

异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在小鼠胚胎发育中的变化*

王方元

(四川大学生物工程系)

摘要 本文采用淀粉凝胶电泳对异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在小鼠发育中的改变进行了研究, 结果证明肝脏中 IDH 的改变很有代表性。妊娠 10 天胚胎、出生前一天胎鼠和出生后一天胎鼠之间 IDH 的带有明显变化, 可作为小鼠不同发育时期有关基因表达的指标。

Markert 等^[1]对乳酸脱氢酶 (LDH) 在小鼠胚胎发育中的变化进行过出色的研究。他指出“在胚胎组织中同功酶分布的图象与成体不同。大多数胚胎组织最初主要含有 LDH₃; 随着发育的进行, LDH 活性逐渐向 LDH₁ 移动。”Markert 等人的工作奠定了借助于同功酶活性的变化来探索发育中基因表达的基础。以后, Donahue^[2]和 Epstein 等^[4]对异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在小鼠胚胎发育中的变化曾作过研究, 接着 Engel^[3]报道了小鼠发育中线粒体酶合成的开始时间。Felder^[2]对小鼠同功酶的生化 and 发生遗传学作了专文评述。本文对不同小鼠品系中 IDH 的组织分布和发育中的变化全过程进行了研究, 有别于前人的工作, 并且认为 IDH 在小鼠的发生遗传学研究中是一种很有用的遗传标志。

材料和 方法

(一) 本实验于 1983 年 3—8 月, 以小鼠品系 C57BL/6J 和 DBA/2J 的新鲜心、肝、肾脏组

织为材料进行研究。其中以 C57BL/6J 品系为主要材料。妊娠雌鼠见栓为妊娠零天。

(二) 小鼠在冷冻条件下处死, 取出新鲜心、肝和肾脏组织 0.1 克, 加 1 毫升脱离子水, 充分匀浆, 然后离心 (1500rpm/25 分钟), 吸取上清液。取新鲜或冰冻的上清液样品作垂直淀粉凝胶电泳。电泳所使用的电极缓冲液为 0.136mol/L Tris 和 0.633 mol/L 柠檬酸, pH 7.0; 凝胶缓冲液为 27 毫升电极缓冲液加脱离子水 400 毫升。电泳以 13V/cm 16 小时完成。取样、匀浆, 离心和电泳均在低温 (5℃) 下进行。

(三) 采用异柠檬酸 (Isocitric acid) 100 mg, NADP (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸) 20 mg, 氯化镁 100mg, NBT (氯化硝基四氮唑蓝) 20mg, PMS (甲硫酚嗪) 5mg, 加入于 100 ml 0.144 mol/L Tris-HCl (三羟甲基氨基甲烷-盐酸) 缓冲液中进行染色, 直到同功酶谱清

* 本文是作者, 在 Yale 大学 Dr. Markert 实验室所完成工作的一部分。整个工作是在 Dr. Markert 的指导和帮助下进行的。特致谢意。

表 1 IDH 在 C57BL/6J 小鼠不同组织中的分布

组织来源	同工酶名称	基因符号*	电泳行为	同工酶活性 (或带数)
肝	可溶性 IDH(S-NADP-IDH), 即 IDH _s	Id _s	走向阳极	强 (3)
	线粒体 IDH(m-NADP-IDH), 即 IDH _m		走向阴极	较强 (1)
心	可溶性 IDH(S-NADP-IDH), 即 IDH _s	Id _s	走向阳极	中 (3)
	线粒体 IDH(m-NADP-IDH), 即 IDH _m		走向阴极	强 (1)
肾	可溶性 IDH(S-NADP-IDH), 即 IDH _s	Id _s	走向阳极	较强 (3)
	线粒体 IDH(m-NADP-IDH), 即 IDH _m		走向阴极	中 (1)

* 据 Handerson^[3] 和 Hutton 等^[4] 人研究 S-NADP-IDH 的基因符号为 Id_s, 定位在小鼠的第八号染色体上。这种同工酶为二聚体, 通过杂交实验证明 A 和 A' 为等显性遗传。

