

各地钉螺 α -磷酸甘油脱氢酶和酯酶同功酶变异的研究*

许学积 郭源华

(中国医学科学院寄生虫病研究所)

以往钉螺 (*Oncomelania*) 的分类沿用形态学的方法。但根据形态特点,对钉螺种的分类,往往可靠性不大 (Davis 1967)。生化方法包括一般蛋白质和同功酶等电泳法用于螺类分类是近十几年来的新发展 (Davis 1967, Wright 等 1979, Rollinson 等 1979)。在螺类同功酶研究中,对酯酶同功酶的研究较多,据报道这个酶系不但可作种间分类参考,而且作为种下不同品系分类的借鉴,也可作为螺类遗传学研究的标志 (Malek 等 1971, Bair 等 1973, Narang 等 1975, Jelnes 1979)。杰尔内斯 (Jelnes 1979) 指出, α -磷酸甘油脱氢酶对小泡螺 (*Bulinus*) 的分类很重要,他用这种酶结合参考其它酶系,分出了二种新螺种。已经查明该酶广泛存在于动物中,如钉螺 (郭、许 1980)、原虫和昆虫等等。我们对我国 10 省 23 个县钉螺的 α -磷酸甘油脱氢酶和酯酶同功酶的变异情况,采用管状和板状等电聚焦二种方法进行研究。现将初步结果报告如下。

材料和方法

(一) 样品准备 钉螺从现场采来后,在实验室短期饲养,经逐个解剖去壳后取出整个软体或足肌和肝脏等组织,每个组织样品加克氏生理盐水 0.2 毫升打成匀浆,吸附于滤纸条上,直接用于分离;必要时用多个钉螺软体,每克组织样品加 10 毫升上述生理盐水打成混合匀浆,离心沉淀,取上清液进行分离。一个地区分离的钉螺数一般为 12—50 只。并用大脐圆扁螺 (*Hippeutis umbilicus*) 作为异种螺酶谱对照。

(二) 等电聚焦方法 管状等电聚焦法见本所 1977 年年报第 12 页。板状等电聚焦的电槽系用国产卧式电泳槽改装的。聚丙烯酰胺凝胶浓度均在 6.6—8.6% 之间。加样时,钉螺样品 3 份加 40% 蔗糖液和克氏生理盐水各 0.5 份,混和后加在板状凝胶或管状凝胶上进行分离,然后进行显色。聚焦条件: 管状等电聚焦电压 220V (伏) (18.3V/管)、电流 20mA (毫安培),通电 3 小时;板状等电聚焦电压 100V (8.3V/cm)、电流 5.8mA,通电 20 小时,或用电压 280V (11.7V/cm)、电流 30mA,通电 5 小时。显色方法见本所 1978 年年报第 10 页。

(三) 酯酶的抑制试验 凝胶放在 Tris-HCl (pH7.4, 0.2M) 缓冲液中,在 30°C 下预育 30 分钟,然后转至新鲜的缓冲液中,以 α -醋酸萘酯或 β -醋酸萘酯为底物和固兰 RR 为显色剂,分别加各种特异和非特异抑制剂进行抑制试验 (不加抑制剂者为对照)。这些抑制剂如 E600、DFP 和毒扁豆碱分别用 10^{-3} 和 10^{-5} M; 重金属硝酸银和硫酸铜分别用 10^{-2} 和 10^{-3} M 浓度。

(四) pI 测定方法 见 Houk 等的方法。

结 果

(一) α -磷酸甘油脱氢酶(结合 NAD⁺)

在所采集的安徽贵池、浙江嵊县和衢县、福建霞浦、四川绵竹、云南大理和下关、广西天等的 172 只钉螺中,分得 α -磷酸甘油脱氢酶,大部分地区的钉螺只有一个区带, pI 为 pH4.7。

* 本项研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部份支持。

但在浙江嵊县一地的钉螺中分得二个区带, pI 为 pH4.7 和 5.3 (图 1 见封 2, 下同)。经过反复试验, 这二个区带每次都出现, 说明该酶已有地区变异。对照圆扁螺也分出一个区带, pI 为 pH4.9。

