

文章编号:1000-7423(2003)-02-0102-04

不同地域阴道毛滴虫品系的同工酶电泳分析

袁丽杰¹ 高兴政²

【摘要】 目的 研究中国大陆不同地域(北京、河北唐山、河北承德、江西九江)阴道毛滴虫 7 个分离株的生物学类型。方法 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、同工酶染色、聚类分析方法进行分析。结果 检测 MDH、LDH、G-6-PD、PGI、PGM 等 5 种酶的同工酶。在 G-6-PD、PGI 酶谱中,7 株完全相同。在 MDH、LDH 酶谱中,北京 1 株、北京 2 株、九江 3 株完全相同,而与承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株不同。在 PGM 酶谱中,北京 1 株、北京 2 株完全相同,而与承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株、九江 3 株不同。并依酶谱绘制系统进化树。承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株与北京 1 株、北京 2 株、九江 3 株大多数同工酶谱存在显著差异,九江 3 株与北京 1 株、北京 2 株在 5 个同工酶谱中存在微小差异。结论 我国阴道毛滴虫虫株可能至少存在 3 种不同的生物学类型。

【关键词】 阴道毛滴虫;同工酶

中图分类号:R382.211

文献标识码:A

Isoenzyme Analysis on Different Isolates of *Trichomonas vaginalis*

YUAN Li-jie¹, GAO Xing-zheng²

(1 Department of Biology, North China Coal Medical College, Hebei 063000;

2 Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083)

【Abstract】 Objective To study the biological types on the seven isolates of *Trichomonas vaginalis* from Beijing, Hebei-Tangshan, Hebei-Chengde and Jiangxi-Jiujiang in the mainland of China. **Methods** The samples were analyzed by PAGE, isoenzyme stain and cluster analysis. **Results** The isoenzyme systems used in the study included MDH, LDH, G-6-PD, PGI and PGM. No difference in the isoenzyme patterns of G-6-PD and PGI was found among the seven isolates. The MDH and LDH patterns of Beijing 1, Beijing 2, Jiujiang 3 strains were identical, while they were distinguishable from those of Chengde, Tangshan, Jiujiang 1, Jiujiang 2 isolates. The PGM pattern of Beijing 1 and Beijing 2 isolates were same but was different from that of the remainders. Gene tree was constructed according to the isoenzyme profiles. The results showed that there are differences in the patterns of the five isoenzymes between the isolates of Beijing 1, Beijing 2, Jiujiang 3 and other four isolates, and Jiujiang 3 was different from Beijing 1, Beijing 2 slightly. **Conclusion** It seems reasonable to assume that there are at least three different biological types of *Trichomonas vaginalis* in China.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*, isoenzyme

阴道毛滴虫是常见病原体,主要引起滴虫性阴道炎,是世界范围广泛流行的性传播疾病。而且滴虫性阴道炎已被列为有利于 HIV-1 感染的潜在危险因素之一^[1,2]。我国幅员辽阔,各地阴道毛滴虫形态相似,但生物学性状及致病力不尽相同。国外学者用同工酶对阴道毛滴虫进行分类研究,但各家意见并不统一^[3-7]。国内尚无此方面的研究报道。因此我国阴道毛滴虫是否有种下分型,有待探讨。本文对我国不同地区的阴道毛滴虫 7 个分离株,用 5 种酶的同工酶进行比较研究,以期了解中国大陆阴道毛滴虫自然隔离群体间的遗传分化和亲缘关系。

材料与方 法

1 虫株来源及抗原制备

分别从北京、河北唐山、河北承德、江西九江临床分离阴道毛滴虫虫株共 7 株,其中北京 2 株、唐山、承德各 1 株,九江 3 株,分别命名为北京 1 株、北京 2 株、

承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株、九江 3 株。经肝浸汤培养基(加 10% 小牛血清)37℃ 无菌培养 24 h,选择活力强的虫体,置 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)1 000 g 离心洗涤,共 3 次,每次 10 min,取沉淀虫体超声粉碎,6 640 g 4℃ 离心 0.5 h,取上清,用紫外分光光度计测蛋白浓度。将抗原分装于 Eppendorf 管中,-20℃ 保存备用。近期电泳。

