

华南兔组织乳酸脱氢酶同工酶的研究

周虞灿 姜科声

(浙江师范大学生物系)

摘 要

本文以聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析华南兔 (*Lepus sinensis sinensis*) 11种组织乳酸脱氢酶同工酶分布特征。分析结果: 骨骼肌和肝组织 5 条同工酶带俱全; 脑、肺、卵巢和盲肠等组织各含有 4 条谱带 (LDH-1, -2, -3和-4); 胃和肾组织含有 3 条谱带 (LDH-1, -2, 和-3); 眼晶状体和睾丸组织也含有 3 条谱带, 但前者是LDH-3, -4和-5, 后者是LDH-1, -2和-5; 谱带最少的是心肌组织, 只有 2 条 (LDH-1和-2)。此外, 还对各组织中的亚基活性分布及电泳图谱特征进行了分析。

关键词 (Key words): 华南兔 (South China hare, *Lepus sinensis*), 组织 (Tissue), 乳酸脱氢酶同工酶变种 (Lactate dehydrogenase isozyme variant), 凝胶电泳法 (Gel electrophoresis)。

研究野兔的遗传进化, 对揭示中国野兔相互间的亲缘关系有着深刻的理论意义。以往从形态解剖、生理结构、生活习性等方面已有较深入的研究, 积累了丰富的有价值的资料。近年来血液型分析法, 蛋白质多态研究法, 作为分子分类和遗传进化的研究技术已显示其重要价值, 得到广泛的应用。

由于取材方便, 本文对浙江金华地区捕获的华南兔 (*Lepus sinensis*), 以聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 比较分析脑、心肌、骨骼肌、肝、肺、胃、肾、卵巢 (♀)、睾丸 (♂)、眼晶状体以及盲肠等 11 种组织的乳酸脱氢酶同工酶的组织分布特异性。

材料和方法

1. 动物来源 华南兔 6 只, 捕自金华附近丘陵地带, 成体, 2 公斤左右。

2. 组织液的提取 动物经麻醉放血后, 每只兔取脑 (右侧大脑皮层)、心肌 (左心尖区)、骨骼肌 (胸大肌)、肝 (左叶外缘) 肺 (右上叶)、胃 (幽门括约肌)、肾 (右肾皮质)、左侧卵巢 (雌性个体)、右侧睾丸 (雄性个体), 眼晶状体 (左眼) 及盲肠 (肠壁肌肉) 等组织。各组织均用冷生理盐水洗血污, 再用滤纸擦干后称取 0.1 克, 置于玻璃匀浆器内, 加入 pH7.0 的冷磷酸盐缓冲液 5 毫升, 冷却后制成匀浆, 离心半小时后, 取上清液置冰箱备用。

3. 电泳 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 基本方法参照作者以前的工作 (周虞灿等, 1984)。凝胶浓度 7%, 凝胶管直径 0.5 厘米, 管长 8 厘米。电极缓冲液为 pH8.3 的 0.005 摩每升 Tris-0.03 摩每升甘氨酸溶液。每管加样 40 微升 (加样液: 40% 蔗糖溶液, 0.5% 溴酚蓝溶液, 组织上清液, 按 1:1:3 配制)。电泳在冰浴冷却下进行, 控制电压

在200—300伏之间，每管电流4毫安，约1个半小时左右。

4. 染色 剥离的胶条在LDH染色液中于37℃下避光保温1小时。染色液配方参照刘国富等(1985)和Gabriel(1971)的报道略加改变，以碘代硝基四唑盐(INT)代替硝基蓝四唑盐(NBT)，所得同工酶区带为鲜红色。

所用试剂除尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)为Boehringer公司产品、丙烯酰胺和双丙烯酰胺为LKB公司产品、INT为Aldrich公司产品外，其余均为国产分析纯或化学纯制品。电泳仪为北京生化仪器厂产品，DY-W₂型。电泳槽，北京六一仪器厂。

实验结果

1. 华南兔11种组织LDH同工酶分布见图1。5种同工酶俱全的只有骨骼肌和肝两种组织；含4种同工酶的有脑、肺、卵巢(♀)和盲肠等4种组织；含3种同工酶的胃、肾、睾丸(♂)和眼晶状体等4种组织；心肌只有2条区带。按LDH亚基活性分布的情况，则脑、心、肺、胃、肾以及卵巢(♀)等组织以含H亚基为主，其中以心肌H含亚基活性最强；以M亚基占优势的有骨骼肌和眼晶状体两种组织，当然骨骼肌含M亚基活性也最强；肝组织同工酶中，H和M的活性近于同等。

