

几种无脊椎动物内源糖的测定*

陈俊民 江静波**

(生物系)

除了葡萄糖和糖原这两种最常见糖类之外,海藻二糖已在许多无脊椎动物找到^[1]。糖类常作为动物的主要能源而在代谢中具有重大意义。由于寄生蠕虫多行无氧或有氧酵解^[2],而糖是无氧代谢的最好能源,并且在酵解中糖中所含能量没有完全释放出来,增加了糖的消耗量,因此糖代谢在寄生虫占据特殊重要的位置。为了研究糖类在无脊椎动物体内的代谢,有必要先对动物器官中各种内源糖的种类与含量进行测定。本文报告了对牛住肉孢子虫(*Sarcocystis blanchardi*),长形非氏吸虫(*Fischoederius elongatus*),胰脏盘吸虫(*Eurytrema pancreaticum*)三种寄生虫,和背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*),褐云玛瑙螺(*Achatina fulica*),樟蚕(*Naturnia pyrectorium*)幼虫三种自由生活无脊椎动物内源总糖、糖原、葡萄糖和海藻二糖等的测定结果。

材料与方 法

(一)试剂:

1. 5%三氯乙酸(以下简称TCA)。
2. 60%(w/v) KOH;分析纯KOH,加蒸馏水配制。
3. 无水乙醇(分析纯)
4. 蒽酮试剂^[3]:蒽酮(分析纯)0.2克溶解在85%硫酸(比重1.84的分析纯浓硫酸100ml加蒸馏水20ml)100ml中。貯冰箱中,一周内使用。
5. 0.4%葡萄糖貯液:葡萄糖(分析纯)0.4克溶于苯甲酸饱和溶液中。置冰箱中保存。
6. 标准葡萄糖溶液:应用前取上述貯液,加蒸馏水稀释至每毫升含葡萄糖40

* 本文有关寄生虫部分曾在北京1963年全国寄生虫学专业学术讨论会上宣读。

** 欧阳怡然、吴秀媚、邓林贵、黄寅荣

微克。

(二) 材料处理:

在屠场检查屠宰的水牛食道,把含有米氏管的食道装在广口瓶中带回实验室,贮藏在冰箱中。试验前先解剖出米氏管,在采集后 8 小时左右进行糖类的分离与测定。长形非氏吸虫和胰阔盘吸虫分别采自水牛的胃和胰管。采集后放在盛有生理盐水的瓶中,换生理盐水几次,然后贮藏在冰箱中,在采集后 8 小时左右进行分析。背角无齿蚌和褐云玛瑙螺经饥饿一天后,将足部肝脏和生殖腺或生殖系统解剖出。将以上动物整体或各部分称重后加 5%TCA 进行匀浆,然后稀释至约 50mg 组织/ml,沸水浴中抽提 15 分钟^[4],并使蛋白质沉淀。离心 10 分钟,取上清备用。把樟蚕幼虫体壁剪破(小心不损坏内脏),使血淋巴直接滴入盛有一定量 TCA 溶液的 10 ml 量筒中,同上处理。各种动物在解剖处理前活动性均良好。本文全部试验在 1963 年 5—7 月间进行。

根据糖原在 60—70% 乙醇中沉淀,葡萄糖在 24—30% KOH 中加热时分解,而海藻二糖不受二者影响的原理^[5],把抽提液分为几个部分:

- (A) 不处理部分。
- (B) 加等量 60% KOH, 然后沸水浴处理 20 分钟。
- (C) 加 1.3 倍体积无水乙醇,用力振荡,离心取上清。
- (D) 将 (C) 再加 KOH 处理。

(三) 测定与计算:

在刻度试管中加样品 1.0ml,置碎冰水中,加蒽酮试剂 5.0ml,沸水浴处理 10 分钟后,以蒸馏水代替样品加蒽酮作为 O 管,在科伟 581 型光电比色计中测光密度,滤光片为 650m μ 。在用不同含量的葡萄糖溶液进行的初步试验中已经证明,当光密度低于 0.7 时光密度与糖含量成正比。因此在每次测定中,根据 (A) 管试验结果,把各部分样品最后浓度控制在光密度 0.6—0.1 之间。同时测定含葡萄糖 40 μ g/ml 的标准管的光密度。然后把各管光密度按下式计算出每克鲜组织或每 ml 血淋巴含糖(按葡萄糖计)mg 数。如:

$$A \text{ 部分含糖量} = \frac{A \text{ 管光密度} \times 0.04}{\text{标准管光密度} \times \text{每 ml 样品中含组织克数}} \text{ mg/g 鲜组织最后}$$

