

# 六种鼠乳酸脱氢酶和超氧化物歧化酶位点变异的研究

金晓玲 何新霞 周虞灿 杨君清\* 于立群\*

(浙江师范大学生物系, 金华, 321004)

## 摘 要

用电泳比较分析了鼠科动物6个种的组织LDH 同工酶的A、B、C 亚基和SOD 同工酶位点的种属差异。结果表明, LDH 的A 和B 亚基在进化上的可变性程度不同。在被分析的2个属共6种鼠中, 首次发现B 亚基的结构具有属的特征, 同属的鼠种B 亚基泳动度相同, 在垂直凝胶电泳板上处于同一泳动线上。不同属的鼠其B 亚基泳动度不同, 家鼠属的鼠B 亚基比姬鼠属的泳动快; A 亚基的结构既有属的特性, 更具有种的特征, 同属不同种的鼠A 亚基泳动速度不同, 表现为LDH 同工酶带的间距不同。LDH 的C 亚基结构因鼠种不同而异, 由C 亚基组成的LDH-X 带黄毛鼠位于自身的LDH-3和LDH-4之间, 社鼠和褐家鼠此带位于自身的LDH-4和LDH-5之间, 白腹巨鼠此带位于自身的LDH-5以外的阴极端, 与黑线姬鼠此带的位置特征相同。SOD 同工酶带只表现种的差异, 其3条带泳动速度的改变具有协同而变的共同特点。被分析的鼠种经配对法比较生化特征的相同程度, 初步表明黄毛鼠亲缘上与褐家鼠比较近, 白腹巨鼠亲缘上又比其余3种鼠更近于姬鼠属。

关键词 鼠科动物; 生化分类; 超氧化物歧化酶; 乳酸脱氢酶

生化分类学或称生化系统分类学 (Biochemical systematics) 的研究是利用生化资料去阐明一个大群体内各个物种间的亲缘关系、进化上的分支地位以及判断种群是单系性或是多系性 (Monophyletic or polyphyletic nature)。系统分类法要进行比较的物种不是几种而是多种, 既可以是一个亚属也可以是一个属的全部成员。需要比较分析的蛋白质种类也不是几种, 而是几十种或几十个位点。分析方法有生物化学法和分子生物学法, 根据所得的生化特征进一步采用生化表相法 (Phenetic analysis) 和分支分析法 (Cladistic analysis) 进行处理得以表达。这类研究报道在国外有关刊物上越来越多。Sullivan 及其同事 (1991) 通过电泳方法对波氏白足鼠 (*Peromyscus boylii*) 种群的16个种进行酶蛋白和非酶蛋白共32个位点的分析, 得出该种群遗传上是单系性的结果。

生化分类的研究与蛋白质、核酸这类生命大分子的进化研究密切相关。最先建立的系统进化树就是根据细胞色素C 蛋白分子氨基酸序列的差异程度而取得的, 发现亲缘关系越近, 一级结构的差异越小 (Fitch 等, 1967; Dayhoff 等, 1972)。至今研究分子进化并用所得资料进行分类研究的大分子除细胞色素C 外还有珠蛋白、免疫球蛋白以及胰岛素

\* 杨君清和于立群为我系88届毕业生

本文于1997年2月6日收到, 1997年12月24日收到修改稿

等 (Nei 等, 1983; Gutfreund, 1981)。值得重视的是核型细微差异的比较也是一种重要的手段 (Houseal 等, 1987; Smith 等, 1989), 核酸序列的比较更是从分子水平直接阐明分子进化的有效手段。采用分子生物学的方法研究物种的进化和分类, 其优点就是生物大分子结构的改变更能反映生物进化的本质, 而且根据其结构差异的程度可以定量地准确地反映亲缘的远近。

我们选用鼠科动物 (Muridae) 进行生化系统分类研究, 并非是其中争论的问题多, 而是因为其种类比较多。研究的目的是从生化角度了解鼠科动物的种间和属间的亲缘远近及其分支地位, 为经典分类学提供另一途径的补充资料。本文报道2个属共6种鼠的组织 LDH 和 SOD 同工酶位点变异的研究。

