维普资讯 http://www.cqvip.com

兽类学报1989.9 (1) :63—67
Acta Theriologica Sinica

秦岭地区大林姬鼠（*Apodemus peninsulae*）的酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶的研究*

马莱龄　陈月仙　李绍文　　李举怀
（北京大学生物系）　　（北京市农林科学院）

摘　要

用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分析了大林姬鼠（*Apodemus peninsulae*）心、肝、脾、肾和腿肌的α—酯酶、β—酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶。结果表明3种同工酶的活性在5种器官组织中均有明显差异，其中以肝组织的酯酶活性最高；不同器官组织的酶谱也有明显差别，如脾的β—酯酶仅有B区带；同一器官组织通常以α-酯酶活性高于β-酯酶。苹果酸脱氢酶在碱性溶液中染色，肝组织有明显的AB区。心肌与腿肌的苹果酸脱氢酶活性略高于其他组织。

关键词（Key words）：大林姬鼠（*Apodemus peninsulae*），α-酯酶（α-Esterase），β-酯酶（β-Esterase），苹果酸脱氢酶（Malate dehydrogenase），同工酶（isozyme），组织特异性（Tissue specificity）。

自50年代同工酶被发现后，已有不少作者（Mess,1979；Rider等，1980）较全面地阐明同工酶的特性和机制。迄今，从无脊椎动物到脊椎动物利用同工酶进行分析研究已有不少工作（李绍文等，1987；杨兴棋等，1984；熊全沫等，1985；Parchment等，1984；Valero等，1983）。实验结果表明同工酶不但具有种的特异性，同时也具有器官特异性。同工酶是由染色体上不同的基因座位编码，可以说，同工酶所反映的物种遗传特性和生理特性可靠。现在各种动物同工酶的研究已成为种属鉴定与分类的一种重要生化手段。

本实验用板状聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳研究了我国秦岭地区大林姬鼠（*Apodemus peninsulae*）3种同工酶的特点，分析了3种同工酶在各器官组织中分布的特异性，为形态分类学与物种进化提供了生化指标依据。关于大林姬鼠同工酶方面的研究，国内外文献中至今未见报道。

材料和方法

实验材料　大林姬鼠采自秦岭山脉南坡。

* 本实验的野外工作得到陕西省汧县长青林业局的大力支持，特此致谢。
本文于1987年9月29日收到。

维普资讯 http://www.cqvip.com

样品制备 新鲜取材。心、肝、脾、肾和腿肌各称取0.1克，各加0.2毫升提取液（0.05摩每升Tris-HCL缓冲液，pH6.5—7.0 含0.25%Triton X-100）。组织块在冰浴中匀浆，匀浆液用二层擦镜纸过滤。

点样 取10微升样品液滴在样纸上（10层擦镜纸4×5毫米）。样纸置胶板距负极1/3处。正极用1摩每升MH_3PO_4溶液浸湿的3层滤纸覆盖，负极用1摩每升NaOH溶液浸湿的3层滤纸覆盖。

电泳 按照Vesterbery（1971）和Wrigley（1971）的方法制成胶板。丙烯酰胺浓度为6.7%，交联度为3.4%，Ampholine（购自北京中国军事医学科学院）pH为3.5—10，其使用浓度最终为2.7%。胶板大小为85×60毫米，其厚度为1毫米。电泳条件参照李绍文等（1985）。

染色方法 α-酯酶 缓冲液为0.1摩每升NaOH-丁烯二酸，pH6.0，底物为乙酸·α·萘脂，10毫克溶于2毫升正丁醇中，染液为固蓝RR盐（重氮固蓝），10毫克溶于5毫于pH6.5磷酸缓冲液，室温下染色。

β-酯酶除以乙酸·β·萘脂代替乙酸·α·萘脂外，同α-酯酶染色。

苹果酸脱氢酶（MDH）辅酶I（NAD）10毫克，氯化硝基四氮唑蓝（NBT）10毫克，甲硫酚嗪（PMS）0.5毫克，Tris—HCl缓冲液pH7.0与pH8.4，NaCl6.6毫克，水13毫升，37℃水浴保温至条带清晰。

pH值测定 停止电泳后，从胶板一侧切下0.5厘米宽1窄条，然后每隔0.5厘米切成小块，将每小块按顺序从负极到正极放入微孔板的小孔中，每孔事先加入0.3毫升重蒸水，浸泡10分钟，然后用玻棒搅匀，依次测定pH值，并画在方格纸上。

结 果

对秦岭地区大林姬鼠的心、肝、脾、肾和腿肌5种组织，进行α-酯酶（α-Esterase简称α-Est），β-酯酶（β-Est）和苹果酸脱氢酶（Malate dehydrogenase简称MDH）板状等电聚焦电泳研究。经多次重复，酶谱结果一致，雌雄之间也未见有差异。发现各种酶的活性在不同组织中有较大的差异，各器官组织的酶谱有明显的不同。

1. α-Est 的酶谱分析

（1）大林姬鼠5种组织的α-Est同工酶谱如图1所示。α-Est酶谱的酸碱度迁移范围是pH2.7—6.0。根据各酶带所占据的pH范围，可将α-Est分为5组活性区，即α-Est. A. B, C, D, E。

