

· 实验室研究 ·

湖北钉螺微卫星锚定 PCR 产物序列分析

郭俊涛 周艺彪 韦建国 赵根明

【摘要】 目的 分析 4 个种群湖北钉螺中微卫星序列及其两侧序列的特点。方法 以 $(CA)_8RY$ 为引物对湖北钉螺基因组 DNA 进行微卫星锚定 PCR(SSR-PCR) 扩增, 对全部 159 个扩增产物进行 T 克隆并测定其中 82 个片段的核苷酸序列。结果 SSR-PCR 的扩增产物是湖北钉螺基因组 DNA 上的散在区域, 不是微卫星序列, 但扩增产物中含有微卫星序列, 测序的 82 个片段中 36 个克隆片段含有微卫星序列。微卫星序列其侧翼序列有一定的保守性, 同一个微卫星的侧翼序列多数情况下是相同的。 $(GA/CT)_n$ 、 $(TTAGGG/CCCTAA)_n$ 两类微卫星在 4 个钉螺种群中均有发现, $(CAA)_n$ 仅在福建福清种群中发现, $(TCTCTG)_n$ 仅在安徽贵池种群中发现, $(GAA/TTC)_n$ 、 $(CAA/TTG)_n$ 、 $(CAT)_n$ 三种微卫星序列仅在四川普格种群中发现。结论 SSR-PCR 扩增的不是微卫星, 其结果的分析应当类似于随机扩增多态性 DNA。因此 SSR-PCR 不能十分有效体现微卫星作为分子标记的优势, 应当根据微卫星的侧翼序列设计针对微卫星的引物, 对微卫星进行 PCR 扩增并进行分析。

【关键词】 湖北钉螺; 微卫星锚定聚合酶链反应; 两翼序列

Sequencing on products of *Oncomelania hupensis* through simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification GUO Jun-tao, ZHOU Yi-biao, WEI Jian-guo, ZHAO Gen-ming. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China Corresponding author: ZHAO Gen-ming, Email: gmzhao@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze the sequence of microsatellite and the flanking sequence from four populations of *Oncomelania hupensis*. Methods We cloned 159 SSR-PCR amplification products of a commonly used primer, $(CA)_8RY$, using *O. hupensis* genomic DNA as template, and sequenced 82 products. Results The sequences obtained were novel *O. hupensis* genomic sequences but not repeat simple sequence. It was observed that 36 out of 82 clones contained microsatellites between priming sites. The flanking sequences of certain microsatellite were invariant. Both $(GA/CT)_n$ and $(TTAGGG/CCCTAA)_n$ were found in four populations of *O. hupensis*. However, $(CAA)_n$ were found only in *O. hupensis* from Fuqing, Fujian province and $(TCTCTG)_n$ were found only in *O. hupensis* from Guichi, Anhui province and $(GAA/TTC)_n$, $(CAA/TTG)_n$, $(CAT)_n$ were found only in *O. hupensis* from Puge, Sichuan province. Conclusion The results obtained by SSR-PCR should not be interpreted as the amplification of microsatellite loci, and analytical rules similar to those for Random Amplified Polymorphic DNA should be used. SSR-PCR could not make the most of the priority of microsatellite. It seems better to amplify the microsatellites with the primers designed on the basis of the flanking sequence.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction; Flanking sequence

湖北钉螺是日本血吸虫病的惟一中间宿主^[1]。相同或不同地域株的日本血吸虫对不同地域钉螺感染率有着显著差异^[2]。目前, 对钉螺种群差异的研究已经发展到直接研究遗传物质 DNA 的变异, 从

而避免了表型变化的影响^[3]。目前对研究钉螺 DNA 变异的主要方法有线粒体 DNA 测序、RAPD、RFLP、AFLP 等, 这些方法各有其局限性, 而微卫星 (microsatellite, 又称 simple sequence repeat, SSR) 作为分子标记可以弥补这些缺陷^[4]。目前这种分子标记在对钉螺遗传变异的研究中运用较少, 本研究对湖北钉螺微卫星锚定 PCR (SSR-PCR) 扩增产物进行克隆、测序, 对 4 个种群钉螺的微卫星序列及两翼序列进行描述, 并分析其特点。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671799, 30872159); 国家“863”计划课题资助项目 (2006AA02Z402); 上海市重点学科建设资助项目 (B118)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 公共卫生安全教育部重点实验室