## 材料和方法

### 1. 动物材料

黑线姬鼠 (*Apodemus agrarius*) 5只, 小林姬鼠 (*Apodemus sylvaticus*) 1只, 社鼠 (*Rattus niviventer*) 15只, 白腹巨鼠 (*Rattus edwardsi*) 5只, 黄毛鼠 (*Rattus rattoides*) 4只, 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 21只, 于1992年4月至6月间捕自浙江师范大学校园和金华北山双龙洞附近山坡。黄胸鼠的生化资料引自以前的报道 (周虞灿等, 1990)。

### 2. 组织液制备

动物经乙醚麻醉放血。每只鼠取肝、肾、心肌、睾丸等组织。用生理盐水洗去血污, 滤纸擦干。称取0.2 g 组织, 加5 ml pH 为7.0的磷酸缓冲液, 用玻璃研磨器冷冻下研磨成匀浆。经高速冷冻离心机离心15 min (10 000 r/min), 取上清液置冰箱备用。分析前取出0.4 ml, 加40% 蔗糖液0.2 ml, 滴加1滴1% 的溴酚兰作指示剂, 每孔加样30  $\mu$ m。

### 3. 电泳

聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳的条件同以前报道 (周虞灿等, 1990)。染色采用 SOD 和 LDH 同时显色法 (周虞灿等, 1991)。

### 4. 试剂与仪器

丙烯酰胺, 双丙烯酰胺, 四甲基乙二胺 (TEMED) 等为美国 Bio-Rad 公司产品, 吩噻二甲酯硫酸盐为美国 Fluka 公司产品。其余均为国产生化试剂。

多功能电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

高速冷冻离心机为 J2-21 型, 美国 Beckman 公司产品。

## 结果和讨论

### 1. 6种鼠肝肾组织 LDH 和 SOD 同工酶位点变异的比较

姬鼠属的2种鼠和家鼠属的4种鼠先分别进行多种组织的电泳分析, 在此基础上各选用 LDH 和 SOD 活性强的肝肾组织在一块凝胶板上进行比较, 结果见图版 I - A。黑色酶带是 LDH 同工酶, 白色酶带是 SOD 同工酶。以下分3点进行结果分析和讨论。

(1) 姬鼠属两种鼠组织 LDH 和 SOD 同工酶特征的比较 从图版 I - A 的10至15号可以看出两种鼠的 LDH-1 位于同一泳动线上, 说明两者结构相似。

SOD 同工酶的泳动度, 两种姬鼠间的差异比较显著。小林姬鼠的 SOD 带泳动速度较

慢, 其主带位于LDH-1带的近前。而黑线姬鼠的SOD带泳动较快, 其主带远离LDH-1带。显然, SOD同工酶泳动度的差别是这两种鼠的一种生化差异的表现。

(2) 家鼠属4种鼠组织间LDH和SOD的比较 从图版I-A的1至9号可见, 4种鼠的LDH-1带位于同一泳动线上。说明它们的B亚基分子结构相似。而其余4条LDH带的泳动度各鼠间差异显著, 表现为LDH同工酶带的间距各鼠间明显不同, 说明它们的A亚基分子结构显著不同。黄毛鼠和褐家鼠的LDH酶带间距最宽, 社鼠次之, 白腹巨鼠最窄。准确地说, 白腹巨鼠的LDH-5带的部位相当于社鼠的LDH-4带和褐家鼠与黄毛鼠的LDH-3与LDH-4之间的位置, 而社鼠LDH-5带相当于褐家鼠与黄毛鼠的LDH-4和LDH-5之间的位置。LDH同工酶带间距的改变, 说明A亚基分子结构因鼠种不同而异。这种改变从进化角度是否具有规律性, 其进化的方向是由间距从窄到宽, 还是从宽到窄, 这将是非常有意义的问题。

