

黑颈鹤与灰鹤血清乳酸脱氢酶 (LDH) 同功酶的比较研究

李永通 李若贤 吴至康

(贵州省生物研究所)

摘要 采用薄层双垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳、特异性的组织化学染色和光密度扫描技术,对黑

黑颈鹤和灰鹤的血清 LDH 同功酶进行研究,发现该二种鹤的血清都具有 5 种 LDH 同功酶,它们的谱型特征为 $LDH_5 > LDH_4 > LDH_1 > LDH_3 > LDH_2$ 。定量结果表明:黑颈鹤的 LDH-A 亚基活性比灰鹤的大。通过不同季节的比较研究证明:黑颈鹤的血清 LDH 同功酶的相对活性存在着季节性差异。

黑颈鹤 (*Grus nigricollis*) 是世界现存 15 种鹤当中发现最晚、分布较窄、唯一生活在高原上的鹤。有关它的生态、行为、繁殖、遗传等研究工作,国内外学者已进行了许多。但有关该鹤的生化遗传指标尚未见公开的报道。本文就黑颈鹤的血清 LDH 同功酶作了研究,并与灰鹤 (*Grus grus*) 作比较。现将研究工作报道如下:

(一) 材料和方法 黑颈鹤和灰鹤的样本均来自它们的越冬地,即贵州省威宁县草海地区。黑颈鹤 3 只 (2♀, 1♂), 灰鹤 2 只 (1♀, 1♂), 均为成体。

1. 血清样本制备 无菌翼静脉抽血 2 毫升,不加任何抗凝剂。以 1000 转/分的速度离心 20 分钟,分离出血清供实验用。

2. 电泳 采用双垂直板状凝胶电泳分离血清 LDH。聚丙烯酰胺凝胶厚度为 1 毫米,分离胶浓度为 7%; 浓缩胶浓度为 2.5%。每个样品槽加样量 5 微升。起始电压为 90V, 1 小时后调至 200V, 维持 4 个小时。

3. 同功酶显色 电泳结束后把凝胶板置于下列溶液中:

- 氧化型辅酶 I (NAD⁺) 50 毫克
 - 氯代硝基四氮唑蓝 (NBT) 30 毫克
 - 吩噻二甲酯硫酸盐 (PMS) 2 毫克
 - 乳酸钠 (IM) 0.5 毫升
 - 氯化钠 2 毫克
 - Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.1) 100 毫升
- 在 37°C 下保温半小时,直至显出酶带。

4. 固定、扫描及亚基计算 显出酶带的凝胶在 7% 的乙酸中固定,制成干胶片供拍照及光密度扫描定量用。采用日本岛津产的 CS-930 型双波长薄层色谱扫描仪,扫描波长 440 纳米。LDH 的亚基含量计算采用 Gerald^[8] 的方法即: A 亚基 = $LDH_5 + \frac{3}{4}LDH_4 + \frac{1}{2}LDH_3 +$

$$\frac{1}{4}LDH_2; B \text{ 亚基} = LDH_1 + \frac{3}{4}LDH_2 + \frac{1}{2}LDH_3 + \frac{1}{4}LDH_4。$$

(二) 结果 研究结果表明:黑颈鹤与灰鹤的血清 LDH 都具有 5 种同功酶,经扫描定量发现它们的相对活性并不相同。黑颈鹤的血清 LDH 中 LDH₅ 比灰鹤的 LDH₅ 活性大。计算表明:黑颈鹤血清的 LDH 的 A 亚基含量明显地比灰鹤的大。虽然这两种鹤都具有 $LDH_5 > LDH_4 > LDH_1 > LDH_3 > LDH_2$ 的谱型,但其基因表达活性有显著差异(见图 1,表 1)。

