

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0130-05

【论著】

采用实时 PCR 技术比较不同方法提纯 隐孢子虫卵囊 DNA 效果

陈盛霞^{1,2}, 吴亮², 沈玉娟¹, 章秋霞², 李婷婷², 姜旭淦², 徐徐信¹, 曹建平^{1*}

【摘要】 目的 比较不同方法提纯隐孢子虫卵囊 DNA 的效果。方法 将分离纯化的隐孢子虫卵囊分别加入美国 Promega 公司 (简称 Promega) 和上海捷瑞公司 (简称捷瑞) 基因组 DNA 纯化试剂盒的裂解液、2% Triton X-100 和 5% 异硫氰酸胍, 同时联合使用冻融法、蛋白酶 K 法和声裂法裂解卵囊, 用试剂盒法或 Chelex-100 法提纯卵囊基因组 DNA, 用实时 PCR 测定隐孢子虫卵囊囊壁蛋白 (COWP) 基因拷贝数, 以 Promega 试剂盒为参照比较不同纯化方法的提纯效果。结果 Promega 试剂盒的裂解液裂解隐孢子虫卵囊的效果最好, 纯化所得卵囊 COWP 基因拷贝数可达 $(6.45\sim 9.86)\times 10^6$; 其他依次为捷瑞试剂盒的裂解液 $[(2.38\sim 3.69)\times 10^6]$ 、5% 异硫氰酸胍 $[(1.27\sim 21.29)\times 10^5]$ 和 2% Triton X-100 $[(2.06\sim 866.70)\times 10^3]$ 。冻融法+蛋白酶 K 法+声裂法提纯隐孢子虫卵囊 DNA 效果最佳, 其次为冻融法+声裂法和蛋白酶 K 法+声裂法, 冻融法+蛋白酶 K 法效果最差。结论 冻融法+蛋白酶 K 法+声裂法联合使用能使卵囊 DNA 的提纯效率达到最大, 捷瑞基因组 DNA 纯化试剂盒和 5% 异硫氰酸胍裂解法提纯隐孢子虫卵囊 DNA 可获得与 Promega 试剂盒相近的效果。

【关键词】 隐孢子虫; 卵囊; 实时 PCR; DNA; 提纯

中图分类号: R382.9

文献标识码: A

Real-time PCR in Analyzing DNA Extraction from *Cryptosporidium* Oocysts

CHEN Sheng-xia^{1,2}, WU Liang², SHEN Yu-juan¹, ZHANG Qiu-xia²,
LI Ting-ting², JIANG Xu-gan², XU Yu-xin¹, CAO Jian-ping^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

【Abstract】 Objective To compare the quality and quantity of DNA extracted from *Cryptosporidium* oocysts by different methods. **Methods** *Cryptosporidium* oocysts were treated with different kinds of lysis buffers from USA Promega (Promega) and Shanghai Genaray (Genaray) commercial DNA extraction kits, 2% Triton X-100 and 5% guanidine thiocyanate. The oocysts were then broken down by freeze-thawing, proteinase K and sonication. Genomic DNA was purified using the commercial kits or Chelex-100. Real-time PCR technique was used to determine the copies of *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene. The Promega commercial DNA extraction kit was used as control. **Results** The Promega kit resulted in a higher copy number of COWP gene $[(6.45\sim 9.86)\times 10^6]$ than that of Genaray commercial DNA kit $[(2.38\sim 3.69)\times 10^6]$, 5% guanidine thiocyanate $[(1.27\sim 21.29)\times 10^5]$ or 2% Triton X-100 $[(2.06\sim 866.70)\times 10^3]$, respectively. The method of freeze-thawing plus proteinase K plus sonication provided the highest copy number of COWP gene. **Conclusion** The method of freeze-thawing + proteinase K + sonication is most effective. The effect of DNA extraction by Genaray kit and 5% guanidine thiocyanate is similar to that of Promega kit.

