

# 家蚕微粒子病原虫 (*Nosema bombycis*) 小亚基核糖体 RNA 全基因的克隆及其二级结构的构建

王见杨<sup>1</sup>, 黄可威<sup>1</sup>, 陆长德<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018; 2. 中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

**摘要:** 在用 PCR 技术扩增、克隆、测序了家蚕微粒子病原虫 *Nosema bombycis* (镇江株) 小亚基核糖体 RNA 基因核心序列 (5'-端起 1 200 bp) 的基础上, 用 SSP-PCR 技术克隆了核心序列 3'-端下游序列, 从而获得了家蚕微粒子病原虫小亚基核糖体 RNA 基因的全序列共 1 233 bp。用 RnaViz、Forcon、DCSE 等生物软件构建了家蚕微粒子病原虫小亚基核糖体 RNA 的二级结构, 与其它微孢子虫及真核生物小亚基核糖体 RNA 的二级结构相比, 该二级结构缺乏螺旋 10、E10-1、11、18、E23-n 和 43。

**关键词:** 家蚕微粒子病原虫; SSP-PCR; 小亚基核糖体 RNA (SSUrRNA) 全基因; 二级结构; 螺旋

中图分类号: Q965.8; Q522 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 03-0290-06

## Analyses of small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium, *Nosema bombycis* and its secondary structure

WANG Jian-Yang<sup>1</sup>, HUANG Ke-Wei<sup>1</sup>, LU Chang-De<sup>2</sup> (1. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China; 2. Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** The nucleotide sequence (1 205 bp) of small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) of the microsporidium, *Nosema bombycis* (Zhenjiang), was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Its 3'-end was obtained using the single specific primer-PCR technique with the primers matching the highly conserved parts of SSUrRNA genes cloned. The entire coding region for SSUrRNA of *N. bombycis* (Zhenjiang) was 1 233 bp as described elsewhere. The sequence shared high homology with those of many microsporidia, especially *N. apis*. The secondary structure of the SSUrRNA was constructed with RnaViz, Forcon and DCSE. There were no helices such as 10, E10-1, 11, 18, E23-n and 43 in it.

**Key words:** *Nosema bombycis*; SSP-PCR; SSUrRNA gene; secondary structure; helix

微孢子虫类是惟一带有原核生物型核糖体的真核生物 (Peyretailade *et al.*, 1998), 即微孢子虫的核糖体不是一般真核生物的 80S 型而为原核生物的 70S 型。70S 型核糖体包含 50S 和 30S 大小两个亚基, 这两个亚基均由核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 和多种蛋白质构成。其中小亚基中的 rRNA 为 16S rRNA, 它与其它真核生物小亚基核糖体中 18S rRNA 一起常被称为小亚基核糖体 RNA (small subunit ribosomal RNA, SSUrRNA)。它的编码基因位于 rDNA 基因簇中, 该基因簇常以多拷贝形式存

在。

迄今为止, 有多株微孢子虫的 SSUrRNA 的编码基因已被克隆测序, 它们的二级结构亦有报道 (Hartskeerl *et al.*, 1993; Hatakeyama *et al.*, 1997; Gatehouse and Malone, 1998; Peyretailade *et al.*, 1998; 王见杨等, 2001a, 2001b)。由于 SSUrRNA 的编码基因具较高保守性, 因此这些已克隆的 SSUrRNA 的编码基因及其二级结构几乎均被用来确定微孢子虫的进化地位或其种属的划分。本研究采用 PCR、SSP-PCR 等技术克隆了家蚕微粒子病原虫

*Nosema bombycis* (镇江株) SSUrRNA 基因全序列, 并构建了它的二级结构, 在基因水平上为不同地理品系的家蚕微粒子病原虫及从野外昆虫中分离到的对家蚕具有病原性的不同微粒子病原虫种属关系的确定奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

家蚕微粒子病原虫由本室继代保存。继代用及对照用家蚕品种为 75 新 × 7532。大肠杆菌 *E. coli* DH12S 由中国科学院上海生化所 219 组提供。质粒 pTZ19R 购自 Pharmacia 公司, pGEM®-T 载体购自 Promega 公司, 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, DNA-zol™ 抽提试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司, RNA 酶 A 购自华美公司, 蛋白酶 K 购自 Merck 公司, 溶菌酶购自上海东风生化试剂厂。主要仪器为美国 Beckman 公司 1000 M 寡核苷酸合成仪、pH 计及 Avanti™ J-25 高速冷冻离心机, 美国 Perkin-Elmer 公司 PCR 扩增仪, Pharmacia 公司 RNA/DNA 计量仪, LI-COR 4200 DNA 测序仪。

