

浙江省周期型马来丝虫等位基因酶谱研究*

邓珊珊 王芃芃 曾肖芃 严晓岚

指导者 陈翠娥

浙江省医学科学院寄生虫病研究所 杭州 310013

摘要 目的: 研究浙江省周期型马来丝虫等位基因酶谱。方法: 用微量平面淀粉凝胶电泳法, 检测浙江省周期型马来丝虫成虫 180 条(雌 60, 雄 120), 微丝蚴 0.4 ml(约 32 000 条)及感染期幼虫约 1 500 条的 ACPH 等 14 种酶的同工酶的等位基因酶谱。结果: 浙江省周期型马来丝虫的 3 个生活期虫体呈现 13 种酶的同工酶的 27 个等位基因位点, 多数位点为纯合子型, 仅 2 个位点(MPI, MDH-2)为杂合子型(占 7.4%)。成虫、微丝蚴及感染期幼虫分别呈现 16、16 及 9 个等位基因位点。同时用相同的方法对实验室传代的周期型马来丝虫等位基因酶谱进行比较检测。结论: 浙江省与实验室传代的周期型马来丝虫的同工酶等位基因酶谱基本相似。

关键词 周期型马来丝虫 等位基因酶谱 淀粉凝胶电泳

我国 14 个省、市、自治区有马来丝虫病流行, 对其病原体周期型马来丝虫(下简称马来丝虫)是否存在种间变异, 黄惠芬等(1988)^[1]和黄李等(1990)^[2]先后从丝虫成虫 MDH 和 GPI 同工酶的电泳型酶谱分析和微丝蚴体内酸性磷酸酶活性分布情况, 认为我国不同地区的马来丝虫可能有种内分化。浙江省曾是马来丝虫病流行较为严重的地区, 研究浙江省马来丝虫等位基因酶谱, 对我国马来丝虫的种下分型有重要意义。

材料与方法

样品制备

1 马来丝虫成虫及微丝蚴 虫体取自马来丝虫——长爪沙鼠动物模型。长爪沙鼠由浙江省实验动物中心提供。取 4 wk~ 6 wk 周龄健康长爪沙鼠, 分别用浙江省马来丝虫(虫源来自浙江省安吉县)和实验室传代保种的马来丝虫(虫源来自贵州省寄生虫病防治研究所提供的阳性沙鼠)的感染期幼虫经腹腔感染, 感染后 6 个月剖检, 从腹腔或附睾收集活动的成虫, 同时收集含有微丝蚴的腹腔液。腹腔液经离心分离收集微丝蚴。成虫和微丝蚴经洗净后加缓冲液分别置于塑料管中冷冻(-70℃)保存备用。

2 马来丝虫感染期幼虫 从微丝蚴腹腔液症的长爪沙鼠, 抽取腹腔液感染中华按蚊。感染后 9 d~ 11 d, 用贝氏分离法收集蚊体内的感染期幼虫, 洗净后用上述法保存备用。

检测方法

对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6PGD, EC 1.1.1.44), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD, EC 1.1.1.49), 肌酸激酶(CK, EC 2.7.3.2), 己糖激酶(HK, EC 2.

7.1.1.), 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADH, EC 1.6.99.3), 磷酸葡萄糖变位酶(PGM, EC 5.4.2.2), 酯酶(EST, EC 3.1.1.1), 苹果酸脱氢酶(MDH, EC 1.1.1.37), 腺苷酸激酶(AK, EC 2.7.1.20), 酸性磷酸酶(ACPH, EC 3.1.3.2), 苹果酸酶(ME, EC 1.1.1.40), 葡萄糖磷酸异构酶(GPI, EC 5.3.1.9), 6-磷酸甘露糖酶(MPI, EC 5.3.1.8)和硫酸锌酰胺脱氢酶(DIA, EC 1.6.2.2)等 14 种酶进行检测。检测方法和染色方法按 Davis 等微量淀粉凝胶平面电泳改良法(1994)^[3]进行, 共检测浙江省与贵州省两地丝虫成虫 540 条(♂ 360 条, ♀ 180 条), 浓集微丝蚴 1.0 ml(约 80 000 条), 感染期幼虫约 3 000 条。所用的电泳仪及试剂均由本所遗传实验室提供。