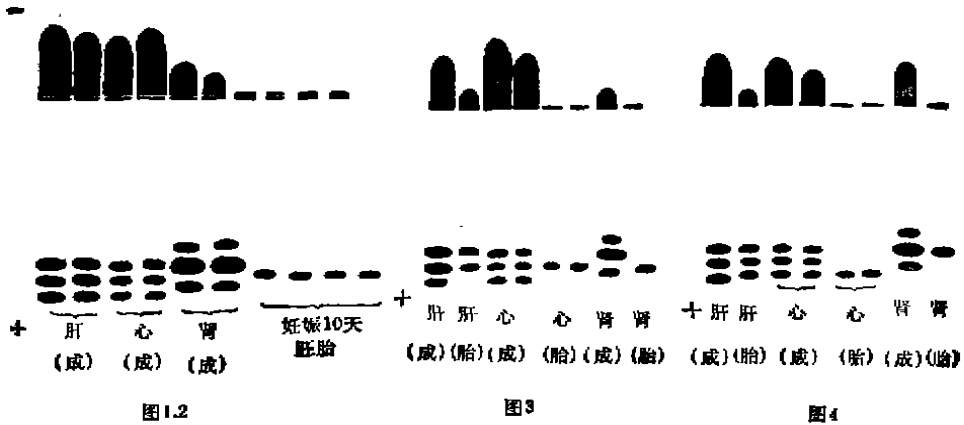


图 1、2 C57BL/6J 成体及妊娠10天胚胎 IDH 电泳图; 图 3 C57BL/6J 出生前一天胎鼠 IDH 电泳图; 图 4 C57BL/6J 小鼠出生后一天胎鼠 IDH 电泳图

楚为止。

结 果

(一) 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在 C57BL/6J 小鼠中的组织差异性 (见表 1 和图 1)。

从表 1 和图 1 可见: C57BL/6J 成体小鼠的 S-NADP-IDH 均含有三条带, 为二聚体 (AA, AA', A'A')。但 IDH 在器官中的分布有明显的差异。其中肝脏以 S-NADP-IDH 为主, 而心脏中则以 m-NADP-IDH 为主; 肾脏的 m-NADP-IDH 较弱, 但在 S-NADP-IDH 则有明

显的三条带, 而且以 AA' 带为最突出, 并可作为该器官 IDH 同工酶的显著标志。

(二) 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在 C57BL/6J 小鼠胚胎发育中的变化 (见表 2 和图 2、3、4)

从表 2 和图 2、3 和 4 可以看出在 C57BL/6J 小鼠胚胎发育的不同阶段 IDH 的活性有明显的差异。在妊娠的第 10 天, 胚胎只有 S-NADP-IDH 存在, 而无 m-NADP-IDH 出现, 且仅有一条带; 出生前一天的胎鼠肝中的 S-NADP-IDH 的出现二条带, 而且第一次有 m-NADP-IDH 出现; 但较弱, 心和肾中的 S-

表 2 IDH 在 C57BL/6J 小鼠胚胎发育中的变化

组织来源	同功酶名称	不同发育阶段 IDH 的活性(或带数)			
		成体	出生后 1 天	出生前 1 天	10 日胚胎
肝	S-NADP-IDH	强 (3)	中 (3)	中 (2)	胚胎为整体匀浆, 只有 S-NADP-IDH 带 (1)
	m-NADP-IDH	较强 (1)	弱 (1)	弱 (1)	
心	S-NADP-IDH	中 (3)	弱 (1)	弱 (1)	
	m-NADP-IDH	强 (1)	痕迹 (1)	无	
肾	S-NADP-IDH	较强 (3)	弱 (1)	弱 (1)	
	m-NADP-IDH	中 (1)	无	无	

NADP-IDH 虽然出现,但含量低,而 m-NADP-IDH 则未能查出;出生后一天的胎鼠,肝中的 S-NADP-IDH 已与成体一样,均为三条带,只是同功酶含量要低得多。以上事实说明,在 C57BL/6J 小鼠的胚胎发育过程中,Id-1 首先在肝中逐渐表达,活性较高,而且出生前后仅一天,带型就有明显变化,可见出生对于胎鼠会带来内环境的急剧改变。在所测器官中,肝脏同功酶的出现早而且活性较高,这充分显示了肝脏在生命活动中的重要性。

