论著

文章编号:1000-5404(2010)11-1180-03

阴道毛滴虫和口腔毛滴虫5种同工酶谱对比分析

梁裕芬[1],韦俊彬[1],运晨霞[2],黄庶识[3] (530001 南宁,广西中医学院:寄生虫学教研室[1],微生物和免疫学教研室[2];530003 南宁,广西科学院生物物理实验室[3])

[摘要] **目的** 分析阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis,Tv)和口腔毛滴虫(Trichomonas tenax,TT)的同工谱特征及其亲缘关系,寻找同工酶谱鉴别指标。**方法** 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,分别进行苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)、谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GLDH)、6-磷酸-葡萄糖脱氧酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)和过氧化氢酶(Catalase)5种同工酶染色,比较分析2种滴虫的酶谱。**结果** MDH同工酶:2种滴虫只有相对迁移率(Rm) 52、85 2条区带相同,而Rm 34、42、94、100 4条区带在2种滴虫之间明显不同;GLDH同工酶:TV无显带,TT共分离出6条酶带;G6PD同工酶:TV只有Rm35、42、52 3条区带,而TT除了显示这3条区带外,还显示出其他迁移率更大的区带;ADH和Catalase均无区带显示。**结论** MDH、GLDH和G6PD3种同工酶均具有鉴别意义。

[关键词] 阴道毛滴虫;口腔毛滴虫;同工酶;分类

[中图法分类号] R372; R382.21; R446.5 **[文献标志码]** A

Five isozymograms of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas tenax*: A comparative study

Liang Yufen[1], Wei Junbin[1], Yun Chenxia[2], Huang Shushi[3] ([1]Department of Parasitology, [2]Department of Microbiology and Immunology, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530001, [3]Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530003, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the characteristics of isozymograms of *Trichomonas vaginalis* (TV) and *Trichomonas tenax* (TT) and their relation in an attempt to find the identification index of their isozymograms. **Methods** Five isozymes including melate dehydrogenase (MDH), glutamic dehydrogenase (GLDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), alcohol dehydrogenase (ADH) and catalase were stained with SDS-PAGE. Isozymograms of TV and TT were compared and analyzed. **Results** Two identical bands (Rm52 and Rm85) of MDH isozymogram and 4 bands (Rm34, Rm42, Rm94 and Rm100) of MDH isozymogram were found in TV and TT, respectively. No band and 6 band of GLDH isozymogram were identified in TV and TT, respectively. Three bands (Rm35, Rm42 and Rm52) of G6PD isozymogram were observed in TV, and more bands of G6PD isozymogram were demonstrated in TT, in addition to the 3 bands in TV. No band of ADH and catalase isozymogram was displayed in TV and TT. **Conclusion** MDH, GLDH and G6PD can be used as an identification index of TV and TT isozymograms.

[Key words] *Trichomonas vaginalis*; *Trichomonas tenax*; isoenzyme; classification

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Province(0728177). Corresponding author:Huang Shushi,E-mail:hshushi@yahoo.com.cn

阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*,TV)和口腔毛滴虫(*Trichomonas tenax*,TT)均为毛滴虫属的单细胞真核动物,都是人体寄生滴虫。在人群中感染率较高[1-3]。一般情况下,TV寄生于泌尿生殖系统等处[4-6],引起阴道炎、尿道炎和前列腺炎等传染性疾病;TT则寄生于人体口腔,定居于牙龈脓溢袋和扁桃体隐窝,可引起牙周炎、牙龈炎等口腔疾患。同时这2种滴虫都可以异位寄生于鼻腔、胸腔、皮肤、腹膜等部位,导致相应部位炎症的发生[7-9]。为了诊断这2种滴虫,目前主要采用病原学诊断技术,包括生理盐水直接涂片法、染色法和体外培养法等[10,11],这些诊断方法最终都是在显微镜下观察并鉴别虫种。但2种滴虫形态结构非常相似,在显微镜下较难分辨,可能使病原诊断结果出现错误。同工酶作为遗传标志物用于生物学分类的研究,已被众多学者充分证明一种十分有效的方法[12,13]。本研究通过对5种在生物体内普遍存在的同工酶,包括苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase,MDH)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GLDH)、6-磷酸-葡萄糖脱氧酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogen-

[基金项目] 广西自然科学基金(0728177)

