

非洲巨螺 (*Achatina fulica*) 酯酶的電泳分析

姜淑媛* 官碧麗* 鄭湧湮** 溫永福**

摘 要

以聚丙烯醯胺膠體電泳法 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 分析臺北市南港地區非洲巨螺 (*Achatina fulica*) 之肝臟、腎臟、心臟、腹足、襟部、兩性腺以及卵白腺之酯酶異構酶 (Esterase isozyme) 組型，發現非洲巨螺各器官或組織之酯酶，均表現極明顯之「種內多型性」(Intraspecific Polymorphism)。不但不同地區的非洲巨螺族羣，表現不同的酯酶異構酶組型，而且，同一地區的族羣，也表現多種酯酶組型。由 44 隻非洲巨螺所做的研究結果，顯示酯酶之組型，在肝臟有五類、腎臟有四類、心臟有七類、腹足有二類、襟部有三類、兩性腺有四類，而卵白腺有四類，其中肝臟和腎臟之酯酶組型最為複雜，各器官或組織均具有 R_m 值為 0.78 和 1 之兩條主要染色帶。

壹、緒 言

非洲巨螺 (*Achatina fulica*) 為陸生大型螺類，自日據時代引進之後，至今已廣泛分佈於臺灣各地，生活於野外雜草叢或農田、菜圃裏。它們是臺灣地區廣東血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 重要的天然中間宿主 (溫永福, 1973; 1977a; 1977b; Alicata and Jindrak, 1970; Chen *et al.*, 1974)，此種寄生蟲亦能感染人體，引起嗜伊紅性腦膜炎 (Alicata, 1969; Cross, 1967; Nomura and Lin, 1945; Yii *et al.*, 1968)。經調查發現，臺灣各地的非洲巨螺，感染廣東血線蟲的比例頗高 (溫永福, 1977c)，因此，非洲巨螺在此種病例的預防和研究上，均極具價值，因此，深入探討臺灣各地非洲巨螺的生理及生化特性有其必要。

異構酶 (Isozyme) 的探討，在分類、生理、演化、生態以及醫學研究上，均極為重要。在螺類的研究方面，Wium-Andersen (1973) 曾以「澱粉膠體電泳法」(Starch Gel Electrophoresis) 探討非洲 *Biomphalaria* 屬五種螺類，肝—胰臟 (Hepatopancreas) 的酯酶 (Esterase) 異構酶，結果發現不同族羣的 *B. alexandrina*，其酯酶異構酶的組型 (Pattern) 亦異，而有些種類，像 *B. pfefferi* 則不因地區而異。Levan 和 Fredga (1972) 的研究，更發現 *Cepaea nemoralis* L., *C. hortensis* Müll.

和 *Arianta arbustorum* L. 等三種陸生蝸牛之酯酶和蘋果酸去氫酶 (Malate dehydrogenase)，均具有極明顯之「種內多型性」(Intraspecific polymorphism)；就 *C. nemoralis* 的酯酶組型來看，仔細分析，每一個體均不相同。

在蚊蟲 (*Culicidae*) 方面的研究結果，也有相同的報告 (Freyvogel *et al.*, 1968)，至於在臺灣地區的非洲巨螺是否有此現象？至目前為止，仍鮮有報告。由於本省氣候溫暖潮濕，極適合非洲巨螺之生長，而非洲巨螺在醫學上和經濟上 (食用或做為家畜飼料) 又極具價值，因此，有計劃的探討臺灣全省各地非洲巨螺的生化 and 生態特徵，實有其必要，本文即在探討臺北市南港地區非洲巨螺的酯酶組型，以期能夠提供一些基本資料，俾有助於其他方面的研究。

貳、實驗材料和方法

一、實驗材料之採集和處理：

本研究所用之非洲巨螺 (*Achatina fulica*)，於民國 70 年 6 至 7 月間，採自臺北市南港區聯成里；選取大小約自 $(6.5 \pm 0.45) \times (3.7 \pm 0.27)$ 公分者，攜回置於籠內，在室溫下飼養一週後，方用來抽取酯酶。此期間不予餵食，僅灑些水使之保持潮濕。

二、實驗方法：

將非洲巨螺的殼輕輕敲破，以解剖剪刀剪取其

* 師大生物系 70 級結業學生

** 師大生物系

肝、腎臟、卵白腺、兩性腺、心臟、襟部和腹足等組織，分別置於 0.1 M 磷酸緩衝溶液，pH 7.0 中，洗除黏液，再將各部份器官，置於磨碎器 (Homogenizer) 中，加入適當體積的前述緩衝溶液，於 0°C 下研磨，磨碎液再置於高速冷凍離心機中，於 4°C 下，以 8,000 g 離心 10 分鐘後，吸取上澄液供電泳之用。

