

中国大陆钉螺种群遗传学研究*

IV. 钉螺等位基因酶谱

孙乐平 周晓农 洪青标 吴中兴

江苏省血吸虫病防治研究所 (无锡 214064)

TK Kristensen

Danish Bilharziosis laboratory 2920 Denmark

摘要 本研究采用水平淀粉凝胶电泳,对中国大陆 7 个地区钉螺的 13 个等位基因酶谱进行了分析。结果:在 17 个等位基因位点中 10 个为无变异的单态位点:Aldeh、Ao、G6pd、Gpdh、Hbdh、Ldh、Sdh、Est-2、Est-3 和 Est-6;7 个为变异的多态位点:Est-4、Est-5、Xdh、Mdh、Idh、Got 和 Ap。在检测的 13 个酶中,检出 6 个多态位点酶:EST、XDH、MDH、IDH、GOT 和 AP,占所测酶数的 46.15%,结果提示:7 地钉螺间存在着一定的亲缘关系,但其基因水平发生了变异,7 个呈多态性的等位基因位点可能为影响中国大陆钉螺遗传变异较为重要的等位基因位点。

关键词 钉螺 种群 等位基因酶谱 多态基因位点

日本血吸虫的中间宿主—钉螺在中国大陆分布范围广,面积大,环境类型复杂,螺壳特征存在相当大的差异^[1]。应用传统的形态分类法,较难作出正确的判断。近年等位基因酶电泳技术已被用来进行种群遗传基因研究。许多学者发现种群或种水平的遗传基因变异形式,以及高度的遗传基因变异与地理区域、移居、气候相一致^[2,3,4]。因此,为进一步研究中国大陆不同种群钉螺的分化程度、地域变异、钉螺易感性基因。我们开展了中国大陆钉螺种群遗传学研究^[5,6,7]。现将其中的 7 个代表性地区钉螺种群的等位基因酶谱报告如下。

材料与方法

1 钉螺来源及样本制备

实验用的 7 个钉螺群体分别采自安徽铜陵山区(AHDLH),福建福清山区(FJFQ),湖北潜江湖区(HBJJ),江苏盐城沿海地区(JSYZ),上海金山水网地区(SHSM),四川丹陵山区(SZDY),云南巍山山区(YNWS)。

将各地采集的钉螺在实验室作短期饲养

后,分别随机挑取成螺 5—25 只,用脱氯水清洗,并用干净滤纸吸掉多余水份,再按每个钉螺加入 0.1—0.2ml 双蒸馏水,在冰浴中匀浆,再经 1 500r/min 低速离心 5min,上清液即为钉螺电泳样品。

2 酶及试剂

实验用 13 种酶:醛氧化酶(AO)、醛脱氢酶(ALDH)、碱性磷酸酶(AP)、酯酶(EST)、谷草转氨酶(GOT)、谷氨酸脱氢酶(α -GPD)、羟丁酸脱氢酶(HBDH)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、山梨醇脱氢酶(SDH)、黄嘌呤脱氢酶(XDH)、磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)和各种酶的底物、辅酶、电泳用淀粉等主要试剂均购自 Sigma 公司。

3 电泳方法

按 Pasteur 等(1987)^[8]的方法进行水平淀粉凝胶电泳。各种酶的电泳工作条件见附表。以酶促偶联染色(浸染法)进行特殊酶染

* 本课题得到联合国开发署/世界银行/世界卫生组织热带病研究和培训特别规划署的资助

色^[9]。酶带显色后,用终止液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水=5:1:5)终止反应,并立即拍照,测量,记录,根据酶活性区域中点与指示剂溴酚兰的移动距离之比,计算相对迁移率(Rf),并将数据输入计算机绘制各种酶的等位基因图谱。

