

· 现场调查 ·

# 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

周艺彪 赵根明 韦建国 姜庆五

**【摘要】** 目的 探讨湖北钉螺种群间的遗传变异关系。方法 采用微卫星锚定 PCR 分子标记技术对来自中国大陆 8 个省的 19 个种群钉螺基因组 DNA 进行扩增,分析钉螺各种群间的遗传变异并对钉螺种群进行聚类分析。结果 19 个钉螺种群间的遗传距离  $D$  在 0~0.73 之间,平均遗传距离  $D$  为  $0.22 \pm 0.013$ 。19 个钉螺种群被聚成 4 类,一类包括分布在长江中下游流域(湖南、湖北、江西、安徽、江苏)的 16 个钉螺种群;广西宜州、福建福清和云南大理的钉螺种群分别单独成一类。结论 目前分布在中国大陆的湖北钉螺可能分为 4 个亚种,即指名亚种、滇川亚种、福建亚种、广西亚种。

**【关键词】** 湖北钉螺;微卫星锚定 PCR;遗传变异;聚类分析

**Genetic diversity in 19 Chinese populations of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissooidea) detected by simple sequence repeat-anchored polymerase chain reaction amplification** ZHOU Yi-biao, ZHAO Gen-ming, WEI Jian-guo, JIANG Qing-wu. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

**【Abstract】** Objective To explore the genetic diversity among populations of *Oncomelania hupensis*. Methods Simple sequence repeat-anchored PCR method was used to amplify the genomic DNA of nineteen snail populations from 8 provinces, and the genetic diversities among these snail populations were analyzed. Results The genetic distance  $D$  among nineteen snail populations ranged from 0 to 0.73 with average genetic distance as  $D 0.22 \pm 0.013$ . All the 19 snail populations were clustered into four groups: one group included 16 snail populations distributed throughout the Yangtze River drainage system below the Three Gorges of the river (Hunan, Hubei, Jiangxi, Anhui, and Jiangsu provinces); Snail populations from Yizhou city, Guangxi province, Fuqing city from Fujian province, and Dali city from Yunnan province belonged to an independent group respectively. Conclusion The distribution of *Oncomelania hupensis* in mainland China could be divided into four subspecies, i.e. *Oncomelania hupensis hupensis* (*O. h. hupensis*), *O. h. robertsoni*, *O. h. tangi*, and *O. h. guangxiensis*.

**【Key words】** *Oncomelania hupensis*; Simple sequence repeat-anchored polymerase chain reaction; Genetic diversity; Clustering

湖北钉螺的种下分类以及与日本血吸虫的协同进化研究在对血吸虫病流行区类型的划分、血吸虫病控制,包括生态控螺等方面具有重要的现实意义。我们采用扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记技术对我国大陆 10 个省 25 个种群钉螺的基因组 DNA 进行了遗传变异分析,其结果大部分与钉螺以前的线粒体细胞色素 C 氧化酶 1 基因(CO I)序列和同工酶的数据结果相似,但对广西钉螺种群的亚种分类地位存在异议<sup>[1]</sup>。本次研究采用另一种分子标记技术微卫星锚定 PCR 或简单重复序列锚定

PCR (simple sequence repeat-anchored PCR, SSR-PCR)对我国大陆不同地方钉螺种群的遗传变异关系进行研究,为中国大陆湖北钉螺的种下分类提供分子生物学的依据。

## 材料与方 法

1. 钉螺:根据我国血吸虫病流行区的类型、AFLP 分析的结果以及以往湖北钉螺的种下分类<sup>[1]</sup>,选取来自云南、广西、福建、湖南、湖北、江西、安徽、江苏 8 个省区的 19 个种群的钉螺作为本次研究的样本,其所在的地区、环境类型及其分布见图 1。其中来自于云南(大理)、广西(宜州)、福建(福清)、安徽(铜陵 2)以及江苏(宜兴)的 5 个钉螺种群为无纵肋的光壳钉螺;其余 14 个钉螺种群为肋壳钉

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671799)