通信作者: 赵根明, Email: gmzhao@shmu.edu.cn

材料与方 法

1. 材料:钉螺分别采集自安徽省贵池市、四川省普格县、福建省福清市、广西壮族自治区宜州市;用尾蚴逸出法鉴别钉螺是否感染血吸虫,剔除感染的钉螺,四地各选择 6 只钉螺作为试验材料。

2. 基因组 DNA 的提取:用 0.3% NaCl 清洗钉螺,吸干表面水分后置于研钵中,加入适量液氮并研磨成白色粉末,使用 Genomic DNA Purification Kit (Fermentas 公司生产)提取基因组 DNA。提取出的 DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶中 130 V 电泳 2 h 以检验其完整性,并用紫外分光光度计测定其含量和纯度。

3. SSR-PCR:反应条件参照文献[5]的方法并略有改动:引物 5'-CAC ACA CAC ACA CAC ARY-3',R 代表一份子嘌呤,Y 代表一份子嘧啶。每 50 μl 反应体系中含有:20 pmol 引物,10~20 ng 模板,1.25 U Taq 酶 (Ampli Taq Gold, Branchburg, New Jersey, USA), 200 μmol/L dNTPs, 10 mmol Tris-HCl (pH 值 8.3), 50 mmol KCl, 1.5 mmol MgCl₂。反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,50℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,共进行 38 个循环,末次循环后 72℃ 延伸 10 min。

4. 克隆和测序:使用 Wizard PCR DNA 纯化系统对 SSR-PCR 产物进行纯化,然后使用 TaKaRa 公司的 pMD18T 载体对纯化得到的 PCR 产物进行 TA 克隆,感受态细胞利用 DN5α 菌株进行制作。然后以 SSR-PCR 的引物对白色菌落进行扩增。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (EB 染色) 中 100 V 电泳 1 h。根据电泳结果,按以下标准选择合适的片段进行测序:对于每个种群的钉螺,不同大小的扩增产物均进行测序,而相同大小的扩增产物则只对其中一个进行测序。测序方法为双脱氧终止法,由北京鼎国生

物技术有限公司在 ABI3730 型测序仪上进行。

5. 序列分析:采用 Bioedit 软件编辑 DNA 序列,RepeatMasker 软件用来分析序列中是否存在微卫星序列 (open-3.1.8),RepeatMasker 使用的搜索引擎为 cross_match (0.990329, RepBase 升级至 20071204, RM database 版本 20071204)。

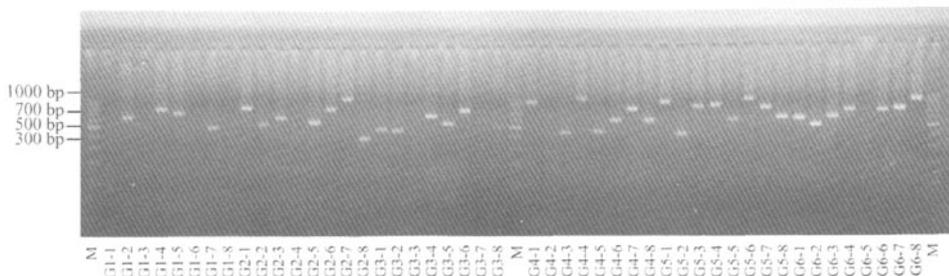
结 果

1. 扩增结果:图 1 为宜州市钉螺的克隆产物电泳图片。本次研究中,福清市 6 只钉螺 SSR-PCR 共得到扩增片段 29 个,宜州市得到 40 个,贵池市得到 34 个,普格县得到 56 个,一共 159 个片段,片段大小为 288~1722 bp。

2. 序列分析:通过测序,发现 SSR-PCR 并不是针对微卫星序列进行扩增,扩增的是基因组 DNA 上的散在区域,部分扩增产物中含有 1~3 个微卫星序列,另外一些则没有。本研究共测定 82 个扩增片段的核苷酸序列,其中 36 个片段含有微卫星序列,基本重复单位的碱基数为 1、2、3、4、6 bp,重复次数为 4~72 次,总长度 18~216 bp。结果见表 1。

