

# 草鱼 LDH 同工酶比较酶学 和免疫化学性质

薛国雄 官 平 张燕生 杨 靖 赵淑慧

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

吴婷婷 夏德全

(淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

**提 要** 本文以草鱼为材料, 利用亲和层析法, 从肌肉、心脏和肝脏中分离纯化了 LDH 同工酶基因产物; LDH-A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub>, 并对其纯度, 氨基酸组成以及动力学性质进行了比较分析, 同时制取了 A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub> 的相应抗体, 利用抗原-抗体免疫吸附反应对一些淡水鱼类的 LDH 酶谱进行了准确的鉴定。

**关键词** 草鱼, 乳酸脱氢酶同工酶, 免疫吸附

鱼类 LDH 同工酶与哺乳类一样, 由 A、B、C 三个基因组成。这种多位点基因酶系在胚胎发育和细胞分化过程中表现出显著分化的基因调控方式, 而且它们的表达具有高度的发育特异性和组织特异性<sup>[1]</sup>。鱼类 LDH 同工酶基因结构和功能远比哺乳类复杂得多。在漫长的基因进化过程中, 原始鱼类只有一个 LDH-A 基因, 而 B 基因由 A 基因进化而来, C 基因由 B 基因进化而形成<sup>[4,12]</sup>。特别是 C 基因的表达更表明某些高度特化细胞所具有的独特代谢活动, 这对研究基因表达和调控的时空特异性, 是极好的指标。

鱼类的生存及进化与其所处生态环境密切相关。不同水域中的同种鱼, 同一水域中的不同种鱼, 由于氧含量、温度、水质等差异, 加之各自代谢类型的差异, 其同工酶基因表达均不同。在鱼类杂交育种中也显示出杂交 F<sub>1</sub> 代所显示的杂交优势与亲本的酶活高低, 酶谱差别具有平行关系(拟另文发表)。这种生理功能和酶组成及结构的不同是 LDH 同工酶分子进化中分子异质性的体现, 也是其相互间氨基酸组成、理化特性差异所致。因此, 准确了解鱼类 LDH 同工酶的理化性质, 对研究鱼类生理功能及结构关系、遗传和非遗传的起源、基因表达与调控以及发育、进化等方面的问题均有重要意义。

## 材 料 和 方 法

### (一) LDH-A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub> 的分离纯化<sup>[5,13]</sup>

1. LDH-A<sub>4</sub> 的纯化 取新鲜草鱼骨骼肌 50 克, 于缓冲液(20mM Tris, 1mM 巯基乙醇, 1mM 氟化苯甲基磺酸胺 pH8.6)中匀浆, 匀浆液 8.000×g 离心 30 分钟, 上清液过 Blue-Dextran 柱, 用上述缓冲液以不小于 5ml/min 的流速过柱, 直至 UV<sub>280</sub><

0.02OD。再用二倍床体积缓冲液(1mM NAD<sup>+</sup>, 1mM 乳酸锂, 10mM Tris, 0.5mM 巯基乙醇, pH8.6)洗脱, 以去除 LDH-B<sub>4</sub> 和含有 B 亚基的杂四聚体。然后用缓冲液(10mM/L Tris, 0.5mM/L 巯基乙醇 pH8.6)洗脱, 除去残留在柱内的 NAD<sup>+</sup> 和乳酸锂, 再用缓冲液(10mM/L NADH, 10mM/L Tris, 0.5mM/L 巯基乙醇, pH8.6)洗脱柱上的 LDH-A<sub>4</sub>, 收集含 LDH 活性流出液, 电泳鉴定后合并含有 LDH-A<sub>4</sub> 的部份, 加饱和硫酸铵至终浓度为 70%, 过夜沉淀。次日离心 13,000 R. P. M 4°C 20 分钟。用少量体积缓冲液溶解沉淀(即 LDH-A<sub>4</sub> 粗品), 装透析袋于上述缓冲液中透析过夜(4°C)。再上 DEAE-Sephadex A-50 柱(预先平衡好), 用缓冲液(10mM/L Tris, 0.5mM/L 巯基乙醇 pH8.6)洗脱, 同时监测酶活, 直至流出液酶活小于 0.3U/ml, 合并 LDH 活性部份, 加饱和硫酸铵至终浓度为 70% 浓度, 过夜沉淀(4°C)。经溶解、透析后即纯化后的 LDH-A<sub>4</sub> 纯品, -70°C 保存备用。

**2. LDH-B<sub>4</sub> 的纯化** 20 克新鲜鱼心肌经生理盐水洗去血污后, 在缓冲液 A(20mM/L Tris, 1mM/L 巯基乙醇 pH8.6)中匀浆, (W:V = 1:5)匀浆液经 14,000 × g 离心 30 分钟(4°C)。上清用纱布过滤后直接加入至预先平衡好的 Blue-Dextran-Sephadex 4B 柱上, 用上述缓冲液以 5ml/min 速度洗脱, 直至流出液的 UV<sub>280</sub> < 0.02OD 为止。再以线性梯度亲和洗脱(起始浓度为 0.01mM/L NAD<sup>+</sup>, 0.01mM/L 乳酸钠溶于 1mM/L 巯基乙醇和 20mM/L Tris 缓冲液中。终浓度为 0.12mM/L NAD<sup>+</sup>, 0.05mM/L 乳酸钠)。中速洗脱, 收集第一个且白峰, 用 75% 硫酸铵终浓度沉淀, 4°C 过夜后离心 10,000 × g 4°C 20 分钟, 沉淀溶于缓冲液 A 中, 用缓冲液 A 透析 24 小时, 再用 PEG 6000 浓缩至所需浓度(2mg/ml 左右), 此为 LDH-B<sub>4</sub>。