【Key words】 *Cryptosporidium*; Oocyst; Real-time PCR; DNA; Extraction

Supported by the Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH (No. WSBKFKT200701), the National Special Program for Scientific Research of Public Health (No. 200802012), and National Key Program for Infectious Diseases of China (No. 2008ZX1004-002, No. 2009ZX10602)

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

基金项目: 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室开放课题 (No. WSBKFKT200701); 国家卫生行业科研专项 (No. 200802012); 国家传染病重大科技专项 (No. 2008ZX1004-002, No. 2009ZX10602)

作者单位: 1 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; 2 江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013

* 通讯作者, E-mail: caojp@yahoo.com

隐孢子虫病(cryptosporidiosis)是一种在世界范围内广泛流行的人兽共患寄生虫病,主要引起感染者长期慢性水样腹泻。卵囊是隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)的感染阶段,即使误食少量卵囊也会引起人类的感染^[1]。国外多次发生因饮用被隐孢子虫卵囊污染水而造成隐孢子虫病的暴发^[2]。为能检测到样品中含量极少的隐孢子虫卵囊,美国环境保护署(Environmental Protection Agency, USEPA)推荐使用免疫磁珠分离(immunomagnetic separation, IMS)试剂盒用于卵囊富集,该方法的缺陷在于价格昂贵且特异性差^[3],近年来有逐渐被 PCR 法取代的趋势。PCR 法具有快速、敏感和特异等诸多优点,样品可直接用于检测而无需富集。PCR 法的敏感性依赖于模板的质量,由于卵囊外的坚固囊壁极大地降低了常规 DNA 提纯方法的效果,需借助一些特殊的物理和化学方法破坏卵囊囊壁,才能获得满足 PCR 实验要求的模板。不同囊壁破坏方法的效果不尽相同,目前国内尚无相关的研究报道。本研究采用实时 PCR 技术的绝对定量原理,比较不同裂解液和不同裂解方法对隐孢子虫卵囊 DNA 提纯效果的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 隐孢子虫卵囊 采集徐州某奶牛场感染安氏隐孢子虫(*C. andersoni*)^[4]的奶牛粪便,卵囊经蔗糖梯度离心法纯化后保存于 2.5%重铬酸钾溶液中,4℃备用。

1.2 质粒、菌株和主要试剂 pGEM-T Easy 载体、PCR 预混液(GoTaq Green Master Mix)、T₄ DNA 连接酶、质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司。基因组 DNA 纯化试剂盒分别为美国 Promega 公司(简称 Promega)和上海捷瑞生物工程有限公司(简称捷瑞),Triton X-100 和异硫氰酸胍购自美国 Sigma 公司。实时定量 PCR 预混液(SYBR Premix Ex Taq)购自大连宝生物有限公司。感受态大肠埃希菌 DH5 α 购自南京生兴生物技术有限公司,-70℃保存。Chelex-100(100~200目)树脂购自美国 Bio-Rad 公司。蛋白酶 K(溶于无菌双蒸水,终浓度为 20 mg/ml,分装保存于-20℃)购自德国 Merck 公司。

1.3 主要仪器 梯度 PCR 仪和蛋白核酸分析仪为德国 Eppendorf 公司产品,实时 PCR 仪(Roter-GENE 2000)为澳大利亚 Corbett 公司产品,凝胶图像分析系统(Genius)为美国 SynGene 公司产品,超声波细胞破碎仪为北京迪索仪器有限公司产品。

2 方法

2.1 隐孢子虫卵囊 DNA 提取 吸取保存于 2.5%

(wt/vol)重铬酸钾溶液中的隐孢子虫卵囊,以双蒸水洗涤 2 次,分装于 1.5 ml EP 管中,每管卵囊数约为 (1~10) $\times 10^6$ 个。提纯基因组 DNA 前,卵囊分别重悬于 150 μ l 细胞核裂解缓冲液(Promega, K1)、300 μ l 动物细胞核裂解缓冲液(捷瑞, K2),100 μ l 2% Triton X-100(K3)或 100 μ l 5%异硫氰酸胍(K4),按如下联合裂解法分别进行卵囊裂解(每种方法均重复 3 次):
① M1: 冻融法(F/T)+声裂法(SON),先将卵囊置于-70℃ 30 min,再置于 56℃水浴 30 min,循环重复 3 次,然后进行超声裂解,功率 100W 10 s/次,重复 6 次;
② M2: 冻融法+蛋白酶 K 法(PRK),卵囊先经冻融法裂解后,再加入 20 mg/ml 蛋白酶 K 20 μ l,56℃水浴 4 h;
③ M3: 蛋白酶 K 法+声裂法,卵囊先经蛋白酶 K 法裂解后,再经声裂法裂解;
④ M4: 冻融法+蛋白酶 K 法+声裂法,卵囊分别经冻融法、蛋白酶 K 法和声裂法联合裂解。