结果与讨论

浙江省马来丝虫等位基因酶谱检测结果 检测成虫(♂ 120 条, ♀ 60 条), 微丝蚴(0.4 ml 约 32 000 条)和感染期幼虫(约 1 500 条)的等位基因酶谱。14 种酶除 DIA 外, 呈现 13 种酶的等位基因酶谱。成虫、微丝蚴及感染期幼虫的等位基因同工酶位点如表 1 所列。成虫的 MPI 和感染期幼虫的 MDH-2 为杂合子型, 余为纯合子型。其中 ACPH、AK-1、CK-1、G6PD、HK-2、MDH-1.2 和 6PGD 等 8 个等位基因同工酶位点在 3 个生活期虫体均可测得; 在成虫和微丝蚴两虫期中可测得 GPI、MPI、NADH 和 PGM-1 等位基因同工酶位点; HK-1、PGM-2 位点仅在成虫期测得; EST-1 和 MDH-3.4.5 位点仅在

* 浙江省自然科学基金资助课题

微丝蚴期测得,ME 等位基因同工酶位点仅在感染期幼虫测到。

表 1 周期型马来丝虫等位基因同工酶位点检测结果

Table 1 Result of detection of allelic locus of periodic *B rugia m alaya*

位点 Locus	成虫 Adult worm		微丝蚴 Microfilaria		感染期幼虫 Infective larva	
	浙(Z)	实(L)	浙(Z)	实(L)	浙(Z)	实(L)
ACPH	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AK - 1	AA	AA	AA	AA	AA	AA
2	AA	AA	-	AA	-	-
EST- 1	-	-	AA	AA	-	-
2	-	-	-	AA	-	-
3	-	-	-	AA	-	-
G6PD	AA	AA	AA	AB	AA	AA
HK - 1	AA	AA	-	-	-	-
2	AA	AA	AA	AA	BB	-
ME	-	AA	-	AA	AA	AA
CK - 1	AA	AA	AA	AA	AA	AA
2	AA	AA	-	-	-	-
GPI	AA	AA	AA	AA	-	-
MDH- 1	AA	AA	AA	AA	AA	AA
2	AA	AA	AA	AA	AB	AB
3	-	-	AA	AA	-	-
4	-	-	AA	AA	-	-
5	-	-	AA	AA	-	-
MPI	AB	AB	AA	AA	-	-
NADD	AA	AA	AA	AA	-	-
PGM- 1	AA	AA	AA	AA	-	-
2	AA	AA	-	-	-	-
6PGD	AA	AA	AA	AA	AA	AA

注: 1 样本数见文内 2 AA, BB 示纯合子, AB 示杂合子 3 无位点出现示“-” 4 ‘L’ 实验室, ‘Z’ 浙江省

Note: 1 For the number of samples, see the text 2 AA, BB- homozygote, ‘AB’- heterozygote 3 ‘-’ No locus 4 ‘L’ Laboratory, ‘Z’ Zhejiang Province

实验室传代的马来丝虫等位基因同工酶谱检测结果 取成虫(♂ 240 条, 120 条), 微丝蚴(约 48 000 条)和感染期幼虫(约 1 500 条), 同时进行 14 种酶的同工酶检测, 3 个生活期虫体的等位基因位点如表 1 所列。成虫的MPI 位点, 微丝蚴的 G6PD 位点及感染期幼虫的MDH-2 位点为杂合子, 其余位点均为纯合子型。在 3 个生活期虫体均可测得 8 个等位基因同工酶位点(ACPH, AK-1, CK-1, G6PD, ME, MDH-1, 2 和 6PGD); 在成虫和微丝蚴 2 个生活期均测得 4 个等位基因同工酶位点(AK-2, MPI, NADD 和 PGM-1); 仅在成虫期出现有 HK-1 和 CK-2 等位基因同工酶位点, 而 EST-1, 2, 3, 和 MDH-3, 4, 5 等 6 个等位基因酶位点仅出现于微丝蚴期。

