入 8-羟基喹啉至终浓度 0.1%,4℃保存备用。

### 3 基因组 DNA 制备

用 0.3%NaCl 清洗,每组 50 只钉螺去螺壳和消化腺,液氮冷冻研磨成粉状,加抽提液(50mmol/L Tris, pH8.0, 100mmol/L EDTA, pH8.8)500 $\mu$ l,内含 1.0%SDS,2%B-巯基乙醇和 0.8mg/ml 蛋白酶 K,充分混匀,在 55℃培养 3h,用等量饱和酚,酚/氯仿(1:1)及氯仿/异戊醇(24:1)抽提 3 次。加 10mg/ml R Nase A,37℃培养 1h,再依次用饱和酚、酚/氯仿、氯仿/异戊醇抽提 3 次,以去除 RNA。最后以 2.5 倍体积预冷无水乙醇沉淀出 DNA,70%乙醇洗涤 2 次,真空干燥,溶于 100 $\mu$ l Tris-ESDTA (pH7.4)缓冲液,-20℃储存备用。

### 4 酶切电泳

上述各地钉螺基因组 DNA 分别经限制性内切酶 Bam HI 和 Pst I 于 37℃酶切 2.5h,然后置含溴乙锭的 0.8%琼脂糖凝胶电泳,每孔 DNA 量为 2.0  $\mu$ g,电压 2v/cm,电泳 12-15h 后当溴酚蓝示踪染料迁移至凝胶前沿 85%左右时,停止电泳,电泳后的凝胶在紫外灯下观察,并加红色滤光片进行照相,曝光时间 3 min。

## 结 果

### 1 中国大陆 9 地隔离群钉螺酶切带型

经 Pst I 和 Bam HI 酶切电泳后作溴乙锭染色,各隔离群 2 种酶切带型见图 1 和图 3,在 23.1 kb 均有一条深染主带,在 $\leq$ 0.56kb 均有几条浅染次带。但在次带上却出现了明显的差异,不仅分子量不同而且带数也不同。其中 BamHI 酶切图谱显示,在分子量 9.4-23.1 kb 之间,云南和四川各有 1 条带;在分子量 2.3-9.4 kb 之间,福建、江苏、湖北、上海、湖南、安徽各有 1 条带;在分子量 0.56-2.3 kb 之间,安徽有 1 条带,福建有 2 条带。其中 Pst I 酶切图谱显示,在分子量

2.3-9.4 kb 之间,云南有 1 条带,湖南有 2 条带;在分子量 0.56-2.3 kb 之间,安徽 1 条带,四川 1 条带,江苏东台 1 条带。

### 2 湖北省内隔离群钉螺酶切带型

以湖北省隔离群的钉螺的基因组 DNA 经 Pst I 和 Bam HI 酶切电泳后溴乙锭染色的结果,湖北省内隔离群的 DNA 长度多态无明显差异,但与同组其它隔离群间差异较明显(图 2,图 4)。两种酶切图谱,在分子量 23.1 kb 处均有 1 条强带,在分子量 $\leq$ 0.56 kb 均有几条浅带。其中 Pst I 酶切图谱上,在分子量 2.3-9.4 kb 之间,,四川有 1 条带;在分子量 0.56-2.3 kb 之间,江苏有 1 条带。其中 Bam HI 酶切图谱上,在分子量 2.3-9.4 kb 之间,四川有 2 条带。

## 讨 论

利用分子生物遗传学技术,从分子水平直接分析生物的 DNA,是近年发展起来作为鉴别种间和种内品系差异的重要手段之一。Mccutchan 等<sup>[7]</sup>通过对曼氏血吸虫、埃及血吸虫和日本血吸虫 DNA 酶切片段分析,首先阐明了各种间分子水平的差异,同时表明曼氏血吸虫种内也存在不同的品系。曾宪芳<sup>[8]</sup>通过我国云南、湖南、湖北、江西、浙江日本血吸虫 DNA 重复序列片段的差异分析,说明了各隔离群日本血吸虫的同源性,提示不同地域品系存在的可能,其间存在着一定程度的变异和亲缘关系。我们通过对中国大陆安徽、四川、云南、湖南、湖北、江苏、上海、福建、江西等不同隔离群的湖北钉螺 DNA 基因片段的分析,发现在经 Bam HI 和 Pst I 限制性内切酶酶切电泳图谱上,不同隔离群, DNA 主带基本一致,大分子量均为 23.1 kb,小片段在 0.8 kb 以下,说明不同隔离群的同源和亲缘关系。但各隔离群在分子量 0.56-23.1 kb 之间带数差异显著,且分子量大小不一,以四川普格、云南巍山、江苏东台各隔离群变异程度较大,湖南、湖北、上海、福建、江