裂解后, K1、K2 裂解产物分别按 Promega、捷瑞基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提卵囊基因组 DNA,以 65℃ 50 μ l Tris-EDTA 缓冲液(pH 8.0)洗涤离心柱,提纯的 DNA 保存于-20℃备用。K3、K4 裂解产物分别加入 100 μ l 20% Chelex-100 混悬液,56℃振荡温育 4 h,取上清保存于-20℃备用。

2.2 隐孢子虫 COWP 基因扩增

2.2.1 目的基因引物设计 根据 GenBank 中隐孢子虫卵囊壁蛋白(COWP)基因序列,用 DNASTar 软件设计引物,上游引物(Ca_COWP_F)为 5'-CACCTCCCAACCCT GAATGTC-3',下游引物(Ca_COWP_R)为 5'-TGCTGG CAAATACTGGA-3',由上海生工生物工程有限公司合成。

2.2.2 目的基因扩增 PCR 反应体系为 PCR 预混液 12.5 μ l,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l, DNA 模板 2 μ l,加双蒸水至 25 μ l。反应条件为:95℃ 45 s;95℃ 10 s,51℃ 20 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.3 pGEM-T Easy/COWP 重组质粒构建和筛选 PCR 产物回收纯化后经 TA 克隆,转化 DH5 α 感受态细菌,蓝白斑筛选。挑取分隔良好的白色菌落于 3 ml LB 培养液(含氨苄青霉素 100 μ g/ml)中过夜培养,抽提质粒 DNA,PCR 扩增对重组质粒进行鉴定,阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序分析。

2.3 实时 PCR 测定隐孢子虫卵囊 COWP 基因拷贝数

2.3.1 定量标准曲线的建立 在蛋白核酸检测仪上测定阳性重组质粒 DNA 浓度,计算质粒 DNA 拷贝数,10 倍倍比稀释成 $10^7\sim 10^2$ μ l 浓度梯度,于荧光定量 PCR 仪上扩增,反应结束后根据设定的阈值(*Ct*),以拷贝数的对数为横坐标,*Ct* 值为纵坐标自动拟合绘制

标准曲线。

2.3.2 实时 PCR 测定不同方法提纯隐孢子虫卵囊 COWP 基因拷贝数 实时 PCR 反应体系为实时定量 PCR 预混液 12.5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μl, 基因组 DNA 模板 4 μl, 加双蒸水补足至 25 μl。反应条件为: 95 °C 45 s; 95 °C 10 s, 51 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。用于 COWP 基因拷贝数分析。

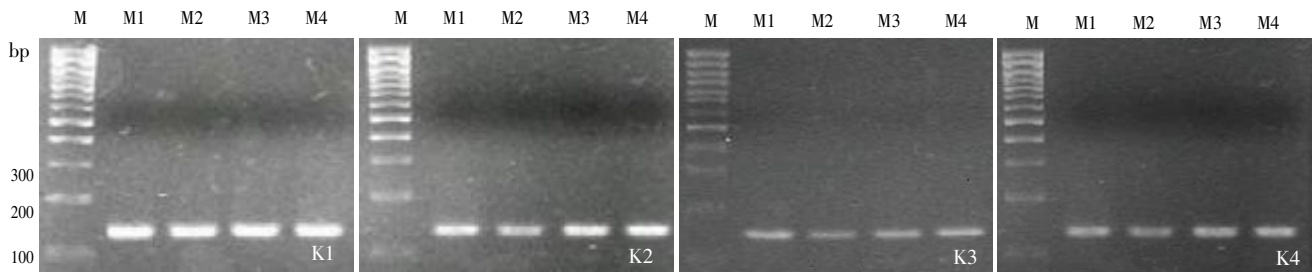
3 统计学分析

用 SPSS 11.0 统计学软件, 单因素方差分析和 LSD 法分析不同裂解方法对卵囊 DNA 提取效果的差异。

结 果

1 不同方法提纯隐孢子虫卵囊 COWP 基因 PCR 扩增结果

以不同方法提纯的卵囊基因组 DNA 为模板, PCR 扩增后, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 COWP 基因片段长度均为约 130 bp (图 1), 与预期的一致。不同裂解液, 肉眼观察 PCR 扩增条带的清晰程度不同, Promega 试剂盒裂解液 (K1) PCR 产物条带最明亮, 其次为捷瑞试剂盒 (K2) 和异硫氰酸胍 (K4), Triton X-100 (K3) 扩增产物条带最暗。相同裂解液、不同裂解方法, 肉眼观察 PCR 扩增条带间差别不显著, 仅见冻融法 + 蛋白酶 K 法 (M2) 条带略暗淡。