表 1 中同时列出各微卫星的侧翼序列,两侧各 22 bp。通过比较发现,不同类型微卫星其侧翼序列一般不同,而相同的微卫星其侧翼序列多数是相同的。侧翼序列相同主要有以下三种情况:在不同种群的钉螺、同种群的不同钉螺、一只钉螺的不同 DNA 位点,例如 F1-2 和 G5-1, A3-1 和 A6-2, S1-2 和 S1-5。此外,表 1 中 F1-1 和 G5-1 两个微卫星序列的基本重复单位都是 TTAGGG,只是重复次数不同,两个微卫星的侧翼序列只相差一个碱基。

在本研究发现的各类型微卫星序列中,(GA/CT)_n、(TTAGGG/CCCTAA)_n 两种微卫星在 4 个钉螺种群中均有发现,而另外一些微卫星只有在



注:M:Marker; 各泳道编号中“G”后的数字表示钉螺编号,“-”后的数字表示钉螺的克隆编号,如 G3-4 表示广西钉螺种群中编号为 G3 的钉螺的第 4 个克隆产物

图1 宜州市湖北钉螺 SSR-PCR 及 T 克隆后的产物

表1 4个种群湖北钉螺的微卫星序列及其侧翼序列

编号	微卫星类型	5'端序列	3'端序列
A2-1	(CT) ₂₁	TTCATGTTCTTCTTTACCT	ATCAATATATATTATGTGTTTG
A2-2	(CT) ₂₅	AGGGGGTATTTAGGTGTATG	GGGTTGTGTGTGTGTGTGTG
A3-1	(CTGTCT) ₄	ATCACACACAATAGACAATTG	CCACAATCACACACAATAGAC
A3-2	(TTAGGG) ₁₂	TTTGACGTCAAACAGTGCTCC	TATAGGGAAAAATTTAAATAAT
A3-3	(A) ₃₂	AGATTTAAGCATAATATACTGT	GCACAAAATATTAGTTTAAAAA
A6-1	(TCTCTG) ₃	ATCACACACAATAGACAATTG	TTCCCTCCACAATCACACACA
A6-2	(TCTCTG) ₄	ATCACACACAATAGACAATTG	CCACAATCACACACAATAGAC
F1-1	(GA) ₃₀	TACAAAAAAGACCATAATTGC	TATCGTAGTTGTGTGTGTGTA
F1-2	(TTAGGG) ₁₈	TTTGACGTCAAACAGTGTCC	TTTCAAAAAATGGACAATTGG
F3-3	(GA) ₃₀	TACAAAAAAGACCATAATTGC	TATCGTAGTTGTGTGTGTGTA
F3-4	(TTAGGG) ₁₈	TTTGACGTCAAACAGTGTCC	TTTCAAAAAATGGACAATTGG
F4-1	(CAAA) ₆	GCTTGTGATCTCATGAATAGTA	AACAAGTAGTATTCCAAACCAT
G1-1	(CCCTAA) ₁₈	ATTTTTTAAAGCTATCCCTAAA	GGAGCTCTGTTTTGACGACAAA
G2-1	(CT) ₃₄	GGCGTAGACAATAACAATCAA	GTATAATGGCCTCGTGGCGTAG
G5-1	(TTAGGG) ₁₂	TTTGACGTCAAACAGTGTCC	CTTAAAAAATGGACACATTTG
G5-3	(GA) ₁₅ TGAAGA(TG) ₄	GCCTGCCTGCTTGGTGTGCGT	ATCCAGAATATAGTACAATGTC
S1-1	(CAT) ₁₂	TCGCATTAAGTTAATTGCTTTT	AAGGACGATGAACTGTGTGTGT
S1-2	(GA) ₃₃	CATCTTCATCATTTTAGTAGGC	TTTTAAATCCATATGCAGTTTTT
S1-4	(GAA) ₇₅	GAGGAGGAGGATGTGTAGCATG	AGTTTGAAGTGGATGGGGAGGT
S1-5	(GA) ₃₃	CATCTTCATCATTTTAGTAGGC	TTTTAAATCCATATGCAGTTTTT
S1-6	(GA) ₂₈	GGGTGGAGATAGGGAAGGAAAT	CAAGAGACGAGCAAAGAAATC
S1-8	(CAA) ₁₀	CCAAAAAGAAAAAAGAAAGG	TGAATGTGACGATACGAGTTTT
S1-9	(CT) ₄₁	GCGTCTAAGCAGCCTCTCTTAC	CCCTCATCCCATCTGTCTGTG
S2-1	(CA) ₄₆	AATTCATAAAATGATACATTGG	TCGCCAGTTATAAGAACCTGGAT
S2-2	(TTAGGG) ₆	ATGCCTGTCAAGAACAATGATCC	CGAACCTGTAAGTACGTATA
S2-3	(CCCTAA) ₆	TTTACGTACTTGCAGTGTTCG	GGATCATTTGTTCTGACAGGCAT
S2-4	(TTC) ₂₇	GCGCCATGAGGCCACCCCAACT	GATGTTCCACGTTCCAAACCAG
S2-5	(CT) ₃₃	TCCTTTCTTTCCACATTTTCT	ATTTCTTCCCTATCTCCACCC
S2-6	(GA) ₂₉	ACAATCTCCCTCAGTGATCATT	CGGGCACAAAAATAGCAGGAT
S3-1	(TTC) ₈	TGCGTGTGTCTCTTCTGGTGG	GGTCTTCACACTCCATTTCCCT
S3-2	(TTG) ₁₂ (TTC) ₁₄	CCGTGCAACTCCAATCATCAAC	TGTAGATTATAGTCACACGACA
S3-3	(TC) ₁₂	TGTTGTGTTGTATTGTAGTGTA	GAAAGTATTCTATTGGGACAT
S3-4	(CA) ₃₆ GAGGA(GAA) ₃ (GA) ₂₅	CACGCACAACCTCCTTCCTCCT	AAAGTTGCTGTTAACAATGTTGT
S4-1	(GA) ₂₈	GGGTGGAGATAGGGAAGGAAAT	CAAGAGACGAGCAAAGAAATC
S5-1	(GAA) ₂₇	ACACACACAACAAC	ACTGAAAGTGACAATAGTGCAA

