

福建棘隙吸虫广东株与福建株的 LDH 同工酶及蛋白质分析

程由¹ 许玉德² 杨文川² 李友松¹ 林金祥¹
潘林祥³ 汪琦² 石磊² 杨佐河³ 余广兴⁴

摘要: 目的 探讨福建与广东两地福建棘隙吸虫生化特点。方法 用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳及薄层等电聚焦电泳等进行分析虫体乳酸脱氢酶(LDH)同工酶和蛋白质。结果 福建与广东两地虫株都有5种LDH同工酶,其中LDH₁、LDH₄和LDH₅的迁移率相同;蛋白质电泳都分离出9条区带,其中有7条带的等电点相同。但在LDH₂和LDH₃的迁移率,蛋白质区带的相对含量,同工酶的总活力与比活力,以及A和B亚基的含量等存在差异。结论 LDH同工酶与蛋白质的某些差异,可归因为基因型相似条件下所出现两地虫株生化遗传上差异。

关键词: 福建棘隙吸虫; 虫株; LDH同工酶; 蛋白质

ANALYSES ON LDH ISOENZYME AND PROTEIN FROM BOTH GUANGDONG STRAIN AND FUJIAN STRAIN OF *ECHINOCHASMUS FUJIANENSIS*

CHENG YouZhu, XU Yude, YANG Wenchuan,

LI Yousong, LIN Jinxiang, WANG Qi, SHI Lei, YANG Zuohe, YU Guangxing

(Fujian Provincial Institute of Parasitic Diseases, Fuzhou 350001)

ABSTRACT: **Aim** Inquired into the biochemical characteristics of *Echinochasmus fujianensis* found in Fujian and Guangdong provinces. **Methods** Compared and analysed two strains by LDH isoenzyme electrophoresis, discontinuous PAGE and thinlayer isoelectric equilibrium PAGE. **Results** Two strains both had five LDH isoenzyme, among them, LDH₁, LDH₄ and LDH₅ had the same mobilities. There were nine bands in protein electrophoresis. Seven bands had the same isoelectric point. But there were differences in the mobilities of LDH₂ and LDH₃, the comparative amount of protein bands total and specific activity of isoenzyme and the amount of A and B subunit. **Conclusion** Under the similar condition of genotypes the differences of the biochemical inheritance can be contributed to the differences of LDH isoenzyme and protein.

KEY WORDS: *Echinochasmus fujianensis*; Strains; LDH isoenzyme; Protein

中图分类号: R373.2 文献标识码: A 文章编号 1002-2694(2000)05-0080-04

福建棘隙吸虫(*Echinochasmus fujianensis*)是在全国人体寄生虫分布调查中发现并以发现地命名,在福建南部调查,人群感染率为3.2%,保虫宿主有犬、猫、猪、黄毛鼠和褐家鼠5种,并且还可感染鸡等动物,是人、畜、禽类共同的寄生虫病原^[1]。该虫生活史感染实验与自然感染调查,均证明其第一中间宿主为铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*),同时阐明各期幼虫形态特征,进一步为确立新种提供依据。鉴于我国人体棘隙吸虫病病原种类问题尚存在争议,近年我们结合形态学研究与分子生物学技术分析,证明在安徽省发现感染人体的藐

小棘隙吸虫即为福建棘隙吸虫^[2],当地人群感染率高达13.4%^[3]。根据广东省平远县报告人体感染棘口吸虫形态学资料^[4],认为该虫与福建棘隙吸虫也很近似。为此,通过现场调查与形态学鉴别以及DNA(RAPD)比较分析^[5],认定当地为福建棘隙

*福建省科技计划基金资助项目(No. 98-Z-156);福建省“百万人才”人选培养资金资助项目

作者单位: 1 福建省寄生虫病研究所(福州, 350001)

2 厦门大学生物学系

3 广东省梅州市卫生防疫站

4 广东省平远县坝头卫生院

吸虫流行区。本文应用乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶和蛋白质等电点测定技术, 对福建棘隙吸虫广东株与福建株进行对比分析, 以期从生化角度提供两地福建棘隙吸虫生化特点资料。

1 材料与方法

1.1 标本来源 从广东省平远县坝头村福建棘隙吸虫流行区的鱼塘内自然感染麦穗鱼与福建省龙海市港尾村人工实验池内麦穗鱼分离得的福建棘隙吸虫囊蚴分别感染实验小犬 1 只, 2 个月后解剖, 取出肠道内虫体, 按其形态特征在镜下分别检出两地虫体。实验小狗感染前 10d 两次粪检吸虫卵阴性。

