

日本血吸虫染色体核型分析及 C 带和 G 带的制备

黄利红, 诸葛洪祥*, 周霞, 陆祥彬, 陈明中, 张慧琴

【摘要】 收集日本血吸虫成虫, 常规气干法制备血吸虫染色体, 改进的 BSG 法制备 C 带, 胰酶消化法制备 G 带, 分析其染色体核型和 C 带、G 带带型特征。研究表明其核型公式为 $2n=4m+6Sm+4St+2$ 性染色体, C 带带型公式为 $2n=5Cl_1+4Cl_2+3Cl_3+2CT+2CT_1$, 各对染色体显示出特征性的 G 带。

【关键词】 日本血吸虫; 染色体; 核型; C 带; G 带

中图分类号: R383.24

文献标识码: B

Analysis of Karyotype and Preparation of C-band and G-band in *Schistosoma japonicum*

HUANG Li-hong, ZHUGE Hong-xiang*, ZHOU Xia, LU Xiang-bin, CHEN Ming-zhong, ZHANG Hui-qin

(Department of Microbiology and Parasitology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

【Abstract】 Chromosomes of *Schistosoma japonicum* were prepared by usual air drying method, C-band and G-band were made by modified BSG method and enzyme digestion method respectively. Results showed that the karyotype of *S. japonicum* was $4m+6Sm+4St+2sex$ chromosome and the C-band formula was $2n=5Cl_1+4Cl_2+3Cl_3+2CT+2CT_1$.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Chromosome; Karyotype; C-band; G-band

* Corresponding author, E-mail: hxzhuge@suda.edu.cn

染色体是遗传信息的载体, 研究血吸虫染色体对于其分类^[1]、进化关系^[2]及基因组定位^[3]有重要意义。随着分子生物学技术的迅速发展, 血吸虫的基因组工程也得到了发展^[4]。目前, 国内外关于日本血吸虫的染色体研究报道较少, 本研究参考龚燕飞等^[5]制备血吸虫染色体的方法并做了一些改进, 制备日本血吸虫染色体及特征性的 C 带和 G 带。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 日本血吸虫成虫 用阳性钉螺(购自江苏省血吸虫病防治研究所)逸出的尾蚴人工感染雄性昆明小鼠(购自苏州大学, 体重 25 ± 3 g) 10 只, 每只小鼠感染尾蚴 50 ± 3 条, 37 d 后向小鼠腹腔注射 $200\ \mu\text{g/ml}$ 秋水仙素 0.5 ml, 4~6 h 后断颈处死小鼠, 灌注法收集成虫备用。

1.1.2 试剂 秋水仙素和 RPMI 1640 培养基购自上海捷瑞生物公司, 胰酶和吉氏(Giemsa)染液购自上海生工生物工程有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 染色体标本的制备 将血吸虫成虫剪碎, 加入 0.25% 胰蛋白酶 5 ml, 于 37 °C 水浴消化 20 min 后加等量 RPMI 1640 终止消化。室温下 $251.95\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 向沉淀中加入预热至 37 °C 的 0.075 mol/L 氯化钾, 立即将细胞吹打均匀, 于 37 °C 低渗处理 20 min。加新鲜固定液(甲醇:冰乙酸为

3:1) 1 ml 预固定 30 s, 轻轻吹打混匀, 同上述方法离心, 弃上清。向沉淀中加入 6 ml 新鲜固定液, 固定 30 min, 同上述方法离心, 重复固定 3 次。最后一次离心后, 弃上清, 向沉淀中加入 0.2 ml 固定液, 用吸管轻轻将细胞团打散成细胞悬液, 滴在预冷的载玻片上, 每片 1~2 滴, 轻轻吹一口气, 快速在酒精灯上过 3 次(勿使固定液燃烧)。待自然干燥后将部分标本片用 1:10 Giemsa 染液(Giemsa 原液:pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为 1:9)染色 20 min, 自来水冲洗, 空气自然干燥(气干), 镜检。

C 带制备: 将上述方法制备的染色体标本于室温静置 3 d 后浸入 0.2 mol/L HCl 液中 20 min, 自来水冲洗。将标本浸入 55 °C 饱和氢氧化钡溶液中 10 min, 预温至 60 °C 的双蒸水漂洗 2 次, 每次 15 s, 移入 55 °C 的 $2\times\text{SSC}$ 溶液中处理 1 h, 然后用预温至 37 °C 的双蒸水冲洗, 1:20 Giemsa 染色 1.5 h, 自来水冲洗, 气干, 镜检。