西各隔离群差异相对较小。从湖北汉川、洪湖、荆州、石首、咸宁 5 地同省湖北钉螺 DNA 经 Bam HI 和 Pst I 酶切图谱看,酶切图谱基本一致,说明在一定地域范围内湖北钉螺 DNA 相对稳定。研究表明,中国大陆湖北钉螺形成基因水平上不同的地域品系是完全可能的,各隔离群湖北钉螺基因水平上的差异程度,与隔离群间的距离关系密切,距离远则变异大,距离近则变异小。另外由于湖北钉螺分布范围广,自然环境和疫区类型复杂,为适应当地的自然环境,也可能是导致钉螺变异的因素之一。

本研究是利用分子生物学技术直接比较 DNA 限制性内切酶电泳图谱,但敏感性受到一定的限制,若能寻找到湖北钉螺同源特异性探针,利用 DNA 杂交技术,对不同隔离群湖北钉螺 DNA 重复序列片段进行检测,将会进一步提高其检测的敏感性,更有利于鉴定湖北钉螺种内变异的差别。有待于今后进一步研究。(本文图 1—4 见封底)

本研究得到湖北荆州地区、咸宁地区、汉川、武

昌、石首、洪湖、潜江市;湖南华容县、西湖农场;江西彭泽、玉山县;安徽广德、铜陵、青阳县;四川大邑、丹陵、彭山、普格县;云南巍山县、大理州;上海金山;福建福清市;江苏扬州市、镇江市润州区、无锡、吴县、盐城市等防疫(血防)站(所)以及江苏省血吸虫病防治研究所有关同志的大力支持和帮助,特此致谢!

### 参考文献

1. 毛守白主编. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 北京:人民卫生出版社 1990.
2. 许学积,等. 动物学杂志 1982,(2): 1.
3. 朱昌亮,等. 动物学杂志 1989,24(1): 7.
4. 何毅勋,等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1990,8: 92.
5. Rollinson D & Kane RA J Moll stud 1991,57: 93.
6. Jarne Philippe, et al. Biochemical Genetics 1990,28(11/12): 577.
7. Mccutchan TF, et al. Proc Nat Acad Sci USA 1984,81: 889.
8. 曾宪芳,等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1993,11: 1.

1993 年 8 月 16 日收稿 1994 年 3 月 16 日修回

(编辑:秦叶君)

## RESTRICTION FRAGMENT LENGTH DIFFERENCES(RFLDS) OF GENOMIC DNA FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL ISOLATES OF *ONCOMELANIA HUPENSIS* IN MAINLAND CHINA

Zhou Xiaonong, et al

Jiangsu Institute of Schistosomiasis Control, Wuxi 214064

### ABSTRACT

In order to identify the different strains of *Oncomelania hupensis* existed in mainland China, experiments on extraction of total genomic DNA of different isolates of *O. hupensis* digested by restriction endonucleases (Bam HI and Pst I) were carried out and restriction fragment length differences (RFLDS) of repetitive DNA detected after agarose gel electrophoretic separation were compared among these isolates of snails. Result showed that the main bands were similar among 9 isolates of *O. hupensis* from Anhui, Sichuan, Yunnan, Hunan, Hubei, Jiangsu, Fujian and Jiangxi provinces and Shanghai in mainland China, but showed difference in sub-bands of snails from Puge (Sichuan province) Weishang (Yunnan province), and Tongtai (Jiangsu province). No difference in band patterns could be found in

snails from 5 isolates within Hubei province. It revealed that there was certain homogenic or sibling relationship existed in these isolates and the variation in the gene level was closely related with the distance between places where the respective isolates were collected and with the natural environment. It also showed DNA of *O. hupensis* within similar areas was relatively consistent.