结 果

1 等位基因位点检出情况 中国大陆 7 地钉螺 13 个酶,共获 20 个等位基因点。其

中 17 个获得可解释的带型用于分析。在 17 个测定基因位点中 10 个为无变异的单态等位点: Aldh、Ao、G6pd、Gpdh、Hbdh、Ldh、Sdh、Est-2、Est-3 和 Est-6; 7 个为变异的多态位点: Est-4、Est-5、Xdh、Mdh、Idh、Got 和 Ap,在 7 个变异的多态位点中 4 个位点显示二聚体(dimer): Ap、Got、Mdh-2 和 Idh-2, 3 个位点显示出单体(monomer): Est-4、Est-5 和 Xdh。

表 1 13 个酶的基因位点及电泳工作条件

Table 1 The condition for electrophoresis in Benzene systems

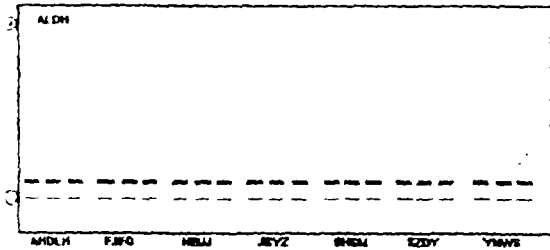
酶 Enzymes	基因位点 Alleles	缓冲系统 Butter system		电流 Voltage (mA)	温度 Temperature (℃)	时间 time (h)	
		名称	Name				pH
Ao EC1.2.3.1	Ao	LioH		8.25	12	4	14
ALDH EC1.2.1.5	Ald	LioH		8.25	12	4	14
Ap EC3.1.3.1	Ap	TC-8		8.10	12	4	14
EST EC3.1.1.1	Est-1	LioH		8.25	12	4	14
	Est-2						
	Est-3						
	Est-4						
	Est-5						
	Est-6						
GOT EC2.6.1.1	Got	LioH		8.25	12	4	14
α-GPD EC1.1.1.8	Gβd	TC-7		6.80	8	4	14
G6PD EC1.1.1.49	G6βd	LioH		8.25	12	4	14
HBDH EC1.1.1.30	Hbd	TC-8		8.10	12	4	14
IDH EC1.1.1.42	Idh-1	TC-7		6.80	8	4	14
	Idh-2						
LDH EC1.1.1.27	Ldh	LioH		8.25	12	4	14
MDH EC1.1.1.37	Mdh-1	TC-7		6.80	8	4	14
	Mdh-2						
SDH EC1.1.1.14	Sdh	LioH		8.25	12	4	14
XDH EC1.2.1.37	Xdh	LioH		8.25	12	4	14

2 等位基因酶和等位基因位点变异情况 在检测的 7 个地区钉螺 13 个酶中,检得多态位点酶 6 个,占所测酶数的 46.15%,它们分别是 EST、XDH、MDH、IDH、GOT 和 AP。在检得的可解释的 17 个等位基因位点中,有 7 个位点呈多态性,占检测位点的 41.18%。

3 等位基因位点在基因图谱上的分布

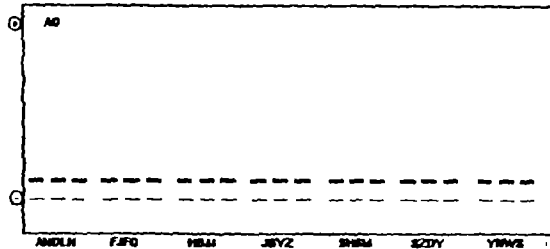
情况 10 个单态位点显示出单带,分别出现在: Aldh^{0.274}、Ao^{0.305}、G6pd^{0.290}、Gpdh^{0.175}、Hbdh^{0.290}、Sdh^{0.258}、Est-3^{0.406}和 Est-6^{0.072}位置上。而多态基因位点较为复杂。Est 共有 5 个基因位点,其中 Est-4 和 Est-5 为多态位点,Est-4 由 2 个等位基因(Est-4^{0.348}、Est-4^{0.314})组成,杂合子为 2 条带型同时出现。Est-5 由 2 个等位基因(Est-5^{0.280}、Est-5^{0.232})组成,杂合子为