### 1.2 家蚕微粒子病原虫的制备和纯化

将适当浓度的家蚕微粒子病原虫 (镇江株) 液涂布于新鲜桑叶, 给 3 龄起蚕添食, 待 5 龄蚕发病时, 解剖蚕体除去中肠内容物, 加适量蒸馏水, 用组织匀浆机匀浆, 经 4 层纱布过滤收集滤液, 3 500 r/min 离心 30 min, 去上清液, 剔除杂质, 留下灰白色孢子沉淀, 再以重蒸水重悬, 如此反复 4 ~ 5 次直至变为较纯的乳白色孢子为止。孢子的进一步纯化按王见杨等 (1999) 的方法进行。

### 1.3 家蚕基因组 DNA 的提取

用适量家蚕后部丝腺, 放入研钵中加入液氮反复研磨, 再加入适量基因组 DNA 抽提缓冲液 DNA-zol, 继续研磨, 加入 RNA 酶 A 至终浓度 20 μg/mL, 37℃ 水浴 1 h, 加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/mL, 混匀, 50℃ 水浴 3 ~ 4 h, 再按常规酚/氯仿方法抽提。

### 1.4 家蚕微粒子病原虫基因组 DNA 的提取

将适量纯化的家蚕微粒子病原虫孢子液于 1.5 mL Eppendorf 管中 4 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 加入 0.2 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL 混匀, 25 ~ 27℃ 水浴 1 h, 4 000 r/min, 室温离心 5 min, 去上清, 加 1 × PBS 适量, 25 ~ 27℃ 水浴 40 min, 加入 DNA 抽提液, 65℃ 水浴 1 h, 用常规酚/氯仿方法抽提。

### 1.5 PCR 引物的设计

在对 GenBank 中录入的相近种属微孢子虫的 SSUrRNA 基因序列进行分析后, 在其高度保守区设计合成了一对引物: 正向引物 P1 (5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3') 和反向引物 P2 (5'-GCAAC-CATGTTACGACTTATATCAGA-3')。引物 P1 与多种微孢子虫病原虫如 [*Nosema apis* (U97150), *Nosema algeae* (AF069063) 等] SSUrRNA 基因的第 1 ~ 22 位碱基互补, 引物 P2 与 *Nosema apis* 的第 1 189 ~ 1 214 位, *Vairimorpha lymantriae* 的第 1 192 ~ 1 217 位, *Vairimorpha necatrix* 的第 1 191 ~ 1 216 位等互补。并用 DNA-STAR 软件对我们已克隆测序的 9 种微孢子虫的 SSUrRNA 基因核心序列 (均约长于 1 200 bp) (王见杨等, 2001) 进行了同源性分析, 在 3'-端选择高度保守区合成两条用于 SSP-PCR 扩增用引物 P3、P4。这两条引物方向相同, P4 在 P3 的下游。P3: 5'-AAGATAATCTGGGTTGCACG-3' 20 bp; P4: 5'-CGTCGCTATCTAAGATGGTA -3' 20 bp。

### 1.6 SSUrRNA 基因及其下游序列的 PCR 扩增

PCR 反应体系: 50 μL, 在体系中分别含有家蚕基因组 DNA 及家蚕微粒子病原虫的基因组 DNA 60 ~ 80 ng, 引物 P1、P2 各 20 pmol (在另两次 SSP-PCR 反应中, 分别含有引物 P3 和 P4 20 pmol), dNTP 为 0.2 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 为 2 mmol/L, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, Taq DNA 聚合酶 3U, 用水补足 50 μL。PCR 循环于 Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 上进行。反应条件: 94℃ 先变性 10 min, 然后以 94℃ 30 s、64.7℃ 30 s、72℃ 30 s 为一个循环, 共循环 25 ~ 30 次后, 于 72℃ 10 min, 停止反应。反应完毕, 用 0.7% 和 2% 琼脂糖凝胶电泳分别对 3 次 PCR 扩增产物进行分析。PCR 扩增产物的回收、克隆、*E. coli* 感受态细胞的制备、连接产物的转化及克隆筛选均按 Sambrook (1989) 方法进行。

