

三种两栖动物的乳酸脱氢酶同工酶的比较

梁淡茹 陈文 陈晶

(华南师大生物系) (广东省水产局) (中山医科大学)

本文作者采用平板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 分析研究了黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus Schneider*) 沼蛙 (*Rana guentheri Boulenger*) 花狭口蛙 (*Kaloula pulchra Gray*) 三种两栖动物的心脏、肾脏、脑、骨骼肌、眼晶体、脾脏、肝脏等七种组织的特异性, 表明这种差异是稳定的。黑眶蟾蜍和沼蛙的LDH(1, 1, 27)同工酶酶谱由1—5条酶带组成, 花狭口蛙的LDH(1, 1, 1, 27)同工酶基本上只由一条酶带组成。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 乳酸脱氢酶同工酶; 垂直平板; 黑眶蟾蜍; 沼蛙; 花狭口蛙

前 言

同工酶作为基因表达的产物, 可以反映出不同物体的不同基因位点的结构, 随着电泳技术的不断发展, 利用同工酶分析两栖类种群分类、遗传和进化方面的研究, 日渐增多。

Pollard (1) Roger (2), Matthews (3) 用电泳技术对两栖类蟾蜍属生化特征比较研究做了不少工作, 如区分不同种, 探讨不同种间亲缘关系及测定种群间的遗传相似值等, Wright (4) 对无尾两栖类各器官和组织同工酶进行了比较研究。

蒙义文 (5) 研究了中华蟾蜍卵母细胞的LDH(1, 1, 27)同工酶在各个时期的变化, 从而探讨了卵母细胞中基因活动状况。

本文是以广东常见的三种不同科的两栖动物, 黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus schneider*)、沼蛙 (*Rana guentheri Boulenger*)、花狭口蛙 (*Kaloula pulchra Gray*) 为材料, 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析了三种两栖动物的心脏、肾脏、脑、骨骼肌, 眼晶体、脾脏、肝脏等七种组织的LDH(1, 1, 27)同工酶, 为探讨两栖动物之间的亲缘关系及各组织中基因的特异性的表达提供生化依据。

材料与方 法

一、材料

本试验采用的三种两栖动物, 每种各取材35只, 均于1984和1985年的3—5月份在华南师大校园和石牌地区捕捉, 其体重分别为: 黑眶蟾蜍25.4—55.1克, 沼蛙37.4—63.8克, 花

• 本文承蒙潘炯华教授, 熊全洙、陈湘舜副教授的指导, 王志高同志提供部分参考文献, 在此表示感谢。

狭口蛙27.1—66.3克。

二、方法

(一) LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的提取

将动物捣碎称体重后，迅速放入冰块中解剖，分别取出心、肾、脑、骨骼肌、眼晶体、脾、肝等七种组织，用0.1M的NaCl洗去组织上的血污，吸干水分按1:10加0.1M的磷酸缓冲液于玻璃匀浆器中，在冰浴中反复匀浆，匀浆后用45000g的HI-SPIN 21型高速离心机，在4°C下离心20分钟，取其上清液，立即用于电泳分析。

(二) 电泳与显色

聚丙烯酰胺凝胶电泳参考朱蓝菲〔6〕的方法进行。电泳时电压保持在360伏，电泳在4°C的冰箱中进行3—5小时。

LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的显色是用硝基四氮唑蓝法。我们参考薛国雄〔7〕、朱蓝菲〔6〕的方法，并进行一些修改，染色液的配方为：每100毫升染色液中含有氧化型辅酶I50毫克、氯化硝基四氮唑蓝30毫克、甲硫吩嗪2毫克，1M乳酸钠10毫升、0.5M Tris-HCl(pH7.4)缓冲液15毫升。电泳后取出胶板，用蒸馏水漂洗几次后，于染色液中进行显色，最后将胶板保存在2.5%的醋酸溶液中或制成干板保存。

(三) 电泳结果分析

胶板显色后，用重蒸水漂洗2—3次，选择分离效果较好的胶板进行摄影，得电泳图谱5—7。将与图谱对应的凝胶条用岛津CS-910型双波色谱扫描仪进行定量测定，测定结果表明，除因仪器灵敏度高，显示个别酶谱上不可见的酶带外，其结果与酶谱显示的情况基本相同。