按下列公式计算出各种糖的含量: A = 总糖, A - B = 葡萄糖, A - C = 糖原, D = 海藻二糖等。

结 果

兹将各种动物器官中各种糖的测定结果列表于下:

表1. 各种动物器官或組織平均含糖量 (mg/g鮮組織或mg/ml血淋巴) 和各种糖占总糖的百分比(%)。

动物	器官或組織	总糖含量 %	糖原含量 %	葡萄糖含量 %	海藻二糖等含量 %	誤差 * 含量 %
住肉孢子虫	小型米氏管	25.5 100.0	8.8 34.2	10.0 39.2	8.1 31.7	+1.3 +5.1
	大型米氏管	16.6 100.0	2.2 13.0	8.6 52.0	5.0 30.1	-0.8 -4.9
长形菲氏吸虫	全虫	100.3 100.0	54.4 54.2	19.3 19.3	19.9 19.8	-6.7 -6.7
胰脏盘吸虫	全虫	33.6 100.0	17.7 52.8	8.4 24.3	7.0 20.9	-0.5 -1.4
背角无齿蚌	足部	76.5 100.0	25.1 32.8	30.5 39.9	24.3 31.8	+3.4 +4.5
	雌性蚌腺	158.4 100.0	57.5 36.3	38.5 24.3	58.6 37.0	-3.8 -2.4
	雄性蚌腺	29.9 100.0	7.1 23.8	11.2 37.4	7.9 26.2	-3.7 -12.6
褐云玛瑙螺	生殖系统	62.0 100.0	31.6 51.0	17.9 28.9	12.4 20.0	-0.1 -0.1
	肝脏	40.6 100.0	17.7 43.6	11.2 27.6	11.5 28.4	-0.2 -0.4
樟蚕(幼虫)	血淋巴	12.3 100.0	0.8 6.6	1.7 14.0	12.0 97.4	+2.2 +18.0

* 三种糖总和减去总糖所得的值。

討 論

Stacey & Barker(1962)[6]在論述糖原的測定方法時指出：組織中糖原的抽提過去一般採用30%KOH煮沸法和TCA冷浸法，前者含有能對蔥醌和鹼性銅溶液起反應的非糖原物質，而後者只抽提出一部分糖原，而Kemp & Heijngen (1954)[4]採用了TCA與組織勻漿後100°加熱15分鐘的方法，據報告能使全部糖原進入溶液。因為後一種方法除了上述優點外，同時也不破壞其它糖分。用這種方法抽提的樣品可用來測量總糖含量，經過不同方法處理以除去別種糖之後，還適用於糖原，葡萄糖和海藻二糖等的測定。因此在本報告的全部試驗中都採用後一種抽提方法。

從試驗結果可以看出，按上述方法抽提，分離測定的結果，三種糖的總和和總糖相差多在5%以下，只有2種器官組織誤差較大。因此這方法基本可用。蔥醌試劑是最常用試劑之一，但據報告[7]含氮物質每6mg氮和1mg糖對蔥醌試劑產生同樣的光密度。在本試驗中已用5%TCA沉淀蛋白質，但誤差仍難完全排除。

據Fairbairn (1958) [1]對包括無脊椎動物主要各門的71種動物進行測定的結果，海藻二糖和葡萄糖、糖原同樣作為最重要的糖類而普遍存在於無脊椎動物組織中。Laurie (1959)[4]根據Fairbairn的意見，把棘頭蟲*Moniliformis dubius*的(D)部分全部作為海藻二糖。我們將各種抽提液用正丁醇-乙醇-水(4:1:1.9)為推進劑

[1] 在园滤纸上进行层析,发现各种组织中均含有单糖、双糖和三糖。其中樟蚕血淋巴抽提液用正丁醇-吡啶-水(2:2:1)作推进剂进行单向纸层析,证实了在樟蚕血淋巴中有大量海藻二糖($R_f = 70$)存在。由于(D)部分在层析中出现大块白斑,不能确定除海藻二糖外是否还有其它糖类,或者还有 Stacey & Barker (1962) [6] 所说的非糖物质,但是看来海藻二糖可能是(D)部分中和蒽酮试剂起反应的主要成分。此外,被乙醇沉淀的部分除了糖原之外,也可能含有其它多糖。据报告[6],在腹足类的葡萄蜗牛(*Helix pomatia*)和 *Viviparus* 的蛋白腺都含有半乳聚糖(galatan)。看来在本试验的褐云玛瑙螺的雌性生殖系统中的蛋白腺部分可能也含有这种糖。这些问题都有待进一步的研究。