因为同工酶带间的间距改变, 说明A亚基的结构改变, 在此主要表现为带电性质的改变。亚基结构的改变又说明表达该亚基的基因发生点突变, 表现为某个位置上氨基酸的取代。可以初步认为A亚基的基因易变, 对外界环境的改变比较敏感, 而B亚基的基因比较保守, 因而也比较稳定。我们曾发现(周虞灿等, 1991)由这2个位点表达的A和B亚基组成的同工酶纯合体A<sub>4</sub>(LDH-5)和B<sub>4</sub>(LDH-1)对温度的敏感程度相差很大。LDH的B亚基的耐热性高, 在70℃下约30 min后仍有活性, 而A亚基在同样温度下就完全失去活性。

SOD酶带的泳动度和同工酶组成, 各鼠间既有相同点又有相异之处。以SOD主带的泳动度来比较, 则黄毛鼠、褐家鼠、白腹巨鼠皆相同, 均位于LDH-1带近前, 唯有社鼠的SOD主带泳动较慢, 位于自身的LDH-2带部位, 并与之重叠。若以SOD各带的活性大小来比较, 只有褐家鼠3条带活性相等。其余各鼠都是1条活性最强的主带, 1条活性不强的次带和1条泳动最快的微弱带。还可看出3条带按活性强弱的排列次序除褐家鼠外其余各鼠总是相同。

从上述分析可见, LDH同工酶种间的区别似有一定的规律, 而SOD同工酶虽也存在种间差别, 但尚看不出其变异规律。

(3) 家鼠属和姬鼠属LDH和SOD的属间比较 从2个属6种鼠的LDH和SOD酶谱可见, 属间的差异主要是LDH同工酶的差异。首先表现为家鼠属的LDH泳动快, 姬鼠属的LDH泳动慢, 说明两属间LDH同工酶的A亚基和B亚基分子一级结构皆不同。其次是表现为家鼠属LDH同工酶带间距大, 姬鼠属的LDH同工酶带间距小。这也说明在不同属间物种中A和B亚基的变异程度不同, 同样反映属间的区别。

从上述LDH同工酶种间和属间的比较, 我们首次获得关于LDH同工酶亚基的变异在生化分类中起重要作用的知识。就本研究对2个属6种鼠的分析, 可以初步认为LDH同工酶的A和B亚基在进化上稳定性显著不同。B亚基表现为属的特征, 即B亚基的变异正好反映出属间的变化。同属的鼠种其B亚基泳动度相同, 不同属的鼠种B亚基泳动度不同。A亚基的可变性比B亚基大, 它不仅反应属的特征, 更突出的是反映种的特征和种的变异。对于同属中不同种的鼠, A亚基的结构不同。LDH的A和B亚基的变异反映出物种进化等级的不同。这一规律能否在啮齿动物中广泛适用, 有待更多的分析结果来验证。可以相信, LDH不同亚基变异规律的比较, 对鼠科各种鼠生化系统分类学研究将是一个较有价值的手段。

SOD 同工酶在部分鼠种间出现明显的区别, 但未发现属的特征, 如家鼠属的社鼠 SOD 泳动速度与姬鼠属的小林姬鼠相同。但 SOD 同工酶本身的变异还是有鲜明的共同特点。首先, SOD 同工酶泳动度的改变, 总是3条酶带协同而变。当泳动速度快时, 3条酶带都快, 慢时都慢。其结果是主带, 次带和弱带的排列次序不因泳动度的改变而变。其次, SOD 同工酶泳动度改变的程度似乎有一定的规律可循。图版 I - A 中 SOD 同工酶的泳动度有3种类型。泳动最慢的是小林姬鼠和社鼠, 最快的是黑线姬鼠, 中等泳动速度的有黄毛鼠、褐家鼠、白腹巨鼠。它们的相互关系是: SOD 泳动慢的鼠种其微带与 SOD 泳动快的鼠种的主带处于同一泳动线上。每改变一种泳动速度, 相差的距离正好是主带和次带两者之和的距离, 图版 I - A 中 SOD 同工酶泳动最慢(小林姬鼠和社鼠)与最快(黑线姬鼠)之间的距离相当于上述距离的2倍, 即4条带的距离。这个现象与属间的区别并无联系, 而要解释它可能要从 SOD 二聚体结构中氨基酸取代部位和取代氨基酸的带电性质去探讨。