本研究採用 Polyacrylamide Gel Electrophoresis 來分析酯酶。膠體 (Gel) 之製作，依照 Cooper (1977) 的方法，加以修改，下層膠體濃度為 7%，上層膠體濃度則為 3.3%，電泳槽之緩衝溶液為 0.05 M Tris-Glycine, pH 8.3。在加入酯酶前，先以 4 mA/tube 之電流通電 (Pre-run) 30 分鐘；於注入酯酶後，先以 1 mA/tube 之電流電泳 10 分鐘後，再以 5 mA/tube 電泳 40 分鐘。

電泳後之膠體先置於 0.1 M 磷酸緩衝溶液，pH 7.0 中 5 分鐘，然後依照 Shaw (1970) 的方法，染色約 15~20 分鐘。染色溶液之配方如下：

Fast Blue RR	100 mg
0.5 M Tris-HCl, pH 7.1	10 ml
* 1% α -Naphthyl acetate	3 ml
H ₂ O	87 ml

* : 1% α -Naphthyl acetate 之配法如下：

α -Naphthyl acetate	1 g
Acetone	50 ml
H ₂ O	50 ml

至酯酶的染色帶 (Bands)，顏色清晰穩定而且不再增加為止。染色後的膠體，以 Methyl alcohol : Acetic acid : H₂O = 20 : 1 : 20 固定保存。為了明確計算每一染色帶之相對泳動距離，染色後之膠體，更以 Gilford 250 光電比色儀所附之膠體掃描儀 (Gel Scanner)，於 420 nm 之波長下掃描，以幫助確認。各電泳帶之「相對移動值」(簡稱 *Rm*) 是以肝酯酶組型中，移動最快，且在各組型中，均存在的電泳帶為 1 比較而得。

參、結果與討論

本研究的結果顯示，不同地區的非洲巨螺，其酯酶之組型也不同，甚至同一地區之非洲巨螺，每一個體之酯酶，在組型或染色帶染色之深淺上，亦

略有差異，這個結果與趙氏 (1978)，以 Polyacrylamide Gel Electrophoresis 分析臺灣省不同地區的臺灣釘螺 (*Oncomelania hupensis formosana*)，發現其 α -羥基丁酸去氫酶 (α -Hydroxybutyrate dehydrogenase) 異構酶的組型，因地區的不同而異的結果相符；也與 Wium-Andersen (1973) 以 *Biomphalaria alexandrina* 為材料；以及 Levan 和 Fredga (1972) 以 *Cepaea nemoralis* 這種陸生蝸牛為材料，所得的研究結果一致。這個結果表示，臺北市南港地區的非洲巨螺，與 *Cepaea* 屬陸生蝸牛一樣，有顯著的「種內多型性」存在。

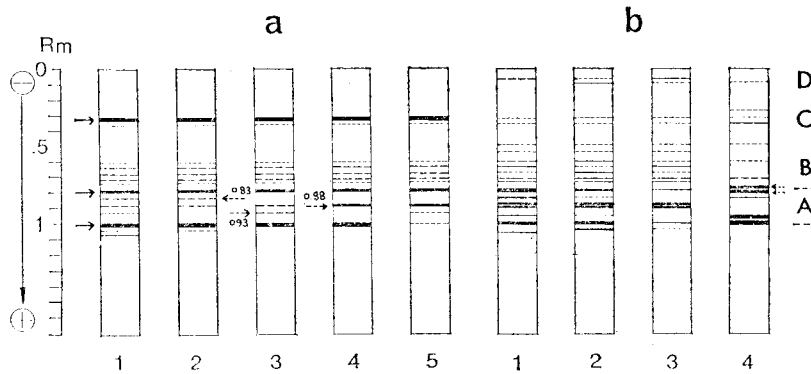
就各器官的酯酶組型及活性來看，肝和腎的酯酶活性最大，組型亦較複雜，其染色帶數目約有 10~18 條，其他器官或組織的染色帶數目則較少，約 1~13 條左右。有關各器官或組織酯酶的組型和染色帶數以及表現各組型的個體數，請參見表一。現將各器官酯酶的組型特徵簡述如下；由於不同地區的非洲巨螺，其酯酶組型有異，因此，本研究結果，僅代表臺北市南港地區非洲巨螺的可能組型，至於其他地區的非洲巨螺，其酯酶組型究為如何，則仍有待更進一步的調查和研究。本研究的結果，係由 44 隻非洲巨螺之研究綜合而得，依照染色帶的數目，移動的距離以及染色的深淺加以歸類。其染色帶之特徵更依活性的大小，分成三級，染色深而明顯 (Sharp) 者，為「一級帶」(Primary band)，以黑色實線表示；稍淺者，稱為「二級帶」(Secondary band)，以粗長虛線代表；而較淡者，則為「三級帶」(Tertiary band)，以細短虛線表示。