住肉孢子虫一向列入孢子虫纲,但许多学者认为把它归入真菌比较合适[8]。寄生水牛的住肉孢子虫依记载有4种[9],但一般认为只有 *Sarcocystis blanchardi* [10] 一种。我们在水牛食道中解剖到的米氏管有2种类型:一型为粗大而两端钝者,另一型为瘦小而两端尖者。通常在一条食道中只能找到一种类型。因此在分析糖含量时分别对它们进行测定,藉资比较。从试验结果看来,小型米氏管各种糖的含量都高于大型米氏管。三种糖含量在小型米氏管相差不多,按高低顺序为葡萄糖、糖原和海藻二糖等;大型米氏管则相差较大,按顺序为葡萄糖、海藻二糖等和糖原。其中小型米氏管糖原含量为大型米氏管的4倍,海藻二糖等也近2倍,只有葡萄糖高出不多。这种差异是否反映出系或种别的问题或者与发展条件、阶段或其它因素有关,有待进一步研究。在本试验中我们用整个米氏管进行分析,由于米氏管外壁有薄层寄主反应组织,因此这一糖分析还包括一小部分寄主反应组织在内。但在文献中海藻二糖迄未在脊椎动物体内发现过,因此其中海藻二糖当全部来自牛住肉孢子虫本身。

两种吸虫总糖和各种糖含量有很大差异。虫体肥厚的长形菲氏吸虫含糖总量高达虫体鲜重的10.0%,而虫体菲薄的胰阔盘吸虫只占3.4%。这样大的差异可能主要是由于两种虫的含水量不同的结果。各种糖占总糖的百分比则在两种吸虫颇为接近,其中以糖原为最高,超过总糖的一半,其它两种糖则相差不多。据报告[11],和长形菲氏吸虫同属一科并且同样寄生在水牛网状胃的 *Gastrothylax orumenifer* 和 *Paramphistomum explanatum* 糖原含量分别为6.46和7.26%鲜重。这些数字和长形菲氏吸虫相远不差。陶义训等(1958) [3] 在牛的胰吸虫测得糖原含量为4.58%鲜重,为本报告的胰阔盘吸虫糖原含量1.77%的2倍多,甚至超过总糖含量。陶义训等系用30% KOH煮沸抽提法,上面已经提到这种抽提液含有能对蒽酮试剂反应的非糖原物质[6],因此有可能使得数字偏高。此外,由于在牛的胰管中存在有 *Eurytrema pancreaticum* 和 *E. coelomaticum* 两种吸虫,而原作者没有详细指出虫种和寄主的种类,因此这种差异到底反应出吸虫种的差异或是寄主的差异,或者是方法上的差异或其它原因,目前还不能确定。据报告[10], *G. orumenifer* 和 *P. explanatum* 在生理盐水中培养10小时后糖原含量分别降低了42.3和36.4%。在本报告的虫体保

存8小时的过程中,糖原含量当有一定程度的降低,但为了测定内源糖的含量,一定时间的饥饿是必要的。根据两种吸虫的糖原含量都超过总糖含量的一半这一点,看来糖原是这两种吸虫所贮存的主要能源。据Fairbairn(1958)[1],海藻二糖在肝片吸虫尤其是孟氏血吸虫含量较低,并且认为寄生蠕虫体内的海藻二糖的意义还未了解清楚。海藻二糖在长形菲氏吸虫和胰阔盘吸虫生理学上的意义有待进一步的研究。

在所测定的各种动物及其器官组织中,背角无齿蚌雌蚌性腺各种糖含量都居首位。雄蚌性腺总糖含量只有它的1/5,糖原,海藻二糖等和葡萄糖分别为其1/8,1/7和1/3。在三种糖之中,雌蚌性腺以糖原和海藻二糖等含量为最高,雄蚌性腺则以葡萄糖为最高。据Fairbairn(1957)[12],去旦白膜的蛔虫卵中糖原和海藻二糖含量分别为78和79mg/g鲜重。看来在背角无齿蚌雌蚌性腺中特别大量的糖原和海藻二糖可能也是卵的主要成分,而推测雄蚌性腺中大量的葡萄糖可能与精子的组成或活动有关。背角无齿蚌足部糖原含量高达25.1mg/g鲜重,和文献[13]上牡蛎肌肉糖原含量26—42mg/g鲜重颇为接近,而远高于其它动物肌肉糖原含量。褐云玛瑙螺生殖系统和肝脏都以糖原含量为最高,而樟蚕血淋巴中则绝大部分为海藻二糖等,占三种糖总和的83%。有趣的是,褐云玛瑙螺是雌雄同体的,其生殖系统各种糖的含量都介于背角无齿蚌雌蚌和雄蚌性腺之间。据报告,鳞翅目昆虫血淋巴中海藻二糖含量为2.0—15.0mg/ml[14],家蚕血淋巴糖原和葡萄糖含量分别为0.5和0.9—2.3mg/ml[13]。我们在樟蚕所测得的结果与上述数字相似。本报告在樟蚕血淋巴的测定中,各种糖总和和总糖之间的误差较大,可能是在血淋巴加KOH处理过程中产生了一些能与茚酮起反应的非糖物质[6]所致。

