

中国石龙子的同工酶

贾守菊 张永普 陈艳乐 金爱红 郑雪娇 江为鹏

(温州师范学院生物与环境科学系 温州 325027)

摘要: 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,对浙江温州和福建宁德中国石龙子(*Eumeces chinensis*)两个地理种群的皮肤、肌肉、胃、小肠、肝脏、肺、肾、心脏、性腺等9种组织中的乳酸脱氢酶、过氧化物酶和醇脱氢酶同工酶进行了研究。结果表明,中国石龙子两种群的同工酶电泳结果具有明显的地理种群特异性,且9种不同组织中的同工酶谱亦表现出组织特异性。

关键词: 同工酶;中国石龙子

中图分类号: Q959.6; Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)05-22-06

Comparative Studies on Isozymes of *Eumeces chinensis*

JIA Shou-Ju ZHANG Yong-Pu CHEN Yan-Le JIN Ai-Hong

ZHENG Xue-Jiao JIANG Wei-Peng

(Department of Biological and Environmental Sciences, Wenzhou Normal College Wenzhou 325027, China)

Abstract: By using the polyacrylamide gel electrophoresis, three isozymes, LDH, POD and ADH from skin, muscle, stomach, intestine, liver, lungs, kidney, heart and sex gland, the nine tissues and organs of *Eumeces chinensis* collected from Ruian, Zhejiang Province and Ningde, Fujian Province were studied. The results showed that the two different geographical populations and the nine tissues had different and distinct isozyme patterns.

Key words: Isozymes; *Eumeces chinensis*

同工酶技术,作为在分子水平上研究生命现象的重要手段之一,在遗传学、分类学、发育生物学等学科中得到了日益广泛的应用。由于同工酶在其分布上具有组织特异性和种属特异性,因而作为基因表达的产物和标志。遗传稳定的生物个体在一定条件下同一组织的同工酶谱是相对稳定的,而不同种属或不同组织的同工酶谱,则可有明显的种属特异性和组织特异性,所以同工酶谱的特异性可作为阐明生物种属间亲缘演化关系的辅助手段之一。通过同工酶分析,可以了解生物个体对环境变化的适应及不同种群遗传变异的情况。

同工酶在对爬行类的研究中已有较多的报道^[1-5],但目前尚未见同一物种不同种群的同

工酶分析。本研究的目的在于研究中国石龙子(*Eumeces chinensis*)不同种群和同一种群的不同组织同工酶的差异,并探讨它们之间遗传分化的程度。

1 材料与方法

1.1 实验材料 材料于2000年4月中旬采于浙江温州和福建宁德,材料均为雄性成体(SVL ≥ 100 mm)。

1.2 样品制备 活体经形态学测量后,解剖取

第一作者介绍 贾守菊,45岁,女,学士,讲师;主要从事酶学研究。

收稿日期:2001-07-03,修回日期:2002-03-25

出皮肤、肌肉、胃、小肠、肝脏、肺、肾、心脏、性腺等9种组织进行匀浆。匀浆缓冲液比例:皮肤、肌肉为1:3(重量/体积),其余7种组织均为1:5(重量/体积)。缓冲液组成:乳酸脱氢酶(LDH):0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4),过氧化物酶(POD):0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),醇脱氢酶(ADH):0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)。冰浴匀浆后于4℃以下离心40 min,转速10 000 r/min。取上清液于-40℃冰箱中保存备用。

1.3 电泳 采用垂直板聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳法进行同工酶分析。凝胶厚度:3 mm,点样量:LDH:20 μ l, POD:30 μ l, ADH:45 μ l。分离胶浓度均为7.5%,分离胶缓冲液为Tris-HCl缓冲液,pH 8.8;浓缩胶:LDH、POD同工酶为2.5%,ADH同工酶为4%,浓缩胶缓冲液:Tris-HCl缓冲液,pH 6.8;电极缓冲液为Tris-Gly系统(pH 8.3)。使用DYY-III-8B稳流稳压电泳仪进行电泳,样品在浓缩胶中稳定电流,每个样品槽1 mA,在分离胶中稳定电流,每个样品槽3 mA,于4℃下电泳至示踪指示剂溴酚蓝至凝胶末端约1 cm处止。