肝之酯酶異構酶組型，大體上可區別為五大類，其染色帶的數目由 10~14 條不等，在本研究中，只有 6.8% 的個體表現第 5 類組型 (參見表一)。每一組型均具有 *Rm* 值為 0.324, 0.78 和 1 等三條一級染色帶，惟第 5 類組型，*Rm*=1 之染色帶，染色很淡；屬於「三級帶」。假若將組型之染色帶更細分為三區 (Zones) 時，便可明顯看出，如圖一 a 所顯示的，只有 A 區之染色帶因組型不同而異，而 B、C 兩區之染色帶則守恆。在 A 區內，在 *Rm*=0.78 和 1 兩染色帶之間，似應有三條染色帶，其中 *Rm*=0.88 者，5 類組型均有，而 *Rm*=0.83 者，僅第 1、2 類組型有之，而 *Rm*=0.93 者，則僅第 1、3、5 類組型具有。

表一 非洲巨螺各器官或組織，酯酶組型染色帶的數目和表現該組型的個體數
 Table 1. Number of bands in each esterase isozyme patterns from seven organs or tissues of *Achatina fulica*

Esterase Pattern	Organ or Tissue							
	Liver	Kidney	Foot	Collar	Albumin Gland	Ovotestis	Heart	
1	B*	14	17	10	11	10	6	1
	I**	12	11	15	13	9	9	7
	% I	27.3	29.7	68.2	40.6	37.5	28.1	17.5
2	B	12	18	8	5	7	8	3
	I	10	15	7	11	8	9	9
	% I	22.7	40.5	31.8	34.4	33.3	28.1	22.5
3	B	11	16	—	4	7	13	4
	I	10	9	—	8	3	4	6
	% I	22.7	24.3	—	25	12.5	12.5	15
4	B	10	12	—	—	6	7	4
	I	9	2	—	—	4	10	7
	% I	20.5	5.4	—	—	16.7	31.3	17.5
5	B	11	—	—	—	—	—	11
	I	3	—	—	—	—	—	9
	% I	6.8	—	—	—	—	—	22.5

* B: No. of band. ** I: No. of Individuals showed the pattern.



圖一 非洲巨螺肝臟(a)和腎臟(b)之酯酶組型。
 箭頭表示 R_m 值為 0.324, 0.78 和 1 之染色帶。

Fig. 1. Diagrams of esterase isozyme patterns from liver (a) and kidney (b) of *Achatina fulica*. Bands are arbitrarily subdivided into four zones. (See text).

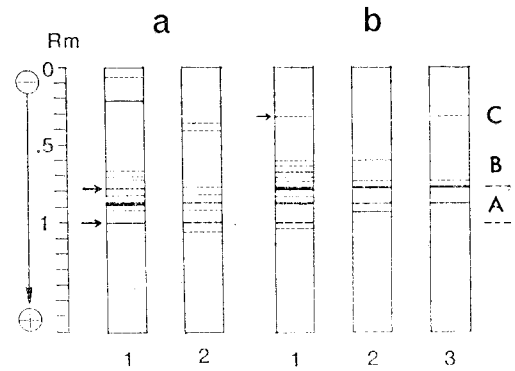
R_m : Relative mobility. The R_m values indicated by the solid arrows are 0.324, 0.78 and 1 respectively.