2 条带型。Xdh 出现 2 个等位基因($Xdh^{0.280}$ 、 $Xdh^{0.243}$)、杂合子出现较少,为 2 条带型同时出现。Mdh-2 由 2 个等位基因($Mdh-2^{0.150}$ 、 $Mdh-2^{0.040}$)组成,较多样本出现在 $Mdh-2^{0.040}$ 基因上呈单带,部分样本出现 3 条带型的杂合子。Idh-2 由 2 个等位基因($Idh-2^{0.250}$ 、 $Idh-2^{0.073}$)组成,杂合子为 3 条带型。Got 为 2 个等位基因($Got^{0.470}$ 、 $Got^{0.400}$)组成,杂合子为 3 条带型。Ap 由 2 个等位基因($Ap^{0.320}$ 、 $Ap^{0.231}$)组成,杂合子的带型为 3 条(图 A-K)。



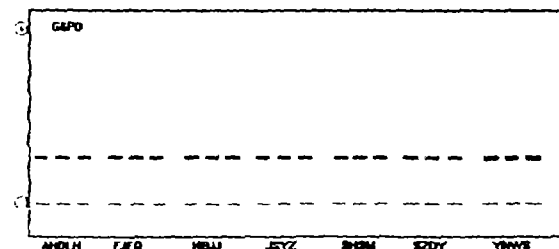
图A 7 地钉螺 Aldh 图谱

Fig A. Electrophoretic pattern of aldehyde dehydrogenase showing a mono-morphic zone in all populations



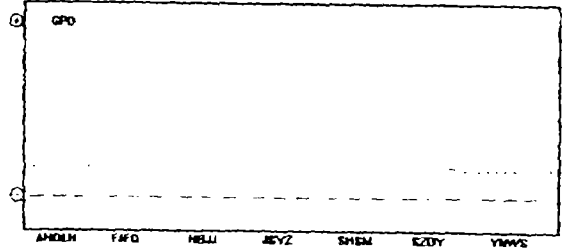
图B 7 地钉螺 Ao 图谱

Fig B. Electrophoretic pattern of aldehyde oxidase showing a mono-morphic zone in all populations



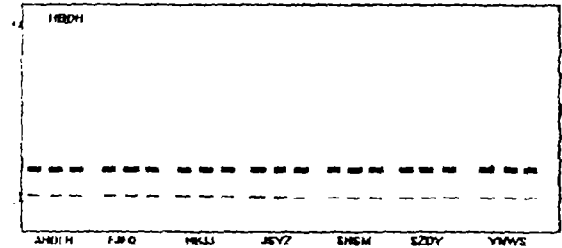
图C 7 地钉螺 G6pd 图谱

Fig C. Electrophoretic pattern of glycerol-6-phosphate dehydrogenase showing a mono-morphic zone in all populations



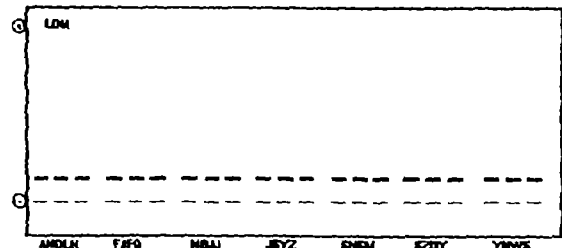
图D 7 地钉螺 Gpd 图谱

Fig D. Electrophoretic pattern of glycerol-3-phosphate dehydrogenase showing a mono-morphic zone in all populations



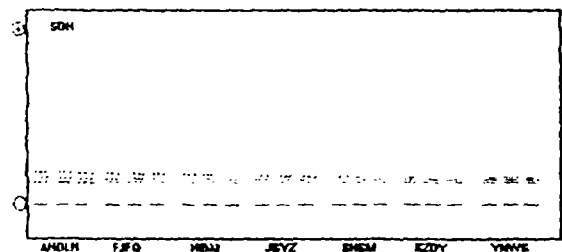
图E 7 地钉螺 Hbdh 图谱

Fig E. Electrophoretic pattern of B-hydroxybutyrate dehydrogenase showing a mono-morphic zone in all populations