2 电泳方法

样品制备 将 7 株阴道毛滴虫可溶性抗原浓度均稀释为 2.0 mg/ml,并各取 20 μl 于 Eppendorf 管中,加等量电泳样品液混匀。

电泳 应用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(PAGE)分离各种同工酶,浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 10%,使用 Tris-甘氨酸缓冲液。凝胶板大小 8.2 cm × 8.2 cm,使用 DYCZ-24D 型电泳槽及 DYY-III 型电泳仪,4℃ 电泳。起始电压为 80 V,样品从浓缩胶进入分离胶后,电压改为 120 V。至溴酚蓝指示剂迁移至距凝胶底部 5 mm 时,关闭电源停止电泳。

作者单位:1 华北煤炭医学院生物科学系,河北 063000;

2 北京大学基础医学院寄生虫学教研室,北京 100083

3 染色方法

各地虫株测试苹果酸脱氢酶(MDH EC1. 1. 1. 37)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD EC1. 1. 1. 49)、乳酸脱氢酶(LDH EC1. 1. 1. 27)、葡萄糖磷酸异构酶(PGI EC5. 3. 1. 9)、葡萄糖磷酸变位酶(PGM EC2. 7.

5.1)等 5 种酶的同工酶。各种酶的染色条件参照 Selandier 等^[8]介绍的方法并加以改进(表 1)。显色后凝胶经蒸馏水冲洗,用固定液(醋酸:甲醇:水=1:5:5)固定。试验以不加特异底物的染色液为阴性对照,则无可见条带出现。

表 1 酶的染色条件
Table 1 Conditions of enzyme staining

酶 Enzyme	缓冲液 Buffer	底物 Substrate	辅酶 Coenzyme	盐 Salt
苹果酸脱氢酶 MDH	0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 40 ml	2.0 mol/L 苹果酸 6 ml 2.0 mol/L malic acid	NAD 2 ml MTT 1 ml PMS 0.5 ml	
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G-6-PD	0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 50 ml	葡萄糖-6-磷酸 100 mg Glucose-6-phosphate	NADP 1 ml MTT 1 ml PMS 0.5 ml	0.1 mol/L MgCl ₂ 1 ml
乳酸脱氢酶 LDH	0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 40 ml	乳酸钠 5 ml Sodium lactate	NAD 2 ml MTT 1 ml PMS 0.5 ml	
葡萄糖磷酸异构酶 PGI	0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 25 ml	果糖-6-磷酸 10 mg Fructose-6-phosphate 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 3 U Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NADP 6 mg MTT 1 ml PMS 0.5 ml	0.1 mol/L MgCl ₂ 0.3 ml
磷酸葡萄糖变位酶 PGM	0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 5 ml	葡萄糖-1-磷酸 5 mg Glucose-1-phosphate 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 50 U Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NADP 0.5 mg MTT 1 ml PMS 0.5 ml	0.1 mol/L MgCl ₂ 5 ml H ₂ O 25 ml

4 聚类分析

将凝胶上同工酶显影条带量化,利用 Ebi(Euro-pean Bioinformatics Institute)Clustalw 软件包对所得数据进行处理,绘制系统发生树。

结 果

1 7 株阴道毛滴虫的 5 种同工酶谱比较(图 1)

1.1 苹果酸脱氢酶(MDH) 各地 7 株阴道毛滴虫此酶活性均较强,显色快,差异显著。其中北京 1 株、北京 2 株及九江 3 株酶型相同,均为 6 条酶带,相应酶带迁移率相同。承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株酶型相同,均为 4 条酶带,相应酶带迁移率相同,其中靠近加样孔的第 3 条带着色浅,带型纤细。

1.2 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD) 7 株阴道毛滴

虫此酶型相同,均为 3 条酶带,中间一条带着色深,显色快,迁移率最快的第 3 条带着色浅。

1.3 乳酸脱氢酶(LDH) 北京 1 株、北京 2 株及九江 3 株酶型相同,均为 3 条酶带,相应酶带迁移率相同,其中北京 2 株及九江 3 株第 2 条酶带显色快,着色深。承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株酶型相同,均为 2 条酶带,相应酶带迁移率相同。

1.4 葡萄糖磷酸异构酶(PGI) 7 株阴道毛滴虫此酶型相同,均为 2 条酶带,迁移率快的第 2 条带着色深。显色快,第一条带细且色淡。

1.5 葡萄糖磷酸变位酶(PGM) 7 株阴道毛滴虫此酶显色慢,着色浅,承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株、九江 3 株酶型相同,均为 1 条酶带,迁移率最快,北京 1 株、北京 2 株酶型相同,均为 2 条,迁移率快的