## 2 家鼠属4种鼠睾丸组织LDH的C亚基变异的比较

已知C亚基是LDH的第3亚基, 由C亚基聚合(4聚体)的带称LDH-X带。结果见图版 I - B。从4种鼠睾丸组织中LDH-X带的泳动度比较, 提出以下2点分析和讨论。

(1) LDH-X带分布的部位因鼠种的不同而异。黄毛鼠的LDH-X带位于自身的LDH-3和LDH-4之间, 社鼠和褐家鼠则位于自身的LDH-4和LDH-5之间, 白腹巨鼠的情况与黑线姬鼠相似, 其LDH-X带位于自身的LDH-5带以外(阴极侧)(周虞灿等, 1990)。这些结果说明它们的C亚基结构不同。LDH-X带如此不同的分布是随机呢, 还是反映一定的进化规律呢? 这很值得探讨。就本研究已分析的鼠种而论, LDH-X带的分布有一个演化过程, 可以从LDH-5以外, 进入到LDH-5以内, 再进入到LDH-4以内, 或者相反, 从LDH-4以内进入到LDH-4和LDH-5之间, 再进入到LDH-5以外。看来LDH-X分布的演化是物种进化水平的标志, 并非随机。若有其他不同进化水平的动物一起进行比较, 对于了解LDH-X带分布部位的演化方向是有益的。

(2) LDH-X带泳动度的比较。虽然各鼠的LDH-X带在自身的LDH同工酶带间的分布有上述种种不同, 但各鼠间LDH-X带的泳动度差异却不大。总的看, LDH-X带的泳动速度都比较慢。上述4种鼠除黄毛鼠的LDH-X带泳动略快外, 其它3种鼠LDH-X带不仅泳动慢, 而且泳动度相差也不大, 甚至黑线姬鼠的LDH-X带的泳动度也与此相当接近(周虞灿等, 1990), 这就不得不怀疑, LDH-X带在不同鼠种中分布部位的不同, 究竟是C亚基分子结构的改变而引起的, 还是由于A和B亚基分子结构改变, 引起LDH同工酶带之间的距离不同程度的增宽, 致使LDH-X带出现不同的分布部位, 或者是3个亚基同时变异的结果, 这有待更多的实验结果来解释。

对于LDH的A、B、C亚基和SOD同工酶泳动度表现出规律性改变的认识, 可以说是首次的。这只有系统分类学研究提供系统的比较才有可能观察到。以往对LDH同工酶的生化学, 比较生化学的研究以及有关学科的应用研究都已较为普遍和深入(Harris, 1980)。用于种属的比较也同样非常广泛。但大多数报道只限于几个种的比较, 比较的重点又放在组织特异性的异同上, 难于发现亚基之间规律性的演化。该酶用于生化系统学研究国外报道也不少见, 但系统分类学者感兴趣的只是位点的变和不变, 只作为一项生化指标而已。至于变的大小, 变的方向, 则是系统分类工作以外的事。我们选用鼠科动物首次进行生化系统分类学研究, 在分析每种蛋白质时, 首先也是着眼于该蛋白质位点的变和

不变, 异和同的取据。但同时也不放过该位点在不同种属中变化的特点, 变化的程序以及在种群中变异的趋向等有关现象的观察和总结。目的是为了了解各类蛋白质位点的变异规律, 筛选适用于鼠类系统分类的蛋白质种类, 避免盲目性。

3 生化特征配对分析

根据上述LDH 的A、B、C 亚基和SOD 的3条酶带的异同数据, 按 Peaceck (1981) 介绍的配对法 (pairwise) 比较其相似性程序, 结果见表1。表中黄胸鼠的材料取自己报道的资料 (周虞灿等, 1990)。可以初步认为, 黄毛鼠、褐家鼠和黄胸鼠三者亲缘上比较接近, 白腹巨鼠比同属的其余4种鼠在亲缘上略近于姬鼠属被分析的这2种鼠。