就本研究的探討結果來看，腎之酯酶活性是各器官和組織中，最高者；其異構酶之組型亦最為複雜，這個結果，與 Freyvogel 等人 (1968) 的研究，發現蚊蟲之排泄器，酯酶活性最大的結果雷同。由37隻非洲巨螺的腎綜合而得之酯酶異構酶組型可分為四類，其染色帶數目由12~18條。第1、2和3類組型，染色帶之分佈十分相似，B、C兩區之型式大致相同(圖一b)，只有A區稍有差異，其第3類組型缺 $Rm=0.83$ 和 0.93 兩條染色帶。而第4類組型則與前三類大不相同， $Rm=0.78$ 之「一級帶」似乎分裂為 0.768 和 0.793 兩條「一級帶」，此外，普遍存在於前三類組型之 $Rm=0.87, 0.89$ 兩條「一級帶」缺如。由於表現第4類組型之非洲巨螺只有兩隻 (5.4%)，且其組型與前三類差異甚大，因此，其精確性尚有待更進一步的探討。

腹足之酯酶活性很低，其異構酶僅具兩類組型，這兩類組型均具有 $Rm=0.78, 0.83, 0.88, 0.93$ 和 1 等染色帶 (圖二 a)；就分區來看，則A區染色帶的分佈，兩類組型極為相似，第1類組型缺C區染色帶而第2類組型則缺B、D兩區染色帶。

襟部 (Collar) 之酯酶活性亦低，其異構酶組型尚稱簡單，約可分為三類，第1類組型具有11條染色帶，而第2、3類組型則只有5和4條；三者均具有 $Rm=0.78, 0.88$ 兩條主要染色帶，至於 $Rm=1$ 之染色帶則缺如 (圖二 b)。

卵白腺 (Albumin gland) 則具有四類酯酶異構酶組型，其染色帶的數目由6~10條。第3和4類組型不具 $Rm=1$ 之主要染色帶， $Rm=0.324$

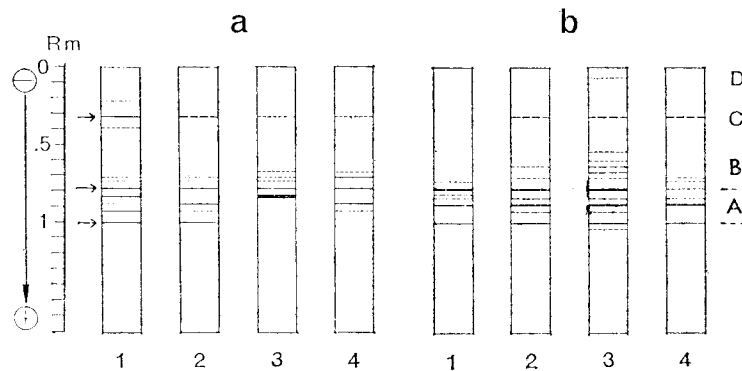


圖二 非洲巨螺腹足(a)和襟部(b)的酯酶組型
 Fig. 2. Diagrams of esterase isozyme patterns from foot (a) and collar (b) of *Achatina fulica*. Bands are arbitrarily subdivided into four zones.

和 0.78 之染色帶，則普遍存在於四類組型；其染色帶之分佈狀況，參見圖三 a。

兩性腺 (Ovotestes) 亦具有四類酯酶異構酶組型，其染色帶之分佈變化並不劇烈，四類組型均具有 $Rm=0.78, 0.83, 0.88$ 和 1 之染色帶 (圖三 b)。其第1類組型缺乏C、D區以及B區內大部份之染色帶，組型之間的差異只是一些次要染色帶 (Minor bands) 之增減而已，染色帶之總數則由6~13條。

心臟之酯酶異構酶組型變化較多，共有七類，其染色帶的數目由1~11條不等。在這七類組型之中，前五類 (第1~5類) 出現之頻率較高，在40隻非洲巨螺之中，共有38隻 (95%) 表現前五類組型，而第6、7兩類組型則各只有一隻。就基本



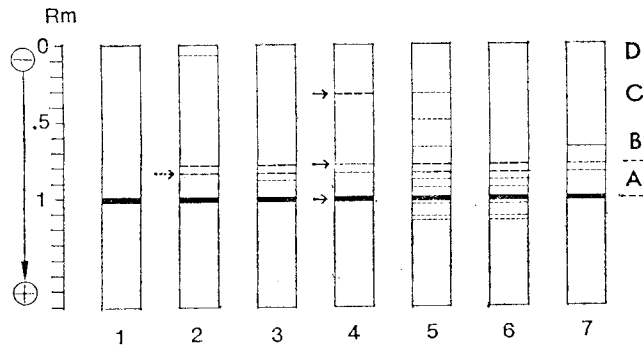
圖三 非洲巨螺卵白腺(a)和兩性腺(b)的酯酶組型
 Fig. 3. Diagrams of esterase isozyme patterns from albumin gland (a) and ovotestes (b) of *Achatina fulica*. Bands are arbitrarily subdivided into four zones.