实验结果

一、黑眶蟾蜍LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的表现

如图1图5所示，黑眶蟾蜍各组织的LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的组成存在很大差异。其中谱带数目最多的是心脏，其LDH₅—LDH₁的活性均很强，而且还出现二条活性较弱的亚带，肾脏、脑、骨骼肌、眼晶体均由LDH₅—LDH₂四条酶带组成，各组织相应酶带的迁移率相同，但酶带的活性有异(见图1、表1)。脾脏由LDH₃ LDH₂二条酶带组成，肝脏由LDH₅—LDH₃三条酶带组成。

二、沼蛙LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的表现

从图2图6所示的酶谱可看出，沼蛙的LDH(1. 1. 1. 27)同工酶存在着组织的特异性，肾、脾、脑、眼晶体、肝脏的酶谱均由五条带组成，五种组织的相应酶带间的迁移率相同，但酶带的活性有差异(见图2、表2)。心脏由四条酶带组成，LDH₃—LDH₁的活性很强，LDH₄活性较弱，骨骼肌的酶谱比较简单，只表达了LDH₆。

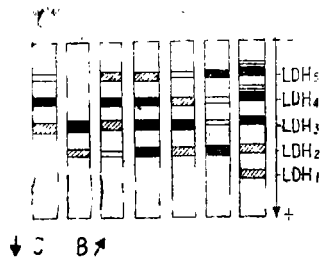


图1. 黑眶蟾蜍LDH B.模式图, C.扫描图

从左至右分别为: 肝脏, 脾脏, 眼晶体, 肌肉, 脑, 肾脏, 心脏.

表1 黑眶蟾蜍的LDH酶谱(参见图1)

名称	各区带酶活含量 %						
	亚带	LDH ₅	亚带	LDH ₄	LDH ₃	LDH ₂	LDH ₁
心	6.491	14.521	6.253	23.325	23.925	13.250	13.732
肾		37.576		10.645	2.459	49.135	0.182
脑		0.824		33.519	39.640	26.014	
肌肉		11.080		32.869	36.650	19.301	
晶体		21.553		36.603	26.523	15.318	
脾					53.618	46.382	
肝		2.242		55.673	42.085		

三、花狭口蛙的LDH(1.1.1.27)同工酶的表现

如图3图7所示,花狭口蛙各组织的LDH(1.1.1.27)同工酶酶谱组成很简单,酶谱上基本上只出现一条深染的酶带(脾脏还常显示活性较弱的LDH₄,肝脏也常出现LDH₁),根据酶带所处的位置和迁移率的数值,我们认为这条酶带应为LDH₃。虽然花狭口蛙LDH(1.1.1.27)同工酶酶谱组成简单,但各组织间酶的活性均有差异(见表3)。

四、三种两栖动物的LDH(1. 1. 1. 27)同工酶的比较

图4是根据每种两栖动物相应组织的电泳图谱中,酶带着色的深浅,宽窄及相对迁移率绘成的比较模式图。从图中可见,黑眶蟾蜍和沼蛙的LDH(1. 1. 1. 27)同工酶酶谱由1—5条酶带组成,花狭口蛙基本上只由一条酶带组成。

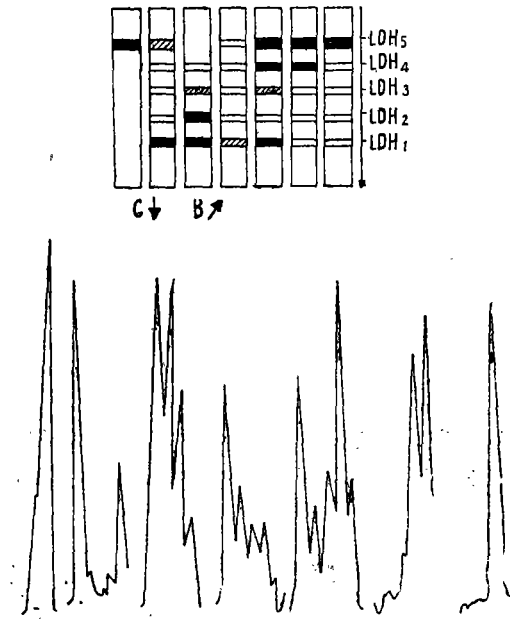


图2. 沼蛙LDH B.模式图, C.扫描图
从左至右分别为: 肌肉, 肾脏, 心脏, 脾脏, 脑, 眼晶体, 肝脏。

表2 沼蛙的LDH酶谱(参见图2)

名称	各区带酶活含量%				
	LDH ₅	LDH ₄	LDH ₃	LDH ₂	LDH ₁
肌肉	100				
肾	32.976	5.225	2.513	12.097	47.205
心		15.268	20.107	28.417	30.105
脾	11.168	13.886	14.587	17.798	42.559
脑	16.087	33.879	12.816	12.530	24.674
晶体	48.981	46.164	1.619	1.017	1.217
肝	93.625	1.365	1.456	1.031	2.511