1.4 染色 各同工酶染色方法参照胡能书^[6]方法。染色后的凝胶用重蒸水洗涤后,保存在乙醇凝胶洗涤液中(乙醇:乙酸:甘油:水=5:2:1:4)。

1.5 结果记录与分析 染色后的凝胶立即拍照,绘图并计算相对迁移率。

2 结果与分析

2.1 LDH 同工酶 由图1、表1可知,中国石龙子两种群的皮肤、胃、肾的酶谱带数均为4条,迁移率相同。谱带着色深浅不同,说明酶活性不同:LDH₁活性在皮肤、肾中温州种群比宁德种群弱,而在胃中LDH₁的活性则相反;LDH₂在这三种组织中均缺失或是活性极弱;LDH₃~LDH₅的活性均为温州种群大于宁德种群。

肌肉、小肠、肝脏中LDH同工酶谱带数均超过5条,除肝脏中宁德种群有8条谱带外,其余均为7条谱带,且迁移率相同。宁德种群在

肝脏中具LDH₂,且活性较强,温州种群在肝脏中无LDH₂活性或活性极弱,中国石龙子两种群的肌肉及小肠中LDH₂也均缺失或活性极弱;肝脏中,LDH₁、LDH₆~LDH₈酶活性温州种群比宁德种群低,LDH₃~LDH₅谱带着色两者十分相似,小肠中,温州种群除LDH₆~LDH₈酶活性比宁德种群稍低外,LDH₁、LDH₃~LDH₅酶活性均为温州种群大于宁德种群;肌肉中,温州种群的LDH₁酶活性比宁德种群强,LDH₃~LDH₈在中国石龙子两种群中酶的活性十分相似。

肺:中国石龙子两种群LDH同工酶谱带数不同,温州种群有4条谱带,宁德种群有6条谱带。两种群LDH₁、LDH₃~LDH₅谱带迁移率相同,这几种同工酶活性均是温州种群大于宁德种群;LDH₂谱带在两种群中均缺失或酶活性极弱;温州种群缺LDH₆、LDH₈,表明这两种同工酶在温州种群中无或活性极弱,宁德种群中这两种同工酶有分布,但从其谱带着色较浅可知酶活性是较弱的。

心:两种群中国石龙子LDH同工酶谱带数均为5条,且迁移率相同。谱带着色除LDH₃温州种群比宁德种群深外,其余同工酶温州种群均比宁德种群强。

性腺:谱带数温州种群5条,宁德种群4条,宁德种群中缺失LDH₂,温州种群中虽有LDH₂,但酶活性较弱;其余谱带迁移率相同,酶活性温州种群均稍高于宁德种群。

图1表明,除个别组织的个别谱带外,中国石龙子两种群的LDH同工酶谱未见明显差异。但在不同种群的同一组织中,LDH同工酶的活性有所差异。一般,LDH同工酶活性浙江温州种群普遍要高于福建宁德种群,说明同一物种不同种群的中国石龙子具有一定的种群地理特异性。

中国石龙子两种群在各组织中均具有LDH₁、LDH₃~LDH₅谱带,LDH₂在一些组织中活性不强或缺失;在肝脏等组织,LDH₃活性相对较强,LDH₁则在心脏中活性最强。