1.2 标本制备 本实验均用活虫, 经蒸馏水洗涤 3 次, 滤纸吸干, 分别称取虫体 1g, 冰浴下匀浆, 加 5 倍体积的 0.01mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4), 低温离心 (10000r/min, 5min) 取上清液, 4℃ 保存备用。

1.3 LDH 酶活力和比活力测定 用乳酸作底物, 加氧化型酶 I, 在 pH10 的条件下, 通过测定生成的丙酮酸的量求得 LDH 酶的总活力。蛋白质浓度用 Folin-酚试法测定, 计算出比活力。

1.4 LDH 同工酶分离 采用不连续柱状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。分离胶浓度 (T) 7%, 交联度 (C) 2.6%, pH8.9; 浓缩胶 T 3.1%, C 20%, pH6.7。加 LDH 酶提取液 50ml/管, 用 pH8.3Tris-甘氨酸电极缓冲液, 恒流 2mA/管, 电泳约 2h。凝胶带用 LDH 酶活性染色, 再用 7% 乙酸固定, 最后用扫描仪扫描, 并依据扫描图各酶的 OD 值计算出 A 亚基和 B 亚基的相对含量。

1.5 蛋白质等电压测定 采用薄层等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶 T 7.5%, C 3.5%, 两性电解质载体浓度 1.9%, pH 范围 3~10。加蛋白质提取液 50ml/管, 正极缓冲液 1mol/L H₃PO₄, 负极缓冲液 1N NaOH, 4℃ 下, 恒压 180V, 电泳约 3h。凝胶用考马斯亮蓝染色, 再用 7% 乙酸固定, 最后用扫描仪扫描。依据各蛋白质电泳区带的 OD 值计算出其相对含量。

2 结果

2.1 两地福建棘隙吸虫蛋白质含量与 LDH 同工酶活性 测出广东株的蛋白质含量为 6.20mg/ml, 福建虫株为 6.10mg/ml 两者蛋白质浓度相近。测出广东株和福建虫株的 LDH 酶总活力与比活力分别为 17.53u/ml; 2826.61 μ /g 和 13.67 μ /ml; 2240.74 μ /g, 前者酶总活力和比活力分别比后者强 3.96u/ml 与 58.578 μ /g。

2.2 LDH 同工酶分离 广东虫株与福建虫株均分离出 5 种 LDH 同工酶, 从正极到负极依次为 LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄、LDH₅ (图 1、3), 两地虫体的 LDH₁、LDH₄ 和 LDH₅ 的迁移率相同, 差异在 LDH₂ 和 LDH₃ (表 1)。

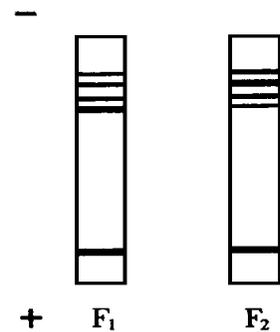


图 1 闽广两地福建棘隙吸虫 LDH 同工酶电泳示意图

F₁ 福建虫株; F₂ 广东虫株

Fig 1 Electrophoresis schemata of LDH isozyme of *E. fujianensis* in Fujian (F₁) and Guangdong (F₂)

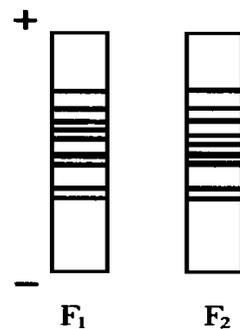


图 2 闽广两地福建棘隙吸虫蛋白质等电聚焦电泳示意图

F₁ 福建虫株; F₂ 广东虫株

Fig 2 Electrophoresis schemata of protein of *E. fujianensis* in Fujian (F₁) and Guangdong (F₂)

