

荧光原位杂交技术在血吸虫生物学中的应用及进展

莫筱瑾, 冯正, 胡薇*

【提要】 血吸虫病是危害最为严重的寄生虫病之一。深入探索血吸虫功能基因可为该病的诊断、疫苗和药物靶点研究提供基础和依据。荧光原位杂交技术可用于血吸虫的功能基因在染色体上定位、构建基因组物理图谱和染色体识别等方面的研究。本文就荧光原位杂交技术在血吸虫研究中的应用, 以及将来可行的研究方向作一简要综述。

【关键词】 血吸虫; 荧光原位杂交; 功能基因; 染色体定位; 基因组物理图谱

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

Application and Progress of Fluorescence *in situ* Hybridization in Schistosome Biology

MO Xiao-jin, FENG Zheng, HU Wei*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Schistosomiasis is one of the most serious parasitic diseases. Schistosome genes research provides the basis for study of schistosomiasis diagnosis, vaccine and drug targets. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in schistosome focuses on researches of location of functional genes on chromosomes, genome physical mapping and chromosome identification. This article reviews the application of FISH in schistosome biology and its potential development.

【Key words】 Schistosome; Fluorescence *in situ* hybridization; Functional gene; Location on chromosomes; Genome physical mapping

Supported by the National Major Special Science and Technology Project of China (No. 2009ZX10004-302)

* Corresponding author, E-mail: hubeixf@yahoo.com

寄生于人体的血吸虫主要有 6 种, 其中以日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)、埃及血吸虫(*S. haematobium*)和曼氏血吸虫(*S. mansoni*)引起的血吸虫病流行范围最广, 危害最大^[1]。

控制和消灭血吸虫病需要有效的防治手段。在药物治疗方面, 吡喹酮是治疗血吸虫病的惟一特效药^[2], 随着对其广泛、持续的使用, 血吸虫对其的耐药性越来越受到关注^[3]; 在疫苗方面, 现有的各种疫苗诱生的保护力较低。开展血吸虫功能基因的深入研究, 分析血吸虫不同阶段基因表达与调控, 了解各功能基因在虫体代谢和免疫等途径中的作用, 有助于解释基因间相互调控的机制, 更好地理解血吸虫的生长发育过程, 及其与宿主间的相互作用, 便于寻找和筛选新的

潜在药物靶点和候选疫苗靶点^[4]。

荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是一种最直接的分析 DNA 序列在染色体或 DNA 分子上排列的分子细胞遗传学技术, 现已广泛应用于动植物遗传学研究中^[5,6]。在临床、产前诊断、肿瘤细胞遗传学和人类基因组研究中, FISH 技术被用于鉴定导致人类遗传病和恶性肿瘤的染色体结构和数目畸变、检测肿瘤组织细胞中基因序列突变和构建人类基因组的物理图谱等, 为基因诊断和肿瘤分析提供了可靠的证据, 为疾病相关基因的发现提供了很好的切入点^[7-9]。此外, FISH 技术也被用于鱼类和植物遗传学研究, 包括鱼类的基因定位、性别鉴定和染色体变异, 以及植物的起源进化、染色体识别、细胞遗传图谱构建和育种等^[10,11]。

基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治” 科技重大专项 (No. 2009ZX10004-302)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: hubeixf@yahoo.com

1 FISH 技术的建立

早期的原位杂交技术是采用放射性标记的 RNA 或 DNA 作为探针, 结合放射自显影的方法, 检测杂

交核酸在细胞内或染色体上的具体位置。例如, 1969 年, Gall 等^[12,13]将标记有氘的核糖体核糖核酸(ribosomal RNA, rRNA)作为探针与细胞中的核糖体脱氧核糖核酸(ribosomal DNA, rDNA)杂交, 或是将放射性标记的 DNA 与 DNA 杂交, 均采用放射自显影的方法来检测核酸杂交信号。

考虑到放射性标记探针不易长期保存、实验材料处理复杂、辐射分解和实验人员安全等问题, 建立了一系列非放射性方法^[14]。例如, 1977 年, Green^[15]发现在生物素与亲和素之间有着异常牢固的特异反应, 使得生物素成为理想的核酸标记试剂。1982 年, Manuclidis 等^[16]用生物素标记核酸, 随后用抗生物素抗体进行检测。这些方法在获得稳定的杂交探针的同时, 减少了非特异背景信号, 缩短了定位检测时间, 提高了实验结果分辨率^[17]。