**Key words:** *Oncomelania hupensis*, genomic DNA, restriction endonuclease, RFLDS

## 消灭血吸虫病地区应用 COPT 检测人群抗体水平

浙江省诸暨市卫生防疫站 (311800) 赵念慈

浙江省诸暨市地方病防治办公室 鄞国兴

为了探索消灭血吸虫病地区人群中血吸虫特异性抗体水平的动态变化,分析血吸虫病流行趋势,我们于 1991 年 8 月在达到消灭血吸虫病标准已 6 年的诸暨市泌湖乡义燕村,应用环卵沉淀试验(COPT)检测人群抗体。现将结果报告如下。

### 调查对象和方法

以当地 8 足岁以上居民为调查对象,抽耳垂微量血 100 $\mu$ l,采用常规 COPT 凹玻片法,37 $^{\circ}$ C 孵育 48h,观察结果。干卵由加善县凤桐乡卫生院提供。COPT 环沉率 1%—2%者为弱阳性,环沉率 $\geq$ 3%为阳性。

### 结 果

1 泌湖乡义燕村总人口 725 人,应检 570 人,实检 530 人,受检率 92.98%,COPT 阳性 78 人,环沉率 1%—2%者 18 人, $\geq$ 3%者 60 人,阳性率为 14.71%。其中无血吸虫病者检查 257 人,COPT 阳性者 17 人(环沉率 1%—2%者 6 人, $\geq$ 3%者 11 人),阳性率为 6.6%。有血吸虫病治疗史者检查 273 人,阳性者 61 人,(环沉率 1%—2%者 12 人, $\geq$ 3%者 49 人),阳性率为 22.3%( $P<0.01$ )。

2 不同年龄人群 COPT 的检测结果 有血吸虫病治疗史者,20—50 岁人群中 COPT 阳性率最高为 27.0%(50/185),无血吸虫病者 20—30 岁人群中 COPT 阳性率最高为 11.7%(14/120)。14 岁以下人群检测 53 人,全部阴性。

### 3 COPT 阳性与血吸虫病史的关系

3.1 COPT 阳性人群和病原治疗药物的关系。根据有血吸虫病治疗史,而 COPT 阳性者 61 例的分

析,末次接受血吸虫病病原治疗的时间都在 5 年以上,所用药物为锑剂治疗者 14 人,锑 273 片治疗者 20 人,血防 846 片治疗者 24 人,呋喃丙胺治疗者 2 人,吡喹酮治疗者 1 人。

### 3.2 COPT 阳性人群与症状、体征的关系

COPT 阳性 78 例中,无血吸虫病史 17 例,其中乏力者 7 例(41.8%),腹胀 5 例(29.4%),烂便 4 例(23.5%),肝肿大 1 例(5.9%)。有血吸虫病治疗史阳性者 61 例,其中乏力 43 例(70.5%),烂便 42 例(68.8%),粘血便 2 例(3.3%),肝肿大 25 例(41%),脾肿大 5 例(8.2%),其中有 1 例肝硬变伴脾肿大晚血病人。综上所述,有血吸虫病治疗史同时 COPT 阳性者,其症状、体征的出现率高于无血吸虫病史者。

### 讨 论

义燕村原是一个血吸虫病重疫区,历史血吸虫病粪检阳性率为 73.2%,通过 30 多年防治工作,于 1979 年达到基本消灭血吸虫病,1985 年通过考核达到消灭血吸虫病标准,由于疫区人群血吸虫病感染率和感染度显著下降,从 1981 年起,粪检已查不到血吸虫虫卵阳性的病人。

8—14 岁年龄 COPT 检查 53 人中,全部阴性,似可证明无新感染的发生,说明当地血吸虫病的流行已被阻断。

本文承蒙郭承荫副主任医师的指教,特此致谢。

1992 年 3 月 25 日收稿

(编辑:单敦昌)