注:表中的编号表示微卫星位点编号,含义如下:A、F、G、S 4 个字母分别指安徽、福建、广西、四川 4 个钉螺种群,字母后的数字表示该种群的钉螺编号,而“.”后的数字则表示该钉螺的微卫星位点编号;表中某些微卫星序列靠近 SSR-PCR 扩增产物的一端,因此提供两侧 DNA 序列少于 22 bp

特定的钉螺种群中才又发现,例如(CAA)_n 仅在福清市的钉螺种群中发现,(TCTCTG)_n 仅在贵池市的钉螺种群中发现,(GAA/TTC)_n、(CAA/TTG)_n、(CAT)_n 3 种微卫星序列仅在普格县的钉螺种群中出现。

讨 论

微卫星序列作为分子标记,有其独特的优势:微卫星呈共显性遗传;数量多,并且在基因组 DNA 上分布广泛而均匀;在群体中有很高的多态性,可以提供丰富的信息;同时有通用性好、杂合度高、重复性好的特点,是一种很好的分子标记^[6,7],能有效弥补 RAPD、RFLP、AFLP 等分子标记方法的缺陷。目前,微卫星分子标记技术已应用到对血吸虫中间宿

主的遗传变异研究中,其中对双脐螺和水泡螺的研究较多见^[8,9],对湖北钉螺的研究国内外报道较少,周艺彪等^[5]、牛安欧和熊衍文^[10]用 SSR-PCR 的方法对湖北钉螺的遗传变异进行研究。目前对湖北钉螺微卫星的研究中使用的方法主要是 SSR-PCR,这种方法不需要设计特异的引物,只是根据真核生物中普遍存在的微卫星设计引物。根据本次研究结果,湖北钉螺 SSR-PCR 类似于 RAPD,是对基因组 DNA 上散在的区域进行扩增,而不是扩增特定的微卫星序列。Caldeira 等^[8]用 SSR-PCR 的方法对光滑双脐螺进行分析时也有相同的发现。SSR-PCR 方法并不是以微卫星序列本身为标记,只是以常见微卫星序列作为引物,扩增的是微卫星之间的基因组 DNA 序列,这使得微卫星序列的种种优势就没有被