型式來說，心肌酯酶之七類異構酶組型以 $Rm=1$ 之主要染色帶為主體，呈色既深而且粗，第 1 類組型即僅含該染色帶。此外，其餘六類組型共同具有的染色帶尚有 $Rm=0.78$ 和 0.83 之次要染色帶（圖四）。由於在基本型態上，這七類組型十分相似，而且大多數二、三級「染色帶」之呈色所需時間甚長，而且顏色很淡，因此，很可能並無七類組型存在，因此，仍有待更進一步的探討。

假若於各器官或組織之酯酶組型中，各選取其中出現頻率最高者，加以比較，結果如圖五所示。 $Rm=0.78$ 和 1 之染色帶普遍存在於各器官或組織中，該兩染色帶亦為所有染色帶中，活性最大，呈色最顯著，而且是構成各器官或組織酯酶組型之最

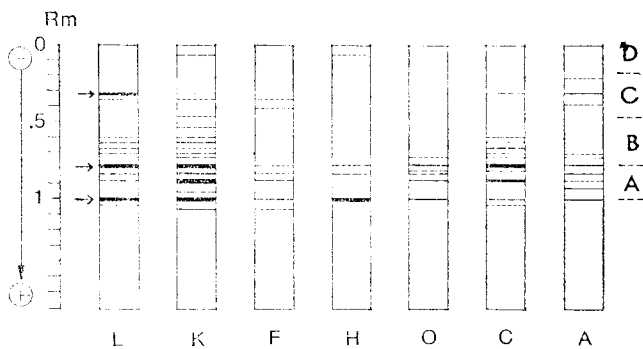
主要「一級染色帶」。其次就組型之複雜性來看，腎臟之酯酶組型最為複雜，肝臟次之，腹足肌肉與心臟最為單純。

由於本研究採得之非洲巨螺，每一個體於實驗前，經依照溫氏 (1973) 的方法檢查結果，在肺臟均發現有廣東血線蟲幼蟲的感染。雖然本研究取材之器官或組織，並未發現有廣東血線蟲之幼蟲存在，不過其他器官或組織的感染廣東血線蟲，是否會影響這些器官或組織之酯酶組型，則尚未可知。不過根據 Laubach 和 Sartain (1978) 的研究，經廣東血線蟲成體感染的大白鼠，其肺內 Lysophospholipase 的活性以及組織之 Eosinophilia 都有明顯的增加；此外，Wright 等人(1979)



圖四 非洲巨螺心臟的酯酶組型

Fig. 4. Diagrams of esterase isozyme patterns from heart muscle of *Achatina fulica*. Bands are arbitrarily subdivided into four zones. $Rm=0.83$.



圖五 非洲巨螺七種不同器官酯酶組型之比較

Fig. 5. Comparison of esterase isozyme patterns among seven organs or tissues studied. Bands are arbitrarily subdivided into four (A, B, C, D) zones. Explanations see text.
L: Liver; K: Kidney; F: Foot; H: Heart; O: Ovotestes; C: Collar; A: Albumin gland.

亦報告, *Bulinus senegalensis* 這種蝸牛, 一旦感染某些寄生蟲, 例如: *Schistosoma haematobium* 等, 其 Glucose phosphate isomerase (GPI) 和 Malate dehydrogenase (MDH) 均有明顯的額外染色帶產生。因此, 本研究之結果, 仍有待與同一地區未感染的非洲巨螺的研究結果, 相互比較分析, 方能確定; 在本研究中, 由於, 從該地區所採得的非洲蝸牛, 其感染率達 100%, 而不同地區的蝸牛, 則酯酶組型已然不同, 殊難比較, 已如前述, 故未能做感染與未感染廣東血線蟲個體, 酯酶組型之比較分析。

此外, 各器官或組織大部份組型之間的差異, 主要皆在次級染色帶 (Minor bands), 而次級帶之呈現有時可能會受個體的代謝情況, 酵素抽取過程中的自然或人為修飾 (Modification) 或操作的誤差等因素的影響, 不過由於本研究取樣的個體數不少, 而且每一組型, 除心臟的第 6、7 類組型外, 其染色帶重複出現的頻率尚高, 因此, 人為之實驗操作的誤差所引起的染色帶變異, 應已減至最低, 也因此, 作者認為, 非洲蝸牛之酯酶組型, 原就具有相當的複雜性。

誌 謝

本文之完成, 承本系蔡在壽老師的大力幫忙, 童武夫副教授提供諸多寶貴意見, 至為感謝!