## CONTENTS OF ORIGINAL ARTICLES

- Seroepidemiological assessment and surveillance on schistosomiasis  
in various endemic areas ..... Zhang Wucheng et al(193)
- Restriction fragment length differences(rflds) of genomic DNA from different  
geographical isolates of *Oncomelania hupensis* in mainland China  
..... Zhou Xiaonong et al(196)
- Effectiveness of comprehensive measures for control of schistosomiasis at  
high risk areas outside embankment ..... Li Yiyi et al(200)
- Field study of integrated river bank development for schistosomiasis control  
..... Song Hongtao et al(203)
- Paragonimus* target antigens recognized by their monoclonal antibodies (McAb)  
to metacercariae or adult worms ..... Shi Zhiming et al(207)
- An experiment study on the application of enzyme-linked immunoblotting  
(ELIB) for diagnosis of kala-azar ..... Bao Yong et al(210)
- Comparative studies on the diagnosis of clonorchiasis by IEST, IFAT and  
Dot-ELISA ..... Liu Xiaoming et al(213)

## 中国大陆不同地域隔离群湖北钉螺基因组 DNA 的限制酶切长度差异(正文见第 196 页)

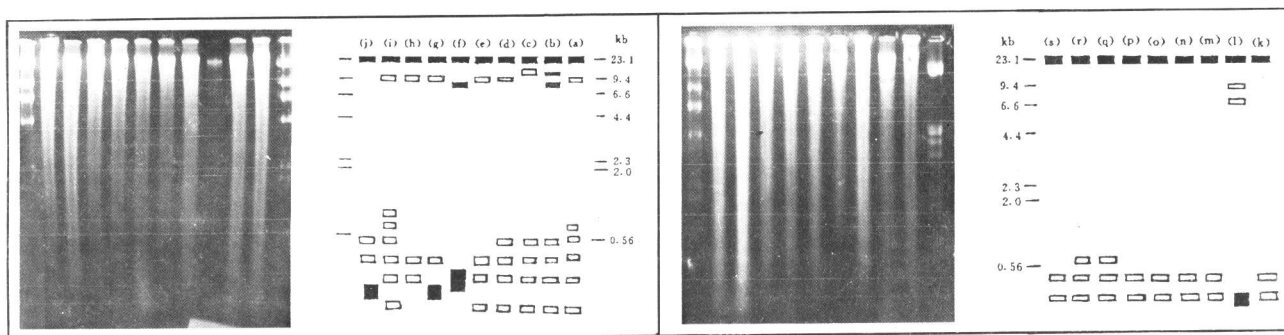


图 1.2 中国大陆各地湖北钉螺经 BamHI 酶切后于含溴乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下摄影结果(旁为示意图)

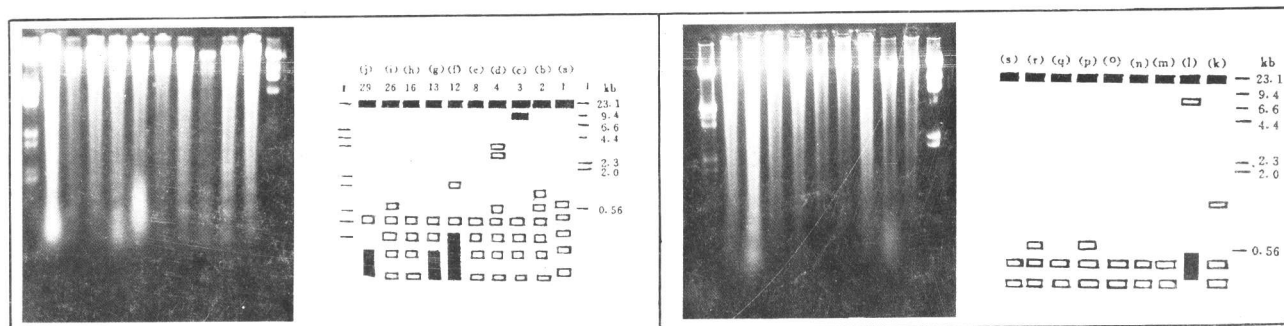


图 3.4 中国大陆各地湖北钉螺经 PstI 酶切后于含溴乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下摄影结果(旁为示意图)