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

螺。每个现场采螺点随机抽取钉螺 120 只左右置于实验室内一起饲养约 1 周,用逸蚴法鉴别钉螺是否感染血吸虫,阴性钉螺用于基因组 DNA 的制备。

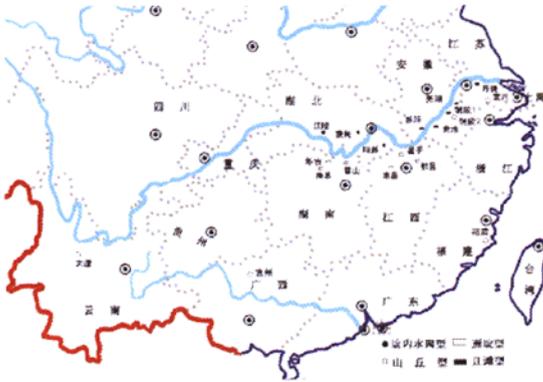


图1 19个湖北钉螺种群的地区分布示意图

2. 基因组 DNA 抽取:从上述逸蚴法阴性的钉螺中,再随机抽取钉螺用 0.3% NaCl 清洗,压碎镜检软体组织内是否含有尾蚴或子胞蚴或母胞蚴,阳性者再次剔除,最后每个种群都选取 15 只阴性的钉螺,去掉螺壳和内脏部分,加入液氮研磨成粉末,按参考文献[2]进行基因组 DNA 的抽取。用 0.8% 琼脂糖检测 DNA 纯度、完整性及浓度,置于 4℃ 保存备用。

3. SSR-PCR 引物:根据 Calderia 等<sup>[3]</sup>的报道,选择 (CA)<sub>8</sub>RY 为 SSR-PCR 引物,即 CAC ACA CAC ACA CAC ARY,共 18 个碱基,其中 R 代表一分子嘌呤,即 A 或 G;Y 代表一分子嘧啶,即 C 或 T。

4. SSR-PCR 扩增反应:参考 Calderia 等<sup>[3]</sup>报道的方法,并做部分调整。PCR 的反应体系为:10× PCR buffer 5 μl; dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4 μl; (CA)<sub>8</sub>RY 引物 (25 pmol/L) 1 μl; Ampli Taq Gold DNA 聚合酶 0.25 μl; 模板 DNA (10~20 μg/ml) 5 μl, 加灭菌超纯水使总体积达 45 μl。反应程序为:95℃ 预变性 5 min, 38 个循环 (95℃ 变性 30 s, 50℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 60 s) 后, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ml 溴化乙锭, EB) 中室温下以 1~2 V/cm 恒压电泳 2 h。紫外灯下观察条带分离情况,并用凝胶成像系统照相保存结果。

5. 统计学分析:图谱用 Glyko BandScan 4.30 软件读带,根据条带的出现/缺失,转化为 1/0,并保存数据结果。用 NTSYSpc 2.1 软件进行聚类分析

(Rohlf, 2000),首先使用 SimQual 程序采用 DICE 法计算两个钉螺种群间的相似系数,  $GS_{DICE} = 2a / (2a + b + c)$ , 式中 a 为任意两个钉螺种群共享条带数, b 和 c 为相应两个钉螺种群间的差异条带数<sup>[4]</sup>, 钉螺种群间的遗传距离  $D = 1 - GS_{DICE}$ 。然后分别用 SAHN 程序和 Njion 程序进行聚类分析。其他数据的处理用 Microsoft Excel 和 SPSS 11.5 软件完成。

### 结果

1. SSR-PCR 扩增:使用 (CA)<sub>8</sub>RY 引物对 19 个钉螺种群的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,共获得清晰、重复性好的条带 12 条,各钉螺种群条带数在 3~6 条之间,条带的长度为 300~1000 bp。

2. 种群间的遗传变异:19 个钉螺种群间的遗传距离 D 在 0~0.73 之间,平均遗传距离 D 为 0.22 ± 0.013,其中以云南大理与广西宜州钉螺种群间的遗传距离 D 最大,为 0.73。分布在长江中下游 (湖南、湖北、江西、安徽、江苏) 的钉螺种群之间的遗传距离 D 在 0~0.27 之间,具有较高的相似性,平均遗传距离 D 为 0.13 ± 0.008,与云南大理、广西宜州和福建福清的钉螺存在较大的遗传分化,平均遗传距离 D 分别为 0.48 ± 0.014、0.49 ± 0.022 和 0.27 ± 0.023。