(二) 酯酶同功酶

1. 活力特征和基因变异

无论是用管状等电聚焦法或板状等电聚焦法分离, 所分得的钉螺酯酶同功酶区带数与取材部位有关, 在 25 只钉螺的足肌中分得羧基酯酶 6 条, 芳基酯酶和乙酰酯酶各 2 条, 胆碱酯酶 3 条, 共 13 条; 在 25 只钉螺的肝脏中分得羧基酯酶 11 条, 芳基酯酶和乙酰酯酶各 2 条, 胆碱酯酶 4 条, 共 19 条(图 2)。25 只钉螺的整个软体组织中分到酯酶 20 条, 除了与肝脏中组分相同的以外, 还多分出羧基酯酶 1 条。有些区带在肝脏和整个软体组织中查到, 但在足肌中却没有查到, 如 2、12、16、17、18、19 等区带。可见这三组织中该酶的组分是有些不同的。从表 1 中足肌各同功酶的 pI 回归分析的统计值来看, 它们几乎全部都在 pH4.50—7.12 之间, 说明它们大多数是偏酸性的。该酶 pI 回归分析的统计值是指等电聚焦形成的 pH 梯度与该酶在凝胶上移动距离之间三次测量的平均值, 用直线回归分析结果的数值 (相关系数 $r = 0.996$)。说明两者的相关性十分密切。

表 1 钉螺足肌酯酶同功酶各分组的 pI (等电点) 值

区带号	测量值	pI 回归分析统计值	酯酶同功酶*
I 1	4.50	4.50	1
II 3	4.60	4.69	1
	4.80	4.73	1
III 5	5.00	5.05	2
	5.30	5.38	2
IV 7	5.50	5.51	3
	5.80	5.74	3
V 9	6.00	5.88	4
	6.20	6.07	4
	6.50	6.57	4
VI 13	6.70	6.71	1
	6.90	6.94	1
	7.10	7.12	1

* 1. 羧基酯酶; 2. 乙酰酯酶; 3. 芳基酯酶; 4. 胆碱酯酶。

用不同的分离方法对 II—VII 各位点的基因组合情况进行观察, 发现各地钉螺表现出不同程度的变异现象 (图 4、5), 这些位点变异表现相当明显, 如图 4B、C、D 所示; 但相同地区钉螺有些位点表现相当稳定, 经过多次重复试验, 还没有发现个体间基因的明显变异现象 (图 3B、D)。位点中基因变异最大的, 要推 I、VII 二位点, 可能两者是比较特殊的 (图 5)。对照圆扁螺的该酶位点的基因特点与钉螺的完全不同, 表明两者是不同质的。

2. 酶谱特点和位点的查出率

10 省 23 个县的钉螺试验结果, 同一地区的酯酶同功酶谱的基本特点相同, 但个体间有小的差异。不同地区的钉螺的该酶谱基本特点大多数是有差异的 (图 6), 这种不同是可重复的。同一省内不同水系的各地区钉螺的该酶谱的基本特点有所不同, 如浙江衢县和嵊县、安徽休宁与贵池、福建霞浦与莆田、湖北黄梅与浦圻、广西天等与都安等都是如此。反之, 同一省内两者水系有关联的地区钉螺的酶谱特点基本相同, 如安徽贵池与石台、江西南昌与进贤、湖南益阳与华容、湖北汉川与钟祥、云南大理与下关等都是如此 (图 6)。山区钉螺孳生地隔离孤立的比湖区水系有关联地区钉螺的该酶谱变化要大些和复杂些。

从 23 个地区钉螺酯酶同功酶位点的查出率来看, 在检查 487 个钉螺中, 有 8 个地区的查出螺数在 24—50 之间, 故计算了各位点总的查出率, 其余 15 个地区由于螺数太少, 不予计算。各地区各位点总的查出率不同, 有的比较稳定, 各次各地每个钉螺均可查到, 无明显变化, 如 II、VI 二位点 (羧基酯酶) 的查出率为 100%。III、IV 二位点 (乙酰酯酶和芳基酯酶) 的查出率不稳定, 分别为 32.9 和 47.6%, 有一部分地区的一些钉螺中没有查到, 如吴江、华容、汉川、天等、西昌等。益阳、大理、下关、都安仅查到少数的 IV 位点 (芳基酯酶)。V 位点 (胆碱酯酶) 在每个地区大部分钉螺中均查到, 查出率为 75.6%。VII 位点也是羧基酯酶, 但有别于其他羧基酯酶, 该位点的查出率为 32.0%。