### 1.7 阳性重组质粒中外源片段的荧光双脱氧测序

由中国科学院上海生物工程中心协助完成。测序试剂盒为 “thermo-sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit” (Amersham-Pharmacia)。测序用引物为正向 5'-CACAATTCACACAAC-3', 反向 5'-TCCCAGTCACGACGT-3'。

### 1.8 家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 二级结构的构建

家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 完整的二级结构, 是在比较了欧洲 rRNA 数据库中其它种属的微孢子虫 SSUrRNA 二级结构的基础上 (de Peer

*et al.*, 1998), 用 Forcon、DCSE、Rnaviz 等生物软件构建的。

## 2 结果与讨论

### 2.1 家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 的编码基因的 PCR 扩增结果

用引物 P1、P2 对家蚕微粒子病原虫基因组 DNA 进行 PCR 扩增时, 得到明显的扩增条带, 大小在 1.2 kb 左右。而该对引物对家蚕基因组 DNA 则没有明显的扩增产物 (图 1)。这一方面确证了从家蚕微粒子病原虫基因组 DNA 中所扩增的产物不是从家蚕基因组 DNA 中扩增而来, 即不存在两种基因组 DNA 相互污染的可能。另一方面表明了家蚕 SSUrRNA 基因与家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因同源性很低, 这可能与家蚕 SSUrRNA 基因为真核生物型而微粒子病原虫 SSUrRNA 基因为原核生物型有关。

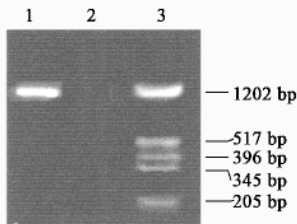


图 1 家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *Nosema bombycis* SSUrRNA gene

1. 引物 P1、P2 对 *Nosema bombycis* 基因组 DNA 的扩增结果 (Lane 1. P1, P2/*Nosema bombycis* genomic DNA);
2. 引物 P1、P2 对家蚕基因组 DNA 的扩增结果 (Lane 2. P1, P2/*Bombyx mori* genomic DNA);
3. 标准分子量对照 (Lane 3. Marker pTZ19/Hinf I)

### 2.2 家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因下游序列的 SSP-PCR 扩增结果

用引物 P3、P4 对家蚕微粒子病原虫基因组 DNA 进行 SSP-PCR 扩增时, 均特异地扩增出一条带。P3 扩增的条带相对较长, 为 700~800 bp, 带较亮, 而 P4 扩增的带为 500~600 bp, 量较少。而这两个引物对家蚕基因组 DNA 则均未显示出明显的扩增产物 (图 2)。由于引物 P3 在引物 P4 的上游, 与已测定的 SSUrRNA 基因序列重叠更多, 更能证实所测得序列的准确性, 同时 P3 的 PCR 扩增产物量较多, 因此选择 P3 的 PCR 扩增产物进行回收克隆。

### 2.3 测序结果

将家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因序列 (1 205 bp) 及其下游序列 (775 bp) 的测序结果拼接后见图 3。用 Clustalx 软件将家蚕微粒子病原虫的 SSUrRNA 基因序列 (1 205 bp) 的 P3 引物 (976 位) 后的序列与 SSUrRNA 基因下游序列 (775 bp) 进行比较后发现, 在应完全重叠区 (共长 229bp) 两者完全相同。这说明了 775 bp 这段序列的确来源于 SSUrRNA 基因 3'-端。

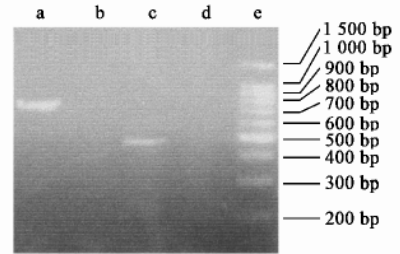


图 2 家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因下游序列的 SSP-PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of the downstream of *Nosema bombycis* SSUrRNA gene