α-EstA区位于pH2.7—3.1。A区在肝中有A_1和$A_2$2条带，其它4种组织都是3条带。心肌A_1、A_2和A_3连成片且着色很深。α-EstB区位于pH4.4—4.6，有5条带。5种组织都有B_4和$B_5$2条带。脾中缺B_1条带，其它4条带连成片，也形成染色很深的区域。心肌和腿肌缺B_1和B_3条带。肝缺B_2和B_3条带肾缺，B_2条带，其中B_3和B_4连在一起着色较深。α-EstC区位于pH4.6—5.1，该区有8条带，可分为2个主带区。5种组织都有染色较深的C_1条带，形成C区第1个主带区。C_2至C_8在肝中连片形成了着色深而宽的第2个主带区。在第2个主带区中各组织都有2条染色较深的C_4和C_5酶带。其它5条带各组织中分布也不相同。α-Est D区位于pH5.1—5.5，有2条带。各组织均有D_1条带。脾、肾和腿肌缺D_2条带。α-EstE区位于pH5.5—6.0，共有6条带。各组织都有着色较浅的E_1条带。E_2至$E_6$5条带在肝和脾中都有，而且肝中的酶带着色比脾深。肾有E_1，E_3和$E_6$3

维普资讯 http://www.cqvip.com

条带。心肌和腿肌除了E_1条带外，其它5条均无（图版1—1）。

（2）5种组织α-Est各区的染色强度差别也很大。α-Est A区染色较深的是心肌和腿肌。表明肌肉系统中α-Est活性最高的是在pH2.7—3.1区域，属强酸性。α-Est B区着色深而宽的是脾。表明造血器官脾脏的α-Est活性最高区是在pH4.4—4.6区域，偏酸性。α-Est C、D、E 3个区着色最深的是肝，尤其是C区和E区。肝中有若干着色很深的条带成形了很宽的活性区域。表明肝的α-Est活性区是pH 4.4—6.0。其它组织的E区染色很浅，仅隐约可见。实验结果表明肝中α-Est活性最高，其次是肾、脾。心肌和腿肌中α-Est活性较低。

2. β-Est的酶谱分析

（1）大林姬鼠5种组织的β-Est酶谱(图版Ⅰ—2)不同于α-Est酶谱，二者差异很大。β-Est酶谱的酸碱度迁移范围为pH4.4—6.5。与α-Est酶谱区带对应比较，缺pH2.7—3.1的A活性区，只有B、C、D和E4组活性区。β-EstB区有5条带，心肌5条带连片形成着色很深的区域，其它组织只有3或4条带。β-Est C区有5条带，在肝中5条带连片形成着色极深的区域。肾虽然也有5条带，但其中3条带仅隐约可见。脾无C区带。心肌和腿肌分别有3条带和4条带。β-Est D区唯有肝有1条着色极深的条带内，其它4种组织均无。β-Est E区有6条带，5种组织中只有肝组织可见到清晰的6条带，肾可隐约见到E_1、E_3、E_4和$E_6$4条带，心肌、脾和腿肌均无E区带。

（2）β-Est的活性在各组织中差异也显著（图版Ⅰ—2）。根据染色强度的初步分析，心肌、腿肌和肾的β-Est活性区是在pH4.4—5.1，偏酸性。脾只是在pH4.6—4.8范围，表明脾中可能只含有一种偏酸性的β-Est。肝的活性范围是在pH4.4—6.5，其中活性最高区是pH4.6—5.5。实验结果说明肝中β-Est活性最高，腿肌的β-Est活性最低。

3. MDH酶谱分析

动物组织中存在两种类型的MDH同工酶即线粒体型（Mitochondrial type简称m-MDH）和可溶性型（Soluble type简称s-MDH）。大林姬鼠的MDH染色时间pH7.0的中性缓冲液和pH8.4的碱性缓冲液染色都可以看到向阳极迁移的s-MDH和向阴极迁移的m-MDH。

（1）MDH同工酶在中性缓冲液中染色，其酶谱的酸碱度迁移范围是pH4.6—7.5，呈明显的2个主区(图版Ⅰ—3)。A区位于pH4.6—5.1，B区位于pH7.0—7.5。A区有4条带，心和腿肌的4条带染色都很深，肝、脾和肾只有3条带，且着色均较浅。B区有4条带，5种组织都有2条染色很深的B_2和B_3条带。但心肌和腿肌的B_2、B_3和B_4连成片且着色极深。

（2）MDH同工酶在碱性缓冲液中染色，其迁移所跨范围为pH4.6—8.5。显现出3个主区。除两端的A和B区外，出现中间型AB区。A区pH4.6—5.5，AB区pH5.7—6.5，B区pH7.0—8.5(图版Ⅰ—4)。A区有4条带，5种组织的第3条带宽而深，唯脾窄而浅，并缺第4条带。AB区有4条带，除脾脏无AB区各带外，其它4种组织都有，但条带数目差异较大，唯在肝中可见到清晰的4条带，该区酶着纸浅于A和B区。B区有4条带，染色均很深，且前3条带几乎融成一片，仅脾脏染色较浅。5种组织中唯肝组织有1条偏碱性的B_4区带，位于pH8.5。