上述结果表明, 用微量平面淀粉凝胶电泳对浙江省马来丝虫和实验室传代的马来丝虫检测 13 种同工酶的等位基因酶谱显示, 两者基本相似, 在 3 个

生活期虫体中虽有差异, 但用相似系数法(Le Blancq 等 1986)^[4-7]检测, 两者的成虫、微丝蚴和感染期幼虫的相似系数分别为 0.94、0.71 和 0.89, 提示两者的变异较小, 其中 ME 等位基因同工酶位点在浙江省马来丝虫的成虫及微丝蚴中缺现, 这是否是浙江马来丝虫等位基因酶谱特点, 值得进一步研究。

丝虫的 3 个虫期分别寄生在不同的宿主环境中, 他们在发育过程中组织分化, 形态改变, 必须适应宿主环境的更换, 虫体的等位基因同工酶就会发生特定的改变, 导致各发育阶段等位基因酶谱呈现差异。

在实验过程中, 观察到丝虫成虫等位基因同工酶谱与虫体的性别无关; 从不同长爪沙鼠宿主个体内取出的成虫或微丝蚴, 它们的等位基因同工酶谱相同。感染期幼虫寄生于蚊媒体, 在检测感染期幼虫等位基因同工酶谱的同时, 曾对中华按蚊成虫进行了检测, 发现 CK-1 位点在两者呈现完全一致。该等位基因同工酶位点是否与马来丝虫和其中间宿主蚊媒间寄居相容性有关, 值得进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 黄惠芬, 郑福中, 李杰, 等 五个地理株周期型马来丝虫成虫蛋白和同工酶电泳分析. 中国寄生虫病防治杂志 1988; 1 17~ 20
- 2 黄李, 黄惠芬, 叶淑铭, 等 三个不同地区周期型马来丝虫微丝蚴组织化学的比较研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1990; 8 56
- 3 Davis GM, Chen CE, Zeng XP. Molecular genetic and anatomical relationships among Pomatiopsid (Gastropoda: prosobranchia) Genera from Southern China. Proc Acad Nat, Sci Philadelphia 1994; 145 191~ 207
- 4 Le Blancq SM, Schnur LF, Peters W. *Leishmania* in the old world: 1. The geographical and hostal distribution of *L. major* zymodemes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80 99~ 112
- 5 Le Blancq SM, Peters W. *Leishmania* in the old world: 2 Heterogeneity among *L. tropica* zymodeme. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80 113~ 119
- 6 Le Blancq SM, Belenu A, Peters W. *Leishmania* in the old word: 3 The distribution of *L. aethiopica* zymodemes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80 360~ 366
- 7 Le Blancq SM, Peters W. *Leishmania* in the old word: 4 The distribution of *L. donovani sensu lato* zymodemes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80 367~ 377

1998 年 7 月 1 日收稿 1999 年 3 月 17 日修回

(编辑: 任燕芬)

STUDIES ON ALLELIC ZYMOGRAM OF PERIODIC *B. MALAYI* FROM ZHEJIANG PROVINCE*

DENG Shanshan, WANG Pengpeng, ZENG Xiaopeng, YAN Xiaolan, Director: CHEN Cui'e
Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013

ABSTRACT

AM: To study the allelic zymogram of periodic *B. malayi* from Zhejiang Province **METHODS:** 180 adult worms (♂ 60, ♀ 120), 32 000 microfilaria and 1 500 infective larvae of periodic *B. malayi* were examined for the isoenzymes of 14 enzymes by horizontal starch gel electrophoresis with 14 different isoenzyme. **RESULTS:** Twenty-seven allelic loci were found in three developing stages of *B. malayi*, most of them were homozygotes, however, two of them (MPL, MDH) were heterozygotes (7.4%). 17, 19 and 9 loci were presented in adult worms, microfilariae and infective larvae, respectively. At the same time, the allelic zymogram of *B. malayi* from Guizhou Province was also examined. **CONCLUSION:** The allelic zymogram of periodic *B. malayi* from Zhejiang Province was similar to that of periodic *B. malayi* from Guizhou Province but passed in the laboratory.