[通信作者] 黄庶识, E-mail:hshushi@yahoo.com.cn

ase, ADH)和过氧化氢酶(Catalase)电泳分离,比较它们的酶谱差异,旨在为鉴别 2 种滴虫提供更为灵敏、准确的新方法,同时揭示 2 种滴虫的一些物质代谢过程。

1　材料与方法

1.1　TV 虫株的来源与电泳样品制备

TV 均来自广西中医学院直属门诊部检验科,共收集 5 个虫株,其中 1 个虫株来自南宁市,2 个来自南宁市郊区,1 个来自广西玉林市,1 个来自广西来宾市,分别编号为 TV_1、TV_2、TV_3、TV_4和 TV_5。TV 经肝胨糖培养基无菌纯培养和扩种,以期获得足够的虫体满足实验所需。虫株标本经广西中医学院陆森然副教授鉴定为毛滴虫属的阴道毛滴虫(*T. vaginalis*,TV)。

分别收集培养 48 h 的 TV 各株虫体,用 0.01 moL/L PBS 缓冲液(pH 7.4)2 500 r/min 离心洗涤 3 次,每次 10 min。把经洗涤的虫体至 2 ml 塑料离心管中,滴加适量 PBS 缓冲液(视收集虫体数量决定)后,置冰箱 -20 ℃冰冻 1 h。解冻后经滴管轻轻吹打,置离心机 8 000 r/min 4 ℃离心 30 min, 取全部上清液, 用紫外分光光度计测蛋白质浓度,然后把浓度稀释为 4 μg/μl,并按 1/5 的量加 40% 蔗糖溴酚蓝液,混匀后作为电泳样品[14]。

1.2　TT 虫株的来源与电泳样品制备

TT 取自广西中医学院在校学生,共收集 4 个虫株,分别编号为 TT_1、TT_2、TT_3、TT_4。4 名学生分别来自口腔医学、壮医学等 4 个不同专业,相互间不认识,平时无接触。采用添加牙垢法培养。虫株标本经广西中医学院陆森然副教授鉴定为毛滴虫属的口腔毛滴虫(*T. tenax*,TT)。TT 电泳样品制备方法与上述 TV 相同。

1.3　电泳过程与结果记录

应用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离 5 种同工酶, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 10%, 使用甘氨酸缓冲液,胶室容积为 13 cm × 10 cm × 0.15 cm。每孔加样品 35 μl,在 4 ℃冰箱内电泳,起始电压为 80 V,样品从浓缩胶进入分离胶后, 电压调节为 120 V,电泳约 14 h。

同工酶区带染色均参照陈毓荃[15]方法进行。电泳结束后,将凝胶浸入新配制的染色液中,37 ℃温浴至酶带显示清晰为止。7% 醋酸固定、漂洗。对固定后的凝胶进行拍照、记录并测量各样品出现酶带数目和迁移距离,按下式计算相对迁移率(relattivemobility,Rm)。

$$Rm = \frac{\text{迁移酶带距离}}{\text{迁移最远酶带距离}} \times 100\%$$

1.4　培养基中细菌干扰 TT 同工酶实验的检测

由于 TT 在培养过程中有共生菌存在,为了检测培养基中细菌是否在冻融过程中死亡破裂,释放出蛋白质影响电泳结果,本研究收集与 TT 电泳样本等量的细菌,并采用与 TT 同工酶电泳分离相同的方法制备共生菌电泳样本和分离同工酶,观察培养基中细菌的同工酶分离结果。

2　结果

2.1　MDH 同工酶谱

TV 和 TT 酶谱有明显不同(图 1),TT 有 2 条酶带迁移速度比 TV 快。TV_1、TV_2、TV_3、TV_5酶谱相同,分别显示 Rm 34、42、52、65、85、90 6 条酶带,其中 Rm 65、85 带粗且着色较深,Rm 34、42、52 带型较细。TV_4则只显示了 5 条酶带,比其他 4 株少了 Rm 65。4 株 TT 显示了相同的 MDH 同工酶谱,分别为 Rm 52、65、67、85、94、100,其中 Rm 85 着色最深。经比较分析,2 种滴虫只有 Rm 52、85 2 条区带相同,而 Rm 34、42、94、100 4 条区带在两滴虫之间明显不同,Rm 34、42 只有 TV 显示,Rm 94、100 则只在 TT 的酶谱上显示。