- a. 引物 P3 对 *Nosema bombycis* 基因组 DNA 的扩增结果 (Lane a. P3/*Nosema bombycis* genomic DNA);
- b. 引物 P3 对家蚕基因组 DNA 的扩增结果 (Lane b. P3/*Bombyx mori* genomic DNA);
- c. 引物 P4 对 *Nosema bombycis* 基因 DNA 的扩增结果 (Lane c. P4/*Nosema bombycis* genomic DNA);
- d. 引物 P4 对家蚕基因组 DNA 的扩增结果 (Lane d. P4/*Bombyx mori* genomic DNA);
- e. 标准分子量对照 (Lane e. 100 bp DNA ladder)

### 2.4 家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 的二级结构

家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 二级结构 (图 4) 不仅同样缺乏在其它真核生物 SSUrRNA 二级结构存在而在一般微孢子虫中没有的螺旋 E10-1、11 和 46, 而且也缺乏在一般微孢子虫中出现过的螺旋 10、E23-n 和 E43。更为有趣的是, 它也缺乏家蚕微粒子病原虫 SES-NU (日本强毒株) 特有的螺旋 18。这说明这些不同地理株系的同属微孢子虫还是有一定差异。

### 2.5 讨论

(1) 经比较发现, 在测得的家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因 3'-端下游序列 775 bp 中紧接核心序列 (1 205 bp) 3'-端后的 28 bp 长序列, 与 Gatehouse 等 (1998) 所测得的蜜蜂微粒子病原虫 *Nosema apis* 的 SSUrRNA 基因 (1 241 bp) 3'-端结尾处的 28 bp 完全相同。进一步比较发现, 家蚕微粒子病原虫 (镇江株) 与蜜蜂微粒子病原虫的 SSUrRNA 基因 3'-端有 141 bp 长的序列完全相同。

```

+1      CACCAGGTTGATTTCTGCCTGACGTAGACGCTATACTCTAAGATTAACCCAI GCAIGTTTATTT
+63     GAATAFAAAGAAAAGACGAACAGCTCAGTAACTCTTATTTGATTTGATGTATTAGGATTTCTA
+125    ACTATGTTAAATTATAGGTAACAATAATACAAIAAAGAAIAAGATCTATCAGTTAGTTGTTAAG
+187    GTAATGGCTTAACAAGACTATGACGGATAACGGTATTACTTTTGTAATATTCCGGAGAAAGGA
+249    GCCITGAGAGATTGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACITGACCTATGATAI
+311    TATAFTGAGGCAGTTATGAGTGGTATTTTATAATTATGTAGTATTTGTAAGTACATATTAACAAG
+373    ATAAATCGGAGGGCAAATCGAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTITCCGAIAGTGTGTA
+435    TGATGATTTGATGACAGTTAAAAAGTCTGTAGTTTATTTTATAATAAGCATTGTAAGGTAIACTG
+497    TATGGTTAGGAGAGAGATGAAAIGTGAIAACCCIAACTGGATGAACAGAAGCGAAAGCTGT
+559    TATACTTAAATGTATTATTAGAACAAGGACGTAAGCTAGAGGATCGAAGATGATTTAGATACC
+621    ATTTGTAGTTCTAGCAGTAAACTATGTTGAATCATAGAIATAITTTTGATATATATTTATGTAGAG
+683    AAATTAAGATTATATTGACTCTGGGGATAGTATGATCGCAAAGATTGAAAAITAAAGAAATTTG
+745    ACGGAAGAATACCACAAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAAITTTGACTCAACGCGGGGTAATT
+807    TACCAGGTATAACATGGTAAAATATTTTATCATGATAGTGGTGCATGGCCGTTTCCAAITGGA
+869    TGCTGTGAAGTAATGATTAATTTCAACAAGATGTGAGACCCCTCATTAGACAGATGTAGTG
+931    AETACATGAAAGGAGAGGATTAAAAACAGGTCCGTTATGCCCTAAGATAATCTGGGTTGAC
+993    GCGCAATACAAIAAIAITTTGATATTATAAGGGATAATTAIAATGTAAGATATATTTGAACATGG
+1055   AATTGCTAGTAAATTTTATTTAATAAGTAGAAITGAAITGAGTCCCTGTTCTTTGTAACACACC
+1117   GCCCGTCCGCTATCTAAGAGTGGTATTATCTATAAAACAAATTTATAAAGTGAATAGATAGTACTA
+1179   GATCTGATATAAGTCCGTAACATGGTTGCTGTGGAGAACCAATTAGCAGGATCATAAATAAAA
+1240   AAAAGATGGGATTAATATAATGAAAGTGTATGCTGACATTTGTAATAAATCTTGTCTACGTTCT
+1302   AAAIACAAAATACCTTCACGAGGTTTAGAAITGTGTGATATAAGGAAGTTATATTAGCTAAAT
+1364   TTAITGATGTGGTAAAGGAGTTGATTAGAAAAAGCTTGTGTAGTTAGGTTGATAGAGAAGATT
+1426   ATTAAGAGATGTAATCTATGGAGTTTAAAGATAGTTTTTATGCCATAAATAICAAAGGATCTAT
+1482   ATTAATTTACAGCACACTAAITTTAACAGATACGGCCATACTACGTGAAAACCACCGGAACCC
+1544   ATCAGAAC'CCGAAGT'AAAACCAGTATGAGCTTAATTAGTACTAAGAAGGGAGACCACIT
+1606   GGGAACGTTGGGTGCTGTATTTTTTATACTTAAACTATTAATTTTITTTGATTAGTTATTTTA
+1668   CTTATGCAATAAAITTTACGTTAAGAAATTTATCGATTAAGCTCAGTGTAGTGTTTTATAGCCT
+1730   ACTAAGATCT