1977 年, Rudkin 等^[18]用标记有荧光素罗丹明的羊抗兔免疫球蛋白(IgG)抗体检测 DNA-RNA 原位杂交物, 首次将荧光素引入原位杂交中。1980 年, Bauman^[19]首次将荧光原位杂交技术用于杂交核酸检测, 直接将 RNA-3'端用荧光素标记作为探针, 用荧光显微镜检测探针与靶序列 DNA 的杂交信号。

2 FISH 技术的特点

荧光原位杂交技术是将 DNA(或 RNA)探针用特殊的核苷酸分子标记, 然后将探针直接杂交到染色体或 DNA 纤维上, 再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合, 来研究 DNA 序列在染色体或 DNA 纤维上的定性、定位和相对定量的分析技术。荧光原位杂交技术不但可用于已知基因或序列的定位, 而且也可用于未知基因或遗传标记及染色体畸变的研究, 在研究基因的定性、定量、整合和表达等方面颇具优势^[20-22]。由于 DNA 分子在染色体上沿着染色体纵轴呈线性排列, 因此在探针直接与染色体进行杂交时, 可将特定基因定位在染色体上, 所以该技术也常用于绘制物理图谱。

荧光原位杂交技术具有安全、快速、灵敏度高、检测信号强、杂交特异性高和能同时显示多种颜色等优点, 不但能显示染色体中期分裂相, 还能显示间期核^[23]。与原位杂交技术相比, 荧光原位杂交技术在灵敏度方面有显著提高, 信号与载体的颜色对比鲜明, 利用不同荧光素可同时定位多个靶序列。此技术能将探针直观地定位到染色体臂上; 能检测出相应探针在基因组中不具有任何表型的同源序列^[24]; 能印证基因的遗传图谱, 比较物理图谱与遗传图谱间的差别; 还可以了解基因位置与功能间的相互关系, 探讨基因在

染色体上的分布规律^[20]。

但对于较短的 DNA 序列或简单串联重复序列, 因其杂交效率不高, 不作为探针在 FISH 技术中使用。此外, 若基因组中存在高比例的重复序列, 将导致单拷贝或寡拷贝 DNA 序列在染色体上的分布不连续, 很难产生清晰可辨的 FISH 信号^[25]。

3 FISH 技术在血吸虫研究中的应用

在曼氏血吸虫研究中, 已有报道应用 FISH 技术对曼氏血吸虫多种功能基因进行深入研究, 明确了它们在染色体上的分布^[26-30], 获得了曼氏血吸虫基因组物理图谱^[31,32]。这些研究对日本血吸虫研究有很好的借鉴作用, 有助于寻找和筛选日本血吸虫新的潜在药物靶点和候选疫苗靶点。

3.1 FISH 技术在血吸虫染色体定位研究中的应用

1989 年, 为了解血吸虫遗传特性, Hirai 等^[33]首次将荧光原位杂交技术应用在血吸虫研究中, 发现 DNA 重复片段 Sma 散在分布于曼氏血吸虫 16 条染色体上, 而 rDNA 定位于 3 号染色体短臂上。同时, 研究也表明, 荧光原位杂交技术在检测探针信号方面特异性好、敏感性高、背景低, 明显优于碱性磷酸酶检测方法^[33]。

3.2 FISH 技术在血吸虫功能基因定位研究中的应用

3.2.1 与染色体结构相关的功能基因 端粒是真核生物线性染色体分子末端的一个独特结构, 在维持染色体结构的完整性方面起着至关重要的作用。Hirai 等^[26]以含有端粒核心序列(TTAGGG)的核酸序列为探针, 与曼氏血吸虫 8 对染色体进行荧光原位杂交, 发现每条染色体末端都有荧光信号, 证明曼氏血吸虫有着类似于人和其他脊椎动物的端粒序列。

