

# Y 拟钉螺等位基因的研究

曾肖<sup>1</sup> 陈翠娥<sup>1</sup> 丁建祖<sup>1</sup> George M. Davis<sup>2</sup>

1 浙江省医学科学院寄生虫病研究所 杭州 310013

2 美国费城自然科学院

**摘要 目的:** 探讨 Y 拟钉螺分类演化的遗传学基础。**方法:** 用微量平面淀粉胶电泳法, 检测浙江省开化及淳安县 6 个螺群宋氏 Y 拟钉螺和 1 个螺群中国 Y 拟钉螺的 24 种等位基因酶谱。**结果:** 共测得 29 个位点, 宋氏 Y 拟钉螺多态位点所占比例为 6.9% - 13.8%; 中国 Y 拟钉螺全部为单态位点。宋氏 Y 拟钉螺的种内 Nei's D 小于 0.12; 但宋氏 Y 拟钉螺与中国 Y 拟钉螺两者种间 Nei's D 为 0.73。**结论:** 在等位基因水平显示 Y 拟钉螺种内变异不明显, 种间差异显著。

**关键词** 宋氏 Y 拟钉螺 中国 Y 拟钉螺 等位基因酶谱 遗传距离

Y 拟钉螺隶属圆口螺科、拟钉螺亚科、厚螺属<sup>[1]</sup>。从 Y 拟钉螺的分类学地位及寄生虫与螺类宿主协同演化的关系, 认为 Y 拟钉螺在传播寄生虫病中的作用值得重视。宋氏 Y 拟钉螺 (*Gammatricula songi*) 是 1994 年在浙江省开化县发现的 Y 拟钉螺新种, Davis 等<sup>[2]</sup>用比较解剖、扫描电镜等方法研究了宋氏 Y 拟钉螺和中国 Y 拟钉螺的螺壳、齿舌、生殖系统等形态学特征, 发现存在种内变异及种间差异。本研究进一步从 Y 拟钉螺的等位基因揭示 Y 拟钉螺分类演化的遗传学基础。

## 材料与方法

### 标本来源

宋氏 Y 拟钉螺 6 个螺群分别采自浙江省开化县的张湾 (C91-21)、徐塘 (C94-2)、中村 (C94-3)、篁岸 (C94-5)、星口 (C94-6) 及淳安县汾口 (C92-9); 1 个螺群中国 Y 拟钉螺采自开化县桐村 (C94-7)。采集的活螺用去氯水洗净, 置组织保存液中 -70 冻存备用。

### 样品制备

冻存的螺经解冻后, 用滤纸吸去螺壳表面水份, 压碎螺壳, 加蒸馏水 5 μl/螺, 研磨成匀浆, 用 2.0 × 9.0 mm 滤纸条吸取匀浆作为电泳样品。

### 电泳方法

以张湾 Y 拟钉螺 (C91-21) 为对照, 按微量平面淀粉胶电泳改良法<sup>[3,4]</sup>对各个螺群的 Y 拟钉螺进行等位基因酶谱检测。共进行 24 种酶的检测, 包括: 天门冬氨酸转氨酶 (AAT, EC2.6.1.2)、酸性磷酸酶 (ACPH, EC3.1.3.2)、腺苷酸激酶 (AK, EC2.7.4.3)、醛氧化酶 (AO, EC1.2.3.1)、碱性磷酸酶 (APH, EC3.1.3.1)、肌酸激酶 (CK, EC2.7.3.2)、硫锌酰胺脱氢酶 (DIA, EC1.6.2.2)、

酯酶 (EST, EC3.1.1.1)、谷氨酸脱氢酶 (GDH, EC1.4.1.3)、葡萄糖磷酸异构酶 (GPI, EC5.3.1.9)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD, EC1.1.1.49)、羟基丁酸脱氢酶 (HBD, EC1.1.1.30)、己糖激酶 (HK, EC2.7.1.1)、异柠檬酸脱氢酶 (ISDH, EC1.1.1.42)、乳酸脱氢酶 (LDH, EC1.1.1.27)、苹果酸脱氢酶 (MDH, EC1.1.1.37)、苹果酸酶 (ME, EC1.1.1.40)、6-磷酸甘露糖酶 (MPI, EC5.3.1.8)、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (NADD, EC1.6.99.3)、辛松果脱氢酶 (OCT, EC1.5.1.11)、磷酸葡萄糖变位酶 (PGM, EC2.7.5.1)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PD, EC1.1.1.44)、山梨醇脱氢酶 (SDH, EC1.1.1.140)、黄嘌呤脱氢酶 (XDH, EC1.2.1.37)。电泳后, 每块胶横切成 0.2 cm 厚的薄片 4 片进行酶染, 染色液的配制及方法参照文献<sup>[3]</sup>。所有试剂为 Sigma 公司产品。染色后淀粉胶薄片孵育于 37 恒温箱中, 待位点着色后, 置灯光屏观察箱上读片, 记录结果。每个螺群重复 10-285 只螺/酶不等。所得实验数据用 Swofford 等<sup>[5]</sup>的基因变异分析计算机程序 Bio sys-1 演算, 得到各个基因的频率, 基因相似性及遗传变异相关系数, 遗传距离矩阵及分类趋化图。

