

文章编号: 1000-7423(2006)-01-0027-05

【论著】

湖北钉螺种群内 AFLP 分子标记遗传变异分析

周艺彪, 赵根明, 韦建国, 姜庆五*

【摘要】 目的 探讨湖北钉螺种群内的遗传变异及其程度。方法 采用扩增片段长度多态性 (AFLP) 分子标记技术对 9 省 (云南、四川、广西、福建、湖南、湖北、江西、安徽、江苏) 13 种群湖北钉螺基因组 DNA 进行扩增, 分析钉螺种群内的遗传变异。结果 湖北钉螺 13 种群 AFLP 扩增片段位点数为 403~472, 江西星子钉螺种群内遗传多样性较高, 多态位点频率、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 93.2%、0.345 和 0.510, 而广西宜州钉螺种群内遗传多样性较低, 以上 3 指标分别为 55.8%、0.191 和 0.287; 广西宜州钉螺种群内的相似性较大, 相似系数 (中位数) 为 0.904, 而江苏丹徒钉螺种群内的相似性较低, 相似系数 (中位数) 为 0.748; 13 种群内的遗传变异差异显著 ($P < 0.01$)。结论 我国广泛分布的湖北钉螺, 种群内存在一定程度的遗传变异。不同地区湖北钉螺种群内遗传变异程度不同, 有的相差较大。

【关键词】 湖北钉螺; 扩增片段长度多态性; 遗传变异

中图分类号: R383.241

文献标识码: A

Analysis of Genetic Diversity of AFLP Marker among Populations of *Oncomelania hupensis*

ZHOU Yi-biao, ZHAO Gen-ming, WEI Jian-guo, JIANG Qing-wu*

(Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 20032, China)

【Abstract】 Objective To explore the degree of genetic diversity among populations of *Oncomelania hupensis*. **Methods** AFLP method was used to amplify the genomic DNA of thirteen snail populations from nine provinces (i. e. Yunnan, Sichuan, Guangxi, Fujian, Hunan, Hubei, Jiangxi, Anhui and Jiangsu) and the genetic diversities among snail populations were analyzed. **Results** The number of AFLP fragments amplified ranged from 403 to 472 for thirteen *Oncomelania* populations. Among the thirteen snail populations, the genetic diversity within the population from Xingzi County, Jiangxi Province, was most significant, and the percentage of polymorphic loci, Nei's genetic diversity and Shannon's information index were 93.22%, 0.345 and 0.510 respectively, while these indices for the snail population from Yizhou City, Guangxi Region, were the lowest, 55.80%, 0.191 and 0.287 respectively. The similarity between the in-group-individuals from Yizhou City, Guangxi Region, was most significant, and the average coefficient of similarity was 0.904, and that from Dantu County, Jiangsu Province, was the lowest (0.748). The genetic diversities among snail populations were significantly different for the thirteen snail populations ($P < 0.01$). **Conclusion** There is a certain genetic variation among *Oncomelania* snail populations from the mainland of China, and this variation is significantly different among snail populations from different areas.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; AFLP; Genetic diversity

Supported by the S & T Programs of the National Tenth Five-year Plan (No. 2004BA718B04)

* Corresponding author, E-mail: jiangqw@shmu.edu.cn

我国大陆湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 分布较为广泛, 不同地区其形态学、细胞学、遗传学等方面存在明显差异, 同一钉螺种群内不同个体间也存在一定程度变异^[1-5]。有研究显示光壳钉螺种群内的遗传变异大于肋壳钉螺种群内的^[2]。而另一些研究结果则相反, 肋壳钉螺种群内的遗传变异大于光壳钉螺种群内的^[3,4]。此外, 湖北钉螺与日本血吸虫之间还存在复杂的相容性, 不同地区钉螺对日本血吸虫不同地理株的易感性明显不同, 即使在同一种群内也不会全部被日本血吸虫感染^[6,7]。本研究采用新一代 DNA 指