(三) S-NADP-IDH 在小鼠胚胎发育中出现的时间(见表 3)。

Donahue 等^[2]曾指出 S-和 m-NADP-IDH 在小鼠胚胎发育的第 12 天开始出现,而 Epstein 等^[3]却在小鼠胚胎发育的第 9 天查出了 S-NADP-IDH 的电泳活性。作者在第 9 天的 DBA/2J 小鼠胚胎中也查出了 S-NADP 的电

泳活性。在第 10 天的 C57BL/6J 小鼠胚胎中查出了 S-NADP-IDH 的电泳活性(见表 3)。

讨 论

(一) 实验结果表明异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 在 C57BL/6J 小鼠的不同组织中,其分布有明显的差异。无论是成体或胎鼠,均以肝脏中的 S-NADP-IDH 的活性最高,这说明肝脏在个体发育中的极端重要性。同时, S-NADP-IDH 在肾脏中的带型极为特别,可视为一种重要的遗传和生理标志。

(二) Wolf 等^[4]在 C311 和 CBA 的杂交后代中测定了胎鼠 S-NADP-IDH 的最早出现时间是在受精后的 248.0 小时,即妊娠的第 9 天,作者在妊娠的第 9 天的 DBA/2J 小鼠胚胎中也查出 S-NADP-IDH 的电泳活性。Wolf 在受精后的第 246.5 小时都未能查出 S-NADP-IDH 的存在,可见 Id₁ 在小鼠中的最早出现时间定为妊娠后的第 9 天是恰当的。即 Id₁ 基因的表达在这时才开始,以后随着发育的进程而活性逐渐增强,由一条带而渐增至出生时的三条带 (AA, AA', A'A')。

(三) 实验结果表明异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 一样,可作为生物学研究中的一种工具酶。在发生遗传研究

表 3 S-NADP-IDH 在小鼠胚胎发育中的改变

胚胎年龄(日)	小鼠品系	同功酶组成(带数)
妊娠第 9 天	DBA/2J	(1)
妊娠第 10 天	C57BL/6J	(1)
妊娠第 18 天	C57BL/6J	(2)
妊娠第 20 天	C57BL/6J	(3)

上,以肝脏 S-NADP-IDH 为最恰当,而肾脏 S-NADP-IDH 由于有特殊的电泳带型,因而在啮齿类物种和亚种鉴别上有一定价值。

参 考 文 献

- [1] Donahue R. P. et al. 1970 Isocitrate Dehydrogenase in Mouse Embryos: Activity and Electrophoretic Variation. *J. Reprod. Fert.* 22: 575—577.
- [2] Felder M. S. 1980 Isozymes. *Current Topics in Biol. and Med. Research* 4: 1—6R
- [3] Engel W. 1973 Onset of Synthesis of Mitochondrial Enzymes during Mouse. *Humangenetik* 20: 133—140.
- [4] Epstein C. J. et al. 1972 The Expression of the Iso-

citrate Dehydrogenase Locus(Id-1) during Mouse Embryogenesis. *Devel. Biol.* 27: 430—433.

- [5] Hutton J. J. et al. 1970 Linkage Analyses using Biochemical Variant in Mice III. Linkage Relationships of Eleven Biochemical Markers *Biochem. Genet* 4: 339—350.
- [6] Henderson N. S. 1965 Isozymes of Isocitrate Dehydrogenase: Subunit Structure and Intracellular Location *J. Exp. Zool.* 158: 263—273
- [7] Markert C. L. et al. 1962 The Ontogeny of Isozyme Patterns of Lactate Dehydrogenase in the Mouse *Devel. Biol* 5: 363—381.
- [8] Wolf U. et al. 1972 Gene Activation during early Development of Mammals. *Humangenetik* 15: 99—118.