真正的利用。

虽然湖北钉螺 SSR-PCR 扩增的产物并非微卫星序列,但是测序发现扩增产物中有时可能含有一个或几个微卫星序列。进一步研究发现的微卫星序列的侧翼序列,发现微卫星的侧翼序列有一定的保守性,而其他多项研究也证实微卫星两端的侧翼序列是较保守的单拷贝序列^[11,12]。因此,可以根据此次研究的结果设计微卫星的特定引物,从而实现特定微卫星序列的 PCR 扩增,以微卫星为分子标记进行更进一步的居群遗传学研究,以揭示钉螺群体遗传结构、群体间遗传分化以及钉螺起源与进化等群体遗传学中研究的关键问题^[13]。微卫星分析结合空间地理信息系统的指标,可以进一步把对湖北钉螺的研究推广到亲缘地理学、景观流行病学、分子生态学等领域。

此次研究中,通过分析各钉螺种群中的微卫星序列,我们发现不同钉螺种群中微卫星序列的类型存在较大的差异。(GA/CT)_n、(TTAGGG/CCCTAA)_n 两种类型的微卫星在安徽、福建、广西、四川 4 个种群的湖北钉螺中都存在。但是并不是每个钉螺个体中都存在这两类微卫星,因为种群中钉螺个体之间微卫星序列的变异是很显著的,某些个体有而某些个体则没有。对于各种群中均存在的微卫星序列,根据它们侧翼序列设计的引物可以在各个种群的钉螺中通用,从而大大提高微卫星分子标记的应用效率。某些微卫星仅在特定种群中有发现,(CAA)_n 仅在福建福清种群中发现,(TCTCTG)_n 仅在安徽贵池种群中发现,(GAA/TTC)_n、(CAA/TTG)_n、(CAT)_n 3 种微卫星序列仅在四川普格种群中发现。由于此次研究的样本量较小,尚不能确定这些微卫星是否为各种群所特有,仅能提供进一步研究的线索。若能进一步证实存在各种群特有的微卫星序列,则这些特有的微卫星可能成为湖北钉螺各个亚种间区别的一种证据,有可能对目前存在较大争议的钉螺亚种分类问题提供新的解决途径^[14,15]。

参 考 文 献

- [1] Gredler V. Zur conchilen-fauna von China. *Malakoz Ges*, 1881, 18:110-132.
- [2] 许静,郑江,周晓农.湖北钉螺分类和鉴定技术的研究进展. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002, 14(2):152-155.
- [3] 周艺彪,姜庆五,赵根明.湖北钉螺遗传多样性及其分子系统学研究进展. *中国血吸虫病防治杂志*, 2005, 17(5):391-396.
- [4] 雷冬梅,张莘,宋春敬.分子生态学的理论与方法研究进展//段昌群. *生态科学进展* (第 1 卷). 北京:北京高等教育出版社, 2004:135-159.
- [5] 周艺彪,赵根明,姜庆五,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. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(9):859-862.
- [6] McCouch SR, Chen X, Panaud O, et al. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol*, 1997, 35:89-99.
- [7] Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, et al. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 1991, 354(6350):204-209.
- [8] Caldeira RL, Carvalho OS, Lage RCG, et al. Sequencing of simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification products of *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 2002, 97:23-26.
- [9] Chlyeh G, Henry PY, Sourrouille P, et al. Population genetics and dynamics at short spatial scale in *Bulinus truncatus*, the intermediate host of *Schistosoma haematobium*, in Morocco. *Parasitology*, 2002, 125(Pt 4):349-357.
- [10] 牛安欣,熊衍文.微卫星锚定 PCR 研究湖北钉螺的遗传变异. *中国寄生虫病防治杂志*, 2002, 15(4):230-233.
- [11] 刘芳,刘卫东,王强,等.微卫星标记及其在贝类遗传选育研究中的应用, 2006, 25(5):268-270.
- [12] 王洪,岳乘飞,刘双环,等.小鼠 11 个品系 20 个微卫星基因位点的遗传分析. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(3):135-138.
- [13] 桂宏胜,杨丽,李生斌.群体遗传学研究中 STR 数据的统计方法应用. *遗传*, 2007, 29(12):1443-1448.
- [14] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China. *Malacologia*, 1995, 37(1):133-156.
- [15] Merenlender AM, Woodruff DS, Upatham ES, et al. Large genetic distances between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *J Parasitol*, 1987, 73(4):861-863.

(收稿日期:2008-06-17)

(本文编辑:尹廉)