纹分析技术——扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 对钉螺全基因组进行扫描, 探讨不同地区钉螺种群内的遗传变异及其程度, 为湖北钉螺的遗传进化及抗性基因的研究提供分子生物学依据。

材料与方法

1 钉螺

钉螺样本分别采自云南、四川、广西、福建、湖南、湖北、江西、安徽、江苏等 9 省 13 个现场螺点。其中属于山丘型的有来自云南大理、四川蒲江 (滇川亚种)、广西宜州 (广西亚种)、福建福清 (福建亚种)、以及江苏宜兴 (丘陵亚种) 的 5 个光壳钉螺种群; 属垅内水网型的有湖北江陵细肋钉螺种群 (指名

基金项目: “十五”国家科技攻关项目 (No. 2004BA718B04)

作者单位: 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室, 上海 200032

* 通讯作者, E-mail: jiangqw@shmu.edu.cn

亚种) 和湖北蔡甸粗肋壳钉螺种群 (指名亚种); 属洲垸型的有湖南南县、君山和江西星子、都昌 4 个粗肋壳钉螺种群 (指名亚种); 属江滩型的有安徽铜陵和江苏丹徒 2 个粗肋壳钉螺种群 (指名亚种)。每个现场采螺点随机抽取成年钉螺约 120 只, 于实验室共同饲养 1 周左右, 先用逸蚴法鉴别钉螺是否感染血吸虫, 剔除阳性钉螺, 再随机抽取阴性钉螺用 0.3% NaCl 清洗, 压碎、镜检钉螺软体组织, 剔除含有尾蚴或子胞蚴或母胞蚴者, 最后每个钉螺种群均选取 30 只以上两次检查均为阴性的钉螺用于基因组 DNA 模板的制备^[8]。

2 基因组 DNA 模板的制备

按参考文献 [9] 进行。

3 AFLP 分析

选用 8 对重复性好、多态性强的引物进行选择扩增^[9], *Pst* I 和 *Mse* I 荧光标记引物序列如下。模板 DNA 酶切-连接、预扩增、选择性 PCR 扩增和 PCR 产物凝胶电泳按参考文献 [8] 进行。

Pst I 和 *Mse* I 荧光标记引物对序列:
 P1: 5'-GACTGCGTACATGCA GAA-3'
 M1: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG-3'
 P2: 5'-GACTGCGTACATGCA GAA-3'
 M2: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT-3'
 P3: 5'-GACTGCGTACATGCA GAC-3'
 M3: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAT-3'
 P4: 5'-GACTGCGTACATGCA GAC-3'
 M4: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC-3'
 P5: 5'-GACTGCGTACATGCA GAC-3'
 M5: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG-3'
 P6: 5'-GACTGCGTACATGCA GTG-3'
 M6: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA-3'
 P7: 5'-GACTGCGTACATGCA GTG-3'
 M7: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG-3'
 P8: 5'-GACTGCGTACATGCA GTC-3'
 M8: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT-3'

4 电泳图谱数量化与数据处理

4.1 电泳图谱信息数量化 用 Glyko BandScan 4.30 软件分别将 8 对引物所扩增的 104 张电泳图谱的条带信息数量化, 以每条带总灰度占其所在泳道的所有条带总灰度之和的百分比 (总灰度百分比) 组建原始数据库。

4.2 数据处理与分析模式 参考 Bloom 等^[10] 和周艺彪等^[11] 图谱信息数量化与数据分析模式, 分别按总灰度百分比 > 0.0% 至 > 0.9% 的读带标准将数据转化为“1”和“0”的形式, 例如: 总灰度百分比 > 0.1% 的条带记为“1”, 否则判为“0”, 由此建立只

有由“1”和“0”组成的一个数据集, 其他类推, 这样每个钉螺种群分别得到 10 个数据集。然后分别对每个钉螺种群的 10 个数据集进行单独分析, 所得结果分别组成每个钉螺种群的 1 个推论或结果数据库。最后对推论数据库进行描述性统计分析。