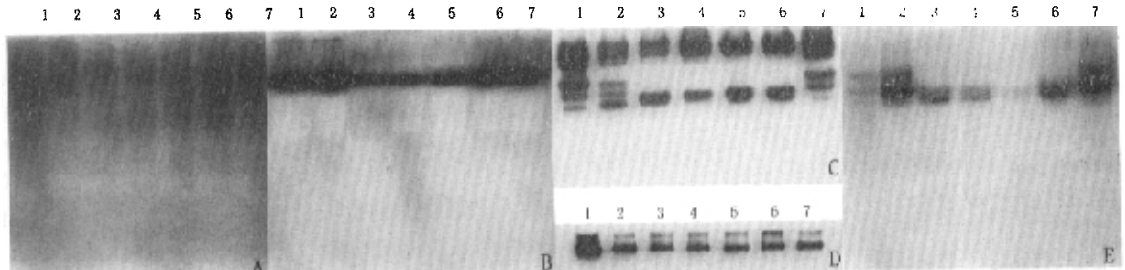


图 1 阴道毛滴虫同工酶图谱 A PGM B PGI C MDH D G-6-PD E LDH 1 北京 1 株 2 北京 2 株 3 承德株 4 唐山株 5 九江 1 株 6 九江 2 株 7 九江 3 株

Fig. 1 The isoenzyme patterns of *Trichomonas vaginalis* A PGM B PGI C MDH D G-6-PD E LDH Lane 1 Isolate Beijing 1 Lane 2 Isolate Beijing 2 Lane 3 Isolate Chengde Lane 4 Isolate Tangshan Lane 5 Isolate Jiujiang 1 Lane 6 Isolate Jiujiang 2 Lane 7 Isolate Jiujiang 3

1 条与其它 5 株相同, 第 1 条带靠近加样孔, 酶带清晰但纤细。

2 7 株阴道毛滴虫 5 种同工酶型分组

综上所述, 可将 7 株阴道毛滴虫 5 种酶的同工酶 (MDH、G-6-PD、LDH、PGI、PGM) 分析结果综合为两大类酶谱 (表 2)。将酶型相同的分离株分在同一组。承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株酶型完全相同 (简称 A 组); 北京 1 株、北京 2 株酶型完全相同 (简称 B 组); 九江 3 株与其它株均有差异 (简称 C 组)。九江 3 株与北京 1 株、北京 2 株有 4 种同工酶 (MDH、G6PD、LDH、PGI) 酶型完全相同, 只有 1 种同工酶 (PGM) 有差异, 而与承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株有 2 种同工酶 (MDH、LDH) 有差异。根据酶谱的差异可将 7 株阴道毛滴虫分为 3 个酶谱群。即承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株酶谱群, 北京 1 株、北京 2 株酶谱群, 九江 3 株酶谱群。

表 2 阴道毛滴虫 7 个分离株 5 种同工酶谱分类
Table 2 Groups of isoenzyme profile of seven isolates of *Trichomonas vaginalis*

同工酶 Isoenzyme	酶谱分类 Groups of isoenzyme profile	
	I	II
PGI	A, B, C	A, B, C
G-6-PD	A, B, C	A, B, C
LDH	A	B, C
MDH	A	B, C
PGM	A, C	B

A 承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株 B 北京 1 株、北京 2 株
C 九江 3 株
A Isolates Chengde, Tangshan, Jiujiang 1 and Jiujiang 2 B Isolates Beijing 1 and Beijing 2 C Isolate Jiujiang 3

3 矩阵图

根据同工酶谱带, 依 NJ (Neighbour-Joining) 方法, 计算遗传距离, 得矩阵图 (见表 3)。

表 3 基于阴道毛滴虫 7 个分离株同工酶谱的矩阵图

Table 3 Matrices based on the isoenzyme profiles of 7 isolates of *T. vaginalis*

虫株 Isolate	1	2	3	4	5	6	7
北京 1 Beijing 1	0	0	0.353	0.353	0.353	0.353	0.059
北京 2 Beijing 2	0	0	0.353	0.353	0.353	0.353	0.059
承德 Chengde	0.353	0.353	0	0	0	0	0.294
唐山 Tangshan	0.353	0.353	0	0	0	0	0.294
九江 1 Jiujiang 1	0.353	0.353	0	0	0	0	0.294
九江 2 Jiujiang 2	0.353	0.353	0	0	0	0	0.294
九江 3 Jiujiang 3	0.059	0.059	0.294	0.294	0.294	0.294	0