表1 生化性质相似性的配对比较

Table 1 Pairwise comparison on the similarity of biochemical character between species							
	小林姬鼠 <i>A. sylvaticus</i>	黑线姬鼠 <i>A. agrarius</i>	白腹巨鼠 <i>R. edwardsi</i>	社鼠 <i>R. niviventer</i>	褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	黄胸鼠 <i>R. flavipectus</i>	黄毛鼠 <i>R. rattoides</i>
小林姬鼠 <i>A. sylvaticus</i>	4	2	2	1	2	2	2
黑线姬鼠 <i>A. agrarius</i>			3	2	1	2	2
白腹巨鼠 <i>R. edwardsi</i>				3	3	4	4
社鼠 <i>R. niviventer</i>					3	3	3
褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>						4	4
黄胸鼠 <i>R. flavipectus</i>							5
黄毛鼠 <i>R. rattoides</i>							

参 考 文 献

周虞灿, 邵邻相, 何新霞 1990 三种鼠组织的SOD 和LDH 同工酶研究 兽类学报, 10 (4): 299~ 303

周虞灿, 何新霞, 邵邻相 1991 SOD 和LDH 在凝胶板上同时显色的方法 生物化学杂志, 7 (2): 201~ 205

Dayhoff M O, Park C M, Mclaughlin P J. 1972 Building a phylogenetic tree: cytochrome C. In: Dayhoff M O, editor: Atlas of protein sequence and structure (VOL. 5). National Biomedical Research Council, Washington, B C.

Fitch W M, Margoliash E. 1967. Construction of phylogenetic tree Science, 155: 279~ 284

Gutfreund H. 1981. Biochemical evolution London and New York: Cambridge University Press, 230~ 260

Harris H. 1980 The principles of human biochemical genetics Oxford, Amstrdam and New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 61~ 69.

Houseal T W, Greenbaum I F, Schmidly D J, Smith S A, Davis K M. 1987. Karyotypic variation of Peromyscus boylii from Mexico. Journal of Mammalogy, 68: 281~ 296

Nei M, Koehn R K. 1983 Evolution of genes and proteins Sunderland and Massachusetts: Sinauer Associates NC. 1~ 12, 62~ 88

Peacock D. 1981. Data handling for phylogenetic trees In: Gutfreund H, editor: Biochemical Evolution, London and New York: Cambridge University Press, 88~ 115.

Smith S A, Greenbaum I F, Schmidly D J, Davis K M, Houseal T W. 1989. Additional notes on karyotypic variation in the Peromyscus boylii species group. Journal of Mammalogy, 70: 603~ 607.

Sullivan J M, Kilpatrick C W, Rennett P D. 1991. Biochemical systematics of the Peromyscus boylii species group. Journal of Mammalogy, 72 (4): 669~ 680

# STUDIES ON VARIATION OF LACTATE DEHYDROGENASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE FOR SIX MURIDS

J N Xiaoling HE Xinxia ZHOU Yucan YANG Junqing YU L iqun

(Department of Biology, Zhejiang Normal University, Jinhua, 321004)

## Abstract

The four species of the genus *Rattus* were used as the ingroup and the two species of the genus *Apodemus* were used as the outgroup. The lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) of kidney and liver extract were examined. The obtained results showed that the variability of subunit B of LDH is different from subunit A in evolution. The former has characteristic of genus (*Rattus* or *Apodemus*), the latter has characteristic of the species. It is based on that the mobilities of subunit B (LDH) are the same among the four species in the *Rattus* group, or also the same between two species in the *Apodemus* group. However the former is faster than the latter. It is also based on that the migratory velocity of subunit A (LDH-5) are changed with the different species in the same genus (*Rattus* or *Apodemus*). The mobilities of subunit C (LDH-X) are also changed with species. For example, the LDH-X zone of *R. rattoides* is located between its LDH-3 and LDH-4, The ones of *R. niviventer* and *R. norvegicus* are located between its LDH-4 and LDH-5, the one of *R. edwardsi* is far from LDH-5 toward cathode.