M: DNA 标志物 (100 bp), M1: 冻融法+声裂法, M2: 冻融法+蛋白酶 K 法, M3: 蛋白酶 K 法+声裂法, M4: 冻融法+蛋白酶 K 法+声裂法; K1: Promega 试剂盒, K2: 捷瑞试剂盒, K3: Triton X-100, K4: 异硫氰酸胍。

M: DNA marker (100 bp), M1: Freeze-thawing + sonication, M2: Freeze-thawing + proteinase K, M3: Proteinase K + sonication, M4: Freeze-thawing + proteinase K + sonication; K1: Promega kit, K2: Generay kit, K3: Triton X-100, K4: Guanidine thiocyanate.

图 1 不同方法提纯隐孢子虫卵囊 COWP 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of COWP gene in *Cryptosporidium* oocysts extracted by different methods

2 隐孢子虫卵囊 pGEM-T Easy-COWP 重组质粒筛选和鉴定

pGEM-T Easy-COWP 重组质粒测序结果显示, 插入片段与预期片段序列一致。

3 实时 PCR 测定卵囊 COWP 基因拷贝数

以构建的 pGEM-T Easy-COWP 重组质粒实时 PCR 扩增获得标准曲线, 根据标准曲线计算各样品中 COWP 基因的浓度, 进而获得不同方法提纯卵囊 COWP 基因的总拷贝数。样品扩增熔解曲线分析显示, 各个测定样品的 PCR 产物熔解温度均一, 未见明显的非特异峰或引物二聚体峰, 单一峰的形状也较锐利 (图 2)。卵囊经 4 种裂解液处理后, 所得卵囊 COWP 基因拷贝数的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中 Promega 试剂盒提纯所获得的 COWP 基因拷贝数最高, 达 $(6.45 \sim 9.86) \times 10^6$ 个; Triton X-100 提纯所得 COWP 基因拷贝数最低, 为 $(2.06 \sim 866.70) \times 10^3$ 个; 捷瑞试剂盒和异硫氰酸胍法所得卵囊 COWP 基因拷贝

数则分别为 $(2.38 \sim 3.69) \times 10^6$ 和 $(1.27 \sim 21.29) \times 10^5$ 个。同种裂解液处理后, 除冻融法+声裂法与蛋白酶 K 法+声裂法之间 COWP 基因拷贝数的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其他裂解方法所得卵囊 COWP 基因拷贝数的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中冻融法+蛋白酶 K 法+声裂法所得卵囊 COWP 基因拷贝数最高, 其次为冻融法+声裂法和蛋白酶 K 法+声裂法, 冻融法+蛋白酶 K 法的 COWP 基因拷贝数最低 (表 1)。