3.2.2 与细胞核受体相关的功能基因 细胞核受体属于一个转录因子超家族, 调控着分化、蜕化和复制等过程。细胞核受体一般由以下几部分组成: 靠近 N 端的 A/B 结构域、DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD)、铰链区(hinge)和配体结构域(ligand binding domain, LBD)^[34,35]。细胞核受体通过 DBD 与靶基因的启动子区结合, 再与结合在 LBD 的共调节子一起, 激活或抑制 mRNA 的合成^[36]。曼氏血吸虫 DNA 结合结构域-核酸受体(2DBD-NRs) cDNAs 有 3 种亚型(Sm2DBD α , 5 144 bp; Sm2DBD β , 5 525 bp; Sm2DBD γ , 6 374 bp), 它们的蛋白质结构上均有 2 个 DBD, 即形式为 A/B-DBD-DBD-hinge-LBD^[37]。Wu 等^[27]分别将 3 个细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)克隆 DNA 定位在完全不同的染色体上, 而这 3 个细菌人工染色体克隆分别含有曼氏血吸

虫 2DBD-NRs 核酸受体 3 种亚型的基因序列, 即 Sm2DBD α 定位于 1 号染色体, Sm2DBD γ 定位于 4 号染色体, Sm2DBD β 则同时定位于性染色体(Z/W)和 3 号染色体。由于 Sm2DBD β 定位于 ZW 常染色质区, 不同于以往重复序列易杂交在 W 异染色质区的情况, 所以研究者认为存在 2 个不同的 Sm2DBD β 拷贝。此外, 还推测在扁型动物门未分化前, 这 3 种核酸受体亚型就已经存于不同染色体上了。Wu 等^[38]则将含有曼氏血吸虫细胞核受体 1 (SmNR1) 序列的细菌人工染色体克隆 DNA 定位于曼氏血吸虫 1 号染色体上。SmNR1 是在各种核酸信号通路中起关键作用的配体之一^[39]。

3.2.3 与核糖体相关的功能基因 含有核定位信号的乳腺碱性保守蛋白 1 (breast basic conserved protein 1, BBC1) 参与细胞的生长发育过程^[40], 同时人 BBC1 蛋白与鼠 60S 核糖体蛋白 L13 (ribosomal protein L13, RL13) 有 96.2% 的同源性, 有可能是核糖体的一部分^[41]。Franco 等^[42]将含有曼氏血吸虫 BBC1/RL13 部分基因的 DNA 片段同时定位于曼氏血吸虫 3 号染色体和 W 染色体异染色质区, 推测定位于不同染色体上的基因可能是具有相同功能的同一拷贝, 或是部分同源的相关基因, 或其中之一是该功能基因的假基因。

3.2.4 血吸虫雌虫特有的功能基因 Hirai 等^[28]将在血吸虫雌虫卵黄细胞中表达的 2 个卵壳蛋白前体基因 (p14 和 p48) 定位在曼氏血吸虫 2 号染色体上, 1 个曾作为血吸虫尾蚴性别检测探针的曼氏血吸虫雌虫特有的 DNA 重复序列 (pW1) 则被证实定位于曼氏血吸虫 W (雌性) 染色体长臂的异染色质区^[43]。这一结果表明 W 染色体上异染色质区是通过阻止 ZW 二价体交叉的形成^[26], 来保持 W 染色体上异染色质区雌虫特异 DNA 片段的稳定遗传^[40]。

3.2.5 与血吸虫基因表达相关的功能基因 可移动遗传原件 (mobile genetic elements, MGEs) 被认为在真核生物进化中起着重要的作用, 而反转录转座子就是其中一类。在曼氏血吸虫基因组中, 反转录转座子占整个基因组的 20% 以上^[44]。反转录转座子分为长末端重复 (long terminal repeat, LTR) 和非长末端重复 (non-long terminal repeat, non-LTR) 两类^[29]。Boudicca 是 LTR 反转录转座子, 而 Perere 03 基因则属于 non-LTR 反转录转座子, 2 个基因在曼氏血吸虫基因组中均以高拷贝数存在^[45]。Valentim 等^[29]将含有反转录转座子 Boudicca 的 BAC 克隆 DNA 定位在曼氏血吸虫 2 号染色体和性染色体 Z 上; 而后又将 Perere 03 基因也定位在曼氏血吸虫 2 号染色体上, 并推测分布于 2 号染色体上的其他基因极有可能也是在反转录转座子