不同性别的个体钉螺酯酶同功酶个别虽略有不同,但基本特点相同,表明是同质的。

讨 论

在6省8个地区钉螺中分出的 α -磷酸甘油脱氢酶(结合NAD⁺)除了浙江嵊县一地以外,都只查到一个区带,表明该酶的遗传基因组合是单型的,这一点与Jelnes(1979)报告非洲小泡螺分出该酶是单型的结果是一致的。至于我们在嵊县钉螺重复分出二个区带的原因可能是由于局部地区基因变异所造成的,不能认为该县的钉螺已成新种。Jelnes(1979)还指出,根据小泡螺用淀粉凝胶电泳分离法分出了分子大小不同的 α -磷酸甘油脱氢酶,已定出了二个新种。Rollinson(1979)稍后对这种螺蚬分类法提出了不同的看法,认为这种方法不可靠。我们与这些学者试验所用的螺种、方法都完全不同,故难以判断。不过据我们的资料来判断,虽然个别地区该酶有差异,但应结合形态等特点加以全面考虑,不能单靠一种酶作为分类的依据。

本研究是以不同的分离方法和显色方法,不同的底物和不同的抑制剂试验等综合方法来查测酯酶的位点及其变异情况。根据酶谱来推断该酶位点数为I—VII,计7个,除I位点二个基因(二聚体)外,其余的可能以2—4个不同的等位基因参与遗传。

在钉螺足肌和肝脏中分出的酯酶同功酶分别为13条和19条,都是由下列4种组分组成的,即:羧基酯酶、芳基酯酶、乙酰酯酶和胆碱酯酶。其中属羧基酯酶的有4个位点(I、II、VI、VII);胆碱酯酶(V)、乙酰酯酶(III)和芳基酯酶(IV)各1个位点。所有这几个位点的清晰度和查出率是不同的,I位点分离出虽然清晰,但有些样品查不到,可能与II位点混在一起,很难区分;III、IV、V、VI四位点,清晰度是好的,但有些位点变异性较大;VII位点变化最大。从查出率来看,II、VI、V三位点查出率较高,而且较稳定,I、III、IV三位点次之,而VII位点较低,约有一半地区三分之二的钉螺