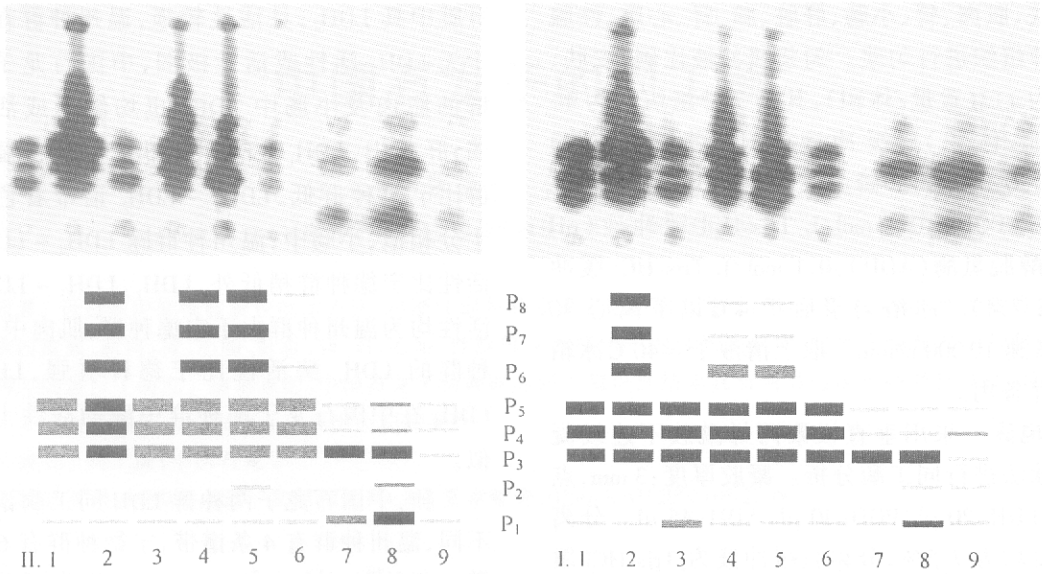


图1 两种群中国石龙子各组织中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶谱比较

I. 浙江温州中国石龙子; II. 福建宁德中国石龙子

1. 皮肤; 2. 肌肉; 3. 胃; 4. 小肠; 5. 肝脏; 6. 肺; 7. 肾; 8. 心脏; 9. 性腺

(注: P₁ ~ P₈ 表示从正极到负极的酶带; 序号表示方法, 下同)

表1 LDH 同工酶电泳谱带迁移率

	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
1 I	0.452		0.415	0.397	0.389			
II	0.452		0.415	0.397	0.389			
2 I	0.452		0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
II	0.452		0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
3 I	0.452		0.415	0.397	0.389			
II	0.452		0.415	0.397	0.389			
4 I	0.452		0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
II	0.452		0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
5 I	0.452		0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
II	0.452	0.430	0.415	0.397	0.389	0.357	0.349	0.332
6 I	0.452		0.415	0.397	0.379			
II	0.452		0.415	0.397	0.379	0.357		0.332
7 I	0.462		0.416	0.400	0.378			
II	0.462		0.416	0.400	0.378			
8 I	0.462	0.438	0.416	0.400	0.378			
II	0.462	0.440	0.438	0.416	0.378			
9 I	0.462	0.438	0.416	0.400	0.378			
II	0.462		0.438	0.416	0.378			

2.2 POD 同工酶 通过对中国石龙子两种群不同组织的 POD 同工酶电泳, 发现 POD 同工酶谱的分布呈现组织特异性(表 2)。在不同的组织中, POD 同工酶的谱带数不同: 胃、小肠、肾、性腺等四组织, 只具 1 条谱带(P₁ 带); 皮肤具 2

条谱带(P₁、P₅ 带); 肝脏具 3 条谱带(P₁、P₉、P₁₁ 带); 肌肉具 4 条或 5 条谱带(P₁、P₃ ~ P₅ 或 P₁、P₄ ~ P₇ 带); 肺具 4 条谱带(P₁、P₇、P₈、P₁₀ 带); 心脏具 7 条谱带(P₁ ~ P₅、P₆、P₇ 或 P₇、P₈ 带)。由表 2 可知: P₁ 带为各组织所共有; P₉、P₁₁ 带为肝脏特有; P₂ 带为心脏特有; P₁₀ 带为肺特有。在一定组织中所特有的谱带, 在其它组织中均不显示酶活(或活性极弱), 比较之下, 肌肉、心脏、肝脏及肺中 POD 同工酶的活性较强, 皮肤、胃、小肠、肾、性腺等组织中的相对较弱, 说明在中国石龙子中, POD 同工酶的分布存在着组织特异性。