3. 聚类分析:采用 4 种聚类方法 (完全连接法、邻接法、单连接法和 UPGMA 法) 对 19 个湖北钉螺种群进行聚类分析。4 种方法的聚类结果很相似,19 个钉螺种群聚为 4 类。无论是光壳还是肋壳钉螺,分布在长江中下游流域 (湖南、湖北、江西、安徽、江苏) 的 16 个钉螺种群均明显聚为一类,而云南大理、广西宜州和福建福清的钉螺各单为一类。在与长江中下游流域钉螺的亲缘关系上,邻接法显示来自广西宜州的钉螺与之亲缘关系较近,而其他 3 种方法均显示福建福清的钉螺与之较近 (图 2~5)。

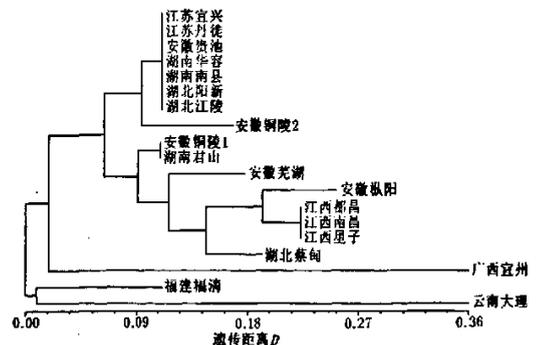


图2 19个湖北钉螺种群的邻接法聚类分析

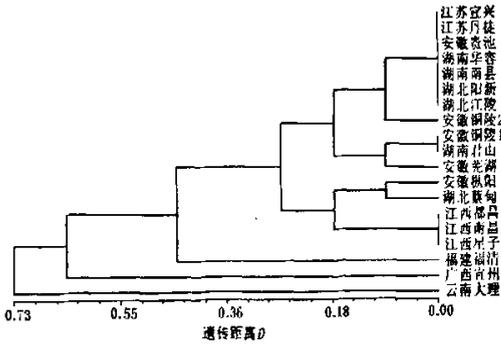


图3 19个湖北钉螺种群的完全连接法聚类分析

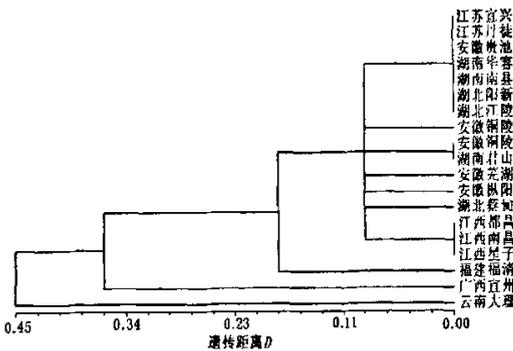


图4 19个湖北钉螺种群的单连接法聚类分析

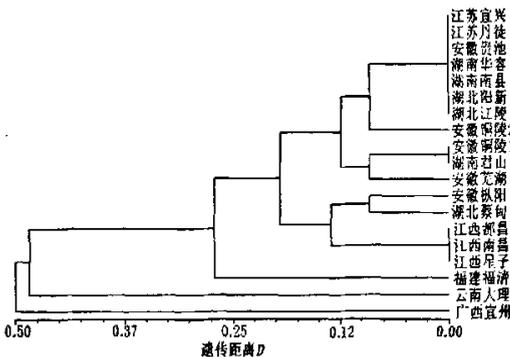


图5 19个湖北钉螺种群的UPGMA法聚类分析

讨 论

钉螺在我国大陆曾分布于长江流域及其以南的12个省、市、自治区。北起江苏宝应县(北纬 33° 20'),南抵广西玉林市(北纬 22° 20'),东至上海南汇区(东经 121° 51'),西达云南云龙县(东经 99° 04')[5]。由于钉螺的形态变异大,孳生环境类型多样,曾造成钉螺分类上的混乱与争议[6,7]。刘月英等[8]根据钉螺的形态特征、地理分布、生态环境及对寄生虫的易感性等方面的差异,将我国大陆湖北钉螺的种下分类分为 5 个亚种:指名亚种 (*Oncomelania hupensis hupensis*, *O. h. hupensis*)、