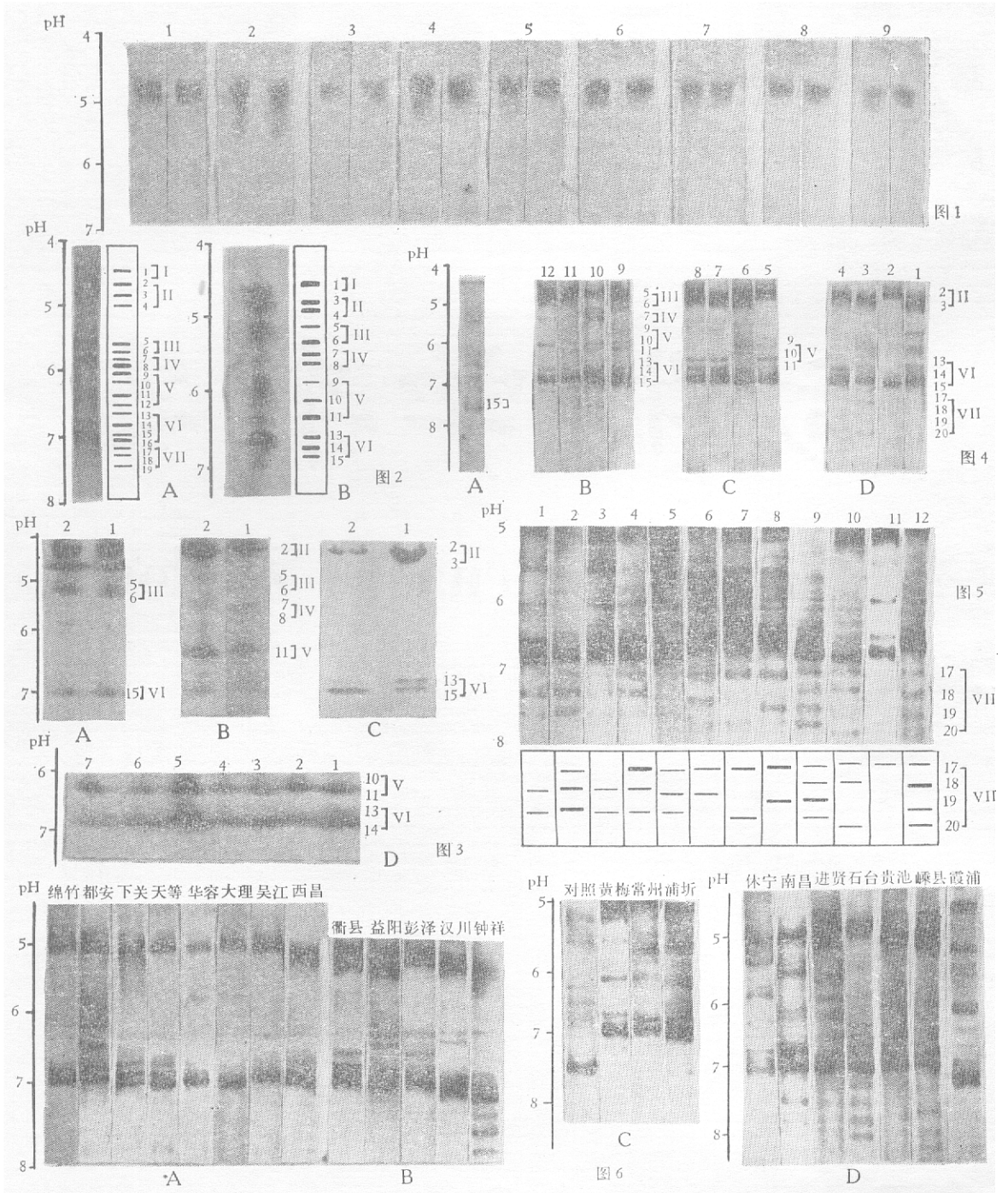
未查到,说明该位点的变异性较大。据马莱克(Malek 1971)、斯坦纳(Steiner 1979)等报告,在分析酶谱区带时,不能忽视构象区带(conformation band)出现的可能性。构象区带是蛋白质降解或代谢的产物,是没有遗传作用的。我们查到的这些位点中只有VII位点比较特殊,变异也大,这个位点是在整个软体和肝脏中查到,而没有在足肌中查到,但试验表明在前者中有32%的查出率,不是偶然出现的,因此似可排除构象区带存在的可能性。

我国幅员广大,钉螺分布地区的类型较多,由于地域不同,环境条件不同,因此钉螺的生理生化特点也不尽相同,可能影响到种群分化;而且钉螺的形态特点也不稳定,所以单靠形态学方法不能解决分类的问题,必须辅以生物化学、免疫学、遗传学等方面的研究,才能澄清我国钉螺的分类问题。

参 考 文 献

- [1] 郭源华,许学积,陈国忠 1980 钉螺的同功酶和核糖核酸的研究。中国医学科学院学报, 2: 206—208。
- [2] 许学积,郭源华 1980 用盘电泳和等电聚焦方法分离钉螺足肌蛋白的研究。中国医学科学院学报, 2: 209—212。
- [3] Bair, R. D. and Etges, F. J. 1973 Differences in esterase frequencies in five strain of *Biomphalaria glabratus* (Say). Int. J. Parasitol. 3: 43—46.
- [4] Davis, G. M. 1967 The systematic relationship of *Pomatiopsis lapidaria* and *Oncomeletia hu-pensis formosana* (Prosobranchia: Hydrobiidae). Malacologia 6: 1—143.
- [5] Davis, G. M. and Lindsay, G. K. 1967 Disc electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations. Malacologia 5: 311—334.
- [6] Houk, E. J., Cruz, W. O. and Hardy, J. L. 1978 Electrophoretic characterization of the nonspecific esterases of the mosquito, *Culex tarsalis*: Conventional and isoelectric focused acrylamide gels. Comp. Biochem. Physiol. 61B: 291—295.
- [7] Jelnes, J. E. 1979 Taxonomical studies on *Bulinus* using isoenzyme electrophoresis with special reference to the africanus group on Kano Plain, Kenya. Malacologia 18: 147—149.
- [8] Jelnes, J. E. 1979 Experimental taxonomy of *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae) II. Recipes for horizontal starch gel electrophoresis of ten enzymes in *Bulinus* and description of internal standard systems and of two new species of the