G 带制备: 将制备的染色体标本于室温放置 3 d 后置 60 °C 烤箱中烘烤 2 h, 自然冷却, 浸入 0.02% 胰蛋白酶溶液中 2 min 取出, 甩去多余的胰酶溶液, 1:10 Giemsa 染色 10 min。自来水冲洗, 气干, 镜检。

1.3 核型分析 计算染色体相对长度与臂比值。相对长度是指单条染色体的长度占包括性染色体在内的单倍染色体总长度的百分比, 即: 相对长度=每条染色体长度/(单倍常染色体总长度+性染色体长度) $\times 100\%$; 臂比值即臂比指数, 是指染色体的长臂长度与短臂长度的比率, 即: 臂比值=长臂长度/短臂长度。

作者单位: 苏州大学基础医学系病原生物学教研室, 苏州 215123

* 通讯作者, E-mail: hxzhuge@suda.edu.cn

2 结果

2.1 染色体核型 从染色体标本中选取 10 个分散良好的中期分裂细胞在油镜下观察, 结果显示, 染色体数目为 16 条, 核型公式为 $2n=4M+6Sm+4St+2$ 性染色体。根据 Levan 标准^[5], 按染色体臂比值分组, 性染色体排在最后, 每组中再按相对长度递减排列。日本血吸虫染色体可分为 3 组+性染色体, 其中 m 组中部着丝粒染色体为 2 对, Sm 组亚中部着丝粒染色体为 4 对 (包括性染色体 1 对), St 组亚端部着丝粒染色体为 2 对

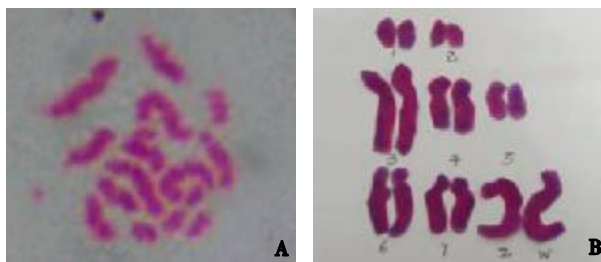


图 1 日本血吸虫染色体分裂中期相(A)和核型(B)

表 1 日本血吸虫染色体核型分析

染色体编号	相对长度(%)	类型	长臂/短臂测量值(μm)	臂比值
1	6.55	M	8/5.5	1.45
2	5.83	M	7/5	1.40
3	20.15	Sm	28.5/13	2.19
4	12.62	Sm	17/9	1.89
5	8.74	Sm	12/6	2.00
6	15.05	St	25/6	4.17
7	13.11	St	21/6	3.50
8	17.96	Sm	26/11	2.36

(图 1)。进行核型分析, 计算相对长度与臂比值 (表 1)。

2.2 C 带 从染色体中选取 3 个分散较好的中期分裂相细胞, 油镜下观察并拍照。每条染色体都有着丝粒带, 此外, 1R 长短臂上各有 1 条末端带, 2R 短臂上有 1 条中间带, 3R 长短臂上各有 1 条中间带, 4R 长臂上有 2 条中间带, 5R 长臂上有 1 条中间带, 6R 长臂上有 1 条末端带, 7R 短臂上有 1 条中间带, Z 染色体长臂上有 1 条中间带, W 染色体短臂上 1 条中间带, 长臂上有 2 条中间带, 其核型公式为 $2n=5CI_1+4CI_2+3CI_3+2CT_1+2CT_2$ (图 2)。

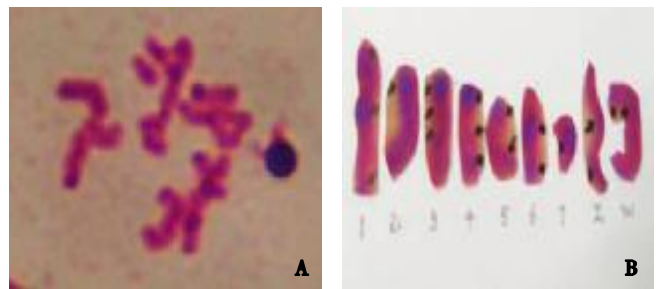


图 2 日本血吸虫染色体 C 分带 (A) 及其核型 (B)

2.3 G 带 选取 3 个分散较好的中期分裂相细胞, 油镜下观察并拍照。1R 染色体长短臂上各有 1 条显带; 2R 染色体短臂有 1 条显带, 长臂有 2 条显带; 3R 及 4R 染色体短臂有 1 条显带, 长臂有 4 条显带; 5R~7R 染色体短臂有 1 条显带, 长臂有 2 条显带; 8R 染色体短臂有 2 条显带, 长臂有 4 条显带 (图 3)。