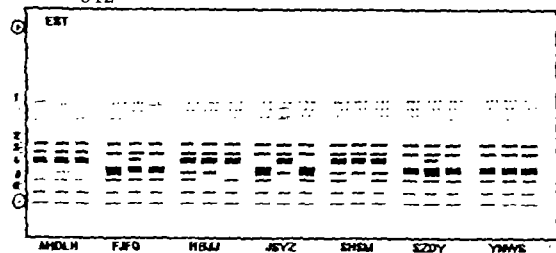
图F 7 地钉螺 Ldh 图谱

Fig F. Electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase



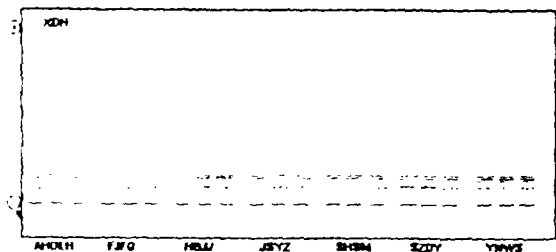
图G 7 地钉螺 Sdh 图谱

Fig G. Electrophoretic pattern of sorbital dehydrogenase



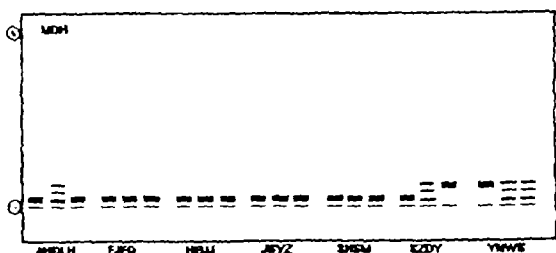
图H 7地钉螺 Est 图谱

Fig H. Electrophoretic pattern of esterases



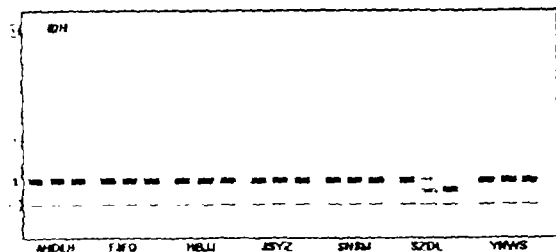
图I 7地钉螺 Xdh 图谱

Fig I. Electrophoretic pattern of xanthine dehydrogenase



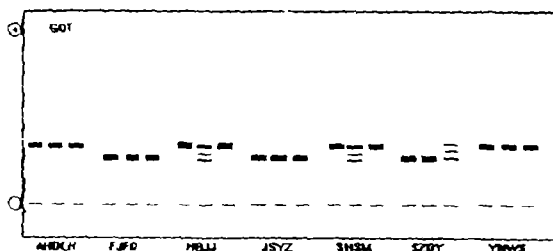
图J 7地钉螺 Mdh 图谱

Fig J. Electrophoretic pattern of malate dehydrogenase



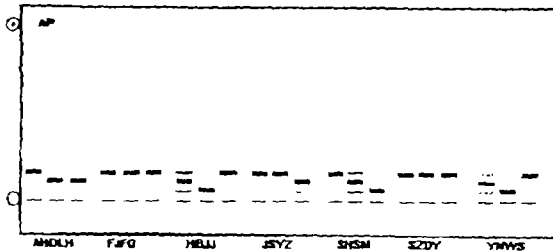
图K 7地钉螺 Idh 图谱

Fig K. Electrophoretic pattern of isocitrate dehydrogenase



图L 7地钉螺 Got 图谱

Fig L. Electrophoretic pattern of glutamate-oxaloacetate transaminase



图M 7地钉螺 Ap 图谱

Fig M. Electrophoretic pattern of alkaline phosphatase

讨 论

利用蛋白质电泳分析技术,国内外许多学者通过对医学贝类的同工酶谱、等位基因、群体结构、遗传变异等的研究,从生物化学的角度为生物分类获得了很有价值的结果^[4]。Michelson^[2],Morgaret^[10]运用同工酶分析方法得出了光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)群体在西印度群岛的差异是与该群体的地理位置上的隔离相一致的结论。郭源华等(1980年)检测了来自中国4省8个地区钉螺的6个酶谱,发现不同地区有差异。周晓农等^[11]发现四川省钉螺的酶带与湖北、江苏省钉螺在10多个等位点上有不同,而此三种钉螺同时与菲律宾夸氏钉螺的酶带类型有着更为显著差异。该遗传学证据提示,中国大陆钉螺统称为指名亚种不妥,至少有多个亚种存在,因此有必要对中国大陆钉螺进行深入的遗传学研究。

本研究应用水平淀粉凝胶电泳,分析了中国大陆7地区钉螺的13个基因酶谱,共检得7个无变异的基因酶和10个无变异的等位基因位点,分别占53.85%和58.82%。表

明中国大陆不同种群的钉螺间存在着一定的亲缘关系。

7 地钉螺等位基因位点在酶谱上的分布可见,17 个等位基因位点中有 7 个呈现多态性,基因位点较为复杂,均由 2 个等位基因组成,杂合子的带型有的为 3 条二聚体酶,有的为 2 条单体酶,提示中国大陆钉螺因环境和地域的明显不同,其基因水平发生了变异。呈现多态性的 7 个等位基因位点可能是影响中国大陆钉螺遗传变异较为重要的等位基因位点。

参 考 文 献

- 1 毛守白主编. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 北京:人民卫生出版社 1990,260
- 2 Michelson EA, et al. Am J Trop Med Hyg 1978,27: 982
- 3 张 仪,等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994,12(3): 172
- 4 周晓农,等. 中国血吸虫病防治杂志 1994,6 (增刊): 25