丘陵亚种 (*O. h. fausti*)、滇川亚种 (*O. h. robertsoni*)、广西亚种 (*O. h. guangxiensis*)、福建亚种 (*O. h. tangi*),而 Davis 等<sup>[9-11]</sup>根据钉螺的分子数据[线粒体细胞色素 C 氧化酶 1 基因(CO I)的序列和同工酶]以及详细的钉螺解剖数据将我国大陆的钉螺分为 3 个亚种:滇川亚种、福建亚种和指名亚种,其中滇川亚种、福建亚种的分类与刘月英等的分类相同,而指名亚种则包括了刘月英等分类中的指名亚种、丘陵亚种和广西亚种。我们采用微卫星锚定 PCR 或简单重复序列锚定 PCR 的分子标记技术和 4 种聚类方法(完全连接法、邻接法、单连接法和 UPGMA 法)对 19 个湖北钉螺种群之间的遗传变异关系进行分析发现,4 种方法的聚类结果很相似,19 个钉螺种群聚为 4 类。无论是光亮还是肋壳钉螺,分布在长江中下游流域(湖南、湖北、江西、安徽、江苏)的 16 个钉螺种群均明显聚为一类,这与 AFLP 分子标记技术分析的结果<sup>[1]</sup>和牛安欧和熊衍文<sup>[12]</sup>的微卫星锚定 PCR 分析的结果一致,也与 Davis 等<sup>[9-11]</sup>的同工酶和线粒体细胞色素 C 氧化酶 1 基因(CO I)序列的数据结果相似,均支持分布在长江中下游流域的钉螺种群(无论光亮还是肋壳钉螺)同属于一个亚种,即指名亚种 (*O. h. hupensis*)。这明显不支持刘月英等<sup>[8]</sup>将分布在长江中下游流域的光壳钉螺种群单列为一个亚种,即丘陵亚种 (*O. h. fausti*)。

在 AFLP 分子标记技术分析的结果中显示<sup>[1]</sup>,除单连接法,将福建福清钉螺种群与广西宜州钉螺种群分开各属一类之外,其他聚类法(完全连接法、邻接法和 UPGMA 法)都将两者归为一类,但两者的遗传距离为全部所分析的 25 个钉螺种群之间的平均水平。而本次研究结果显示,来自于广西宜州的钉螺种群与其他地方的钉螺种群之间存在较大的遗传分化,4 种方法的聚类结果均提示,广西宜州钉螺种群是一个不同于其他 18 个钉螺种群的独立亚种。广西宜州钉螺种群与福建福清钉螺种群之间的平均遗传距离 *D* 为 0.45,是 19 个钉螺种群之间遗传距离 *D* 的 2 倍多。同工酶的研究结果也显示<sup>[9]</sup>,广西钉螺种群与福建钉螺种群之间存在较大的遗传分化,在系统树位于不同的分支,但遗憾的是广西钉螺种群与长江中下游流域的钉螺种群被聚为一类,同时 Davis 等将它们归属于指名亚种。我们在对钉螺种群间的遗传距离与地理距离的相关性进行分析时发现<sup>[13]</sup>,如果指名亚种包括 1 个来自广西宜州的

钉螺种群时,遗传距离  $D$  和 Nei 无偏遗传距离与地理距离的相关系数分别为 0.5276 和 0.5770; 当不包括该种群时,其相系数分别降为 0.3380 和 0.3736, 变化相当大。然而当指名亚种不包括同是光壳钉螺的 2 个种群(江苏宜兴钉螺和安徽铜陵山区钉螺)时,即 15 个肋壳钉螺种群间的遗传距离  $D$  和 Nei 无偏遗传距离与地理距离的相关系数变化不大,分别为 0.3612 和 0.3916。这提示广西宜州钉螺种群与其他指名亚种钉螺种群间存在着较大遗传分化。福建与广西钉螺种群之间的地理距离相隔较远,并且在形态学上也存在明显的差异,福建钉螺比广西光壳钉螺的唇峰更发达,壳型更肥胖<sup>[8]</sup>。这些表明广西光壳钉螺种群是一个既不同于福建亚种(*O. h. tangi*)也不同于指名亚种的独立亚种,即广西亚种(*O. h. guangxiensis*)。