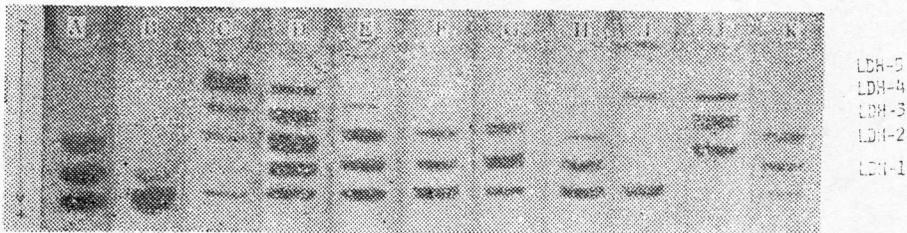


图1 华南兔11种组织LDH同工酶分布图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of LDH isozymes for eleven tissues in South China hare, A. 脑 Brain; B. 心肌 Heart; C. 骨骼肌 Muscle; D. 肝 Liver; E. 肺 Lung; F. 胃 Stomach; G. 肾 Kidney; H. 卵巢 Ovary; I. 睾丸 Testis; J. 眼晶状体 Lens; K. 盲肠 Caecum.

2. 雄性个体，睾丸组织LDH-4带的泳动率不同于其他组织，它界于正常的LDH-4和LDH-5之间。另外，因缺少LDH-3和LDH-4带，从而出现明显的不连续分布图谱。

3. 出现LDH同工酶的变种。胃和卵巢的LDH-1和LDH-2、肾的LDH-2和LDH-3等3种组织的6条区带内可清楚地存在2条亚带。

讨论

野兔种类较多，分布广泛，但对野兔组织和血液中酶蛋白和非酶蛋白的分析研究尚不多见。早期，Plageman及其同事(1960)，Stambaugh等(1966)对兔组织LDH同工酶作过许多研究，但被研究的动物是家兔，不是野兔。

我们分析华南兔是由于取材方便，因为浙江境内分布的野兔属华南兔(*Lepus sinensis sinensis* Gray)(诸葛阳,1982)。

华南兔LDH同工酶组织分布特异性以及H、M亚基活性分配规律，如结果所述，除作为资料外，并无更多值得讨论之处，因为没有相比较的参比动物(如另一种野兔)或参比因素(如不同的生理条件)。

在此需要重复的是，华南兔的睾丸组织LDH同工酶分布与其他被分析的10种组织不

同,即出现不连续分布的图谱。

关于睾丸组织 LDH 同工酶分布的特殊性早有报道,并为人们所关注。Bianco 等(1963)、Goldberg(1977)、Edwards等(1977)曾从人的睾丸或精子中发现不同于H和M亚基的C亚基,由它组成的C₄LDH同工酶称为X带,位于LDH-3和LDH-4之间。我们对雄性成体华南兔分析的结果,睾丸组织 LDH 同工酶谱未发现新带,而是在LDH-3和LDH-4处出现缺失。这种异常现象的含义尚不清楚,但很可能是与睾丸组织特殊功能有关。专门研究不同动物睾丸(或精子)组织或同一动物不同发育阶段的睾丸组织LDH同工酶的分布将是饶有兴趣的。

华南兔组织LDH同工酶的另一特点是出现亚带。所分析的11种组织中有3种组织(胃、肾、卵巢)的6条LDH带内各存在2条亚带(图1)。对亚带的出现目前有两种解释,其一认为是乳酸脱氢酶亚基位点发生突变,出现等位基因所致(Harris,1980)。在本世纪60年代,Nance及其同事(1963),Boyer等(1963),Kraus等(1964)都先后从人的红细胞分析中发现LDH同工酶亚带,其亚带的数目有3条、4条,但常见的是2条。他们就是用LDH同工酶亚基的变种来解释其结果。根据这个解释,如果H亚基出现变种H*,则正常亚基H和变种亚基H*在与M亚基的随机组合中(每分子同工酶由4个亚基组成),则LDH-1,LDH-2,LDH-3,LDH-4的亚带数理论上应分别为5,4,3,2;而LDH-5因是M亚基的纯合体,所以不出现亚带。同理,若M亚基出现变种的M*,则LDH-2,LDH-3,LDH-4,LDH-5的亚带数理论上应是2,3,4,5;此时,LDH-1因M是H亚基的纯合体,不出现亚带(Harris,1980)。因此,根据LDH-1或LDH-5带是否出现亚带可以判断究竟是那个亚基发生突变。从我们的结果可见,胃组织和卵巢组织的LDH-1存在亚带。可以认为华南兔这2个组织中LDH同工酶的H亚基出现变种。而肾组织的亚带出现在LDH-2和LDH-3中,则难以判断是那个亚基出现变种。既然华南兔的胃和卵巢组织的H亚基出现变种H*,则LDH-1和LDH-2带的亚带数理论上应是5条和4条,而实际上,它们都只有2条。关于亚带数实际值与理论值不符的情况,我们曾在另一篇文章中试图作过解释(周虞灿等,1987)本文不再重复。关于出现亚带的另一种解释,认为是Ldh基因产物转录或翻译后进行修饰的结果(金昊等,1985;Yamamura,1979;Alahiotis,1983)。可见LDH同工酶出现亚带的本质可能是复杂的,有待科学实验的进一步探索。