```

图 3 家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因序列 (1 233 bp) 及其下游序列

Fig. 3 The sequences of the core region and downstream of SSUrRNA gene of *Nosema bombycis*  
图中下加横线处序列分别为 P1、P3、P4、P2 (互补序列) 引物序列, 阴影部分为 SSUrRNA 基因 3'-端  
+1 ~ +1 205 bp 为图 1 中克隆测序结果, +931 ~ +1 739 bp 为图 2 中克隆测序结果

The underlined sequences are the primers' sequences of P1, P3, P4, P2 (P2 complementary sequence) respectively.

The shadowed sequence is the 3'-end of SSUrRNA gene. The sequence from +1 bp to +1 205 bp corresponds to the fragment in Fig. 1, with +931 bp ~ +1 739 bp to Fig. 2

Gatehouse 等 (1998) 在比较了微粒子病原虫属 *Nosema* 和变形虫属 *Vairimorpha* 不同种的 SSUrRNA 基因 3'-端的高度保守区后, 确定了蜜蜂微粒子病原虫 SSUrRNA 基因的 3'-端。由于本实验所测的家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因 3'-端的 141 bp 长的序列与蜜蜂微粒子病原虫的完全相同, 因此可以认为起初测得的核心序列 (1 205 bp) 与核心序列 3'-端后的延伸的 28 bp 一起 (共 1 233 bp)

是家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因的全序列。这个长度又与 Baker 等所报道的家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因长度相符 (Pieniazek *et al.*, 1996; Hatakeyama *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1997)。

(2) SSUrRNA 编码基因 (SSUrDNA) 的研究如今在微孢子虫研究中发挥着越来越重要的作用 (Hatakeyama *et al.*, 1997; Pieniazek *et al.*, 1996;