总 结

本文用5%TCA和动物组织共同匀浆后在沸水浴中抽提15分钟,离心取上清。然后根据60—70%乙醇沉淀糖原,在30%KOH中加热破坏葡萄糖,而海藻二糖不受二者影响的原理,对三种糖进行分离,最后加茚酮试剂反应,用光电比色计测光密度,计算出样品中总糖、糖原、葡萄糖和海藻二糖等含量。其中在含海藻二糖的部分中可能还存在有其它寡糖,单糖甚至非糖物质。

本文报告了牛住肉孢子虫,长形菲氏吸虫,和胰阔盘吸虫三种寄生虫,和背角无齿蚌,褐云玛瑙螺和樟蚕幼虫三种自由生活无脊椎动物的器官或组织内源糖的测定结果。

牛住肉孢子虫两型米氏管之间各种糖的含量有所不同,小型者所含的糖原为大型者的4倍。但还不能断定两型之间是否涉及系或种的差别。长形菲氏吸虫总糖和糖原含量颇高,分别达10.03和5.44%鲜重。两种吸虫糖原含量都超过总糖的一半,从这点看来,糖原可能是这两种吸虫贮藏的主要能源。

背角无齿蚌雌蚌性腺各种糖含量在各种动物组织中居首位,糖原、葡萄糖和海藻二糖等含量分别为5.7%、3.85%和5.86%鲜重。其中含量特别高的糖原和海藻二糖可能是作为卵的主要成分而输送到卵中去的。背角无齿蚌足部糖原含量达2.51%鲜重,和牡蛎肌肉相近而远超过其它类动物肌肉的糖原含量。褐云玛瑙螺肝脏和生殖系统都以糖原含量为最高,而生殖系统中各种糖的含量都介于背角无齿蚌雌蚌和雄蚌性腺之间。樟蚕幼虫血淋巴以海藻二糖等含量为最高,达1.20%,但其中海藻二糖的确切含量尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fairbairn D. 1938. Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. *Canad. J. Zool.* 36, 787—795.
- [2] von Brand T. 1932. *Chemical Physiology of Endoparasitic Animals*. pp. 92—93. Academic Press Inc., New York.
- [3] 陶义训、马立人、林国鎬、吴光、1958. 日本血吸虫糖原含量的测定。生化学报1(3), 218—223.
- [4] Kemp A. & van Heijningen A. J. M. 1954, A colorimetric micro-method for determination of glycogen in tissues. *Biochem. J.* 56, 646—648.
- [5] Laurie J. S. 1959, Aerobic metabolism of *Moniliformis dubius* (*Acanthocephala*). *Exptl. Parasitol.* 8, 188—197.
- [6] Stacey M. & Barker S. A. 1932. *Carbohydrates of Living Tissues*. pp. 119—120, 2—3. Academic Press Inc., New York.
- [7] Dische Z. 1935. New color reactions for the determination of sugars in polysaccharides. In Glick D. ed. 'Methods of Biochemical Analysis.' pp. 313—358.
- [8] Spindler L. A. & Zimmerman H. E. Jr. 1945. The biological status of *Sarcocystis*. *J. Parasitol.*, 31 (suppl.), 13.
- [9] Wenyon C. M. 1926. *Protozoology*. Vol. II. p. 768. Bailliere, Tindall & Cox, London.
- [10] Bhatia B. L. 1938. *Protozoa: Sporozoa*. p. 363
- [11] Goll M. M. 1957. Carbohydrate metabolism in trematode parasites. *Zeit. für Parasit.* 18, 36—39.
- [12] Fairbairn D. & Passey R. F. 1957. The occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. *Exptl. Parasitol.* 6, 566—574.
- [13] Spector W. S. ed. 1956. *Handbook of Biological Data*. pp. 66—72.
- [14] Gilmour D. 1961. *Biochemistry of Insects*. p. 197. Academic Press Inc., New York.