参 考 文 献

- 刘国富、温得启、胡晓梅 1985 高原鼠兔和高原鼯鼠乳酸脱氢酶同工酶的初步研究。兽类学报5(3):223—227。
金昊、吴鹤龄 1985 乳酸脱氢酶同工酶基因在冬眠黄鼠中的表达。遗传学报12(4):295—301。
周虞灿,姜科声 1987 Lactate dehydrogenase variant from rabbit tissues. In "Abstracts: International meeting on biochemistry" pp 116, Beijing, China。
周虞灿、胡晓梅 1984 野生小家鼠与实验小白鼠杂交代代的血红蛋白电泳分析。兽类学报4(1):53—61。
诸葛阳 1982 浙江省兽类区系及地理分布。兽类学报2(2):157—166。
Alahiotis, S.N.A., Onoufriou, M., Fotaki and M. Pelecanos 1983 Drosophila lactate dehydrogenase, developmental aspects. *Biochem. Genet.* 21:199—211。
Bianco, A. and W.H. Zinkham 1963 Lactate dehydrogenase in human Testes *Science* 139:601—602
Boyer, S.H. and D.C. Fainer 1963 Lactate dehydrogenase variant from human blood: evidence for molecular subunits. *Science* 141:642—643。
Edwards, Y.H. and D.A. Hopkinson 1977 Developmental changes in the electrophoretic patterns of human enzymes and other proteins. In: "Isozymes" M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, eds., pp19—78, Alan Liss, New York。
Gabriel, O. 1971 Locating enzymes on gels. In "Methods in enzymology", Vol.22, W.B. Jakoby, ed., pp578—604, Academic Press, New York.

- Goldberg, E., 1977 Isozymes in testes and sperm. In: 'Isozymes', M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, eds., vol. I, 80—125, Alan Liss, New York.
- Harris, H., 1980 The principles of human Biochemical genetics. 61—69, Elsevier/North-Holland Biochemical Press.
- Kraus, A.P. and C.L. Neely 1964 Human erythrocyte lactate dehydrogenase: four genetically determined variants. *Science* 145:595—597.
- Nance, W.E., A. Claflin and O. Smithies 1963 Lactate dehydrogenase: genetic control in man. *Science* 142: 1075—1077.
- Plagemann, P.G. W., K. F. Gregor and F. Wroblewski 1960 The electrophoretically distinct forms of mammalian lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 235(8):2282—2287.
- Stambaugh, R. and D. Post 1966 Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase heart (H₄) and muscle (M₄) isozymes. *J. Biol. Chem.* 241(7):1462—1467.
- Yamamura, K. I. 1979 Epigenetic formation of lactate dehydrogenase isozymes in the house, *Mus musculus* *J. Exp. Zool.* 208:271—230.

(Abstract)

STUDIES ON LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYME OF TISSUES FROM SOUTH CHINA HARE, *LEPUS SINENSIS*

ZHOU Yucan

JIANG Kesheng

(Department of Biology, Zhejiang Normal University, Jinhua)

This paper deals with the tissue specificity of lactate dehydrogenase isozyme in South China hare. Eleven tissue LDH isozymes have been analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. It has been found from results that there are five zones in tissues of muscle and liver; four zones (LDH-1, -2, -3 and -4) in the brain, lung, ovary and caecum; three in the stomach, kidney, eye and testis; and two (LDH-1 and LDH-2) in the heart. However, certain general correlation have been noted, M subunits have the preponderance in tissues of muscle and lens while H subunits in tissues of heart, brain, lung, stomach, kidney, ovary and caecum, and both M and H subunits, come close to equality in tissues of liver. The electrophoretic variants of LDH isozymes in tissues of South China hare are found. The sub-bands appeared within six LDH isozyme zones of three tissues (stomach, kidney and ovary).