4.3 数据统计分析 参考 RAPD 标记数据分析方法, 将 AFLP 分子标记作为等位基因进行遗传多态性分析^[12,13]。用 Popgen32 软件计算多态位点频率 [$P = (\text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}) \times 100\%$]、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数等^[14,15]。用 NTSYSpc2.1 软件 SimQual 程序 DICE 法计算两钉螺个体间的相似系数, $GS_{DICE} = 2a / (2a + b + c)$, 其中“a”为任意两个钉螺的共享谱带数, “b”和“c”为相应两个钉螺间的差异条带数^[16]。多个种群内的遗传多样性指数和相似性比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 法进行检验, 两个种群的比较采用非参数的 Mann-Whitney 法进行比较。其他数据的处理与作图用 Microsoft Excel 和 SPSS11.5 软件完成。

结 果

1 湖北钉螺种群内的遗传多样性

13 个钉螺种群的内 AFLP 扩增片段位点数为 403~472, 这些钉螺种群内的遗传多样性存在显著性差异 (Nei's 基因多样性指数 $\chi^2 = 2500.56$, $P < 0.01$; Shannon's 信息指数 $\chi^2 = 2501.20$, $P < 0.01$), 其中江西星子的肋壳钉螺种群内遗传多样性最高, 多态位点频率、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别高达 93.2%、0.345 和 0.510, 而广西宜州的光壳钉螺种群内遗传多样性最低, 3 个指标分别为 55.8%、0.191 和 0.287。7 个粗肋壳钉螺种群内的遗传多样性明显不同 (Nei's 基因多样性指数 $\chi^2 = 600.30$, $P < 0.01$; Shannon's 信息指数 $\chi^2 = 600.26$, $P < 0.01$), 其中以湖南君山钉螺种群内的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数的值最低, 仅为 0.276 和 0.420, 比云南大理和四川蒲江光壳钉螺种群内的这两个指数还要低 ($P < 0.01$)。5 个光壳钉螺种群内的遗传多样性也明显不同 (Nei's 基因多样性指数 $\chi^2 = 977.48$, $P < 0.01$; Shannon's 信息指数 $\chi^2 = 977.48$, $P < 0.01$)。以云南大理钉螺种群内的遗传多样性最高。湖北江陵细肋钉螺种群内的遗传多样性大小处于中间水平, 3 个指标分别为 82.6%、0.302 和 0.450 (表 1)。