另外, 由表 2 可知, 中国石龙子两种群的各个对应的组织中, 除了个别组织中的个别谱带外, POD 同工酶谱带数大致相同, 迁移率及酶活性也大致相同。例如: 中国石龙子两种群在皮肤均具 P₁、P₅ POD 同工酶谱带, 酶活性均为 P₁ > P₅; 肌肉均具 P₁、P₄、P₅ 谱带, 酶活性均为 P₅ > P₁ > P₄; 胃、小肠、肾、性腺只表达 P₁ 带; 心脏均具 P₁ ~ P₅、P₇ 带, 酶活性表现均为: P₅ > P₄ > P₁ > P₇ > P₃ > P₂; 肝脏均具 P₁、P₉、P₁₁ 带, 酶活性

均为 $P_{11} > P_1 > P_9$; 肺均具 P_1 、 P_7 、 P_8 、 P_{10} 带, 酶活性均为 $P_1 > P_7 > P_8 > P_{10}$, 这一结果表明中国石龙子两种群的 POD 同工酶差异不显著。

从表 2 可知, 肌肉中, 温州种群具 P_3 谱带而无 P_6 、 P_7 谱带, 宁德种群则相反; 心脏中, 温

州种群具 P_9 带而无 P_6 带, 宁德种群则具 P_6 带而无 P_9 带; 另外, 从谱带着色深浅的不同可知, 中国石龙子两种群同一组织中相应的 POD 同工酶活性有差异, 这一结果表明不同种群的中国石龙子之间存在着种群的地理特异性。

表 2 POD 同工酶电泳谱带迁移率

		P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6	P_7	P_8	P_9	P_{10}	P_{11}
1	I	0.6937				0.5480						
	II	0.7085				0.5535						
2	I	0.6937		0.6008	0.5754	0.5480						
	II	0.7085			0.5717	0.5535	0.5299	0.4379				
3	I	0.6937										
	II	0.7085										
4	I	0.6937	0.6566	0.6055	0.5754	0.5480		0.4333		0.3909		
	II	0.7085	0.6636	0.6175	0.5800	0.5535	0.5291	0.4414				
5	I	0.6950										
	II	0.6965										
6	I	0.6950								0.3782		0.3526
	II	0.6965								0.3951		0.3653
7	I	0.6950						0.4278	0.3953		0.3658	
	II	0.6965						0.4391	0.4111		0.3817	
8	I	0.6950										
	II	0.6965										
9	I	0.6950										
	II	0.6965										

2.3 ADH 同工酶 中国石龙子 ADH 同工酶的电泳结果见表 3, 既有明显的组织特异性, 也有一定的地理种群特异性。对比各组织 ADH 同工酶活性, 中国石龙子两种群中, 均以肝组织中的 ADH 同工酶活性最高; 心脏及小肠中 ADH 同工酶活性相对也较高; 肾脏中 ADH 同工酶从

酶谱上未能表现出来; 其余各组织中 ADH 同工酶活性相对都较弱。即 ADH 同工酶在一些组织中未见酶带(肾); 在一些组织中具 1 条酶带(性腺); 在一些组织中具 2 条酶带(胃、心脏、小肠); 在一些组织中具 3 条或 4 条酶带(肝脏)。

表 3 ADH 同工酶电泳谱带迁移率

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
P_1	I				0.4179			0.4307		
	II							0.4261		
P_2	I	0.3109	0.3109	0.3109	0.3174	0.3175		0.3441	0.3464	0.3430
	II	0.3171	0.3209	0.3191	0.3214	0.3203		0.3436	0.3516	0.3546
P_3	I	0.2829	0.2832	0.2858	0.2846	0.2847				0.3107
	II				0.2846	0.2858				0.3185
P_4	I	0.2532			0.2533					
	II				0.2531					

除肌肉、皮肤、肺外, 中国石龙子两种群相应组织中的酶带数、迁移率大致相同; 酶活性差

别不大。ADH 同工酶以宁德种群活性较高。另外, 温州种群的肌肉、皮肤、肺只有 1 条酶带,

且酶活性极弱,而宁德种群的肌肉中有 3 条酶带,酶带清晰,酶活性相当高,皮肤和肺中均有 2 条酶带,酶带同样清晰,酶活性相对也较高;肝脏中温州种群的 ADH 同工酶谱带数为 3 条, P_1 带着色较浅,而宁德种群有 4 条酶带, $P_2 \sim P_4$ 带均十分清晰,着色深, P_1 带着色虽浅,但酶带清晰,在这四组织中,中国石龙子 ADH 同工酶的种群特异性较大,其余组织 ADH 同工酶未见明显的种群特异性。