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

1。5种组织之间的和的α-Est和β-Est的酶谱均有很大的差异，即使同一组织这2种酶的酶谱也有很大的不同。各活性区的酶带数目差异也很明显，从而推测这2种酯酶的组成成分不相同，各组织中所含的酯酶成分也十分不同。

2。各组织的α-Est和β-Est都有独自的染色最深的区带。这一现象在某些组织中2种酯酶很相似，例如脾组织的2种酯酶染色最深，亦即活性最强的是B_3和B_4条带。而某些组织这2种酶又有很大的差异。如肾的α-Est有7条染色极深的条带（B_3、B_4和C_1至C_5）。而其β-Est仅有4条深染条带（B_3、B_4和C_2、C_3）。以上结果不仅表明2种酯酶组成不同，而且也显示出同一组织中2种酶的活性也不同。总之，同种组织中α-Est活性离子高于β-Est活性。

3。结果表明大林姬鼠AB区的MDH是偏碱性的酶，只在碱性条件下才能催化底物。因此，可认为哺乳动物的MDH在碱性溶液中染色较为适宜。

4。中埜荣三等（1966）用聚丙烯酰胺凝胶和淀粉凝胶电泳方法，认为MDH同工酶在哺乳类中几乎不随组织出现差异。但本实验用板状等电聚焦电泳分析，发现MDH同工酶同样存在组织的特异性。如在碱性缓冲液中染色，肝有AB区带而脾无。又如肝组织中有一条pH8.4的B_4区带而其它组织缺，可以说明等电聚焦电泳方法的灵敏性较之上述另两种方法为高。另外，各组织酶带分布的数目也很不一致。这均表明MDH同工酶在组织之间同样存在有较大的差异。

综上所述，α-Est、β-Est和MDH3种同工酶都存在明显的组织特异性。各组织因功能不同其酶活性也不同，如肝组织中，酯酶活性高于其它4种组织；心肌与腿肌需释放大量的能量以满足运动需求，因而MDH同工酶活性比其它3种组织显得略高。

参 考 文 献

李绍文、孟玉萍、张宗炳，李举怀 1985 蜜蜂酯酶同工酶的研究。昆虫学报28（1）：369—374

李绍文、孟玉萍、张宗炳、李举怀 1987 膜翅目昆虫酯酶同工酶的比较研究。昆虫学报30（3）：266—270

杨兴棋、邓初夏、陈宏溪 1984 几种罗非鱼乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶的电泳研究。遗传学报11（2）：132—140

熊金珠、夏盛林 1985 中国胭脂鱼同工酶的研究。动物学报31（1）：20—27。

中埜荣三、山本定明 1966 蛋白质核酸酵素11（11）：1011—1021。

Moss,D.W.1979 Isoenzyme Analysis.The Chemical Society.Lordon Great Britain 37—63.

Parchment,R.E.and A.M.Benson 1984 Glutathione S-transferase isozyme of mouse intestine: Differential induction by 2(3) tert-butyl-4-hydroxyanisale.*Biochem.Biophys.RES Commun* 118(3):1015—1021.

Rider,C.C.and C.B.Taylor 1980 Isoenzymes.Chapman and Halt.New York U.S.A.14—17, 75—78.

Valero,A., R.Hermoso and M.Monteoliva 1983 Electrophoretic studies on some species of cestodes. *Rev.Iber.Parasitol* 43(1):89—92.

Vesterbery, O.1971 Isoelectric focusing of proteins.*Methods Enzymol* 22:389—412.

Wrigley,C.W.1971 Gel electrofocusing.*Methods Enzymol* 22:559—564.

维普资讯 http://www.cqvip.com

外文摘要 (Abstract)

STUDIES ON THE ESTERASE AND MALATE DEHYDROGENASE ISOZYME ZYMOGRAMS OF *APODEMUS PENINSULAE* OF THE REGION QIN LING

MA Lailing CHEN Yuexian LI Shaowen
(Department of Biology, Peking University)
LI Juhuai
(Beijing Municipal Academy of Agricultural and Forestry Sciences)

The thin-layer isoclectric focusing clectrophoresis with polyacrylamide gel method were used to analyse the α-Esterase (α-Est),β-Esterase (β-Est) and Malate dehydrogenase (MDH) isozymes in the five kinds of tissues of *Apodemus peninsulae*. The samples covered heart,liver,spleen,kidney and muscle.The results show that all the three kinds of isozyme have obvious tissue specificity.There are clear different enzyme activities in the five tissues.The Esterase activity in liver is higher than in other four tissues.The zymograms in the different tissues have distinct differences as well.Spleen is different from other tissues, its β-Est only existing in region and band B. In the same tissue, the α-Est and β-Est are different too. Normally, the activity of α-Est is higher than of β-Est.The MDH of liver has an evident region AB when it is stained in alkaline solution,but spleen has none.The MDH activities of heart and muscle are a little higher than of other tissues.