

血清乳酸脱氢酶同功酶圆盘电泳分离法 在鱼类分类工作中的应用

周宗汉 林金榜

(南京大学生物系)

近年来鱼类同功酶的研究中应用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离技术非常广泛。这种方法具有分辨力高,操作简便,分离时间短等优点。目前研究同功酶谱的变化来鉴定生物的种类,了解种群的地理分布以及在遗传育种等方面,已成为一种有效的实验技术。研究发现,乳酸脱氢酶(LDH)同功酶在动物体内的分布有一定的组织和种属特异性。用电泳方法分析 LDH 同功酶可作为鱼类分类的一种方法。

同功酶的分离采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,区带分离显色清晰,重复性好,便于扫描定量。

我们基本按 Davis^[5] 法,对四种淡水鱼类(鲤鱼、草鱼、鲮鱼、乌鳢)、江海回游性鱼类(刀鲚)、海水鱼类(梭鱼)进行血清 LDH 同功酶圆盘电泳分析,结合鱼类血清 LDH 同功酶的特点,对聚丙烯酰胺的配比进行了一些比较。本文介绍我们在鱼类方面采用的具体操作方法和结果。

一、材料和方法

(一) 采血与血清的制备 用干燥注射器从活鱼尾动脉抽取血样约 0.5 毫升,在室温放置 2 小时,离心 15 分钟(3000 转/分)。取出的血清保存在冰箱中(4℃)备用。

(二) 试剂的配制

1. 贮存液及溶液的配制 见表 1。
2. 溴酚兰蔗糖溶液 称溴酚兰 0.1 毫克,蔗糖 4 克,加蒸馏水至 100 毫升。
3. 0.5 克分子浓度乳酸钠溶液 取 85% 乳

表 1 贮存液及溶液的配制

贮液	100 毫升溶液中的含量		pH	溶液混合比
A	1 当量盐酸	48 毫升	8.9	分离胶 A:C:水:F = 1:2:1:3 凝胶浓度 5.7%
	*Tris	36 克		
	**TEMED	0.24 毫升		
C	丙烯酰胺	22.8 克		
	甲叉丙烯酰胺	1.12 克		
F	过硫酸铵	0.14 克		
B	1 当量盐酸	48 毫升	6.7	成层胶 B:D:E:F = 1:2:1:4 凝胶浓度 2.5%
	Tris	6 克		
	TEMED	0.46 毫升		
D	丙烯酰胺	10 克		
	甲叉丙烯酰胺	2.5 克		
E	蔗糖	40 克		
电极缓冲液	Tris	6 克	8.3	使用时稀释 10 倍
	甘氨酸	28.8 克		
	蒸馏水	1000 毫升		

* 三羟甲基氨基甲烷; ** 四甲基乙二胺。

酸溶液 5 毫升,加 1 当量氢氧化钠溶液 50 毫升,加蒸馏水至 100 毫升。

4. 0.5 克分子浓度染色缓冲液 pH 7.2 称 Tris 60.57 克,1 当量盐酸 425 毫升(约浓盐酸 35.4 毫升)加蒸馏水至 1000 毫升。

5. 基质染色液 称硝基兰四唑(NBT) 30 毫克,辅酶 I(NAD) 50 毫克,吩嗪二甲脂硫酸盐(PMS) 2 毫克,0.5 克分子浓度染色缓冲液 pH 7.2 15 毫升,0.5 克分子浓度乳酸钠溶液 15 毫升,0.1 克分子浓度氯化钠溶液 5 毫升,加蒸馏水至 100 毫升。如呈绿色即失效。

6. 2% 醋酸溶液 以上试剂需放置 4℃ 冰

箱保存。

(三) 操作

1. 凝胶的制备 将洁净电泳管(内径×高为4.5毫米×80毫米,在50毫米处刻一标记)。垂直插入制胶电泳管架的小孔中,下端用橡皮塞塞好。在电泳管中先制备分离胶,然后在分离胶上面再做一层成层胶。

分离胶制备 用吸量管按分离胶溶液混合比例配制胶液,加至电泳管刻度处,小心覆盖少量蒸馏水,使具与空气隔绝,使胶面平整。静置在室温下40分钟,待水层下面出现一清晰界面,即为聚合完毕。

成层胶制备 将分离胶上的蒸馏水用滤纸条吸干,用吸量管按成层胶溶液混合比例配制胶液,每管0.1毫升,表面覆盖少量蒸馏水,静置在室温30分钟即可聚合完毕。

2. 加样 将已聚合的成层胶上面的蒸馏水用滤纸条吸干,加入10微升血清和50微升溴酚兰溶液。

3. 电泳 在已加样的凝胶柱上小心地加满电极缓冲液。电泳管从架上取出,除去管下端的橡皮塞,将电泳管插入上槽底孔内,然后在电泳上、下槽分别加电极缓冲液,上槽接阴极,下槽接阳极,并接通电源。