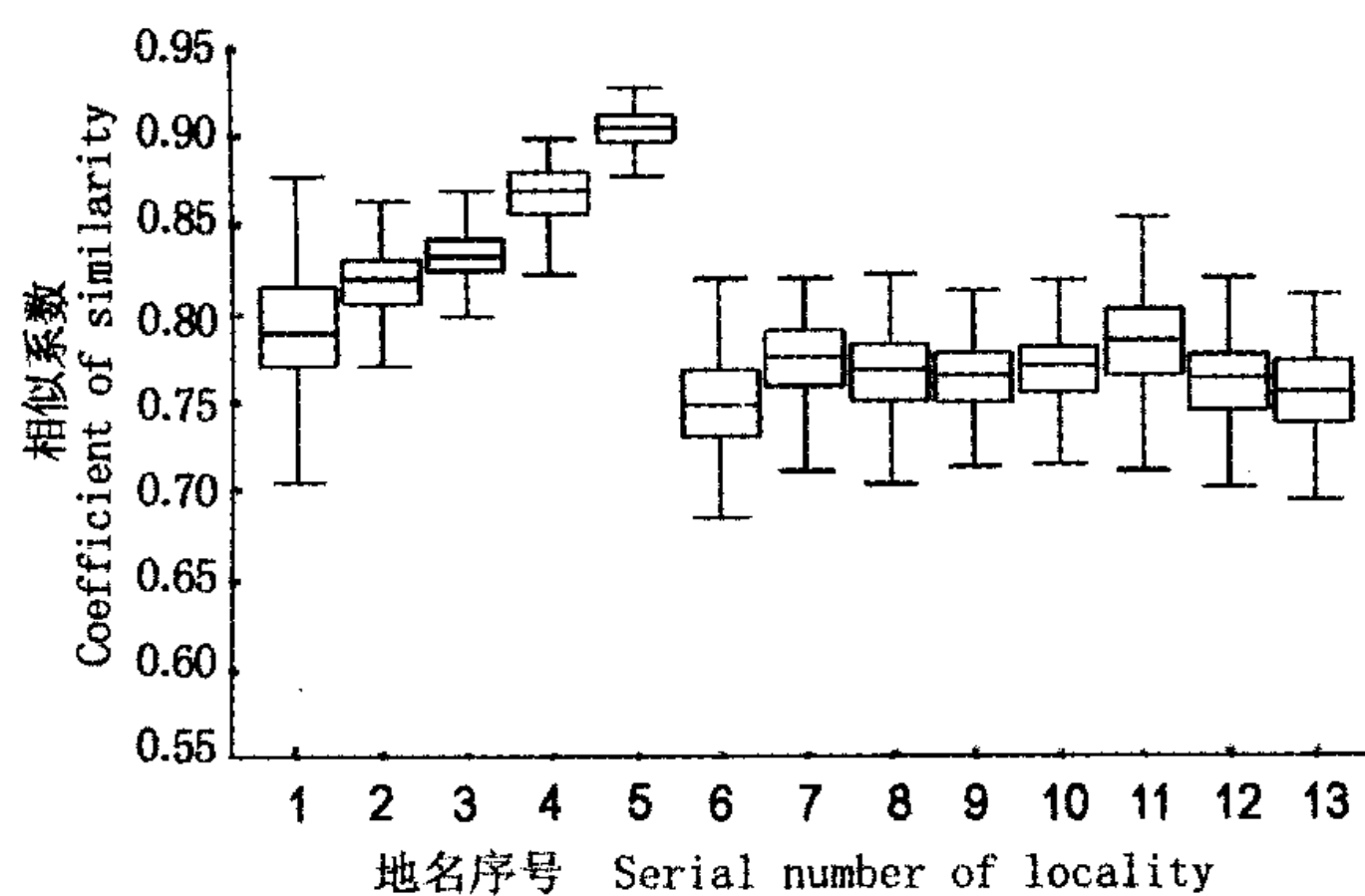
2 湖北钉螺种群内钉螺个体间的相似性

在 13 个钉螺种群中以广西宜州钉螺种群内的相似性最大, 相似系数的中位数 $Z = 0.904$, 而江苏丹徒的钉螺种群内的相似性最低, $Z = 0.748$,

表 1 13 个湖北钉螺种群内的遗传多样性结果 ($\bar{x} \pm se$)
Table 1 Genetic diversity among 13 populations of *Oncomelania hupensis*

种群 Population	位点数 No. Loci	多态位点数 No. polymorphic loci	多态位点率 Percentage of polymorphic loci (%)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity	Shannon's 信息指数 Shannon's information index
大理 Dali	436 ± 3.2	379 ± 8.8	86.9	0.322 ± 0.003	0.476 ± 0.004
宜兴 Yixing	403 ± 3.8	314 ± 6.4	77.9	0.270 ± 0.003	0.404 ± 0.004
蒲江 Pujiang	424 ± 0.8	314 ± 12.2	74.0	0.285 ± 0.003	0.421 ± 0.004
福清 Fuqing	430 ± 2.1	304 ± 12.0	70.6	0.253 ± 0.003	0.377 ± 0.004
宜州 Yizhou	405 ± 3.5	226 ± 10.1	55.8	0.191 ± 0.003	0.287 ± 0.005
丹徒 Dantu	467 ± 0.5	418 ± 5.7	89.5	0.333 ± 0.002	0.493 ± 0.003
铜陵 Tongling	426 ± 0.8	370 ± 5.2	86.9	0.322 ± 0.003	0.478 ± 0.004
都昌 Duchang	434 ± 2.7	378 ± 4.2	87.1	0.313 ± 0.003	0.465 ± 0.004
星子 Xingzi	472 ± 0.8	440 ± 7.2	93.2	0.345 ± 0.002	0.510 ± 0.003
蔡甸 Caidian	433 ± 0.5	371 ± 5.4	85.9	0.330 ± 0.003	0.485 ± 0.004
江陵 Jiangling	415 ± 0.6	343 ± 6.1	82.6	0.302 ± 0.003	0.450 ± 0.004
南县 Nanxian	459 ± 1.0	403 ± 8.6	87.8	0.339 ± 0.003	0.500 ± 0.003
君山 Junshan	453 ± 6.0	391 ± 3.9	86.3	0.276 ± 0.003	0.420 ± 0.004