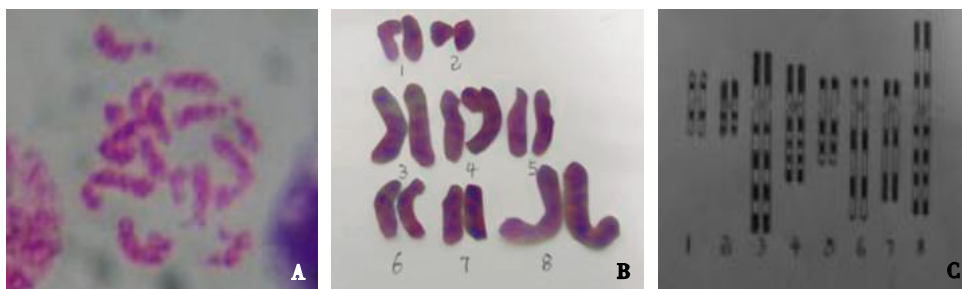


图 3 日本血吸虫染色体 G 分带 (A)、核型 (B) 及其模式图 (C)

3 讨论

血吸虫染色体对于研究其遗传学和细胞生物学有重要意义。目前所发现的寄生于人体的血吸虫都是二倍体, 有 8 对染色体, 即 7 对常染色体和 1 对性染色体。雌虫是异形配子体(ZW), 雄虫是同形配子体(ZZ)^[7]。可能因为日本血吸虫细胞不易增殖分裂, 获得其中期分裂相相对较难, 故对日本血吸虫染色体研究报道较少。

1968 年瑞典 Caspersen 等首先提出了染色体的荧光分带技术^[8], 此后分带技术相继出现, 为染色体的研究带来第二次技术革命。C 带是结构异染色质带的简称, 通常位于着丝粒附近, 是由一些高度重复的 DNA 组成的, 在一个物种内其大小、位置、数目、DNA 组分和染色质反应有很大的差异性。分析血吸虫 C 带特征, 有助于探讨 6 种血吸虫的进化关系^[1]。G 带

是用吉姆萨染液, 利什曼染液, 瑞氏染液或其他类似的染料将染色体染成各种不同宽度和色调的横纹, 经胰蛋白酶消化、染色处理的染色体呈现明暗相间的带型。染色体 G 显带特征, 对细胞遗传学特性、染色体基因定位及染色体多态性改变的研究有重要意义。染色体 G 显带^[9]具有操作简便、经济和能长期保存等优点, 因而成为最常用的染色体分带方法, 而 G 带显带与否关键在于胰蛋白酶浓度、温度和时间搭配。

本研究参照龚燕飞^[6]和陈韶红^[10]等制备染色体方法, 并作了 3 点改进: ①秋水仙素有一定毒性, 对离体的血吸虫作用时间太长易造成虫体死亡, 太短则使中期分裂相减少。本研究将秋水仙素注射到昆明小鼠体内而间接作用于血吸虫, 提高了中期分裂相的制备效率; ②制备 C 带时室温放置 3~7 d; 酸处理时间延长, 使 DNA 充分钝化; 降低 Giemsa 染液浓度, 延长染

色时间, 显带清晰; ③制备 G 带时降低胰酶浓度 (0.25% 改为 0.025%)^[11,12]在同一标本上摸索作用时间, 即将玻片分段浸入胰蛋白酶溶液, 染色后, 如果细胞仍呈蓝紫色, 说明胰酶作用时间不够, 如细胞为桃红色, 说明作用时间较合适。本研究方法成功获得了血吸虫染色体中期分裂相, 并获得了特征性的 C 带、G 带带型图。