活动中发挥关键作用的调控序列。

3.2.6 与血吸虫代谢相关的功能基因 血吸虫缺乏从头开始的嘌呤核苷酸合成途径, 依赖于嘌呤补救途径获取核苷酸。腺苷酸基琥珀酸是一种参与嘌呤补救途径的酶^[46]。Fouk 等^[30]将含有曼氏血吸虫腺苷酸基琥珀酸裂解酶基因的细菌人工染色体克隆定位在曼氏血吸虫 2 条性染色体长臂上, 为曼氏血吸虫遗传图谱增加了一个新的位点, 有利于将来整个基因组的测序。结合曼氏血吸虫细菌人工染色体文库筛选数据, Fouk 等^[30]推测腺苷酸基琥珀酸裂解酶基因在曼氏血吸虫基因组中可能是以单拷贝形式存在的。

3.2.7 与血吸虫生长发育相关的功能基因 首次在果蝇中发现的同源盒 (Hox) 基因簇是编码转录因子、调控胚胎发育的一组基因^[47]。基因簇中各成员的空间表达具有共线性, 即该簇中靠近 3' 的基因成员表达先于胚胎发育, 而 5' 的基因成员表达则在胚胎发育之后^[48]。Pierce 等^[49]对曼氏血吸虫 Hox (*S. mansoni* Hox, SmHox) 基因簇中 4 个成员 (SmHox8、SmHox4、SmHox1 和 Smox1) 进行研究, 发现含有 SmHox8 和 SmHox4 基因的 BAC 克隆 DNA 定位于曼氏血吸虫 4 号染色体, 含有 SmHox1 和 Smox1 基因的 BAC 克隆 DNA 则定位于 3 号染色体。而在节肢动物和脊椎动物中, Smox1 是在 SmHox8 和 SmHox4 之间的。Pierce 等^[49]推测 Hox 基因簇顺序先发生了改变, 进而 SmHox1 和 Smox1 形成新的组合, 转移至 3 号染色体。

Fitzpatrick 等^[50]发现曼氏血吸虫酪氨酸酶 1 型和 2 型 (*S. mansoni* tyrosinase, SmTYR1/SmTYR2) 的二酚氧化酶活性影响虫卵卵壳的形成和成熟。应用荧光原位杂交技术将含有这 2 种曼氏血吸虫酪氨酸酶基因的 BAC 克隆 DNA 同时定位于曼氏血吸虫 4 号染色体和 W 性染色体上。Fitzpatrick 等^[50]认为, 抑制曼氏血吸虫酪氨酸酶的表达, 或针对其设计药物, 有可能成为抗血吸虫病可行的治疗方法和限制血吸虫虫卵传播的有效策略。

3.2.8 参与血吸虫与宿主相互作用的功能基因 曼氏血吸虫毒液类致敏原 (*S. mansoni* venom allergen-like, SmVAL) 基因簇与宿主/寄生虫间慢性相互作用有关。Chalmers 等^[51]先经 PCR 证明, 在同一个 BAC 克隆 DNA 序列中同时存在 3 个不同的曼氏血吸虫 SmVAL 基因簇 (SmVAL2/SmVAL8/SmVAL12), 而后将此 BAC 克隆 DNA 定位在曼氏血吸虫 6 号染色体的长臂和 W 染色体短臂上。结合曼氏血吸虫基因组数据, Chalmers 等^[51]证明在整个曼氏血吸虫基因组中, 许多 SmVAL 基因簇是以空间连锁形式存在的。

血吸虫成虫利用超氧化物歧化酶 (superoxide dis-

mutase, SOD)的歧化作用,将氧负离子(O_2^-)转变为过氧化氢(H_2O_2)和氧气(O_2)^[52],以逃避宿主的免疫反应^[53],而胞浆超氧化物歧化酶(cytosolic SOD, CT-SOD)是具有铜/锌结构的 SOD 中的一种^[54]。Mei 等^[55]应用荧光原位杂交技术,证实由酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)文库筛选得到的 2 个含有 CT-SOD 基因拷贝的 YAC 克隆 DNA 分别定位在曼氏血吸虫 1 号染色体和 3 号染色体上。