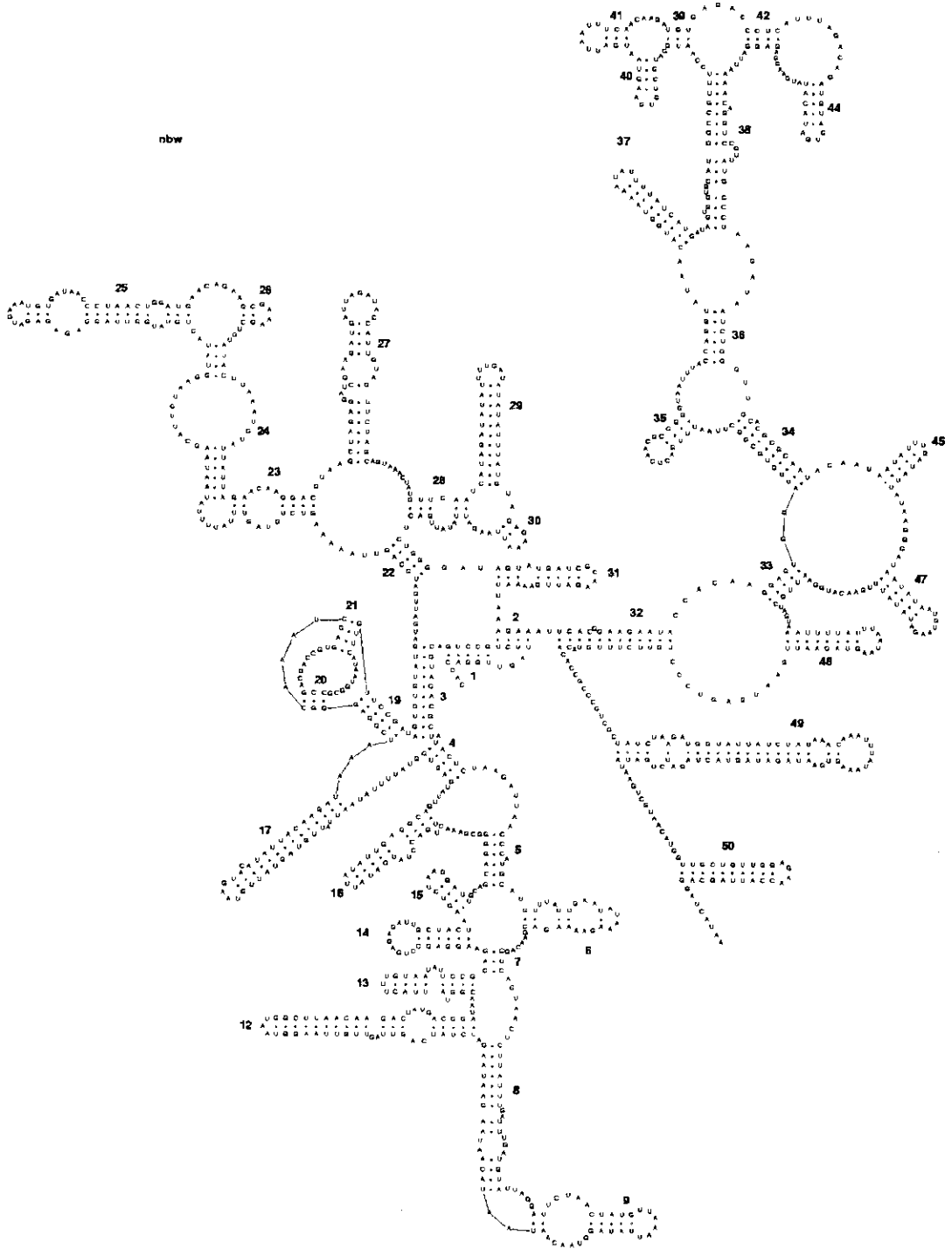


图 4 家蚕微孢子虫 SSUrRNA 的二级结构

Fig. 4 The secondary structure of SSUrRNA of *Nosema bombycis*

Vossbrink *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 1998; Malone and Melvor, 1996)。Hatakeyama 等 (1997) 测定了 5 种微孢子虫的 SSUrDNA 序列并构建了它们的二级结构模型, 发现 M11 与 M12 具相同的螺旋结构,

但比 SES-NU 多出螺旋 43。在比较了它们的 SSUrDNA 一级结构 (长度、GC 含量、相似性等) 及 SSUrRNA 二级结构后认为, 家蚕微孢子虫 (NIS-M11 株) 应改属于 *Vairimorpha*。可见微孢子

虫 SSUrRNA 的二级结构在其分类中具有重要作用。Pieniazek 等 (1996) 测定了 *Nosema trichoplusiae* 的 SSUrDNA 序列 (1 233 bp), 发现其与家蚕微粒子病原虫的 SSUrDNA 序列完全一致, 认为它是家蚕微粒子病原虫的同种异名。Vossbrinck 等 (1998) 测定了来自两种宿主的微孢子虫 *Amblyospora onnecticus* 的 SSUrDNA, 发现它们完全相同, 认为 rDNA 序列可以用来鉴别微孢子虫的中间宿主。而 Baker 等 (1998) 则通过比较 4 个属的 6 种微孢子虫及其宿主的 SSUrDNA 构建的系统树后认为宿主-寄生物在其进化过程中共同演变是一重要机制。Malone 等 (1996) 通过比较 14 种微孢子虫的 SSUrDNA 的 V4 可变区后, 认为他们从菜粉蝶 *Pieris rapae* 中分离的微孢子虫与 *Vairimorpha* 关系更近。

