

华枝睾吸虫和东方次睾吸虫囊蚴形态、同工酶及蛋白质等比较研究

吴中兴 邢道荣 郑葵阳 陈有贵

(徐州医学院寄生虫病研究室)

叶炳辉

(南京医学院寄生虫学教研室)

在华枝睾吸虫病流行病学调查过程中, 检查第二中间宿主淡水鱼类有无囊蚴感染是重要的一环。华枝睾吸虫囊蚴和东方次睾吸虫囊蚴的外部形态颇为相似, 初学者鉴别较难, 我们进行了形态大小的测量和观察, 并将两种囊蚴的乳酸脱氢酶同工酶, 苹果酸脱氢酶同工酶和酯酶同工酶的酶谱及蛋白质等作了比较研究, 兹将结果报告如下。

一、两种囊蚴的形态测量

(一) 材料和方法 从市场购得麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*), 在实验室去鱼头和内脏, 将鱼肉绞碎, 称重, 放入锥形量杯内, 按 1:25 加入人工消化液, 置 37°C 温箱内过夜, 并多次用玻璃棒搅拌或振摇, 使充分消化。将人工消化的鱼肉, 倒去上层消化液, 反复清洗, 再将鱼肉沉渣分次倒入生理盐水玻皿中, 在实体显微镜下用小吸管收集囊蚴, 滴加载玻片上再加盖玻片 (18 × 18mm), 在显微镜下观察和测量。

(二) 结果

1. 两种囊蚴的大小及囊壁厚度(见表 1)

2. 两种囊蚴的外形多见椭圆形和圆形。华枝睾吸虫囊蚴口吸盘为 43.5—50.6 微米, 腹吸盘为 50.5—53.1 微米, 排泄囊呈黑褐色, 颗粒较大, 每个颗粒约 4.1—8.5 微米。东方次睾吸虫囊蚴的口吸盘为 49.2—58.9 微米, 腹吸盘为 47.1—

表 1 两种囊蚴大小的测量统计 (单位: 微米)

项目	华枝睾囊蚴	东方次睾吸虫囊蚴
长度	127.5—170	147—176.8
(平均值)	138—146	161.2—168
宽度	110.5—156	122—163
(平均值)	133—140.5	143—149
囊壁厚度	1.7—5.1	8.5—20.4
(平均值)	4.0—4.04	11.6—13.1

54.7 微米, 排泄囊呈棕黄色, 颗粒较小, 每个颗粒约 1.7—4.7 微米。

二、两种囊蚴同工酶的比较

(一) 材料和方法

1. 囊蚴匀浆的制备

匀浆液配方 0.2mol/L Tris 25ml, 0.1 mol/L HCl 45ml, 蒸馏水 30ml, Triton (X-100) 0.5ml。

从麦穗鱼检获两种囊蚴的阳性鱼肉, 用人工消化液分离出华枝睾吸虫囊蚴及东方次睾吸虫囊蚴, 并分别计数 2,000 个, 先用蒸馏水洗涤两次, 再用上述匀浆液洗涤两次, 吸干多余的液体, 加入 0.5ml 匀浆液, 用组织磨碎器, 置冰水中人工磨碎成浆, 再以 2000 转/分离心 12 分钟, 放入 4°C 冰箱待用。

2. 电泳 采用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳 (PAGE) 法, 根据 Davis 方法制备 7.5% 分离胶 pH8.9 和 2.5% 浓缩胶 pH6.7 Tris-甘氨酸

缓冲系统。电压：浓缩胶为 240V，分离胶为 360V，冰浴降温，以溴酚蓝为指示剂，当溴酚蓝线接近底部管口时停止电泳。

3. 染色

(1) 乳酸脱氢酶同工酶染色液

0.5mol/L 乳酸钠	10ml
0.1% N-甲基吩嗪硫酸盐 (PMS)	2ml
0.3% 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)	10ml
辅酶 I (NAD)	25mg
蒸馏水	28ml

(2) 苹果酸脱氢酶同工酶染色液

苹果酸溶液 (2.76g/25ml 用 NaOH 调至中性) 2.5ml

氰化钾溶液 0.01 mol/L	1ml
辅酶 I (NAD) 0.01 mol/L	0.25ml
氯化硝基四氮唑蓝 (50mg/ml)	0.25ml
N-甲基吩嗪硫酸盐 (1.6mg/ml)	0.25ml
Tris-HCl pH8.0 0.01 mol/L	1.75ml

(3) 酯酶同工酶染色液

醋酸- α -萘脂	20mg
丙酮	2ml
0.1 mol/L pH6.4 磷酸缓冲液	20ml
坚固蓝	20mg

电泳完毕将圆柱凝胶剥离，立即移至上述三种染色液中，37°C 水浴。酯酶同工酶半小时左右即呈现出咖啡色酶带，苹果酸脱氢酶同工酶和乳酸脱氢酶同工酶需数小时，酶带呈紫蓝色。

(二) 实验结果

1. 乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶：华枝睾吸虫囊蚴和东方次睾吸虫囊蚴的 LDH 都呈现三条带，其 Rf 值分别为 0.05、0.06、0.11 和 0.05、0.06、0.15，仅第三条酶带有所不同 (图 1-1)。