3.3 FISH 技术在血吸虫基因组物理图谱构建研究中的应用 物理图谱是描绘(基因组)DNA 上可识别标记的位置和相互之间的距离的图谱,分辨率约为 1~3 Mb,是基因作图简单、有效、准确和可靠的方法^[24]。一个完整的物理图谱是由分布于整个基因组中相互重叠的重组 DNA 克隆所构成的,对于遗传基因的排列和编码信息的获取有着重要作用^[55,56]。而基因组物理图谱是指一系列 DNA 限制性酶切片段沿染色体的有序排列形式。基因组物理图谱能反映基因组中基因或标记间的实际距离,是基因组组织结构的真实反映;它所容纳的信息量大,不仅包含了基因的编码区,也包含了内含子和基因的调控区;它对研究基因的结构、功能、时空表达调控和基因间关系有着极为重要的作用。通过一些模式生物全基因组物理图谱基因组序列分析找到大量的功能基因,发展新的分子标记以增强遗传图谱上分子标记的密度,加速基因图位克隆(map-based cloning)的进程^[57]。

1995 年, Hirai 等^[58]建立了应用荧光原位杂交技术构建曼氏血吸虫基因组物理图谱的方法。同年, Tanaka 等^[31]将随机选取的 100 个曼氏血吸虫酵母人工染色体克隆中的 77 个 YAC 克隆 DNA 定位在曼氏血吸虫 8 对染色体上,构建了曼氏血吸虫基因组物理图谱;尤其要指出的是定位在 3 号染色体上的 14 个 YAC 克隆完全覆盖了整条染色体。2000 年, Le Paslier 等^[59]在构建完成的曼氏血吸虫细菌人工染色体文库中选择了 8 个细菌人工染色体克隆,并将这 8 个细菌人工染色体克隆的 DNA 分别定位在曼氏血吸虫 1 (2 个克隆)、2、3、5 号和 ZW (3 个克隆)性染色体上,补充了曼氏血吸虫 BAC 文库筛选和末端测序的数据,同时说明这些 BAC 克隆广泛分布于整个曼氏血吸虫基因组中,可以为物理图谱和测序研究提供新资源。在此基础上,2009 年, Berriman 等^[32]将 43%曼氏血吸虫基因组序列定位在包括性染色体在内的 8 对曼氏血吸虫染色体上。

3.4 FISH 技术在血吸虫染色体识别研究中的应用 血吸虫 8 对染色体可用 C 显带方法进行识别,但 5、6 和 7 号染色体尺寸小、形态相近、带型类似,识别较

为困难^[60]。Taguchi 等^[61]采用染色体显微解剖技术和染色体的体外扩增技术(degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction, DOP-PCR),获得 3 种不同 DNA,它们分别针对 5、6 和 7 号整条染色体,随后用生物素或地高辛标记这 3 种 DNA 作为探针,结合荧光原位杂交技术,根据染色体所显示的不同荧光颜色,可以清楚的识别曼氏血吸虫 5 (绿色)、6 (粉色)和 7 号(黄色)染色体。

4 结语

2009 年,日本血吸虫全基因组草图公布,整个基因组大小为 397 Mb,编码近 14 000 个基因。但是由于采用的是鸟枪法结合 BAC 克隆末端测序的策略,仍然有小于 10%基因序列(gap)未能获得^[62],并且已获得的基因组序列信息在染色体上的分布情况仍不得而知,影响了对日本血吸虫功能基因的分析 and 挖掘。因此,可考虑用荧光原位杂交技术构建日本血吸虫基因组物理图谱,来帮助基因组精细测序和了解功能基因在染色体上的分布,为进一步了解日本血吸虫生物学特性提供依据。