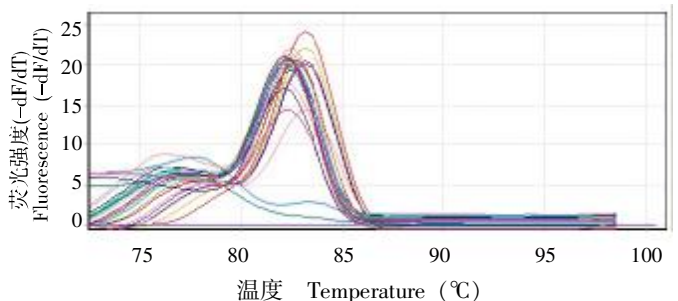


图 3 实时 PCR 测定卵囊 COWP 基因拷贝数熔解曲线

Fig.2 Melt curve for quantification of the copies of COWP gene by real-time PCR

讨 论

隐孢子虫卵囊广泛存在于全球各类水体中,是引起全球性隐孢子虫流行和暴发的主要原因之一^[5]。PCR 技术检测隐孢子虫是目前研究的热点之一,该方法正逐渐替代改良抗酸染色法和免疫磁珠分离法(IMS)用于临床隐孢子虫病诊断及水源隐孢子虫的检测及鉴定^[5-7],同时实时 PCR 技术还可定量测定隐孢子虫的感染度^[8,9],极大方便了隐孢子虫的检测和研究。但隐孢子虫卵囊基因组 DNA 提纯一直是隐孢子虫研究的难点之一^[10],目前对常用的裂解卵囊、提纯基因组 DNA 方法的效果尚缺乏客观评价,在一定程度上阻碍了隐孢子虫研究的深入。本研究采用实时 PCR 测定提纯后隐孢子虫卵囊基因组 DNA 扩增的 COWP 基因拷贝数,比较不同方法的提纯效果,所得结果较普通 PCR 和半定量 PCR 更为准确可信^[11]。

由于隐孢子虫卵囊壁坚固,常规试剂盒的裂解液难以达到理想的裂解效果,需要辅以其他物理和化学方法裂解卵囊,释放基因组 DNA^[7]。常用方法有冻融法、蛋白酶 K 法和声裂法,实际使用时常联合 2 种或 3 种方法以提高裂解效果。Anceno 等^[12]认为声裂法裂解效果最佳,经超声裂解后可显著提高卵囊基因组 DNA 回收率,冻融法和蛋白酶 K 法的效果不及声裂法显著,因蛋白酶 K 法裂解卵囊效果不佳,建议与其他方法联合使用。本研究结果支持这一观点,这 3 种裂解方法联合使用可使卵囊基因组 DNA 的纯化效率达到最高,从而提高卵囊 COWP 基因拷贝数。

在隐孢子虫的分子生物学研究中,国外研究者常用德国 Qiagen 和美国 Promega 等公司的试剂盒提纯

卵囊基因组 DNA^[8,12]。Anceno 等^[12]认为这两种试剂盒纯化卵囊基因组 DNA 的效率可达 90%以上。但进口试剂盒价格昂贵,不适合大批量样品的检测。异硫氰酸胍是一种强烈的变性剂,可迅速溶解蛋白,使细胞结构破碎^[13],被广泛用于卵囊 DNA 和 RNA 提取^[14,15]。作为裂解液,其纯化隐孢子虫卵囊基因组 DNA 所得拷贝数达到 $(1.27\sim 21.29)\times 10^6$ 个,与 Promega 试剂盒在同一数量级上。捷瑞基因组 DNA 纯化试剂盒的提纯效果与异硫氰酸胍相近,也与 Promega 的试剂盒在同一数量级上。Triton X-100 也是一种强烈变性剂,亦用于卵囊基因组 DNA 提纯^[16,17]。实时 PCR 结果表明,2% Triton X-100 对卵囊的裂解效果远低于捷瑞试剂盒和异硫氰酸胍,联合使用冻融法、蛋白酶 K 法和声裂法其基因组 DNA 拷贝数仅为 8.67×10^5 个,不适于隐孢子虫卵囊的提纯。

本研究结果表明,通过联合使用冻融法、蛋白酶 K 法和声裂法裂解卵囊后,捷瑞基因组 DNA 纯化试剂盒和异硫氰酸胍也可达到较高的提纯效果,完全可以用于 PCR 的检测。

参 考 文 献

- [1] Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, et al. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 3809-3817.
- [2] Sisco WM, Atwill ER, Lanyon LE, et al. *Cryptosporidia* on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States[J]. Prev Vet Med, 2000, 43(4): 253-267.
- [3] Fontaine M, Guillot E. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples[J]. J Microbiol Methods, 2003, 54(1): 29-36.
- [4] Liu HP, Cao JP, Shen YJ, et al. Isolation and identification of an isolate of cow-origin *Cryptosporidium* sp.[J]. Chin J Parasitol

表 1 不同方法提纯隐孢子虫卵囊效果 (n=3)
Table 1 DNA extraction from *Cryptosporidium* oocysts by different methods (n=3)