Key words: Periodic *B. malayi*, allelic zymogram, horizontal starch gel electrophoresis

* Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province

全国丝虫病技术指导组第十六次会议概况

全国丝虫病技术指导组(以下称指导组)第十六次会议于1999年6月22~24日在江苏省无锡市召开。卫生部疾病控制司和江苏省卫生厅有关领导、指导组全体成员及黔、桂、浙、沪等省、自治区、直辖市有关防治机构代表共22人出席。会议听取了指导组一年工作汇报及有关我国防治丝虫病经验、1998年我国丝虫病监测和消灭丝虫病进展、全球防治丝虫病进展概况、慢性丝虫病症状分析、中国龙线虫病情况及有关科研工作的进展;检查了卫生部《1996~2000年全国寄生虫病防治计划》中有关丝虫病内容的执行情况;讨论了如何加强监测及严格审评,以逐步实现全国消灭丝虫病,以及对今后工作的意见和建议。

自1998年6月召开的指导组第十五次会议以来,各地在全面领会卫生部《消灭丝虫病标准》《消灭丝虫病审评》的基础上,进一步加强对丝虫病监测和消灭丝虫病工作的领导和技术指导,确定或调整了消灭丝虫病规划,并注意培训基层专业人员和采取质量控制措施,使丝虫病监测和消灭丝虫病工作稳步、并规范地发展。迄1998年底,全国已累计有620个县、市通过消灭丝虫病审评(含省、地及县级审评),占864个流行县、市的71.8%。通过监测,在海南省琼山市发现有局部残留疫点,在广东省雷州市和惠来县存在残留疫点地区,经采取肃清残存传染源措施后,当地微丝蚴率已降至零。江西省正开始对存在残留疫点地区实施乙胺嗪药盐防治。

会议指出,我国防治丝虫病虽已取得巨大成就,但决不能掉以轻心。近年来有些省在监测中发现存在残留疫点,一方面反映了监测工作的深入,另一方面表明必须继续加强监测,以查找可能存在的防治中薄弱环节地区,彻底消除隐患。近年来在个别已通过消灭丝虫病审评地区的外来人员中检出微丝蚴血症者的事实,表明丝虫病监测是一项长期的任务,即使在已达到消灭丝虫病标准地区,监测工作仍不应终止。通过会议交流及指导组成员赴基层考察时了解的情况,反映出在丝虫病监测和消灭丝虫病审评工作中尚存在个别忽视质量和不够严格的情况,必须引起重视。

会议认为,当前必须再接再厉,进一步加强监测,严格审评,以逐步实现全国消灭丝虫病,为全球消灭丝虫病作出贡献。为此,提出如下建议:在丝虫病监测工作中要加强对基层的技术指导,完善质控措施,严把各个技术环节的质量关;在消灭丝虫病审评工作中,要坚持预审,并按卫生部《消灭丝虫病标准》《消灭丝虫病审评》各项要求,严格审评程序,做到不懈可击;

在原班氏丝虫病流行区的消灭丝虫病审评中,可采用免疫色谱试验(ICT)测试卡代替常规血检用于必要时抽查;继续通过重点监测,注意查找可能存在的残留疫点,并采取有效措施予以消除;在总结各地经验的基础上,制定消灭丝虫病地区监测方案;结合世界卫生组织有关方案的要求,在各省、自治区、直辖市设一社区级慢性丝病患者照料点,进行宣教,提高自我保健意识,并给予积极治疗,减少痛苦;规范丝虫病监测资料的整理,要注意各项原始记录的收集、保存和记录齐全;保持与丝虫病监测和消灭丝虫病工作任务相适应的人员、设备和经费配置。

(孙德建)