参 考 文 献

- [1] McManus DP, Gray DJ, Li Y, *et al.* Schistosomiasis in the People's Republic of China: the era of the Three Gorges Dam[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 442-466.
- [2] Chen MG. Use of praziquantel for clinical treatment and morbidity control of schistosomiasis japonica in China: a review of 30 years' experience[J]. Acta Trop, 2005, 96(2): 168-176.
- [3] Fenwick A, Webster JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance[J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(6): 577-582.
- [4] Shao X, Wu ZD, Yu XB. Era of postgenome in schistosome research[J]. J Trop Med, 2004, 4(1): 98-100. (in Chinese) (邵筱, 吴忠道, 余新炳. 后基因组时代的血吸虫研究[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(1): 98-100.)
- [5] Heiskanen M, Peltonen L, Palotie A. Visual mapping by high resolution FISH[J]. Trends Genet, 1996, 12(10): 379-382.
- [6] Jiang LM, Gill BS. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years[J]. Genome, 1994, 37(5): 717-725.
- [7] Choi SS, Kang YS, Kim UJ, *et al.* Chromosomal localization of ESTs obtained from human fetal liver *via* BAC-mediated FISH mapping[J]. Mol Cells, 1999, 9(4): 403-409.
- [8] Fox JL, Hsu PH, Legator MS *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis[J]. Clin Chem, 1995, 41(11): 1554-1559.
- [9] Mecucci C. FISH (fluorescent *in situ* hybridization): the second youth of cytogenetics[J]. Haematologic, 1995, 80(2): 95-97.
- [10] Quan JX, Dai JX. Current and future application of fluorescence *in situ* hybridization techniques to fish genetics[J]. Zool Res, 1999, 20(3): 225-229. (in Chinese) (权洁霞, 戴继勋. 荧光原位杂交技术在鱼类遗传学研究中的应用及前景[J]. 动物学研究, 1999, 20(3): 225-229.)
- [11] Koumbaris GL, Bass HW. A new single-locus cytogenetic mapping system for maize (*Zea mays* L.): overcoming FISH detection