裂解液 Lysis buffer	裂解方法 Lysis method	拷贝数/ μ l No. copies/ μ l	COWP基因拷贝数 No. copies of COWP gene
Promega试剂盒 Promega kit	冻融法+声裂法 F/T + SON	162 700.0 \pm 23 580.0	$(8.135\pm 1.179)\times 10^6$
	冻融法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK	129 000.0 \pm 4 358.9	$(6.450\pm 0.218)\times 10^6$
	蛋白酶 K 法+声裂法 PRK + SON	161 600.0 \pm 3 011.6	$(8.080\pm 0.151)\times 10^6$
	冻融法+声裂法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK + SON	197 216.0 \pm 5 231.0	$(9.861\pm 0.262)\times 10^6$
捷瑞试剂盒 Generay kit	冻融法+声裂法 F/T + SON	53 466.0 \pm 763.8	$(2.673\pm 0.038)\times 10^6$
	冻融法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK	47 533.0 \pm 723.4	$(2.377\pm 0.036)\times 10^6$
	蛋白酶 K 法+声裂法 PRK + SON	55 133.0 \pm 1 115.0	$(2.757\pm 0.056)\times 10^6$
	冻融法+声裂法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK + SON	73 766.0 \pm 2 311.5	$(3.689\pm 0.116)\times 10^6$
Triton X-100	冻融法+声裂法 F/T + SON	91.8 \pm 6.1	$(1.836\pm 0.122)\times 10^4$
	冻融法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK	10.3 \pm 0.1	$(2.060\pm 0.020)\times 10^3$
	蛋白酶 K 法+声裂法 PRK + SON	91.5 \pm 3.5	$(1.830\pm 0.070)\times 10^4$
	冻融法+声裂法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK + SON	4 333.3 \pm 212.2	$(8.667\pm 0.424)\times 10^5$
异硫氰酸胍 Guanidine thiocyanate	冻融法+声裂法 F/T + SON	6 313.3 \pm 693.2	$(1.263\pm 0.139)\times 10^6$
	冻融法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK	636.0 \pm 18.5	$(1.272\pm 0.037)\times 10^5$
	蛋白酶 K 法+声裂法 PRK + SON	6 370.0 \pm 380.4	$(1.274\pm 0.076)\times 10^6$
	冻融法+声裂法+蛋白酶 K 法 F/T + PRK + SON	10 643.3 \pm 720.1	$(2.129\pm 0.144)\times 10^6$

- Parasit Dis, 2007, 25(2): 81-86. (in Chinese)
(刘海鹏, 曹建平, 沈玉娟, 等. 隐孢子虫牛源分离株的分离和鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 81-86.)
- [5] Shen YJ, Cao JP. PCR detection for water-borne cryptosporidiosis [J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2005, 32(1): 10-13. (in Chinese)
(沈玉娟, 曹建平. 水源性隐孢子虫的 PCR 检测[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2005, 32(1): 10-13.)
- [6] Patel S, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene [J]. Int J Parasitol, 1999, 29(8): 1241-1247.
- [7] Wiedenmann A, Krüger P, Botzenhart K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples; a review of published protocols and current developments[J]. J Indust Microbiol Biotechnol, 1998, 21(3): 150-166.
- [8] Guy RA, Payment P, Krull UJ, et al. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(9): 5178-5185.
- [9] Tanriverdi S, Tanyeli A, Baslamisli F, et al. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9): 3237-3244.
- [10] Shen YJ, Cao JP, Lu WY, et al. Preparation of DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR detection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(4): 228-230. (in Chinese)
(沈玉娟, 曹建平, 卢潍媛, 等. 微小隐孢子虫卵囊 DNA 提取及用于 PCR 检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 228-230.)
- [11] Jenkins M, Trout J, Fayer R. A semi-quantitative method for measuring *Cryptosporidium parvum* infection using polymerase chain reaction[J]. J Microbiol Methods, 1997, 28(2): 99-107.
- [12] Anceno AJ, Katayama H, Houpt ER, et al. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water[J]. Int J Environ Hlth Res, 2007, 17(4): 297-310.
- [13] Hu GB, Mei XG, Liu Y. Improved single-step method for extracting total RNA from *Taxus* cells with guanidinium isothiocyanate [J]. Biotechnology, 2001, 11(5): 31-33. (in Chinese)
(胡国斌, 梅兴国, 刘怡. 改良异硫氰酸胍一步法提取红豆杉细胞 RNA[J]. 生物技术, 2001, 11(5): 31-33.)
- [14] Majewska AC, Werner A, Sulima P, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland[J]. Vet Parasitol, 2000, 89(4): 269-275.
- [15] Ng CT, Gilchrist CA, Lane A, et al. Multiplex real-time PCR assay using scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1256-1260.
- [16] Spano F, Putignani L, McLauchlin J, et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 150(2): 209-217.
- [17] Morgan UM, Constantine CC, O'Donoghue P, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis [J]. Am J Trop Med Hyg, 1995, 52(6): 559-564.
(收稿日期: 2008-08-18 编辑: 盛慧锋)