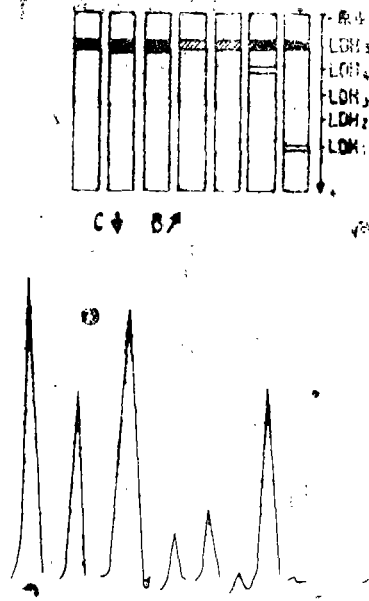


图3. 花狭口蛙LDH B.模式图, C.扫描图
 从左至右别为: 心脏, 肾脏, 脑, 肌肉, 眼晶体, 脾脏, 肝脏

表3 花狭口蛙的LDH酶谱(参见图3)

名称	各区带酶含量 %				
	LDH ₅	LDH ₄	LDH ₃	LDH ₂	LDH ₁
脑	100				
晶体	100				
肌肉	100				
脾	100				
肾	100				
心	94.699	5.301			
肝	97.832				2.168

对心脏这一组织, 黑眶蟾蜍的酶带数目最多, 有五条深染的酶带和二条弱的亚带, 沼蛙只有四条酶带, 缺少LDH₅, 花狭口蛙只有LDH₅。三种两栖动物脑的酶谱间也有很大的差异, 黑眶蟾蜍只显现四条谱带, 缺少LDH₁, 沼蛙有五条酶带, 花狭口蛙只表达LDH₅。脾脏中, 黑眶蟾蜍只有LDH₃、LDH₂两条酶带, 沼蛙由五条酶带组成, 花狭口蛙由一条深染的LDH₅和活性较弱的LDH₄酶带组成。眼晶体的酶谱中, 黑眶蟾蜍由LDH₅—LDH₂四条酶带组成, 沼蛙有五条酶带, 花狭口蛙只有LDH₅一条酶带(见模式图4)。

三种两栖动物，各组织相应的LDH(1.1.1.27)同工酶酶谱不仅是酶带的数目不同，同时酶带的活性也有差异(见图4)。

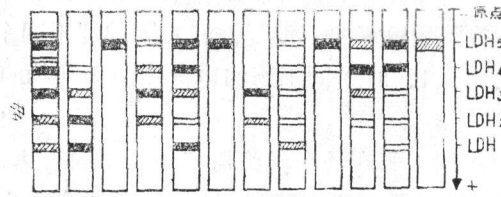


图4 黑眶蟾蜍、沼蛙、花狭口蛙LDH同工酶比较图

从左至右分别为：蟾心、沼心、花心、蟾脑、沼脑、花脑、蟾脾、沼脾、花脾、蟾眼晶体、沼眼晶体、花眼晶体



图5、6、7 分别为黑眶蟾蜍、沼蛙、花狭口蛙的LDH同工酶酶谱。

图5从左至右分别为：肝脏、脾脏、眼晶体、肌肉、脑、肾脏、心脏。

图6从左至右分别为：肌肉、肾脏、心脏、脾脏、脑、眼晶体、肝脏。

图7从左至右分别为：心脏、肾脏、脑、肌肉、眼晶体、脾脏、肝脏。

分析与讨论

脊椎动物的LDH(1.1.1.27)同工酶一般是由两个基因编码的亚基A和B构成，由于亚基A和B之间亲和力的大小不同，因而出现了不同数目的同工酶。Markert [8] 等认为同工酶分子组成的差异又受基因所控制，是基因生化表现型，因而LDH(1.1.1.27)同工酶在各种生物体内，表现明显的种类特异性和组织器官的特异性。

黑眶蟾蜍、沼蛙、花狭口蛙，在分类上分别属于蟾蜍科、蛙科和姬蛙科，这三种两栖动

物的亲缘关系较远,不仅反映在形态结构上,而且反映在同工酶酶谱上,以上三种两栖动物的LDH(1.1.1.27)同工酶,无论在酶带数目或各酶带的酶活含量上都有差异(见图1—3,表1—3),而且差异是稳定的,重复性好,同种蛙不同个体和不同性别几乎没有差异,从而说明LDH(1.1.1.27)同工酶的电泳在两栖动物的进化和分类上有一定的参考价值。