- limits with marker-selected sorghum (*S. propinquum* L.) BAC clones [J]. Plant J, 2003, 35(5): 647-659.
- [12] Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cyrological preparations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1969, 63(2): 378-383.
- [13] Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1969, 64(2): 600-604.
- [14] Manning JE, Hershey ND, Broker TR, et al. A new method of *in situ* hybridization[J]. Chromosoma, 1975, 53(2): 107-117.
- [15] Green NM. Avidin[J]. Adv Protein Chem, 1975, 29: 85-133.
- [16] Manuelidis L, Langer-Safer PR, Ward DC. High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes[J]. J Cell Biol, 1982, 95(2): 619-625.
- [17] Langer-safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79(14): 4381-4385.
- [18] Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence[J]. Nature, 1977, 265(5593): 472-473.
- [19] Bauman JG, Wiegant J, Borst P, et al. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome labelled RNA [J]. Exp Cell Res, 1980, 128(2): 485-490.
- [20] Lv YT, Wang L, Ning SB, et al. Progresses and applications of fluorescence *in situ* hybridization[J]. Acta Botan Sin, 2000, 42(11): 1101-1107. (in Chinese)
(吕应堂, 王玲, 宁顺斌, 等. 荧光原位杂交技术的发展与应用[J]. 植物学报, 2000, 42(11): 1101-1107.)
- [21] Liang Y, Wang SY, Jia CW. Progress of fluorescence *in situ* hybridization[J]. Chin J Birth Hlth Heredity, 2005, 13(5): 119-120. (in Chinese)
(梁毓, 王树玉, 贾婵维. 荧光原位杂交技术的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(5): 119-120.)
- [22] Zhong XB, Fransz PF, de Jong JH, et al. High resolution physical mapping by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Hereditas, 1997, 19(3): 44-48. (in Chinese)
(钟筱波, Fransz PF, de Jong JH, 等. 用荧光原位杂交技术构建高分辨率的 DNA 物理图谱[J]. 遗传, 1997, 19(3): 44-48.)
- [23] Stephens JL, Brown SE, Lapitan NL, et al. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique[J]. Genome, 2004, 47(1): 179-189.
- [24] Ning SB, Song YC, Wang L, et al. Maize *nacl* and *cll* genes map to chromosome arms 10L and 2S, and to 4L and 5L, respectively[J]. Chromosome Res, 2000, 8(3): 273.
- [25] Bie TD, Zhang BQ, Gao DR, et al. Application of *in situ* hybridization in plant molecular cytogenetics research[J]. Chin Agr Sci Bull, 2008, 24(11): 85-92. (in Chinese)
(别同德, 张伯桥, 高德荣, 等. DNA 分子原位杂交在植物分子细胞遗传学中的应用[J]. 中国农学通报, 2008, 24(11): 85-92.)
- [26] Hirai H, LoVerde PT. Identification of the telomeres on *Schistosoma mansoni* chromosomes by FISH[J]. J Parasitol, 1996, 82(3): 511-512.
- [27] Wu W, Niles EG, Hirai H, et al. Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contain two DNA binding domains[J]. BMC Evol Biol, 2007, 7: 27.
- [28] Hirai H, Tanaka M, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: chromosomal localization of female-specific genes and a female-specific DNA element[J]. Exp Parasitol, 1993, 76(2): 175-181.
- [29] Brindley PJ, Laha T, McManus DP, et al. Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites[J]. Trends Parasitol, 2003, 19(2): 79-87.
- [30] Foulk BW, Pappas G, Hirai Y, et al. Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(12): 1487-1495.
- [31] Tanaka M, Hirai H, LoVerde PT, et al. Yeast artificial chromosome (YAC)-based genome mapping of *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 69(1): 41-51.
- [32] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*[J]. Nature, 2009, 460(7253): 352-358.
- [33] Hirai H, Spotila LD, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: chromosomal localization of DNA repeat elements by *in situ* hybridization using biotinylated DNA probes[J]. Exp Parasitol, 1989, 69(2): 175-188.
- [34] Wurtz JM, Bourguet W, Renaud J P, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors[J]. Nat Struct Biol, 1996, 3(2): 206.
- [35] Renaud JP, Moras D. Structural studies on nuclear receptors[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(12): 1748-1769.
- [36] Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(3): 384-391.
- [37] Wu W, Niles EG, LoVerde PT, et al. *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: sixteen new members and a novel subfamily[J]. Gene, 2006, 366(2): 303-315.
- [38] Wu W, Niles EG, Hirai H, et al. Identification and characterization of a nuclear receptor subfamily I member in the Platyhelminth *Schistosoma mansoni* (SmNR1)[J]. FEBS J, 2007, 274(2): 390-405.
- [39] Leid M, Kastner P, Lyons R, et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently[J]. Cell, 1992, 68(2): 377-395.
- [40] Adams SM, Helps NR, Sharp MG, et al. Isolation and characterization of a novel gene with differential expression in benign and malignant human breast tumours[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(2): 91-96.
- [41] Olvera J, Wool IG. The primary structure of rat ribosomal protein L13 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201(1): 102-107.
- [42] Franco GR, Tanaka M, Simpson AJ, et al. Characterization of a *Schistosoma mansoni* homologue of the gene encoding the breast basic conserved protein 1/L13 ribosomal protein[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998, 120(4): 701-708.
- [43] Gasser RB, Morahan G, Mitchell GF. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 47(2): 255-258.
- [44] Laha T, Brindley PJ, Verity CK, et al. Pido, a non-long terminal repeat retrotransposon of the chicken repeat I family from the genome of the Oriental blood fluke, *Schistosoma japonicum*[J]. Gene, 2002, 284(1): 149-159.
- [45] DeMaeco R, Machado AA, Bisson AW, et al. Identification of 18 new transcribed retrotransposons in *Schistosoma mansoni*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333(1): 230-240.
- [46] Senft AW, Miech RP, Brown PR, et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*[J]. Int J Parasitol, 1972, 2(2): 249-260.
- [47] McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning [J]. Cell, 1992, 68(2): 283-302.
- [48] Slack JM, Holland PW, Graham CF. The zootype and the phylogenetic stage[J]. Nature, 1993, 361(6412): 490-492.
- [49] Pierce RJ, Wu W, Hirai H, et al. Evidence for a dispersed Hox gene cluster in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(12): 2491-2503.
- [50] Fitzpatrick JM, Hirai Y, Hirai H, et al. *Schistosoma* egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases[J]. FASEB J, 2007, 21(3): 823-835.
- [51] Chalmers IW, McArdle AJ, Coulson RM, et al. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (Sm-

