

中国本兔不同组织器官酯酶同工酶的比较研究

俞远京 韦声波 聂崇兴 陈代雄

(湖南医科大学实验动物中心, 寄生虫教研室, 长沙, 480078)

摘要 本文通过对中国本兔不同组织器官, 酯酶同工酶进行普通凝胶电泳分析, 结果发现大脑、肺、小肠、脾、肾、肝、心、卵巢、肌肉、血浆、血清、溶红细胞等 12 种组织都有酯酶同工酶活性, 其平均电泳迁移率分别为 Rf 0.13—0.39 和 Rf 0.39—0.70, 并以肝脏、肾脏两种组织的酯酶同工酶活性最高。

中国本兔 (*Oryctolagus cuniculus*)^[1] 是世界现存的最古老品种之一, 广泛分布在我国各地, 具有繁殖力强, 耐粗食, 适应性和抗病力强, 体型小等特点, 常常作为实验动物用于生物医学研究。但目前对中国本兔与其他品种家兔的遗传关系, 尚缺乏生化遗传学的系统研究。

酯酶 (Esterase EC. 3.1.1.1) 是催化脂类化合物水解的酶系, 有人认为与机体的去毒作用有关, 在生物物种内较为稳定, 具有物种特异性^[2]。迄今为止, 有人对新西兰家兔的酯酶同工酶进行了大量研究, 对其基因已精确地定位于染色体上^[3], 但未见对某一品系家兔的不同组织的酯酶同工酶谱进行比较研究的报道。

本研究试图通过对中国本兔不同组织器官酯酶同工酶的分析比较, 以期弄清中国本兔酯酶同工酶活性在不同组织的表现, 为进一步比较中国本兔与其他品系家兔间的遗传关系, 开发中国本兔资源提供实验依据。

(一) 材料和方法

1. 实验动物 中国本兔 10 只(雄、雌各 5 只), 体重约 1.5 公斤, 纯白, 眼红, 耳短, 产于湖南省宁乡县。

2. 样品处理 按常规自兔心脏采取全血, 分装制备血清与血浆。然后按红细胞压积 2 倍加生理盐水混匀, 以 300 g 离心 10 分钟, 弃去上

清液, 重复洗涤红细胞 3 次; 再按红细胞压积加等量体积蒸馏水, 制成溶血液, 置 -30℃ 冰箱保存。再以空气栓塞法将兔处死, 剖取心、肝、脾、肺、肾、大脑、十二指肠、肌肉、卵巢等组织, 除去表面脂肪, 用生理盐水冲洗 3 次, 将组织与蒸馏水按 1:3(w/v) 比例在冰浴中电动匀浆 5 分钟, 将组织悬液置日立超速离心机, 低温离心 (4℃, 30,000 g, 15 分钟), 取上清液以 300 μl 分装放至 -30℃ 冰箱备用。

3. 主要试剂

- (1) 丙烯酰胺 (Acrylamide, Acr)
- (2) 甲叉双丙烯酰胺 (N,N'-Methylenabisacrylamide, Bis)
- (3) 四甲基乙二胺 (N,N',N',N'-Tetramethyl-oenylenediamine TEMED)
- (4) 过硫酸胺 (Ammonium Persulfate AP) 以上均为 Sigma 公司产品。

采用普通凝胶 (PAGE) 垂直板型电泳^[4], 胶板大小 120×170×1 (mm), 凝胶浓度 (T%) 7.5%, 交联度 (C%) 4%。13 个加样槽, 样品液加入等量 40% 蔗糖饱和液, 混匀离心 15 分钟 (1,400 g) 后用微量进样器小心加样, 加样量为 20—70 μl, 电泳条件为: 浓缩胶稳压 240 伏, 分离胶稳压 360 伏, 电泳约 3 小时。

染色主要参考黄氏方法^[5], 染色完毕, 胶板

表 1 中国本兔不同组织酯酶同工酶的酶带数目

酶带数目 迁移率	组织												
	大脑	肺	小肠	脾	肾	肝	心	卵巢	肌肉	血浆	溶红细胞	血清	
Rf 0.39—0.70	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Rf 0.13—0.39	2	3	2	3	5	7	4	4	2	2	1	2	
合计	5	6	5	6	8	10	7	7	5	5	4	5	

用蒸馏水冲洗 1 次, 在岛津 CS-930 型双波长薄层色谱扫描仪上进行透射扫描, 扫描条件为: λ_1 528 nm; λ_2 700 nm; 扫描速度 20 mm/分钟; 记录仪 Y 轴灵敏度 $\times 32$ 。

(二) 结果和讨论 心、肝、脾、肺、肾、大脑、十二指肠、卵巢、血清、血浆、溶红细胞、肌肉等, 都有酯酶同工酶活性(见图 1)。其加样量各组织器官, 分别为: 大脑 $70 \mu\text{l}$, 肺 $60 \mu\text{l}$, 十二指肠 $70 \mu\text{l}$, 脾 $30 \mu\text{l}$, 肾 $40 \mu\text{l}$, 肝 $40 \mu\text{l}$, 心 $60 \mu\text{l}$, 卵巢 $30 \mu\text{l}$, 肌肉 $50 \mu\text{l}$, 血浆 $20 \mu\text{l}$, 血清 $20 \mu\text{l}$, 溶红细胞 $20 \mu\text{l}$ 。