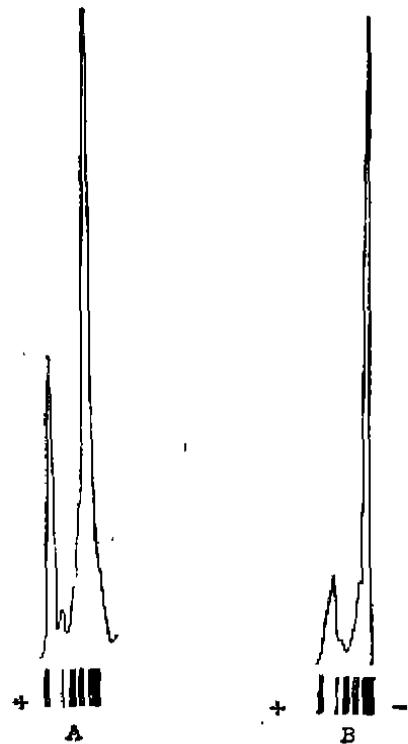


图 1 黑颈鹤和灰鹤血清 LDH 同功酶的扫描曲线及电泳酶谱 (A: 黑颈鹤, B: 灰鹤)

通过不同季节的研究又表明:黑颈鹤的血清 LDH 同功酶在不同的季节间,各个同功酶间的相对活性存在着显著性的差异。在 11 月份越冬季节,该鹤的血清 LDH 中的 A 亚基含

表1 黑颈鹤与灰鹤血清 LDH 同功酶的相对活性及亚基含量比较

物种	黑 颈 鹤		灰 鹤		t 测验结果 df = 3 $t_{0.05} = 3.182$
	11月(1987)		11月(1987)		
	范 围 (%, uv·mm)	均值±标准差	范 围 (%, uv·mm)	均值±标准差	
LDH ₁	17.48—18.72	18.1±0.62	22.89—24.31	23.6±0.71	8.920**
LDH ₂	3.27—3.73	3.5±0.23	3.24—3.56	3.4±0.16	0.573
LDH ₃	3.98—4.82	4.4±0.42	3.97—5.03	4.5±0.53	0.224
LDH ₄	7.46—8.74	8.1±0.64	7.89—8.31	8.06±0.21	0.103
LDH ₅	64.75—66.85	65.8±1.05	59.46—61.34	60.4±0.94	6.003**
A亚基	73.15—76.75	74.9±1.75	68.17—70.98	69.6±1.43	3.708*
B亚基	23.79—26.11	25.1±1.31	29.28—31.57	30.4±1.12	4.840*
A/B	2.71—3.30	2.99±0.28	2.14—2.45	2.29±0.15	3.620*

* 差异显著; ** 差异极显著; uv·mm = 微伏·毫米(适用于表2)。

表2 黑颈鹤血清 LDH 同功酶相对活性及亚基含量的季节性差异

时 间	1987年11月(冬季)		1987年7月(夏季)		t 测验结果 df = 4 $t_{0.05} = 2.776$
	范 围 (%, uv·mm)	均值±标准差	范 围 (%, uv·mm)	均值±标准差	
LDH ₁	17.48—18.72	18.1±0.62	19.32—20.28	19.8±0.48	3.755*
LDH ₂	3.27—3.73	3.5±0.23	1.19—2.41	1.8±0.61	4.517**
LDH ₃	3.98—4.82	4.4±0.42	6.64—7.76	7.2±0.56	6.928*
LDH ₄	7.46—8.74	8.1±0.64	22.90—24.51	23.7±0.80	26.3738**
LDH ₅	64.75—66.85	65.8±1.05	46.55—48.45	47.5±0.95	22.3848**
A亚基	73.15—76.75	74.9±1.75	67.34—71.31	69.3±1.96	3.3396*
B亚基	23.79—26.11	25.1±1.31	29.26—32.09	30.7±1.44	4.4991*
A/B	2.71—3.30	2.99±0.28	2.05—2.47	2.26±0.21	3.6130*