4 系统进化树

依据 Neighbour-Joining 方法得系统进化树, 提示

北京 1 株、北京 2 株归属一组, 九江 3 株为一组, 两组亲缘关系近。承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株形成另一支系 (图 2)。

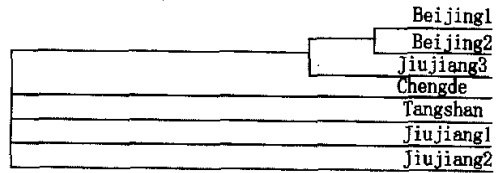


图 2 系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree

讨 论

近年来, 国外学者相继应用同工酶技术分析了阴道毛滴虫的种内演化情况。Gradus 等^[3]对 4 株阴道毛滴虫 EST (酯酶)、SOD (超氧化物歧化酶)、ACP (酸性磷酸酶) 酶谱进行比较。Salem 等^[4]对 3 株阴道毛滴虫进行了 G-6-PD、MDH、PGM、PGI、ME (苹果酸酶)、HK (己糖激酶)、LDH 酶谱分析, 均发现依据同工酶谱型, 可将阴道毛滴虫进行种下分型。Soliman 等^[5]对 32 株阴道毛滴虫进行 8 种酶谱分析, 发现 LDH、MDH、HK、GPI 同工酶谱可将阴道毛滴虫分为 5 个酶株群。Proctor 等^[6]对 63 株阴道毛滴虫进行 ME、MDH、HK、LDH 4 种酶谱分析, 并将其分为 15 个酶株群。Vohra 等^[7]对 11 株阴道毛滴虫进行谱型分析, 依据 LDH、MDH、GPI、HK、PGM、ME 将其分为 3 个酶株群。与之相比, 本文同工酶型分析结果与 Vohra 等 (1991) 的研究相似, 承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株 LDH 酶谱条带数、中国 7 株 PGI 酶谱条带数和承德株、唐山株、九江 1 株、九江 2 株、九江 3 株 PGM 酶谱条带数均与 Vohra 等报告的 11 株阴道毛滴虫相应酶谱条带数相同。提示不同国家流行的阴道毛滴虫具有相同虫株的可能。

本实验对我国不同地区的 7 株阴道毛滴虫, 用 5 种酶的同工酶进行比较研究, 发现这 5 种同工酶中有 3 种 (MDH、LDH、PGM) 在各虫株间显示出多型性, 表现为条带数和带型的不同。而在 G-6-PD、PGI 两种酶中, 各虫株均显示出相同的酶型。这一结果证实同工酶谱亦可以成为我国阴道毛滴虫种下分型的依据。同时, 说明我国阴道毛滴虫存在种内多态性, 依此同工酶谱, 至少可能将其分为 3 个不同的生物学类型。此结果与系统进化树提示结果一致。另外, 上述结果, 显示阴道毛滴虫虫株的不同地区分布与其 3 种生物学类型之间似无相关性, 如, 北方株承德株、唐山株酶型与九江 1 株、九江 2 株完全相同。此结果有待进一步验证。

参考文献

[1] Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. Non ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study[J]. AIDS, 1993; 7:95-102.

[2] Passey M. Issues in the management of sexually transmitted diseases in Papua New Guinea[J]. PNG Med J, 1996, 39:252-260.

[3] Gradus MS, Matthews HM. Electrophoretic analysis of soluble proteins and esterase, superoxide dismutase and acid phosphatase isoenzymes of members of the protozoan family trichomonadidae[J]. Comp Biochem Physiol B, 1985, 81: 229-233.

[4] Salem SA, Azab ME, Abd-el-Ghaffar FM, et al. Characterization of Egyptian isolates of *Trichomonas vaginalis* I. Isoenzyme patterns[J]. J Egypt Soc Parasitol, 1992, 22:675-682.

[5] Soliman MA, Ackers JP, Catterall RD. Isoenzyme characterization of *Trichomonas vaginalis*[J]. Br J Vener Dis, 1982, 58:250-256.

[6] Proctor EM, Naaykens W, Wong Q, et al. Isoenzyme patterns of isolates of *Trichomonas vaginalis* from Vancouver[J]. Sex Transm Dis, 1988, 15:181-185.