2. 苹果酸脱氢酶 (MDH) 同工酶：华枝睾吸虫囊蚴的 MDH 呈显四条带，Rf 值为 0.05、0.125、0.25、0.40；东方次睾吸虫囊蚴的 MDH 呈显三条带，Rf 值为 0.06、0.18、0.26，故两种囊蚴明显不同 (图 1-2)。

3. 酯酶 (Est) 同工酶，华枝睾吸虫囊蚴呈

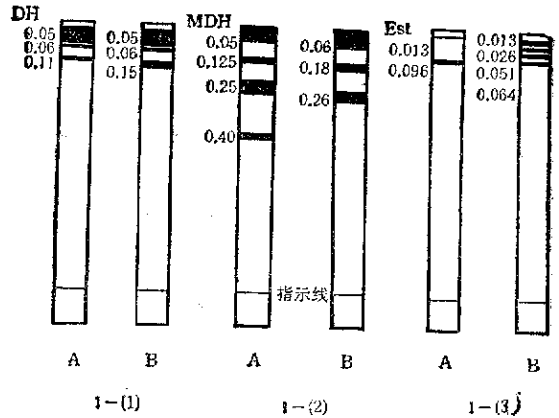


图 1 华枝睾吸虫囊蚴 (A) 及东方次睾吸虫囊蚴 (B) 三种同工酶酶谱比较图 (PAGE 法)

(1) LDH 同工酶染色；(2) MDH 同工酶染色；(3) Est 同工酶染色。

三条带，Rf 值 0.0、0.013、0.096；东方次睾吸虫囊蚴呈显四条带，Rf 值 0.013、0.026、0.051、0.064。两种囊蚴明显不同 (图 1-3)。

四、两种囊蚴的蛋白质、脂、糖类的比较

材料和电泳方法同前，电泳后用氨基黑染蛋白质，用雪夫氏试剂 (PAS) 染糖，用苏丹黑染脂质。

华枝睾吸虫及东方次睾吸虫囊蚴的蛋白质染色各显一条区带，其 Rf 值为 0.013 (图 2-1)，糖类染色，两种囊蚴各显一条区带，Rf 值为 0.04 (图 2-2)，脂类染色：华枝睾吸虫囊蚴显示

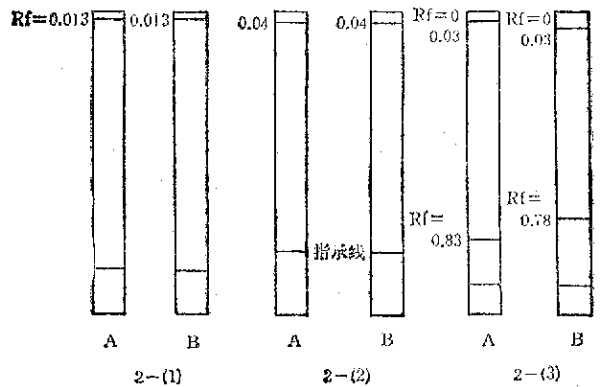


图 2 华枝睾吸虫囊蚴及东方次睾吸虫囊蚴 (B) 的 PAGE 区带图

(1) 蛋白质染色 (氨基黑染色)；(2) 糖类染色 (PAS 染色)；(3) 脂类染色 (苏丹黑染色)。

三条区带, Rf 值为 0、0.03、0.83; 东方次睾吸虫囊蚴也显示三条区带, Rf 值为 0、0.06、0.78(图 2-3)。

四、讨论和结语

1. 华枝睾吸虫囊蚴和东方次睾吸虫囊蚴通过测量观察, 在大小方面无明显差异。主要是囊壁厚度区别显著。东方次睾吸虫囊蚴囊壁较厚且透明, 即使在低倍镜(10×10)或在实体显微镜下也能鉴别, 但必须经常观察, 才能熟练掌握。

2. 采用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳(PAGE), 染色, 两种囊蚴的 LDH 呈现三条酶带, 但 Rf 值有所不同, MDH. Est 两种囊蚴有明显差别, 蛋白质染色两种囊蚴相同, 糖类染色也相同, 脂

类染色呈现三条区带, 但 Rf 值有所不同。

考虑到仪器设备和方法学的不同, 可能会出现更明显的差异结果, 因此还可以采用等电聚焦作进一步研究。

参 考 文 献

- 叶炳辉等 1982 两室内品系中华按蚊酯酶同工酶比较研究 南京医学院学报 2(3): 6—8。
- 叶炳辉等 1983 两室内品系中华按蚊苹果酸脱氢酶(MDH)和乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的比较研究南京医学院学报 3(4): 5—8。
- Rotmans JP 1978. Schistosoma mansoni purification and characterization of malate dehydrogenases. *Exp. Parasitol.* 46:31.
- Sundaram Tk. et al. 1960. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria, molecular size subunit structure, amino acid composition immun-ochemical homology and catalytic activity, *Biochemistry.* 19:2017.