- of endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 isolated from soil of China[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2011, 29(2): 81-83. (in Chinese)
(玄英花, 崔春权, 郑善子. 棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 共生细菌的 16S rDNA 序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(2): 81-83.)
- [30] Yagita K, Endo T. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan[J]. J Protozool, 1990, 37(6): 570-575.
- [31] Bogler SA, Zarley CD, Burianek LL, et al. Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis[J]. Mol Biochem Parasitol, 1983, 8(2): 145-163.
- [32] Kong HH. Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba* [J]. Korean J Parasitol, 2009, 47(1): 21-28.
- [33] Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, et al. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: Four nuclear 18S rDNA sequence types[J]. J Euk Microbiol, 1996, 43(6): 498-504.
- [34] Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the eight new 18S rRNA gene sequence type[J]. J Euk Microbiol, 1998, 45(1): 45-54.
- [35] Hom M, Fritsche TR, Gautom RK, et al. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter carphillus* [J]. Environ Microbiol, 1999, 1(4): 357-367.
- [36] Li HH, Xuan YH, Zheng SZ. Genotype identification of the 18S rDNA in *Acanthamoeba* species isolated from tap water in Yanji City[J]. Chin J Zooses, 2009, 25(12): 1215-1217. (in Chinese)
(李红花, 玄英花, 郑善子. 自延吉市自来水分离的棘阿米巴 18S rDNA 基因型鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(12): 1215-1217.)
- [37] Zheng SZ, Xuan YH, Wang YH, et al. Genetic identification of *Acanthamoeba* spp. CJY/S1 and CJY/S2 isolated from soil[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(5): 391-392. (in Chinese)
(郑善子, 玄英花, 王月华, 等. 从土壤中分离的棘阿米巴属 CJY/S1 和 CJY/S2 株的 18S rDNA 基因型鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(5): 391-392.)
- [38] Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, et al. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visves vara 1992 (Lobosea: Acanthamoeba)[J]. Acta Protozool, 2003, 42(2): 325-329.
- [39] Di Cave D, Monno R, Bottalico P, et al. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(6): 607-612.
- [40] Booton GC, Kelly YW, Seal DV, et al. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hongkong[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(5): 1621-1625.
- [41] Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(8): 755-760.
- [42] Nuprasert W, Putaporntip C, Parivakanok L, et al. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4636-4640.
- [43] Lorenzo-Morales J, Morcillo-Laiz R, Martin-Navarro CM, et al. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain[J]. Cont Lens Anterior Eye, 2010, 34(2): 83-86.
(收稿日期: 2011-02-22 编辑: 衣凤芸)

(上接第 228 页)

- VAL) gene family[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 89.
- [52] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)[J]. J Biol Chem, 1969, 244(22): 6049-6055.
- [53] Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?[J]. Parasitol Today, 1988, 4(8): 218-225.
- [54] Simurda MC, Van KH, Rekosh DM, et al. *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn) [J]. Exp Parasitol, 1988, 67(1): 73-84.
- [55] Mei H, Hirai H, Tanaka M, et al. *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of a gene encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase[J]. Exp Parasitol, 1995, 80(2): 250-259.
- [56] Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, et al. A second-generation linkage map of the human genome[J]. Nature, 1992, 359(6398): 794-801.
- [57] Zhang D, Zhu HC, Huang LY. Bacterial artificial chromosome and its use in genomics[J]. Lett Biotechnol, 2003, 14(5): 406-409. (in Chinese)
(张达, 朱厚础, 黄留玉. 细菌人工染色体及其在基因组学研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(5): 406-409.)
- [58] Hirai H, LoVerde PT. FISH techniques for constructing physical maps on schistosome chromosomes[J]. Parasitol Today, 1995, 11(8): 310-314.
- [59] Le Paslier MC, Pierce RJ, Merlin F, et al. Construction and characterization of a *Schistosoma mansoni* bacterial artificial chromosome library[J]. Genomics, 2000, 65(2): 87-94.
- [60] Hirai H, Taguchi T, Saitoh Y, et al. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(4): 441-452.
- [61] Taguchi T, Hirai Y, LoVerde PT, et al. DNA probes for identifying chromosomes 5, 6, and 7 of *Schistosoma mansoni* [J]. J Parasitol, 2007, 93(3): 724-726.
- [62] Zhou Y, Zheng H, Liu F, et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay[J]. Nature, 2009, 460(7253): 345-351.
(收稿日期: 2011-03-09 编辑: 高石, 瞿麟平)