并且这些钉螺种群内的相似性也存在明显的差异 ($\chi^2 = 4449.67$, $P < 0.01$)。5 个光壳钉螺种群内的相似性相差较大 ($\chi^2 = 1880.21$, $P < 0.01$)，其中云南大理钉螺种群内的相似性较低，且个体间的相似系数较为分散，其 $Z = 0.789$ ，极差为 0.198。与 5 个光壳钉螺种群相比，7 个粗肋壳钉螺种群内的相似性较为接近，但也存在明显差异 ($\chi^2 = 247.80$, $P < 0.01$)，其中种群内相似性最高为安徽铜陵的钉螺种群， $Z = 0.775$ 。湖北江陵细肋钉螺种群内的相似性大小处于光壳与粗肋壳钉螺种群之间， $Z = 0.785$ ，明显低于云南大理钉螺种群内的相似性 ($Z = 3.41$, $P < 0.01$)，也明显高于安徽铜陵钉螺种群内的相似性 ($Z = 5.79$, $P < 0.01$)。不同地区光壳钉螺种群内的相似性普遍高于肋壳钉螺种群内的相似性 (图 1)。



1: 大理 Dali, 2: 宜兴 Yixing, 3: 蒲江 Pujiang, 4: 福清 Fuqing, 5: 宜州 Yizhou, 6: 丹徒 Dantu, 7: 铜陵 Tongling, 8: 都昌 Duchang, 9: 星子 Xingzi, 10: 蔡甸 Caidian, 11: 江陵 Jiangling, 12: 南县 Nanxian, 13: 君山 Junshan

图 1 13 个湖北钉螺种群内个体间相似系数图

Fig. 1 Boxplot of the similarity coefficient between snail individuals of the 13 *Oncomelania* snail populations

讨 论

一个物种种群内的个体基因水平互有差异，通常表现出各种遗传变异，进而反映物种的进化潜力及对环境的适应性。本次研究采用 AFLP 方法对来自中国大陆 9 省 13 地区的钉螺种群进行分析，结果显示，我国大陆广泛分布的钉螺，不仅其种群内存在一定程度的遗传变异，而且不同地区钉螺种群内的遗传变异程度也不同，并且有的相差较大。例如江西省星子县的肋壳钉螺种群内的多态位点频率、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别高达 93.22%、0.345 和 0.510，而广西省宜州市的光壳钉螺种群内的这 3 个指标仅为 55.80%、0.191 和 0.287；群内个体间相似性，平均相似系数最高为 0.904，最低仅为 0.748，并且不同地区光壳钉螺种群内的相似性普遍高于肋壳钉螺种群内的相似性。这与周晓农等^[2]报道有些差异，而与 Wilke 等^[4]报道较为一致。1994 年周晓农等^[2]用同工酶方法研究中国大陆 9 省 34 个地区钉螺（各种群的钉螺样本数为 5~25 个）的遗传变异，结果发现，四川（大邑、丹棱、彭山）、福建（福清）和安徽山区（广德、青阳）光壳钉螺种群内的多态位点百分比和平均杂合度较高，而其他地区肋壳钉螺种群内的多态位点百分比和平均杂合度较低，认为光壳钉螺的遗传变异和分化远大于肋壳钉螺。Wilke 等^[4]对我国三峡大坝以下 5 省 10 地区钉螺线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (COI) 基因进行克隆测序，发现不同地区的肋壳钉螺种群比光壳钉螺种群有较高的单倍体多样性和核苷酸多样性。本次研究同样发现位于三峡大坝以下的江苏宜兴和福建福清光壳钉螺种群内的遗传变异均明显低于此区域内肋壳钉螺种群内的遗传变异，但不在此区域内的云南大理钉螺种群内