在对分布于四川、云南和福建的钉螺亚种分类地位上,无论是钉螺的形态、生态、生理和地理分布资料<sup>[8]</sup>,还是钉螺的分子数据[线粒体细胞色素 C 氧化酶 1 基因(CO I)的序列、同工酶,基因组 DNA 的 AFLP 和 SSR-PCR 分子标记]<sup>[1,9,11]</sup>,都较为一致地认为分布在四川和云南两省的钉螺同属于一个亚种,即滇川亚种(*O. h. robertsoni*),分布在福建省的钉螺是一个独立的亚种,即福建亚种。

因此,根据目前已掌握的钉螺形态、生态、生理、地理分布资料<sup>[8,14-16]</sup>以及钉螺的分子数据<sup>[1,9,11]</sup>,目前分布在我国大陆的湖北钉螺种下分类可能分为 4 个亚种,即指名亚种(*O. h. hupensis*),主要分布在长江中下游流域(湖南、湖北、江西、安徽、江苏和浙江等省),其中的肋壳钉螺栖于湖沼洲滩、江河沿岸及平原地区的沟渠和稻田,光壳钉螺孳生于丘陵的沟渠及溪流沿岸;滇川亚种(*O. h. robertsoni*),分布在四川和云南两省,为光壳钉螺,栖于灌溉沟渠,山坡草滩及稻田;福建亚种(*O. h. tangi*),分布在福建东南滨海地带,为光壳钉螺,栖于低山草滩、山溪坡地及灌溉沟渠;广西亚种(*O. h. guangxiensis*),分布在广西省的西部,为光壳钉螺,孳生于保水性差的薄砂砾土及山沟乱石中。

#### 参 考 文 献

[1] 周艺彪,赵根明,韦建国,等. 25 个湖北钉螺种群 AFLP 分子标记的遗传变异研究. 中华流行病学杂志,2006,27(10):865-

870.

- [2] 周艺彪,姜庆五,赵根明. AFLP 标记技术在湖北钉螺遗传多样性中的应用研究. 中国血吸虫病防治杂志,2005,17(1):34-38.
- [3] Calderia RL, Vidigal THDA, Simpson AJG, et al. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(4):535-544.
- [4] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979,76:5269-5273.
- [5] 毛守白. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治. 北京:人民卫生出版社,1990:636.
- [6] 赵慰先. 人体寄生虫学. 北京:人民卫生出版社,1983:330-343.
- [7] 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.
- [8] 刘月英,楼子康,王耀先,等. 钉螺亚种分化. 动物分类学报,1981,6(3):253-266.
- [9] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China. *Malacologia*, 1995, 37:133-156.
- [10] Davis GM, Zhang Y, Xu XJ, et al. Allozyme analyses test the taxonomic relevance of ribbing in Chinese *Oncomelania* (Gastropoda: Rissocoea: Pomatiopsidae). *Malacologia*, 1999, 41:297-317.
- [11] Davis GM, Wilke T, Zhang Y, et al. Snail-*Schistosoma*, *Paragonimus* interactions in China: population ecology, genetic diversity, coevolution and emerging diseases. *Malacologia*, 1999, 41:355-377.
- [12] 牛安歌,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.
- [13] 周艺彪,赵根明,韦建国,等. 日本血吸虫中间宿主湖北钉螺遗传变异的空间相关分析. 复旦学报(医学版),2007,34(2):207-212.
- [14] Davis GM, Wu WP, Xu XJ. Ecogenetics of shell sculpture in *Oncomelania* (Gastropoda) in canals of Hubei, China, and relevance for schistosomiasis transmission. *Malacologia*, 2006, 48:253-264.
- [15] 周艺彪,姜庆五,赵根明,等. 中国大陆钉螺壳壳形态性状数量聚类分析. 动物分类学报,2006,31(2):441-447.
- [16] 周艺彪,姜庆五,赵根明,等. 湖北钉螺种群内螺壳壳形态性状变异分析. 动物学杂志,2005,40(5):77-83.

(收稿日期:2007-04-05)

(本文编辑:张林东)