參 考 文 獻

1. 溫永福: 廣東住血線蟲在非洲巨大蝸牛體內之分佈狀況。中華民國微生物學雜誌, 6: 116-121, 1973。
2. 溫永福: 廣東血線蟲在非洲巨螺肺內的發育狀況。中華民國微生物學雜誌, 10: 74-79, 1977a。
3. 溫永福: 廣東住血線蟲在非洲巨大蝸牛體內的遷移路線及發育狀況的研究。中國貝誌, 4: 55-62, 1977b。
4. 溫永福: 臺灣及其離島地區廣東住血線蟲在非洲巨螺宿主的感染狀況。師大生物學報, 12: 47-52, 1977c。
5. 趙大衛: 不同地方產臺灣釘螺的 α -酮基丁酸除氫醇素分析。貝類學報, 5: 69-76, 1978。
6. ALICATA, J. E.: Present status of *Angiostrongylus cantonensis* in man and animals in the tropics. J. Trop. Med. Hyg. 72: 53-63, 1969.
7. ALICATA, J. E., and K. JINDARK: Angiostrongyliasis in the Pacific and Southeast Asia. Charles, C. Thomas Publisher, Springfield, USA.
8. CHEN, S. N., C. T. LO, S. Y. LEE, and K. H. LIU: *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Achatina fulica* from Taiwan. Chin. J. Microbiol. 7: 62-63, 1974.
9. COOPER, T. G.: Electrophoresis, The Tools of Biochemistry. John Wiley and Sons, New York, 1977, p. 194-233.
10. CROSS, J. H.: Review of angiostrongyliasis in Taiwan. South Pacific Commission, Seminar on Helminthiasis and Eosinophilic Meningitis Working papers SPC/HEM/WP: 5, 1967.
11. FREYVOGEL, T. A., R. L. HUNTER and E. M. SMITH: Non-specific Esterases in Mosquitos. The J. of Histochem. and Cytochem. 16(12): 765-790, 1968.
12. LAUBACH, H., and K. E. SARTAIN: Effects of Various Numbers of Adult *Angiostrongylus cantonensis* on Lung Lysophospholipase Activities and Bone Marrow Eosinophil Levels of Specific Pathogen-free rats. J. Parasitol. 64(6): 1145-1146, 1978.
13. LEVAN, G., and K. FREDGA: Isozyme Polymorphism in three species of land snails. Hereditas 71: 245-252, 1972.
14. NOMURA, S., and P. H. LIN: The first human case infected with *Haemostrongylus ratti* Yokogawa. Fomosan Med. World. 3: 589-592, 1945.
15. SHAW, C. R.: Starch Gel Electrophoresis of Enzymes—A compilation of recipes. Biochem Genet. 4: 297-320, 1970.
16. WIUM-ANDERSEN, G: Electrophoretic Studies on Esterases of some African *Biomphalaria* spp. (Planorbidae). Malacologia 12(1): 115-122, 1973.
17. WRIGHT, C. A., D. ROLLINSON, and P. H. GOLL: Parasites in *Bulinus senegalensis* (Mollusca: Planorbidae) and their detection. Parasitology 79: 95-105, 1979.
18. YIH, C. Y., C. Y. CHEN, J. W. FRESH, T. CHEN, and J. H. CROSS: Human angiostrongyliasis involving the lung. Chin J. Microbiol. 1: 148-150, 1968.

Electrophoretic Studies on Esterase Isozymes of *Achatina fulica*

SHU-YAUN JING, BIH-LIH GUAN, YEONG-JING CHENG
and YUNG-FU WEN

Department of Biology, National Taiwan Normal University

ABSTRACT

Esterase zymograms prepared from liver, kidney, ovotestes, albumin gland, foot, collar, and heart of *Achatina fulica* from Nan-Kang area in Taipei city were examined by means of polyacrylamide gel electrophoresis.

The results indicated that the esterase isozyme patterns of *A. fulica* varied from one population to another. The liver and kidney showed particularly rich in esterase isozymes and gave relatively complicated electrophoretic patterns. This study also revealed that the esterase isozymes from the organs or tissues indicated above showed distinctly different patterns. However, two major bands, namely, 0.78 and 1 (*R_m* value) were found to be constantly appeared in almost all of the esterase isozyme patterns. It is obviously that esterase has intraspecific polymorphism in *A. fulica*.