电泳开始时,将电压调至240伏特,当溴酚兰染料进入分离胶时,加大电压至360伏特,每支管的电流为2.5毫安,通电90分钟。

4. 显色 电泳完毕,取出电泳管,用细长针头的注射器吸取蒸馏水注入胶和管壁之间,沿管壁慢慢转动,使凝胶与管壁分离,然后用洗耳

球插入管口,小心将凝胶柱挤出,将取出之凝胶条浸入盛有基质染色液并预先编号有机玻璃染色缸小格中。置37℃解育30分钟,然后固定在2%醋酸溶液中。

二、结果

六种鱼类 LDH 同功酶区带的相对迁移率(Rf 值)比较:

$$Rf = \frac{\text{原点到色带前沿的距离}}{\text{原点到溴酚兰色带的距离}}$$

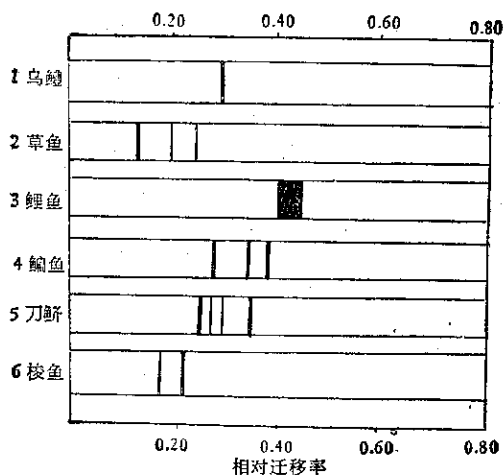


图1 相对迁移率

三、讨论

1. 关于分离胶的配比,在电泳条件一致的情况下,我们采用7.5%、7.0%、5.7%、5.0%四

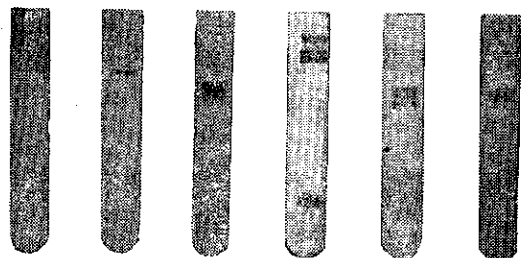


图2 几种鱼类血清 LDH 同功酶圆盘电泳图

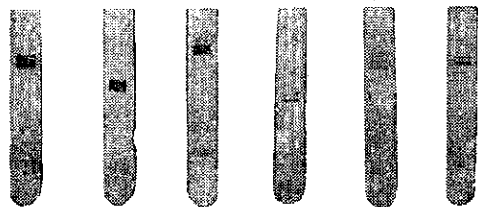


图3 刀鲚各种组织 LDH 同功酶圆盘电泳图

表 2

编号	种类	LDH 同功酶区带(条)	相对迁移率
1	乌鳢	1	0.30
2	草鱼	3	0.14、0.20、0.24
3	鲤鱼	1	0.45
4	鳊鱼	3	0.28、0.34、0.38
5	刀鲚	4	0.25、0.27、0.29、0.35
6	梭鱼	2	0.18、0.22

组配比试验,以 5.7% 为最好。

2. 本法操作较为简便,基质染色液用量少,可节约昂贵药品。加入血清标本,通电 90 分钟。染色孵育 30 分钟,由肉眼观察比较即初步可判断结果。

3. 聚丙烯酰胺凝胶的时间与过硫酸铵浓度有关,在一定量的 TEMED 浓度下,过硫酸铵浓度越高,丙烯酰胺凝胶聚合时间越快;反之,在一定量的过硫酸铵浓度下,TEMED 剂量越多,丙烯酰胺聚合的时间也越快。

凝胶聚合时间的不同直接影响 LDH 同功酶的分离程度,在我们实验条件下,以 40 分钟为合适。

4. 从分析的这几种鱼中可以看出,每种鱼的 LDH 同功酶区带都有它一定的谱型,可以从血清 LDH 同功酶谱型中看出每种鱼的特异

性。根据这种特异性,可以区别不同的鱼类(见图 2)。

5. LDH 同功酶仅是鉴别种属分类的一种方法,可以对形态上难以区分的种属进行鉴别。但对不同种类的多指标的筛选或综合应用尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 莽克强等: 1975, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社。
- [2] 湖北省水生生物研究所鱼类育种组: 1975, 盘状电泳在鱼类选种工作中的应用, 淡水生物学, 科技参考, 第 3 期, 1—8 页。
- [3] 薛国雄。1978, LDH 同功酶, 生物科学动态, 第 3 期, 10 页。
- [4] Салменкова, Е. А., 1973, Генетика изоферментов рыб. Успехи соврем Биол., 75(2):217—235.
- [5] Davis, B. 1964, Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404—427.