3 讨 论

3.1 LDH 同工酶 LDH 是参与机体能量代谢的十分重要的酶。LDH 同工酶催化乳酸与丙酮酸之间的氧化还原反应。通常认为:LDH 同工酶是由两个座位(Ldh-A、Ldh-B)编码的四聚体。一般由 Ldh-B 编码的 B 亚基的主要功能是催化乳酸脱氢,在心肌中含量较丰富,而由 Ldh-A 编码的 A 亚基,主要功能是催化丙酮酸还原,在缺氧型的组织中例如肝脏中含量较高。不同组织器官的主要生理功能不同,所以含 A 亚基和 B 亚基的比例就有不同,这就造成 LDH 同工酶的组织特异性。从上述结果可以看出,中国石龙子两个种群的心肌及肝脏中,LDH₁ 含量较高,活性较强,而其它组织 LDH₁ 的活性一般都较弱;相反,肝脏、肌肉、小肠等组织,LDH₅ 的活性较强,这一结果与其它爬行动物(丽斑麻蜥 *Eremias argus*; 山地麻蜥 *Bremias brenchleyi*; 北草蜥 *Takydromus septentrionalis*; 白条草蜥 *Takydromus wolteri*; 多疣壁虎 *Gekko japonicus*; 无蹼壁虎 *Gekko swinhonis*; 宁波滑蜥指名亚种 *Scincella modesta modesta*) LDH 同工酶电泳结果相符^[2]。LDH₂ 除了在心脏中有弱的活性外,在其它组织中基本缺失,此结果与早期 Shaklee^[7] 有关鱼的研究结果及冯照军等人的有关 7 种蜥蜴的研究结果有相似之处,不同之处为 LDH₄ 在多数组织中都有较强表达,但此结果却与李新宏^[3] 的结果相同,这可能与中国石龙子的生态环境、生活习性及细胞代谢特异性有关。此外,在肌肉、小肠及肝脏等组织,有亚带^[8] 出现。亚带是由

于亚基翻译后修饰造成的^[9];各种动物肝组织 LDH 同工酶的分布与该动物的食性、行为有关,亚带的出现,使 LDH 同工酶对糖代谢的调控更加精细准确^[10]。中国石龙子一些组织中有亚带出现,表明中国石龙子与蛇类^[5] 相似,已比较适应陆地环境,在食性等方面也已有较多的进化。中国石龙子两种群的电泳图谱,除个别组织的个别谱带外,是较为相似的,但在酶活性上有所差异,这说明两种群中国石龙子有一定的种群特异性。

3.2 POD 同工酶 POD 广泛存在于动物、植物及微生物中,是生物体重要的酶类之一。POD 可利用 H₂O₂ 作为氧化供氢体,参与多种生理生化反应。POD 同工酶是由复等位基因编码的酶系,可能有 Pod-A、Pod-B、Pod-C 三个基因座位^[11]。徐丽珊^[12] 曾对蚯蚓进行过 POD 同工酶研究,结果为 POD 同工酶显色不明显,酶活性不高;李亚南对草鱼的一些免疫组织器官进行过类似的研究,结果仅在草鱼的前肾发现有一条酶谱带。然而在中国石龙子中,除在小肠、肾及性腺 POD 同工酶较少表达外,在其它组织中都有较多的表达,尤其在肌肉、心脏、肺等组织,酶活性比较高,POD 同工酶谱带数也多,可否说明这些组织代谢较活跃,能产生较多的活性氧,POD 同工酶形式的多样性是为了机体能更好地清除 H₂O₂ 毒害,这可能是中国石龙子在进化过程中所产生的保护自身的措施之一。此外,通过 POD 同工酶图谱同样可以看出,中国石龙子 POD 同工酶具有明显的组织特异性,不同组织 POD 同工酶的分布及酶活性都各不相同;中国石龙子两种群之间存在着一定的地理种群特异性。