的遗传多样性较高, 其多态位点频率、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数的值甚至超过了一些肋壳钉螺种群这些指标的值。

本次研究所采用的 AFLP 分子标记技术具有随机扩增多态性 DNA (RAPD) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 两种技术优点, 即在对某种生物遗传背景不甚了解的情况下, 利用它可对该物种的基因组各部分可能存在的 DNA 序列变异进行扫描分析, 具有较强的多态性以及实验结果稳定可靠等优点^[17,18]。同时在研究过程中也充分考虑了研究遗传变异、分化的两个关键指标, 即样本量与分子位点数。有研究显示^[8], 湖北钉螺样本量和分子位点数与遗传变异信息的可靠性之间存在明显的关系, 当样本量低于 7 时, AFLP 总位点数、多态位点数、多态位点频率、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数变化很大, 而当样本量超过 30, 这些指标值的变化趋于平稳。当 AFLP 分子位点数低于 128, 这 3 个指标值变化相当剧烈; 当分子位点数超过 338 时, 这些指标值的变化趋于稳定。本研究对每个钉螺种群都随机取 30 只, 用 8 对引物对这些钉螺基因组 DNA 进行扩增, 每个钉螺种群的 AFLP 扩增片段数均在 403~472 之间。此外, 本研究还采用这 3 个指数和个体间相似系数 4 个指标同时对钉螺种群内的遗传变异进行考察, 它们之间具有较强的吻合性或一致性, 但也有例外, 如湖南君山钉螺的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数较低, 但多态位点频率却较高以及种群内个体间的相似系数较低。由此可见, 本研究所用的分析指标合理, 结果比较可靠。与同工酶分析结果不同的原因可能是同工酶研究中存在如下不足: ① 可能存在假性同工酶的干扰而夸大了遗传变异; 同工酶分析比较的仅为基因型产物, 而非基因本身, 其所反映的信息也仅是基因组编码区所表达的信息, 这编码区基因仅占整个基因组的很小部分; 由于遗传密码的兼并性, 遗传密码第 3 个碱基的变异, 一般不能被蛋白质多肽链上的氨基酸反映出来, 还有 DNA 中一些碱基的替换并不导致多肽链中氨基酸序列的变化等, 因此同工酶所探测到的变异并不能代表整个基因组的变异^[19]。② 同工酶研究所用的样本量可能不足, 以及各个种群的样本量相差较大^[2]。③ 钉螺中已知的多态位点被忽略^[20]。④ 同工酶研究所用的位点数过少^[4]。

此外本研究还发现, 广西宜州和福建福清钉螺种群内的遗传变异最低, 并与其他钉螺种群内的遗传变异程度相差较大。其可能的原因是这些地区的钉螺分布较为局限, 钉螺种群小, 易发生显著的遗传漂变, 导致了这些小种群内遗传多样性的降低。也正是由于这些地区钉螺种群内的遗传多样性不高, 它们对环境

变化的适应性也较差, 因此通过改造环境或用药物控制或消灭这些地区的钉螺可能较容易见效。

致谢 本研究得到湖南省血吸虫病防治所卓尚炯研究员、广西壮族自治区疾病预防控制中心黎学铭研究员、以及云南大理、四川蒲江、江苏宜兴和丹徒、福建福清、安徽铜陵、江西星子和都昌、湖北蔡甸和江陵、湖南南县和君山等血防站(疾控中心)有关同志的大力支持和帮助, 谨此致谢!