[7] Vohra H, Sharna P, Sofi BA, et al. Correlation of zymodeme patterns, virulence and drug sensitivity of *Trichomonas vaginalis* isolates from women[J]. Indian J Med Res, 1991, 93:37-39.

[8] Selander RK, Caugant DA, Ochman H, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics [J]. Appl Environ Microb, 1986, 873-884.

(收稿日期:2002-08-28 编辑:庄兆农)

文章编号:1000-7423(2003)-02-0105-01

【简报】

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》引用中文期刊情况初步调查

王启娟 薛佩莲 李成建

中图分类号:R38 文献标识码:A

为使广大医务工作者了解我国寄生虫病学方面的信息,在有限的时间内迅速查阅较多及较重要的文献,掌握学科发展动向,同时使图书信息部门在选购有关文献时既不减少有效情报信息,又能合理使用有限的经费,应该重视核心期刊。作者采用文献计量学方法,对我国寄生虫病学主要期刊作了初步分析,从中找出该学科领域主要期刊,即核心期刊,供广大医务工作者和图书信息部门参考。

1 文献来源和统计方法

统计的期刊文献来源于《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》。该刊为卫生部主管,中华预防医学会与中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所主办的寄生虫学与寄生虫病专业性学术期刊。将 1998~2002 年《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》所有文章引用的中文期刊逐一统计、整理、归纳,找出核心期刊。

2 结果和讨论

1998~2002 年《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》引用中文期刊文献共 1 997 条,引自 275 种中文期刊,其中中医药学 221 种,生物科学 26 种,农业科学 10 种,大专院校学报 7 种,其他 11 种。在 221 种医药学期刊中,中华医学系列杂志 29 种,中国医学系列杂志 38 种,医学院学报 47 种,国外医学系列分册 12 种,临床(实用)医学杂志 17 种,省市医药 42 种,军队医药 5 种,其他 31 种;其中引次在 7 次以上的期刊有 35 种,依次为:1 中国寄生虫学与寄生虫病杂志(545),2 中国寄生虫病防治杂志(161),3 中国血吸虫病防治杂志(136),4 中国人兽共患病杂志(115),5 实用寄生虫病杂志(53),6 中华医学杂志(53),7 地方病通报(42),8 国外医学寄生虫病分册(39),9 中华内科

杂志(29),10 寄生虫与医学昆虫学报(28),11 中华流行病学杂志(24),12 动物学报(24),13 上海免疫学杂志(22),14 中国药理学报(20),15 中华传染病杂志(18),16 湖南医科大学学报(17),17 中华预防医学杂志(16),18 第二军医大学学报(14),19 昆虫学报(13),20 生物化学与生物物理学报(12),21 同济医科大学学报(10),22 中国公共卫生(9),23 生物化学与生物物理进展(9),24 中华微生物和免疫学杂志(8),25 中华皮肤科杂志(8),26 中华外科杂志(8),27 中国免疫学杂志(8),28 新疆医科大学学报(8),29 江苏医药(8),30 中国兽医寄生虫病杂志(8),31 动物分类学报(8),32 动物学研究(8),33 中华病理杂志(7),34 中国媒介生物学及控制杂志(7),35 四川动物(7)。

35 种期刊合计引次为 1 502 次,占 75.2%;其中前 17 种合计 1 342 次(占 67.2%),占期刊刊种的 6.2%,能满足三分之二的信息量,是我国寄生虫学与寄生虫病学现阶段中文核心期刊;其中前 5 种合计 1 010 次(占 50.6%),占期刊刊种的 1.8%,能提供二分之一的信息量,是该学科中文核心期刊;前 2 种合计 706 次(占 35.4%),占期刊刊种的 0.7%,能提供三分之一的信息量,是该学科高效中文核心期刊;特别是《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》引次最多,达 545 次(占 22.3%),占期刊刊种的 0.4%。

利用引文法调查专业核心期刊,国内已屡有报道。本调查结果表明,《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》能满足 22.3%的信息量,该刊是我国寄生虫学与寄生虫病学首选核心期刊,同时也说明它的理论水平和应用价值较高。该刊同其他 16 种期刊构成了我国寄生虫学与寄生虫病学核心期刊,是广大医务工作者获取我国本学科情报信息的重要来源,也是从事临床科研教学必需的参考工具。

作者单位:中国人民解放军第四〇一医院,青岛 266071

(收稿日期:2003-02-24 编辑:富秀兰)