通过多次重复同样条件下的实验, 以上组织器官的酯酶同工酶, 其平均电泳迁移率和酶带数目见(表 1)。

12 种组织中以肝、肾的酯酶同工酶活性

最高且带纹分辨清楚, 肺的酯酶同工酶虽然活性较高, 但带纹不清, 而且血红蛋白不易除掉, 影响扫描结果的判断。

据文献报道^[5,7], 家兔有九个不同的基因位点, 控制酯酶同工酶的合成。这些基因位点所控制合成的酯酶同工酶, 分别分布在血清、血浆、红细胞(溶红细胞)、肝、肾、脾组织中, 以红细胞内酯酶同工酶的酶带数目最多。通过对中国本兔 12 种组织的 PAGE, 发现中国本兔酯酶同工酶除分布在以上组织中, 还分布在心、肺、肌肉、大脑、卵巢、十二指肠中。以肝、肾的活性最强且酶带数目最多, 与前人工作略有不同。这与肝、肾是机体主要的解毒器官的生理功能有关。而其他组织酯酶同工酶的活性与酶带数目, 可能与控制该组织酯酶的基因开启是

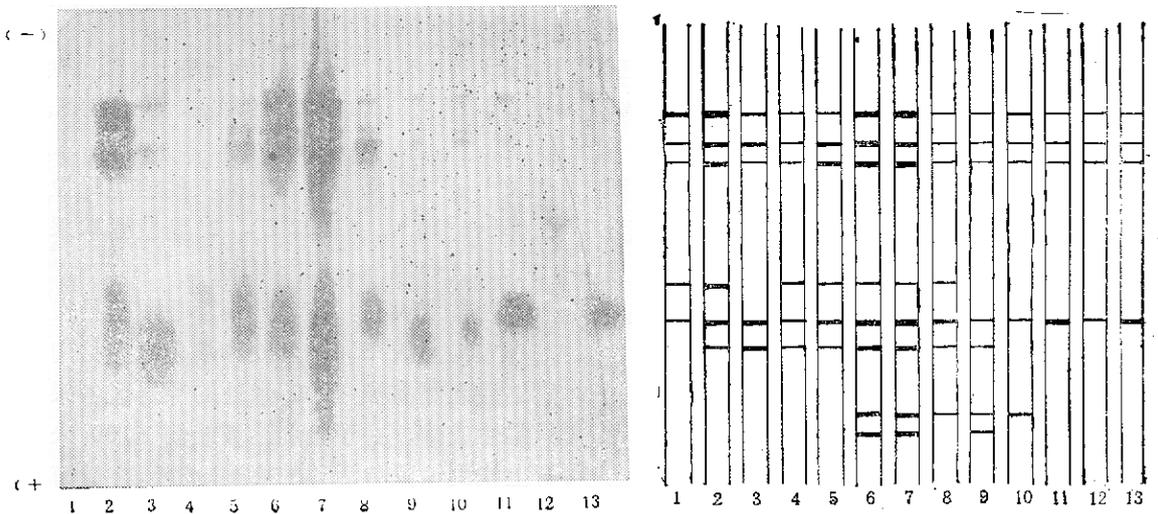


图 1 中国本兔不同组织器官 PAGE 电泳图

1. 大脑; 2. 肺; 3. 小肠; 4. 脾; 5. 肾; 6, 7. 肝; 8. 心; 9. 卵巢; 10. 肌肉; 11. 血浆; 12. 红细胞(溶红细胞); 13. 血清

否完全有关。

Grunde 和 Bellen 等认为^[6]在 PAGE 中靠近阴极的酶带是由酯酶的 Es-1 基因位点所决定, 并且 Es-1 决定的酯酶同工酶只分布在红细胞、血清、肾、肝、脾组织中, 以图 1 和表 1 可以看出, 对中国本兔不同组织的 PAGE, 可以将酶带分为两大部 (Rf0.39—0.67 和 Rf 0.13—0.39), 其中靠近阴极的部分 (Rf0.39—0.70) 与 Grunde^[6] 等描述的一致, 都是由三条酶带所组成, 亦可以认为是由 Es-1 基因位点所决定的, 但除 Grunde 等所描述的组织有 Es-1 活性外, 心、肺、肌肉、十二指肠、卵巢、大脑、肾也有这种同工酶的分布。

在 PAGE 中靠近阳极 (Rf0.13—6.39) 的部分, 不同组织的酶带的数目相差甚远, 这可能是由酯酶同工酶的其他基因位点 (如 Es-2, Es-3 等) 所决定, 并且存在组织的特异性。

通过对 10 只中国本兔 12 种组织的 PAGE

分析, 发现不同个体的同一组织酯酶同工酶的酶谱基本一致, 为进一步研究不同品系家兔的遗传关系提供了有用的分析指标。

参 考 文 献

- [1] 杨幼凤等 1988 蛋白质电泳在动物分类学中的应用 动物学杂志 23 (3): 46—50。
- [2] 施新猷 1989 医用实验动物学 50—52 陕西科学技术出版社。
- [3] 聂崇兴 1987 凝胶电泳的凝胶浓度和交联度的正确选择 生物化学与生物物理进展 1: 50—53。
- [4] 黄民生等 1988 滇池高背鲫和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶同工酶的比较研究 动物学研究 9 (1): 69—73。
- [5] Fox R. et al. 1979 Chromosomal homology of Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) linkage group VI with rodent species. *Genetics* 93(1): 183—188.
- [6] Grunder A. A. et al. 1965 Genetic variation in red cell esterases of Rabbit, *Genetics* 52: (1) 1345—1353.
- [7] Stephen J. O. Brier. 1982 A compilation linkage and restriction maps of genetically studied organisms. *Genetic Maps* 2: 304—307.