参 考 文 献

- [1] Liu YY, Lou ZK, Wang YX, et al. Subspecies differentiation of *Oncomelania* snails [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1981, 6: 253-266. (in Chinese)
(刘月英, 楼子康, 王耀先, 等. 钉螺亚种分化 [J]. 动物分类学报, 1981, 6: 253-266.)
- [2] Zhou XN, Sun LP, Hong QB, et al. Population genetics of *Oncomelania* spp. in mainland China I. Genetic variations among populations of *Oncomelania* spp. [J]. Chin J Schisto Control, 1995, 7: 67-71. (in Chinese)
(周晓农, 孙乐平, 洪青标, 等. 中国大陆钉螺种群遗传学研究 I. 种群遗传差异 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7: 67-71.)
- [3] Shi CH, Qiu CP, Xia MY, et al. Preliminary study on cytochrome C oxidase 1 gene of *Oncomelania hupensis* from Miaohu area in Hubei Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19: 41-44. (in Chinese)
(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 1 基因差异的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19: 41-44.)
- [4] Wilke T, Davis GM, Cui EC, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissooidea) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology [J]. Acta Trop, 2000, 77: 215-227.
- [5] Zhou YB, Jiang QW, Zhao GM, et al. Analysis of morphological variation within *Oncomelania hupensis* populations [J]. Chin J Zool, 2005, 40(5): 90-97. (in Chinese)
(周艺彪, 姜庆五, 赵根明, 等. 湖北钉螺种群内螺壳形态形状变异分析 [J]. 动物学杂志, 2005, 40(5): 90-97.)
- [6] Yuan HC, Upatham ES, Kruatrachue M, et al. Susceptibility of snail vectors to oriental anthropophilic *Schistosoma* [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1984, 15: 86-94.
- [7] Hong QB, Zhou XN, Sun LP, et al. Susceptibility of *Oncomelania hupensis* from different districts and different environmental type to *Schistosoma japonicum* in different districts [J]. Chin J Schisto Control, 1995, 7: 83-86. (in Chinese)
(洪青标, 周晓农, 孙乐平, 等. 不同地区不同环境类型钉螺对日本血吸虫易感性的测定 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7: 83-86.)
- [8] Zhou YB, Jiang QW, Zhao GM, et al. Appropriate sample size and molecular marker loci in the study of genetic diversity of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Epidemiol, 2005, 26: 951-954. (in Chinese)
(周艺彪, 姜庆五, 赵根明, 等. 湖北钉螺 AFLP 分子标记遗传多样性研究的合理样本量与分子位点数 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26: 951-954.)
- [9] Zhou YB, Jiang QW, Zhao GM. Application of amplified fragment length polymorphism in the study of genetic diversity of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Schisto Control, 2005, 17: 34-38. (in Chinese)
(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 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17: 34-38.)
- [10] Bloom GC, Gieser P, Lazaridis EN. Linking image quantitation and data analysis [A]. Looney SW. Biostatistical methods [C]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002, 15-27.

(下转第 34 页)

ELISA 检测兔抗重组融合蛋白 AP33 血清, 10 例广州管圆线虫雌性成虫超声粉碎上清包被的阴性对照孔的 A_{490} 均值 $\pm s = 0.183 \pm 0.037$, 阳性标准 A_{490} 值 = 0.294; 96.9% (31/32) 的阴道毛滴虫虫株 AP33 蛋白检测结果阳性, 其 A_{490} 均值 = 0.35~1.95。

讨 论

本实验克隆的 *Tv317* 虫株 ap33 基因核苷酸序列与已报道的 3 个 ap33 基因序列比较, 核苷酸和氨基酸序列同源性较高, 提示 *Tv317* 虫株 ap33 基因核苷酸和氨基酸序列变异程度与国外文献报道相似。