## 结 果

检测了 6 螺群宋氏 Y 拟钉螺, 1 螺群中国 Y 拟钉螺近 5 000 只螺, 共测得 29 个位点, 48 个等位基因 (表 1)。6 螺群宋氏 Y 拟钉螺仅 AAT2、DIA、NADD1 等 3 个位点存在差异; 而宋氏 Y 拟钉螺与中国 Y 拟钉螺有 AAT1、AAT2、ACPH1、AK1、CK1、EST3、EST4、G6PD、GPI、HBD1、MPI、NADD1、OCT、6PGD1、PGM1、SDH 等 16 个位

表 1 7 螺群 γ拟钉螺的等位基因频率 N= 检测的个体数 A B C... F 代表不同的等位基因

Table 1 Allele frequencies for seven populations of *Gammaticula*  
N = Number of individuals detected A B C... F represent different alleles

位点 Locus	C91-21	C94-2	C94-3	C94-5	C94-6	C92-9	C94-7	位点 Locus	C91-21	C94-2	C94-3	C94-5	C94-6	C92-9	C94-7
AAT1 (N)	235	55	53	50	55	46	75	HBD1 (N)	215	55	48	50	55	51	75
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
AAT2 (N)	175	50	48	50	55	46	75	C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	.000	1.000	1.000	1.000	.000	E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	HK (N)	180	50	48	50	50	46	75
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ACPH1 (N)	215	60	58	50	60	51	75	ISDH1 (N)	205	55	53	50	55	10	75
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	ISDH2 (N)	135	50	48	25	55	46	75
AK1 (N)	230	60	58	50	60	51	75	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	LDH1 (N)	175	55	53	50	55	20	75
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	MDH (N)	245	55	53	50	55	71	75
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
AO (N)	244	55	53	50	55	46	75	ME1 (N)	250	55	53	50	55	20	75
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
APH (N)	250	55	53	50	55	66	75	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	MPI (N)	253	25	48	50	50	56	75
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
CK1 (N)	195	55	53	50	55	46	75	B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	NADD1 (N)	200	55	53	50	55	30	75
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	.990	.255	1.000	.670	.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
DI A (N)	245	80	101	100	105	40	125	D	.010	.745	.000	.330	1.000	.000	.000
A	.992	.138	.975	1.000	.000	1.000	1.000	OCT (N)	215	55	53	50	55	47	75
B	.000	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	B	.826	.818	.123	.740	.545	.351	.000
D	.008	.863	.025	.000	.000	.000	.000	C	.174	.182	.877	.260	.455	.649	1.000
EST1 (N)	220	60	58	50	60	61	75	6PGD1 (N)	225	55	53	50	55	27	75
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
EST3 (N)	205	50	48	50	50	56	75	C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	PGM1 (N)	185	50	48	100	100	51	75
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
GDH (N)	160	55	53	50	55	46	75	D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
G6PD (N)	255	60	58	50	60	76	75	F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	G	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000	PGM2 (N)	285	50	48	100	100	71	75
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	SDH (N)	220	55	53	50	55	66	75
GPI (N)	180	55	53	48	60	65	75	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
B	.847	.718	.642	.635	.800	.208	.000	C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.153	.282	.358	.365	.200	.792	.000	XDH (N)	230	50	53	50	55	36	75
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000	B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

点不同。各螺群的 29 个位点的遗传学变异显示, 宋氏 γ拟钉螺多态位点占 6.9% - 13.8%; 中国 γ拟钉螺全部为单态位点。经 Nei's (1972) 遗传距离 (genetic distance) 方法计算, 宋氏 γ拟钉螺种内 Nei 氏遗传距离小于 0.12, 开化宋氏 γ拟钉螺与淳安宋氏 γ拟钉螺间的遗传距离为 0.05; 而宋氏 γ拟钉螺与中国 γ拟钉螺两者种间的平均 Nei 氏遗传距离为 0.73。据此描绘出分类趋化图 (图 1)。

讨 论

等位基因酶谱的分析, 80 年代已用于有关血吸虫、并殖吸虫和钉螺等的研究, 对用经典形态学分类难以解决的种、近缘种及亚种的分类学地位及其亲缘关系可用此项技术进行鉴定和评估<sup>[6-8]</sup>。采用等位基因酶 (allozyme) 的酶谱多态性 (polymorphism) 对种内 (或亚种内) 不同种群进行的遗传学

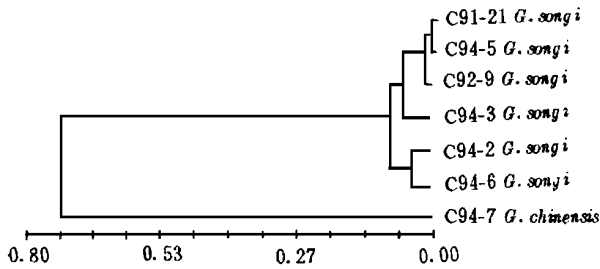


图 1 7 螺群 *γ* 拟钉螺的 Nei's(1972) 遗传距离经 UPGMA 处理的分类趋化图

Fig. 1 Phenograms based on UPGMA treatment of Nei's (1972) genetic distance involving seven populations of *Gammatricula*