- Bulinus forskali* complex. J. Chromato. 190: 405—411.
- [9] Malek, E. A. and File, S. K. 1971 Electrophoretic studies on the digestive gland esterases of some *Biomphalarid* and *Lymnaid* snails. Bull WHO 45: 819—825.
- [10] Narang, S. and Narang, N. 1975 Esterases in *Biomphalaria glabratus* (Mollusca: Pulmonata): Characterization, polymorphism, inheritance pattern and interspecific differences. Ann. Acad. Brasil. Cienc. 47: 4 (abstract).
- [11] Rollinson, D. 1979 The use of enzymes in taxonomy of *Bulinus*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73: 601—602.
- [12] Rollinson, D. and Southgate, V. R. 1979 Enzyme analyses of *Bulinus africanus* group snails (Mollusca: Planorbidae) from Tanzania. Tran Roy Soc Trop & Hyg 73: 667—672.
- [13] Steiner, W. W. M. and Joslyn, D. J. 1979 Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. Mosquito News 39: 35—54.
- [14] Wright, C. A. and File, S. K. 1968 Digestive gland esterases in the genus *Bulinus* (Mollusca: Planorbidae). Comp. Biochem. Physiol. 27: 871—874.
- [15] Wright, C. A. and Rollinson, D. 1979 Analysis of enzymes in *Bulinus africanus* group (Mollusca: Planorbidae) by isoelectric focusing. J. Natur. Hist. 13: 263—273.



《各地钉螺 α -磷酸甘油脱氢酶和酯酶同工酶变异的研究》一文之附图 (正文见 1 页)

图 1 各地钉螺 α -磷酸甘油脱氢酶谱的比较 1. 贵池 2. 歙县 3. 衢县 4. 霞浦 5. 绵竹 6. 大理 7. 下关 8. 天等 9. 对照(圆扁螺)

图 2 钉螺的肝脏和足肌酯酶同工酶各位点基因 A. 肝脏 B. 足肌 1—4 羧基酯酶 5、6 乙酰酯酶 7、8 芳基酯酶 9—12 胆碱酯酶 13—19 羧基酯酶

图 3 相同地区钉螺酯酶同工酶各位点的基因(板状等电聚焦) A. 乙酰酯酶位点 B. 四种组分 II-V 位点 C. 羧基酯酶位点 D. 胆碱酯酶位点 图上方 1—7 为钉螺编号

图 4 不同地区钉螺酯酶同工酶各位点基因变异情况(管状等电聚焦) A. 对照(圆扁螺酯酶同工酶谱) B. 芳基酯酶位点和乙酰酯酶位点基因变异 C. 胆碱酯酶位点基因变异 D. 羧基酯酶位点基因变异 图上方 1—12 为钉螺编号

图 5 各地钉螺整个软体组织酯酶同工酶 VII 位点基因变异情况 1. 南昌 2. 钟祥 3、4. 浦圻 5. 进贤 6—8. 霞浦 9. 石台 10. 西昌 11. 黄梅 12. 歙县

图 6 各地钉螺酯酶同工酶谱的基本特点(管状等电聚焦) A. 乙酰酯酶和芳基酯酶缺乏,胆碱酯酶较差,羧基酯酶较明显。 B. 乙酰酯酶和芳基酯酶缺乏,胆碱酯酶和羧基酯酶较明显。 C. 乙酰酯酶较明显。 D. 乙酰酯酶缺乏,胆碱酯酶和羧基酯酶较明显。