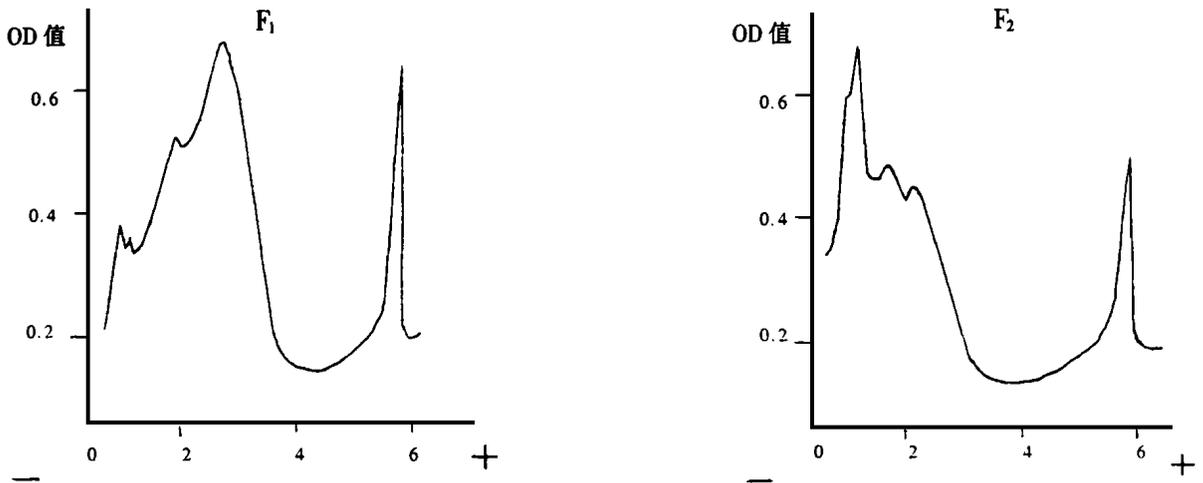


图3 闽广两地福建棘隙吸虫 LDH 同工酶电泳扫描图

F₁. 福建虫株 F₂. 广东虫株

Fig 3 Scanning patterns of LDH isozyme of *E. fujianensis* in Fujian (F₁) and Guangdong (F₂)

表1 闽广两地棘隙吸虫 LDH 同工酶电泳迁移率

Tab 1 Relative migratory rates of LDH isozyme of *E. fujianensis* in Fujian and Guangdong

	广东虫株 Guangdong strain	福建虫株 Fujian strain
LDH ₁	0.943	0.943
LDH ₂	0.301	0.396
LDH ₃	0.226	0.245
LDH ₄	0.142	0.142
LDH ₅	0.104	0.104

的 A 亚基和 B 亚基相对含量均有程度不同的差异 (表 2)。

表2 闽广两地福建棘隙吸虫各 LDH 同工酶及亚基的相对百分含量 (%)

Tab 2 The relative content of LDH of *E. fujianensis* in Fujian and Guangdong

	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅	A 亚基	B 亚基
广东虫株 Guangdong strain	24.1	25.3	19.8	14.8	16.0	56.7	43.3
福建虫株 Fujian strain	19.1	16.2	17.9	24.9	22.0	46.3	53.4

福建棘隙吸虫广东株与福建株各 LDH 同工酶

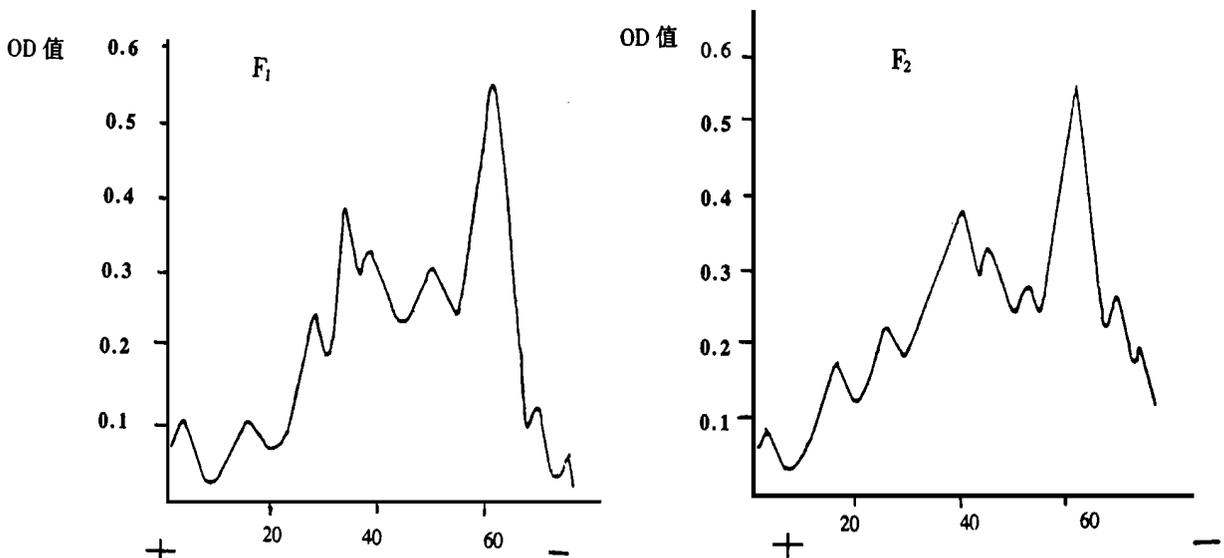


图4 闽广两地福建棘隙吸虫蛋白质等电聚焦电泳扫描图

F₁. 福建虫株; F₂ 广东虫株

Fig 4 Electrophoresis schemata of protein of *E. fujianensis* in Fujian (F₁) and Guangdong (F₂)