分析与计算机技术结合形成了等位基因酶谱数值分类学 (numerical taxonomy) 分析<sup>[9]</sup>。但对 *γ* 拟钉螺方面的研究, 国内外尚未见报道。

本研究结果表明, 宋氏 *γ* 拟钉螺种内 Nei's D 小于 0.12, 比较开化与淳安两个不同地区的宋氏 *γ* 拟钉螺, Nei's D 为 0.05, 可见种内遗传距离较小, 螺群间的变异小。中国 *γ* 拟钉螺作为不同的种, 与宋氏 *γ* 拟钉螺的差异较大, Nei's D 为 0.73, 远远大于宋氏 *γ* 拟钉螺种内的遗传距离。分类趋化图也显示, 宋氏 *γ* 拟钉螺各螺群间的亲缘关系密切, 而中国 *γ* 拟钉螺与之比较则差距显著, 提示种间差异明显。

圆口螺科包括圆口螺亚科和拟钉螺亚科, 钉螺属圆口螺亚科, *γ* 拟钉螺与拟钉螺属拟钉螺亚科<sup>[1]</sup>。研究表明, 拟钉螺亚科中某些螺类不仅是并殖吸虫的中间宿主, 还可以传播血吸虫, 但 *γ* 拟钉螺与寄生虫的关系尚不清楚<sup>[10]</sup>。根据寄生虫与螺类宿主的协同演化关系, 两者在分子遗传学上必然存在相容性, 因而从等位基因酶谱研究 *γ* 拟钉螺, 进而比较 *γ* 拟钉螺与可能传播的寄生虫的等位基因关系, 可为进

一步探讨 *γ* 拟钉螺在传播寄生虫病上的意义提供重要的理论依据。

致谢 本文标本采集得到开化县卫生防疫站喻淑华医师, 淳安县卫生防疫站徐金昌医师大力支持, 特此感谢。

参 考 文 献

- 1 Davis GM, 陈翠娥, 康在彬, 等 亚洲和美洲的并殖吸虫的螺类宿主 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994; 12 279
- 2 Davis GM, Chen CE, Yu SH. Unique morphological innovation and population variation in *Gammatricula songi*, a new species of Triculinae from China (Gastropoda: Risssoacea). Proc Acad Natl Sci Philadelphia 1994; 145 107
- 3 Davis GM, Forbes V, Lopez G. Species status of northeastern American Hydrobia (Gastropoda: Prosobranchia): ecology, morphology and molecular genetics Proc Acad Natl Sci Philadelphia 1988; 140 191
- 4 Davis GM, Chen CE, Zeng XP, et al Molecular genetic and anatomical relationships among Pomatiopsid (Gastropoda: Prosobranchia) genera from southern China Proc Acad Natl Sci Philadelphia 1994; 145 191
- 5 Swofford DL, Selander RB. Biosys-1 Illinois: Illinois Natural History Survey, 1989 3- 33
- 6 何毅勋, 李新武, 胡亚青, 等 中国大陆日本血吸虫品系的研究 VI. 多位点酶电泳分析 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1991; 9 290
- 7 Agatsuma T, Habe S. Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani* Parasitology 1985; 91 489
- 8 张 仪, 冯 婷, Davis GM. 中国大陆钉螺等位基因位点的研究 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994; 12 172
- 9 余新炳主编 现代应用寄生虫学 第 1 版 北京: 中国医药科技出版社, 1993 282
- 10 Davis GM. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. Progr Clin Parasitol 1992; 3 145

1997 年 8 月 15 日收稿 1997 年 12 月 28 日修回

(编辑: 富秀兰)

STUD IES ON ALLOZYME OF GAMM ATRICULA

ZEN G Xiaopeng<sup>1</sup>, CHEN Cuie<sup>1</sup>, D NG Jianzu<sup>1</sup>, George M. Davis<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013

<sup>2</sup> Academy of Natural Sciences of Philadelphia, U. S. A.

ABSTRACT

**AM:** To furnish molecular genetic evidences for taxonomy of *Gammatricula*. **METHODS:** A total of 24 enzymes of 6 populations of *Gammatricula songi* and 1 population of *Gammatricula chinensis* collected from Kaihua County and Chunan County of Zhejiang Province were studied using horizontal starch gel electrophoresis **RESULTS:** 29 loci were found The percentages of polymorphic loci of *G. songi* populations were 6.9% - 13.8%. All loci of *G. chinensis* were monomorphic The Nei's distance among *G. songi* populations did not exceed 0.12 The Nei's distance between *G. songi* and *G. chinensis* was 0.73 **CONCLUSION:** The allozyme variations of inter-*G. songi* are limited, but the allozyme variation between *G. songi* and *G. chinensis* is significant

**Key words:** *Gammatricula songi*, *Gammatricula chinensis*, allozyme zymogram, genetic distance