* 差异显著; ** 差异极显著。

量比7月份的夏季大 ($p < 0.05$, 见表2)。这说明黑颈鹤血清 LDH 的基因活性在不同季节是有变化的。

(三) 讨论 自1959年 C. L. Markert 等用酶谱分析高等动物的 LDH 以来, 电泳技术已被广泛应用于当代生物学的各个领域。Wilson 等^[4]在对乳酸脱氢酶的纯品进行了氨基酸组成分析, 发现不同纲的脊椎动物 LDH 的 A 和 B 亚基有着不同的氨基酸序列。近缘关系的物种在氨基酸序列中很相似, 但不同物种不同分子形式的同功酶活性部位一般是高度保守的。Markert^[5]提出: LDH 同功酶分子组成的差异是由基因所决定的, 且是物种长期演化的结果。他认为 B 基因是由 A 基因演化而来的。本研究表明: 黑颈鹤与灰鹤血清

LDH 是由 2 个基因: A 和 B 调控的。5 种 LDH 同功酶是 A 和 B 基因产生的 A 和 B 亚基的不同四聚体, LDH₅ 和 LDH₁ 对热较敏感, 在较高温度下 (50℃) 容易失活。LDH₅ 主要催化丙酮酸还原为乳酸的反应, 它是无氧酵解过程, 在糖酵解反应活泼的器官和组织中含量最大, 如骨骼肌、脾脏等。显然不同组织、不同物种所呈现的特异性同功酶酶谱是与其特定的生理功能和代谢类型紧密相关的。黑颈鹤与灰鹤血清 LDH 同功酶都是以 LDH₅ 活性最高, LDH₂ 活性最低为显著特征。黑颈鹤与灰鹤不同之处是前者的 A 亚基含量比后者高, 这显然与物种不同的生态及生理代谢类型有关。因为鹤具有对环境质量高度敏感的特性。黑颈鹤主要生活于高海拔的云贵、青藏高原, 由于恶劣、

严寒的气候,尤其是长期生活于高原上缺氧的环境,促进了 LDH-A 基因的表达活性。机体呈现在以糖酵解为主的分解代谢是该鹤长期以来对环境适应的结果。

由于环境因素及人类的活动加剧,黑颈鹤与灰鹤的群体正面临下降的威胁。基本遗传数据的缺乏在濒危及珍稀动物的管理与研究中是一个相当重要、不可忽视的问题^[7]。为了保护 and 挽救珍稀物种,人工驯养、繁殖黑颈鹤的工作正在进行。为了做好此项研究工作,必须对该鹤的生化遗传指标进行研究。

参 考 文 献

- [1] 吕宗宝等 1980 黑颈鹤繁殖生态的观察 动物学杂志 (1): 20—24。
- [2] 李士鹏 1987 LDH 同功酶的发生遗传学探讨 生物科学动态 (2): 14—18。
- [3] 李永通等 1986 黑颈鹤染色体组型的初步研究 草海科学考察集 贵州人民出版社 161—165。
- [4] 吴至康等 1985 黑颈鹤越冬生态初步研究 生态学报 5(1): 71—75。
- [5] 熊全沫 1986 同功酶电泳数据的分析及其在种群遗传学上的应用 遗传 8(1): 1—5。
- [6] 薛国雄 1978 乳酸脱氢酶同功酶 生物科学动态 (3): 10—16。
- [7] Ferrell R. E. *et al.* 1980 Protein polymorphisms in the bald eagle. *Biochemical Genetics* 18: 39—43.
- [8] Gerald P. C. 1972 LDH isozymes. *Standard Methods of Clinical Chemistry* 7: 49—61.
- [9] Markert C. L. *et al.* 1975 Evolution of a gene: Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of genes structure, function, and regulation. *Science* 189: 102—114.
- [10] Wilson A. C. *et al.* 1964 Evolution of lactic dehydrogenase. *Fed. Proc.* 23: 1258—1266.