- 5 周晓农,等. 中国血吸虫病防治杂志 1995,7 (1): 1
- 6 周晓农,等. 中国血吸虫病防治杂志 1995,7 (2): 67
- 7 周晓农,等. 中国血吸虫病防治杂志 1995,7 (4): 202
- 8 Pasteur N, et al. Manuel technique de genétique par électrophorèse des protéines. Paris: Technique et Documentation (Larousse), 1987, 54—121
- 9 Richardson, B. J.; Barerstock, P. R.; Adams, M. Allozyme Electrophoresis. Academic press, Sydney 1986, 410
- 10 Mulrey M, et al. Malacologia 1988, 29: 309
- 11 周晓农,等. 中国血吸虫病防治杂志 1994,6 (5): 262

1995 年 3 月 22 日收稿 1996 年 1 月 11 日修回

(编辑:秦时君)

STUDIES ON THE POPULATION GENETICS OF *ONCOMELANIA* SPP. IN THE MAINLAND OF CHINA IV.

ELECTROPHORETIC PATTERN OF SNAIL ALLOZYME

Sun Leping, Zhou Xiaonong, Hong Qingbiao, Wu Zhongxing

Jiangsu Institute of Parasitic Diseases (Wuxi 214064)

TK Kristensen

Danish Bilharziasis Laboratory (2920, Cjarlottenlund, Denmark)

ABSTRACT

A total of 13 allozymes of 7 populations of *Oncomelania* snails from 7 provinces in the mainland China were examined by horizontal starch gel electrophoresis. Results demonstrated that out of 17 loci examined, 10 were monomorphic loci: Aldh, Ao, G6pd, Gpdh, Hbdh, Ldh, Sdh, Est-2, Est-3, and Est-6, and 7 were polymorphic loci: Est-4, Est-5, Xdh, Mdh, Idh, Got and Ap. Banding pattern showed that six enzymes were polymorphic accounting for 46.15% (6/13) of total enzyme systems examined. Results indicated that a certain of relative relationship was existed along with the significant variation presented based on their environment and location among the 7 populations of snails from the mainland of China. It was revealed that the 7 polymorphic loci were the important loci affecting the genetic variation in the different populations of *Oncomelania* spp.

Key words: *Oncomelania* snails, Population, Banding pattern of allozyme, polymorphic loci