3.3 ADH 同工酶 ADH 是一种二聚体酶,该酶由两个基因座位(Adh-1 和 Adh-2)编码^[6]。在本研究中,ADH 同工酶具比较明显的组织特异性。就酶活性而言,ADH 同工酶在肝脏中活性最高,这与傅必谦^[13] 等人的有关社鼠研究的结果是相一致的。ADH 同工酶在肾中几乎不表达,在其它组织中,ADH 同工酶一般都有表达,但酶活性高低不等;就中国石龙子两个种群

ADH同工酶而言,在一些组织中有较明显的种群特异性,但在多数组织中,种群特异性不明显。至于ADH同工酶在肝脏中活性最高的生理意义,可能与肝组织的解毒功能密切相关^[14-16],也可能与一定强度的无氧酵解机能相关^[11],目前关于ADH同工酶在动物体内存在的生理意义尚无定论。

综上所述,通过对中国石龙子两个种群LDH同工酶、POD同工酶、ADH同工酶分析,3种同工酶在中国石龙子不同组织器官中的分布,都具明显的特异性,浙江温州与福建宁德的中国石龙子种群之间既具有共同的酶谱特征,又具有一定的种群特异性,表明种群之间也有一定程度的遗传分化。

参 考 文 献

- [1] 龚大洁,周开亚. 同工酶及其在爬行动物系统中的应用. 西北师范大学学报(自然科学版), 1999, 35(1): 111 ~ 116.
- [2] 冯照军,杨克合,季丽萍等. 七种蜥蜴几种组织中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的比较研究. 两栖爬行动物学研究, 1995, 第4, 5辑. 245 ~ 251.
- [3] 李新宏,赵文阁. 黑龙江省七种蛇乳酸脱氢酶和酯酶同工酶比较研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1998, 14(1): 64 ~ 70.
- [4] 沈建伟,陆佩洪,陈宜峰. 壁虎属三种壁虎几种组织中LDH同工酶的比较. 南京师大学报(自然科学版), 1996, 19(4): 45 ~ 51.
- [5] 聂刘旺,郭超文,吴孝兵. 游蛇科五种蛇四种组织LDH同工酶凝胶电泳的分析. 动物学研究, 1995, 16(1): 31 ~ 36.
- [6] 胡能书,万国贤. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.
- [7] Shaklee J B. Developmental and biochemical genetic of lactate dehydrogenase isozymes in fish. In: Markert C L, Isozyme I eds. Molecular Structure. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 101.
- [8] 禹邦超,刘德立. 应用酶学导论. 武汉: 华中师范大学出版社, 1995.
- [9] Klose T. The research of LDH isozyme of tissues in mice. *Biochem Genet*, 1975, 13: 707.
- [10] Fine. Developmental changes of mammalian LDH. *Biochemistry*, 1963, 2 116 ~ 2 118.
- [11] 李亚南. 草鱼免疫器官和血液的六种同工酶生化与遗传特性分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(4): 389 ~ 393.
- [12] 徐丽珊,包松芳. 三种蚯蚓不同部分的五种同工酶的比较分析. 浙江师大学报(自然科学版), 2000, 23(1): 57 ~ 59.
- [13] 傅必谦,袁虹,张可心等. 社鼠组织器官同工酶的研究. 兽类学报, 1997, 17(2): 141 ~ 145.
- [14] Krebs H A, Perkins J R. The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem J*, 1970, 118: 635 ~ 644.
- [15] Pietruszko K. Heterogeneity, polymorphism, and substrate specificity of alcohol dehydrogenase from horse liver. In: Markert C L ed. Isozyme Molecular Structure. New York: Academic Press, 1975. 707 ~ 724.
- [16] Basaglia F. Interspecific gene differences and phylogeny of the Sparidae family (perciformes, teleostei), estimated from electrophoretic data on enzymatic tissue expression. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99B: 495 ~ 508.