参 考 文 献

- [1] Hirai H, Taguchi T, Saitoh Y. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(4): 441-452.
- [2] Grossman AI, Short RB, Cain GD. Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in schistosomes (Trematoda: Schistosomatidae) [J]. Chromosoma, 1981, 84 (3): 413-430.
- [3] Hirai H, LoVerde PT. FISH techniques for constructing physical maps on schistosome[J]. Parasitol Today, 1995, 11(8): 310-314.
- [4] LoVerde PT, Hirai H, Merricka JM, et al. *Schistosoma mansoni* genome project: an update[J]. Parasitol Int, 2004, 53(2):183-192.
- [5] Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201-202.
- [6] Gong YF, Zeng YR, Zhang ZP, et al. Analysis of the karyotype and G-banding pattern of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(3): 133-135. (in Chinese) (龚燕飞, 曾庆仁, 张祖萍, 等. 日本血吸虫染色体核型及其 G 带带型分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(3): 133-135.)
- [7] Short RB. Sex and the single schistosome[J]. J Parasitol, 1983, 69(1): 3-22.
- [8] Lan MY, Zhao YG. Culture and Application Technology of Mosquito Cell[M]. Atomic Energy Press, 1991. 94-96. (in Chinese) (蓝明扬, 赵郁光. 蚊细胞培养及应用技术[M]. 原子能出版社, 1991. 94-96.)
- [9] Short RB, Liberatos JD, Teehan WH, et al. Conventional Giemsa-stained and C-banded chromosomes of seven strains of *Schistosoma mansoni*[J]. J Parasitol, 1989, 75(6): 920-926.
- [10] Chen SH, Chang ZS, Chen MG, et al. Improvement in the preparation of *Paragonimus westermani* chromosome for karyotype analysis[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20(3): 155-157. (in Chinese) (陈韶红, 常正山, 陈名刚, 等. 卫氏并殖吸虫染色体制备方法的改进[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(3): 155-157.)
- [11] Yu YJ, Su ZJ, Ding ZG, et al. Analysis of G-banding pattern of *Microtus fortis* by artificial propagation[J]. Acta Laboratory Animals, 2001, 9(4): 255-256. (in Chinese) (俞远京, 苏志杰, 丁志刚, 等. 人工繁殖的东方田鼠 G 带核型研究[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(4): 255-256.)
- [12] Wang H, Ma YJ, Yang P. Preliminary study of mitotic chromosome karyotypes, G-banding of *Anopheles stephensi*[J]. J Xi'an Univ Art Sci, 2005, 8(1): 15-17. (in Chinese) (王虹, 马雅军, 杨频. 斯氏按蚊的有丝分裂染色体核型、G 带的初步研究[J]. 西安文理学院学报, 2005, 8(1): 15-17.) (收稿日期: 2007-10-25 编辑: 高石)
- (上接第 148 页)
- [5] Shen YZ, Pan XZ. Nervous system diseases in AIDS patients[J]. J Applied General Practice, 2007, 5(3): 248-250. (in Chinese) (沈银忠, 潘孝彰. 艾滋病的神经系统病变[J]. 实用全科医学, 2007, 5(3): 248-250.)
- [6] Cinque P, Scarpellini P, Vago L, et al. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction [J]. AIDS, 1997, 11 (1): 1-17.
- [7] Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5044-5047.
- [8] Bertschy S, Opravil M, Cavassini M, et al. Discontinuation of maintenance therapy against toxoplasma encephalitis in AIDS patients with sustained response to anti-retroviral therapy [J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(7): 666-671.
- [9] Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, et al. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73 (5): 921-925.
- [10] Miao YM, Awad-El-Kariem FM, Franzen C, et al. Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy[J]. J AIDS, 2000, 25(2): 124-129.
- [11] Hewitt RG, Yiannoutsos CT, Higgs ES, et al. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(4): 1084-1092.
- [12] White AC Jr, Chappell CL, Hayat CS, et al. Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial[J]. J Infect Dis, 1994, 170(2): 419-424.
- [13] Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide[J]. J Infect Dis, 2001, 184(1): 103-106.
- [14] White CA Jr. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004, 2(1): 43-49.
- [15] Smith HV, Corcoran GD. New drugs and treatment for cryptosporidiosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17(6): 557-564.
- [16] Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals[J]. Acta Trop, 2005, 94(1): 61-76.
- [17] Maggi P, Larocca AM, Quarto M, et al. Effect of antiretroviral therapy on cryptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, 19(3): 213-217.
- [18] Bern C, Kawai V, Vargas D, et al. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru[J]. J Infect Dis, 2005, 191(10): 1658-1664.
- [19] Molina JM, Goguel J, Sarfati C, et al. Trial of oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection[J]. AIDS, 2000, 14(10): 1341-1348.
- [20] Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, et al. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis[J]. N Engl J Med, 2002, 346(25): 1963-1969.
- [21] Bicart-See A, Massip P, Linas MD, et al. Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bienewisi* microsporidiosis in a patient with AIDS[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44 (1): 167-168.
- [22] Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, et al. Therapeutic strategies for human microsporidia infections[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2005, 3(3): 419-434.
- [23] Chakrabarti P, Samantaray JC, Malik S. Mixed infection with three intestinal coccidian parasites in an AIDS patient[J]. J Assoc Physicians India, 2004, 52: 975.
- [24] Paul N, Kannagai R, Robert K, et al. A HIPS-mimic[J]. J Intern Med, 2005, 258(6): 579-80.
- [25] Verdier FJ, Fitzgerald DW, Johnson DW, et al. Trimethoprim sulfamethoxazole compared with ciprofloxacin for treatment and prophylaxis of *Isospora belli* and *Cyclospora cayatanensis* infection in HIV infected patients. A randomized, controlled trial[J]. Ann Int Med, 2000, 132(11): 885-888. (收稿日期: 2007-04-10 编辑: 高石)