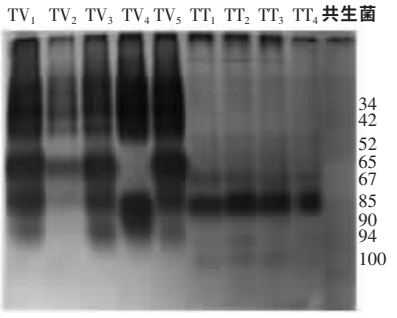


图 1　TV 和 TT 的 MDH 同工酶图谱分析

2.2　GLDH 同工酶

TV 无显带(图 2)。TT 共分离出 6 条酶带:分别是 Rm 50、59、73、77、86、100,其中 TT_1的 Rm 73、100 带较深,TT_2的 Rm 73、77 酶带颜色深,TT_3的 Rm 73 颜色最深,Rm 77、86 带也较深,TT_4除 Rm 50、100 2 条酶带外,其他酶带均显较深的颜色。

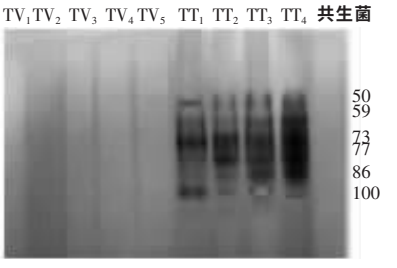


图 2　TV 和 TT 的 GLDH 同工酶谱分析

2.3　G6PD 同工酶

TV 5 个虫株带型相同(图 3),分别为 Rm 34、42、52 3 条区带。TT 各株除显示与 TV 相同的 3 条区带外,还显示出其他迁移率更大的区带,其中 TT_1和 TT_4为 Rm 63、83 2 条区带;TT_2为 Rm 71;TT_3为 Rm 63、71、83、100,是分离出区带最多的一个虫株,一共显示 7 条区带。

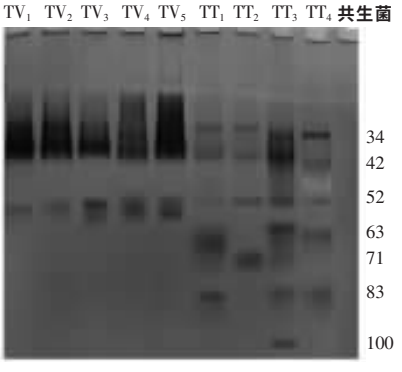


图 3　TV 和 TT 的 G6PD 同工酶图分析

2.4 ADH 同工酶

TV 和 TT 的 ADH 均无区带显示。

2.5 Catalase 同工酶

TV 和 TT 均无同工酶区带显示。

2.6 培养基中细菌干扰 TT 同工酶实验的检测结果

用分光光度计测定细菌电泳样品提取液的蛋白质浓度为 0.01 μg/μl,电泳后分别染色,均无 MDH、GLDH、G6PD、ADH 和 Catalase 的酶带显示(图 1~3)。

3 讨论

苹果酸脱氢酶的生物学功能是催化苹果酸脱氢生成草酰乙酸。从酶谱看,两种滴虫均有 5 种以上的同工酶,但 Rm 不尽相同,Rm 34、42 只有 TV 显示,Rm 94、100 则只在 TT 的酶谱上显示,由此可以看出,MDH 同工酶谱对于 TT 和 TV 有鉴别意义。

TT 各虫株均显示 GLDH 6 条同工酶区带,TV 无显带。说明 TT 体内 GLDH 含量较高,活性也较强,表明谷氨酸的脱氨基作用活跃;而 TV 的 GLDH 同工酶含量较少或活性较差,其体内谷氨酸的分解代谢途径可能与 TT 不相同。

在生物体内,磷酸戊糖途径是由 G6PD 催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 6-磷酸葡萄糖内酯开始的。在本实验中,TV 和 TT 均显示 G6PD 同工酶区带,且 TT 可以分离出更多的区带,从实验结果推测,磷酸戊糖途径在两种滴虫体内都存在,但 TT 的这一代谢途径可能更具灵活性。

本实验结果显示,2 种滴虫均缺乏 ADH,说明滴虫体的丙酮酸不能通过生成乙醇的途径分解。Gutteridge 等[16]的研究也表明:TV 糖酵解的最终产物中未分离出乙醇,这与本实验的结果是一致的。

过氧化物酶体的标志酶是 Catalase,其作用是催化过氧化氢产生水和氧气,在本实验中 Catalase 阴性,说明滴虫体内担当分解毒性物质功能的物质不是 Catalase,可能它们具有其他解毒途径。此实验结果也与电镜观察未发现过氧化物酶体存在相吻合[17]。