2.3 蛋白质等电点分离 福建棘隙吸虫广东株与福建株的蛋白质电泳的示意图和扫描图见图 2、4, 两者等电点均分离出 9 条电泳区带 (按正极到负极的顺序的罗马字母依次编号), 其中两者相同的蛋白质区带共有 7 条, 差异在 IV、V 区带上 (表 3)。

表 3 闽广两地福建棘隙吸虫蛋白质等电点 (PIs)

Tab 3 PIs of protein of *E. fujianensis* in Fujian and Guangdong

	广东虫株 Guangdong strain	福建虫株 Fujian strain
I	4.3	4.6
II	4.8	4.8
III	5.1	5.1
IV	5.3	5.4
V	5.4	5.6
VI	5.9	5.9
VII	6.0	6.0
VIII	6.2	6.2
IX	6.4	6.4

广东虫株与福建虫株蛋白质区带 I、II、IV 和 V 4 条相对含量基本相似, 其中 III、VI、VII 条福建虫株蛋白质带的相对含量较高; VIII、IX 2 条广东虫株蛋白质带的相对含量较高 (表 4)。

表 4 闽广两地福建棘隙吸虫蛋白质区带相对百分含量 (%)

Tab 4 The relative content of protein bands of *E. fujianensis* in Fujian and Guangdong

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
广东株 Guangdong strain	9.6	10.5	15.6	11.5	12.2	13.6	10.7	9.0	8.6
福建株 Fujian strain	9.5	10.7	14.0	11.2	12.0	12.8	10.3	10.3	9.1

3 讨论

动物体蛋白质的合成是受基因控制的, 它的生化表现型是在物种化过程中形成的, 其种属遗传特性和变异信息必然要被编入 DNA 遗传密码中去, 再经复制转录等系列程序, 最终在蛋白质分子构象中予以表达并可通过电泳方法被分离检出^[6]。从福建和广东两地福建棘隙吸虫的蛋白质等电聚焦电泳结果可以看出, 构成两虫株的蛋白属酸性蛋白, 等电点范围在 4.3~6.4 之间, 它们均可分离出 9 条蛋白区带, 除第 IV、V 条区带的等电点不相同外, 其余各区带的等电点均相同, 两者的各蛋白区带的相

对百分含量有一定差异但不显著。本实验结果表明, 构成两虫株的蛋白质等基本组成较为相似, 这与前文 RAPD 的分析结果相一致^[5], 因而进一步印证了它们的同属同种。

LDH 是动物体的糖代谢的关键酶。LDH 同工酶是由 A、B 两亚基按不同比率构成的四聚体, 控制该亚基的 A、B 两基因编码不同, 其生物活性随生物体的种属差异及器官组织的代谢特点而受到精细调节。因此, LDH 同工酶具有显著的种属特异性和组织特异性, 是可靠的物种差异鉴定遗传标记物^[7,8]。福建和广东两地福建棘隙吸虫 LDH 同工酶的共同点是均可分离得到 5 条酶带, 同时两者又有着明显的特征性差异, 最为突出的一点是广东株虫体的 LDH 总活力和比活力相对较高且表现为 B 亚基占优势的酶谱特征, 而福建株的 LDH 总活力和比活力相对较低, 且表现为 A 亚基占优势的酶谱特征。

从福建棘隙吸虫广东株与福建株的生化分析表明, 两者 LDH 同工酶与蛋白质上存在某些差异, 可归为基因型相似条件下所出现两地虫株的生化遗传上的差异。

4 参考文献

- 程由注、林金祥、方彦炎, 等. 福建棘隙吸虫流行病学调查与感染实验 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1994, 1: 10.
- 程由注、张耀娟、林陈鑫, 等. 福建棘隙吸虫与相关虫种随机引物扩增多态 DNA 分析及感染实验观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1999, 17: 135.
- 肖祥、汪天平、吕大兵, 等. 人体自然感染藐小棘隙吸虫首次发现 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1992, 10: 132.
- 潘林祥、姚良治、余碧秀. 棘口科吸虫人体感染 4 例报告 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6 (2): 23.
- 程由注、李友松、林金祥, 等. 广东省平远县鱼源性吸虫混合感染调查及 DNA (RAPD) 分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16 (3): 52.
- 杨凤幼. 蛋白质电泳在动物分类学中的应用 [J]. 动物学报, 1988, 23 (3): 46.
- 何毅勤、李新武、胡亚青等. 中国大陆日本血吸虫品系的研究 [J]. VI: 多位点酶电泳分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9 (4): 290.
- 罗仲金、王玲、刘庆, 等. 人蛔虫、猪蛔虫和犬蛔虫乳酸脱氢酶同工酶的比较研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1988, 6 (2): 136.

2000 年 1 月 2 日收稿 2000 年 3 月 30 日修回