本实验构建的 pET32a(+)-ap33-BL21DE3 系统虽为 T7 启动子, 但在 IPTG 较低浓度时 (0.1 mmol/L) 也能很好地诱导重组融合蛋白 AP33 的表达, 其表达量高达细菌总蛋白的 35% 左右, 并主要以包涵体形式存在。Western blotting 结果证实, 重组融合蛋白 AP33 能与抗阴道毛滴虫全虫抗体结合, 证明其具有良好的抗原性; 免疫双扩散试验证实, 重组融合蛋白 AP33 免疫家兔后能产生高效价抗体, 阴道毛滴虫全虫超声粉碎上清包被 ELISA 检测结果证实, 重组融合蛋白 AP33 免疫家兔后产生的高效价抗体能与阴道毛滴虫全虫超声粉碎上清中的天然 AP33 蛋白结合, 说明重组融合蛋白 AP33 中的重组蛋白 AP33 具有良好的免疫原性。

常规的生理盐水涂片法检出率为 35%~80%^[1], 其敏感性受多种因素影响, 如镜检者的经验、阴道棉签拭子法的操作、镜检时的温度和标本保存时间等, 尤其男性感染者生理盐水涂片法检测敏感性只

有 9.7%~22.3%^[5]。

本研究用重组融合蛋白 AP33 包被 ELISA 检测结果表明, 96.9% 的阴道毛滴虫临床分离虫株表达 AP33 蛋白。78.0% 经染色、镜检确诊为滴虫性阴道炎患者血清中存在抗 AP33 蛋白特异性抗体。检测敏感性为 78.0%, 特异性为 100%。检测稳定性高, 重复性好, 血清标本保存时间长。

综上所述, 本实验从 *T. v* 临床分离虫株中构建了 ap33 基因高效表达系统 pET32a(+)-ap33-BL21DE3, 所表达的重组融合蛋白 AP33 均有良好的抗原性和免疫原性, 可作为阴道毛滴虫感染诊断试剂盒用抗原, 解决了阴道毛滴虫高纯度诊断抗原的来源问题, 也有利于诊断方法的标准化。

参 考 文 献

- [1] Draper D, Parker R, Patterson E, et al. Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the InPouch Tv culture system[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31: 1016-1018.
 - [2] Arroyo R, Engbring JA, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*[J]. Mol Microbiol, 1992, 6: 853-862.
 - [3] Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesin display molecular mimicry to metabolic enzymes[J]. Adv Exp Med Biol, 1996, 408: 207-223.
 - [4] Engbring JA, Alderete JF. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence[J]. Mol Microbiol, 1998, 28: 305-313.
 - [5] Xie H, Huang HC, Pan CW, et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* in male urethritis[J]. Chin J Parasit Dis Con, 2002, 15: 148-150. (in Chinese)
(谢辉, 黄慧聪, 潘长旺, 等. 男性尿道炎患者阴道毛滴虫感染情况调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15: 148-150.)
- (收稿日期: 2005-05-30 编辑: 富秀兰)

(上接第 30 页)

- [11] Zhou YB, Jiang QW, Zhao GM, et al. Analysis of Genetic diversity of AFLP marker within populations of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 396-400. (in Chinese)
(周艺彪, 姜庆五, 赵根明, 等. 湖北钉螺 AFLP 分子标记电泳图像信息数量化数据的分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 396-400.)
 - [12] Luch M. The similarity index and DNA finger printing [J]. Mol Biol Vol, 1990, 7: 478-484.
 - [13] Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, et al. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 139-151.
 - [14] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1973, 70: 3321-3323.
 - [15] Lewontin RC. The apportionment of human diversity [J]. Evol Biol, 1972, 6: 381-398.
 - [16] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
 - [17] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
 - [18] Otsen M, den Bieman M, Kuiper MT, et al. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat [J]. Genomics, 1996, 37: 289-294. (in Chinese)
 - [19] Zhou YB, Jiang QW, Zhao GM. Development of research in genetic diversity of *Oncomelania hupensis* and its molecular systematics [J]. Chin J Schisto Control, 2005, 17: 391-396. (in Chinese)
(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 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17: 391-396.)
 - [20] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China [J]. Malacologia, 1995, 37: 133-156.
- (收稿日期: 2005-09-26 编辑: 富秀兰)