据文献报道,TV 虫体中蛋白质的提取方法一般是经超声粉碎后离心分离[15],在本实验中由于 TT 为有菌培养,如采用超声波破碎虫体,会导致所提取的同工酶不纯。反复实验证明,虫体冻融 1 h 后经轻轻抽打,虫体细胞全部破碎,蛋白质释放,但培养基中细菌结构完整,冻融前后接种,培养基中细菌均生长良好。因而,采用冻融 1 h 后即离心的方法提取滴虫蛋白,不但比较纯净,而且更简单、方便。

据袁丽杰等[15]报道,不同地域的 TV 同工酶可能存在差异。为了使实验结果更可靠,本研究收集了 5 株 TV 和 4 株 TT,它们都来自于不同的地域。从实验结果来看,TV 不同虫株、TT 不同虫株之间确实存在差异。

通过对 5 种酶谱进行对比分析,表明 2 种滴虫亲缘关系较近,它们的异化作用有其共同性,但亦有特殊性,在两虫种之间或同一虫种的虫株之间,无论是糖代谢还是氨基酸代谢均可能存在不同途径。但总体来说,TT 所显示的区带更多,反映 TT 的代谢途径更具多样性,推测其对外界环境的适应能力更强。实验结果同时表明,TV 和 TT 在 MDH 同工酶、GLDH 同工酶和 G6PD 同工酶 3 种同工酶谱中,均有一些共同的区带,但也有非常明显的不同的区带,所以 MDH 同工酶、GLDH 同工酶和 G6PD 同工酶的电泳分离是灵敏、准确的鉴别两种人体滴虫的新方法。

参考文献:

[1] 梁裕芬, 周德喜. 某高校大学生常见寄生虫感染情况调查[J]. 中国学校卫生, 2007, 28: 28-29.

[2] 罗新萍. 洛阳市不同人群阴道毛滴虫感染情况调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16(2): 104.

[3] 刘定山. 呼吸道检出口腔毛滴虫 1 例报告[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(6): 716.

[4] 何康. 男性毛滴虫性尿道炎 215 例致病情况调查[J]. 临床皮肤科杂志, 2004, 33(1): 19.

[5] Pillay D G, Hoosen A A, Vezi B, *et al*. Diagnosis of Trichomonas vaginalis in male urethritis[J]. Trop Geogr Med, 1994, 46(1): 44-45.

[6] Lewis K L, Doherty D E, Ribes J, *et al*. Empyema caused by trichomonas[J]. Chest, 2003, 123(1): 291-292.

[7] Chiche L, Donati S, Corno G, *et al*. Trichomonas tenax in pulmonary and pleural diseases[J]. Presse Med, 2005, 34(19 Pt 1): 1371-1372.

[8] Duboucher C, Caby S, Chabé M, *et al*. Human pulmonary trichomonoses[J]. Presse Med, 2007, 36(5): 835-839.

[9] Duboucher C, Farto-Bensasson F, Cheron M, *et al*. Lymph node infection by Trichomonas tenax: report of a case with co-infection by Mycobacterium tuberculosis[J]. Hum Pathol, 2000, 31(10): 1317-1321.

[10] 徐敏, 尹跃平. 阴道毛滴虫病的实验室诊断方法研究进展[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2003, 29(1): 33-36.

[11] 吴哲幼, 周立群, 柳建发. 口腔毛滴虫病研究进展[J]. 地方病通报, 2005, 20(2): 78-80.

[12] 陆家海, 许键, 郭中敏, 等. 酯酶同工酶鉴定细粒棘球蚴细胞系(13G-5)种属来源[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 56-57.

[13] 王少海, 何立, 康在彬. 滇川钉螺的同工酶谱比较[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(1): 52-54.

[14] 袁丽杰, 高兴政. 不同地域阴道毛滴虫品系的同工酶电泳分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(2): 102-105.

[15] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 239-245.

[16] Gutteridge W E, Coomb G H. Biochemistry of parasitic protozoa[M]. London: Macmillan Press Ltd, 1977: 45-48.

[17] 蔡蕙珍, 陈文列, 钟秀容, 等. 阴道毛滴虫酶的定位与代谢的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6(4): 256-258.

(**收稿**:2009-12-15;**修回**:2010-01-11)

(编辑 张 维)