LDH(1.1.1.27)同工酶在各个组织器官中的不同表达是和这一组织器官的生理功能适应的,一般在厌氧生活的骨骼肌和肝脏LDH₅的酶活含量高,而在不厌氧生活的心脏、脑和肾脏LDH₁的酶活含量较高。以沼蛙为例,沼蛙心脏的LDH(1.1.1.27)同工酶酶谱含有丰富的LDH₁、LDH₂,B基因的活性较强,而骨骼肌和肝脏基本只有A基因表达,含有丰富的LDH₅,这一结果与Markert〔8〕(1965)在哺乳类发现的情况类似。为此这种表达可以作为鉴别组织器官生化特异性的标志之一。

Shakiee〔8〕认为LDH_A在缺氧条件下,具有重要的生化代谢功能,花狭口蛙善用其鳃部的尖锐突起掘土钻入深土中,经常生活在厌氧环境中,因而其LDH同工酶(1.1.1.27)酶谱出现主要由A亚基组成的酶带是可以理解的。

LDH(1.1.1.27)同工酶分别由不同座位上的基因A和B编码组成的五种同工酶,电泳图谱表现为五条带,但从实验结果看到,黑眶蟾蜍心脏的酶谱有七条区带,除五条酶活较强的酶带外,还出现酶活较弱的两条亚带(见图1图5),这种情况既不象群体中杂合子的酶谱,也不是C基因。究竟能否用后生的形式,即Markert〔8〕提出的,在正常亚单位转译后,由于二硫键桥氢键及多肽键间各种形式的相互作用,可以改变酶的三维结构,达到后生形式的饰变,从而造成同工酶酶谱的多样性来解释,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 〔1〕Pollard, C. M., et al., *Herpetologica*, 29(1973), 251—253.
- 〔2〕Rogers, S. J., *Copeia*, (2)1973, 322—330.
- 〔3〕Matthews, T. C., *Copeia*, (3)1975, 454—465.
- 〔4〕Wright, D. A., and C. M. Richards, *J. Exp. Zool.*, 221, (1982), 283—293.
- 〔5〕蒙义文, *西栖爬行动物研究*, 5(1982), 19—28.
- 〔6〕朱蓝菲, *水生生物集刊*, 7(4)1982, 539—545.
- 〔7〕薛国雄, *生物科学动态*, (3)1978, 10—17.
- 〔8〕Markert, C. L., J. B. Shakiee, & G. S. Whitt, *Science* 189(1975), 102.
- 〔9〕熊全洙, *动物学报*, 31(1)1985, 20—27.

COMPARISON OF LDH ISOENZYME ANALYSES AMONG THREE SPECIES OF AMPHIBIAN

Liang Danru

Chen Wen

(Biology Dept. S. C. N. U.)

(Guangdong Fisheries Bureau)

Chen Jing

(Zhong Shan Medical science Univ.)

Abstract

This paper reports the result of LDH isoenzyme analyses in three species of Amphibian; *Bufo melanostictus Schneider*, *Rana guentheri Boulenger* and *Kalouallata pulchra Gray*. seven organs including the heart, spleen, brain, kidney, liver, bony muscle and eye crystal have been studied through slab acrylamide gel electrophoresis technique. Stable idiosyncrasies are found. The LDH isoenzymes of *R. guentheri Boulenger* and *B. Melanostictus Schneider* are composed of one to five bands, while the LDH isoenzyme of *K. pulchra Gray* is basically composed of only one band.

Key words : Acrylamide gel electrophoresis ; electrophorogram , flat-bed electrophoresis ; LDH isoenzymes ; *B. Melanostictus Schneider*, *R. guentheri Boulenger*, *K. pulchra Gray*

(上接第45页)

THE DISTRIBUTION OF CROCODILE IN THE HANJIANG REGION

Zeng Zhaoxuan

(Geography Dept.)

Abstract

Three points are presented here: 1. The crocodile was once living in the Hanjiang River valley. There are many ancient records in corroboration of this. 2. There were two species living in the Hanjiang valley; the *Crocodylus porosus* living in the coastal regions along the South Sea; the *Tomistoma schlegelii*, living only in the river valleys. 3. The killing off of the Crocodile in the Hanjiang valley took place at the early period of Ming Dynasty, more than 550 years ago.

Key words; Hanjiang; Crocodile; geographical distribution; killing off