(3) 本研究测得的家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因的全序列 1 233 bp, 长度虽然与 Baker 等 (Pieniazek *et al.*, 1996; Hatakeyama *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1997) 所报道的家蚕微粒子病原虫 SSUrRNA 基因 1 232 ~ 1 234 bp 相符, 但序列并不完全一致。同时家蚕微粒子病原虫 (镇江株) 与家蚕微粒子病原虫 (日本强毒株) 两者 SSUrRNA 的二级结构也略有差别, 这说明了不同地理品系的家蚕微粒子病原虫还是有一定差异。

家蚕微粒子病原虫 (镇江株) SSUrRNA 基因全序列的测定, 又为用 SSUrDNA 对我们从野外昆虫中分离到的多种微粒子病原虫的种属关系的确定奠定了基础。

本研究所测序列已被美国 GenBank 数据库收录公布, 登录号为 AF240347。

**致谢** 本研究大部分实验工作是在中国科学院上海生物化学研究所 219 组完成的, 感谢毛小红和赵昀先生的大力帮助。

## 参 考 文 献 (References)

Baker M D, Vossbrinck C R, Beanel J J, Andreadis T G, 1998. Phylogeny of *Amblyospora* (Microsporidia: Amblyosporidae) and related genera on small subunit ribosomal DNA data: a possible example of host-parasite cospeciation. *J. Invertebr. Pathol.*, 71 (3): 199 - 206.

Baker M D, Vossbrinck C R, Didier E S, Maddox J V, Shaddock J A, 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with

emphasis on AIDS related forms. *J. Euk. Microbiol.*, 42: 564 - 570.

de Peer Y V, Caers A, Rijk P D, Wachter R D, 1998. Database on the small ribosomal subunit RNA. *Nucl. Acids Res.*, 26 (1): 179 - 182.

Gatehouse H S, Malone L A, 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microsporida): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidences of a large tandem repeat unit size. *J. Invertebr. Pathol.*, 71: 97 - 105.

Hartskeerl R A, Schuitema A R, de Wachter R, 1993. Secondary structure of the small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Nucl. Acids Res.*, 21 (6): 1 489.

Hatakeyama Y, Kawakami Y J, Iwano H, Inoue T, Ishihara R, 1997. Analyses and taxonomic inferences of small subunit ribosomal RNA sequences of five microsporidia pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66 (4): 242 - 252.

Malone LA, McIvor C A, 1996. Use of nucleotide sequence data to identify a microsporidian pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). *J. Invertebr. Pathol.*, 68 (3): 231 - 238.

Pieniazek N J, da Silva A J, Slemenda S B, Visvesvara G S, Kurti T J, Yasunaaga C, 1996. *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of small subunit ribosomal RNA coding region. *J. Invertebr. Pathol.*, 67 (3): 316 - 317.

Peyretailade E, Biderre C, Peyret P, Duffieux F, Metenier G, Gouy M, Michot B, Vivares C P, 1998. Microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSUrRNA reduced to the universal core. *Nucl. Acids Res.*, 26 (15): 3 513 - 3 520.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 49 - 59.

Vossbrinck C R, Andreadis T G, Deebrunner-Vossbrinck B A, 1998. Verification of intermediate hosts in the life cycles of microsporidia by small subunit rDNA sequencing. *J. Euk. Microbiol.*, 45 (3): 290 - 292.

Wang J Y, Huang K W, 1999. Genomic DNA polymorphisms in eight species of the microsporidian spores by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Acta Sericologica Sinica*, 25 (3): 195 - 197. [王见杨, 黄可威, 1999. 用 RAPD 技术检测不同来源微孢子虫的 DNA 多态性. 蚕业科学, 25 (3): 195 - 197]

Wang J Y, Huang K W, Mao X H, Zhao Y, Lu C D, 2001a. Small subunit ribosomal RNA genes of microsporidia. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 33 (2): 229 - 232. [王见杨, 黄可威, 毛小红, 赵昀, 陆长德, 2001a. 微孢子虫核糖体小亚单位 RNA (SSUrRNA) 基因. 生物化学与生物物理学报, 33 (2): 229 - 232]

Wang J Y, Huang K W, Lu C D, 2001b. Studies on the ribosomal RNA gene (rDNA) of a microsporidium isolated from *Pieris rapae* L. *Acta Microbiologica Sinica*, 41 (5): 598 - 604. [王见杨, 黄可威, 陆长德, 2001b. 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA 编码基因的研究. 微生物学报, 41 (5): 598 - 604]