(上接第 129 页)

- [4] Chen XY, Jiang QW, Zhao GM, et al. Schistosomiasis situation in the People's Republic of China in 2000 [J]. Chin J Schisto Control, 2001, 13(3): 129-131. (in Chinese)
(陈贤义, 姜庆五, 赵根明, 等. 2000 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, 13(3): 129-131.)
- [5] Xiao DL, Yu Q, Dang H, et al. Schistosomiasis situation in the People's Republic of China in 2003[J]. Chin J Schisto Control, 2004, 16(5): 401-404. (in Chinese)
(肖东楼, 余晴, 党辉, 等. 2003 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2004, 16(5): 401-404.)
- [6] Zhang SJ, Liu ZD, Li GH, et al. Snail distribution and susceptible zones of schistosomiasis in endemic area around Poyang Lake [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1990, 8(1): 8-12. (in Chinese)
(张绍基, 刘志德, 李国华, 等. 鄱阳湖区钉螺分布和血吸虫病易感地带的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8(1): 8-12.)
- [7] Cao L, Hu GH, Guo JG, et al. Compliance study on mass chemotherapy with praziquantel in schistosomiasis hyper-endemic area of Poyang Lake region for 6 successive years[J]. Parasit Infect Dis, 2003, 1(4): 153-155. (in Chinese)
(曹力, 胡广汉, 郭家钢, 等. 鄱阳湖血吸虫病重疫区居民连续 6 年吡喹酮化疗依从性研究[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2003, 1(4): 153-155.)
- [8] El Gaddal AA. The Blue Nile Health Project: a comprehensive approach to the prevention and control of water-associated diseases in irrigated schemes of the Sudan [J]. J Trop Med Hyg, 1995, 88(1): 47-56.
- [9] Zhang J, Hu GH, Song KY, et al. Intervention strategies for water conservancy workers against acute schistosome infection in Poyang Lake regions[J]. Chin J Schisto Control, 2008, 20(4): 302-303. (in Chinese)
(张矩, 胡广汉, 宋矿余, 等. 鄱阳湖区水利施工人员急性血吸虫病感染防控干预对策[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(4): 302-303.)
- [10] Qiu CG, Hu GH, Hu WC, et al. Expanded application of health education for schistosomiasis control in adult men[J]. Parasit Infect Dis, 2006, 4(4): 173-176. (in Chinese)
(邱慈桂, 胡广汉, 胡位陈, 等. 成年男性血吸虫病防治健康教育现场推广应用[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2006, 4(4): 173-176.)
- [11] Mott KE. Schistosomiasis control; everybody's business[C]. International Symposium of Schistosomiasis, Beijing, China, 1992: 13.
- [12] Hu GH, Zhang SJ, Lin DD, et al. Long-term effect of health education in schistosome infection control among school children in lake region[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1999, 17(4): 124-125. (in Chinese)
(胡广汉, 张绍基, 林丹丹, 等. 健康教育控制湖区小学生血吸虫感染的远期效果[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 124-125.)
- [13] Hu GH, Hu J, Song KY, et al. The role of health education and health promotion in the control of schistosomiasis; experiences from a 12-year intervention study in the Poyang Lake area[J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 232-241.
- [14] Hu GH. Health Education for Schistosomiasis Control[M]. Beijing: People's Military Publishing House, 1997: 24-27. (in Chinese)
(胡广汉. 血吸虫病健康教育[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997: 24-27.)
- [15] Hu GH, Lin DD, Zhang SJ, et al. The role of health education for schistosomiasis control in heavy endemic area of Poyang Lake region, People's Republic of China[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 2000, 31(3): 467-472.
- [16] Hu GH, Liu JX, Zhang SJ, et al. Evaluation on effectiveness of health education for schistosomiasis control among adult male inhabitants in heavy endemic areas in Poyang Lake region[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1996, 9(3): 195-198. (in Chinese)
(胡广汉, 刘建翔, 张绍基, 等. 鄱阳湖重疫区成年男性居民血吸虫病健康教育效果评价[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1996, 9(3): 195-198.)
(收稿日期: 2008-08-26 编辑: 盛慧锋)