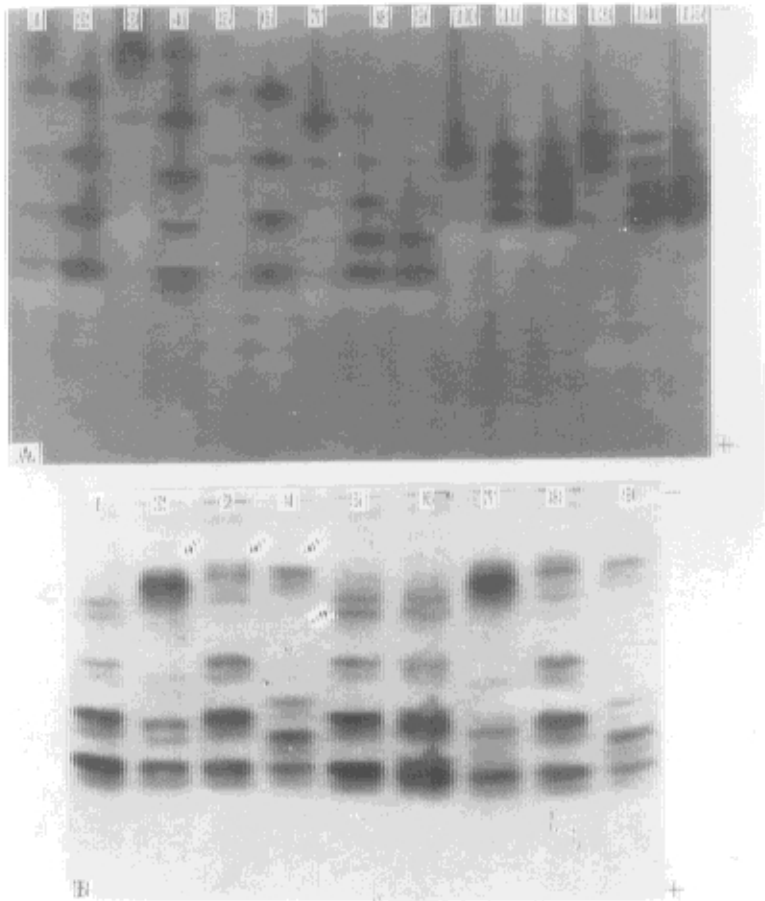
For each species there are three SOD zones that their mobilities are different from species to species. The migratory velocities of the three zones are changed coordinately.

The phenetic analysis of the biochemical data suggested that *R. rattoides* with *R. flavipectus* or with *R. norvegicus* are allied in systematics and that *R. edwardsi* is closer to *A. agrarius* than the other four species of *Rattus* group.

**Key words** Muridae; Biochemical systematics; Lactate dehydrogenase; Superoxide dismutase

J N Xiaoling et al: Studies on variation of lactate dehydrogenase and superoxide  
dismutase for six murids

Plate I



图版说明

- A. 家鼠属4种鼠和姬鼠属2种鼠组织LDH 和 SOD 电泳图谱  
1~ 2、3~ 4、5~ 6号分别为黄毛鼠、社鼠和褐家鼠的肝、肾组织; 7~ 9、10~ 12、13~ 15号分别为白腹巨鼠、小林姬鼠、黑线姬鼠的肝、肾、心组织
- B. 家鼠属4种鼠睾丸组织LDH-X 带电泳图谱  
1、5、6号为黄毛鼠; 2、7号为社鼠; 3、8号为褐家鼠; 4、9号为白腹巨鼠
- A. Electrophoretic comparison of LDH and SOD in the tissues of liver and kidney between four species (*Rattus*) and two species (*Apodemus*)  
No. 1~ 2, 3~ 4 and 5~ 6 are from liver and kidney of *R. rattoides*, *R. niviventer* and *R. norvegicus*; No. 7~ 9, 10~ 12 and 13~ 15 are from liver, kidney and heart of *R. edwardsi*, *A. sylvaticus* and *A. agrarius*, respectively.
- B. Electrophoretic comparison of LDH-X in the tissues of testis among four species (*Rattus*).  
No. 1, 5 and 6 are *R. rattoides*; No. 2 and 7 are *R. niviventer*; No. 3 and 8 are *R. norvegicus*; No. 4 and 9 are *R. edwardsi*