**3. LDH-C<sub>4</sub> 的纯化** 120 克草鱼新鲜肝脏, 用生理盐水洗除血污后, 于缓冲液 B(10mM/L 磷酸缓冲液 pH7.1, 1mM/L 巯基乙醇)中匀浆(W:V = 1:4), 经 30,000 × g 4°C 离心 2 小时后, 用 4—8 层纱布滤掉上清液中脂肪, 重复上述离心一次, 该上清液直接上柱, 基本方法参照 B<sub>4</sub> 纯化步骤但缓冲液需改为 B。线性梯度洗脱液为缓冲液 B 及缓冲液 B 中含 0.5mM/L 氯化钠, 收集的且白峰再过 Sephacryle S-200 柱 DEAE-Sephadex A-50 柱, 二个柱的缓冲液均为 B。收集到的 LDH 活性峰即为 LDH-C<sub>4</sub> (全过程在 4°C 中进行)。

## (二) 免疫抗体的制备和抗血清效价测定

将纯化的 LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 分别注射到大耳白兔(New Zealand White)的脚趾和背部皮下多点注射, 每星期一次, 四星期后按常规方法获得抗血清。当抗血清的效价经免疫双扩散测定达到 1/16—1/32 时即可杀兔采血, 否则需加强免疫。合格的抗血清提取其抗体 IgG(最后浓度为 5—6mg/ml) 即可进行抗原-抗体的免疫吸附反应。抗原与抗体的比例为 1:0.5—1.5。抗原与抗体混合物在 37°C 保温 5 分钟后离心 10,000 R. P. M 15 分钟, 取上清进行淀粉胶电泳。

## 结 果

### (一) LDH 的理化特性

1. 经上述方法纯化后的 LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 用淀粉胶电泳分析均为一条带。

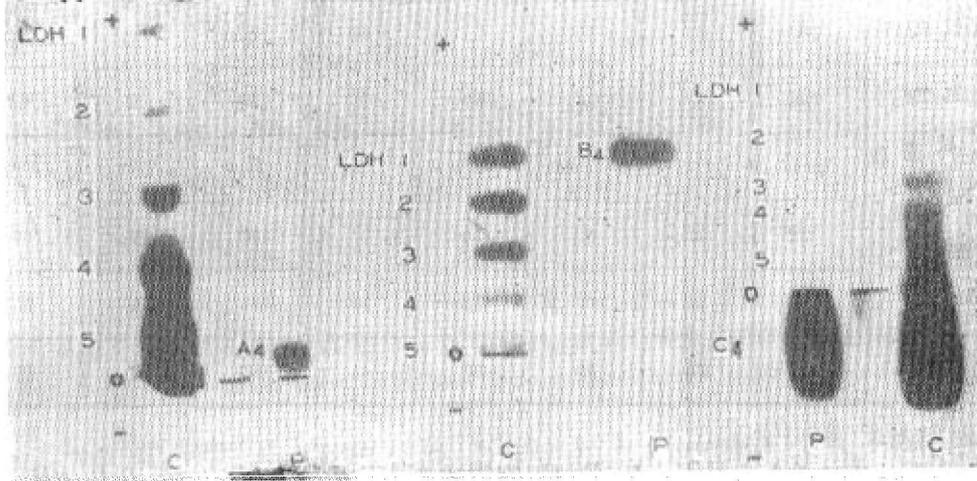


图 1 纯化前后的 LDH 图谱

Fig. 1 LDH pattern before and after purification

LDH-A<sub>4</sub>(骨骼肌), LDH-B<sub>4</sub>(心肌), LDH-C<sub>4</sub>(肝脏); C—纯化前, P—纯化后

2. LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 经 SDS 电泳测定它们的亚基分子量分别为 35,000、35,000、及 34,000 道尔顿。

3. LDH 氨基酸组成。用 HPLC 测定 LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 自由氨基酸组成,测定是以 LDH 四聚体分子量为 140,000 道尔顿计算。取 3 次测定的平均值,小数点后不计。

测定结果表明, A、B、C 三种亚基氨基酸种类和氨基酸数有显著差异,是三种不同基因产物。

4. 酶动力学性质测定结果。经过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算, LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 的 km 值分别为 0.5mM/L, 0.4mM/L, 和 0.42mM/L<sup>[2]</sup>。

底物浓度对酶促反应的影响 在一定的浓度情况下, LDH-A<sub>4</sub> 最适底物丙酮酸钠浓度为 0.7mM, LDH-B<sub>4</sub> 最适底物乳酸钠浓度为 40mM, LDH-C<sub>4</sub> 最适底物丙酮酸钠浓度为 0.85mM。这表明 B<sub>4</sub> 与辅酶的亲和力最大,受底物抑制程度也最大,而 C<sub>4</sub> 与辅酶亲和力最小,对底物抑制程度最不敏感。

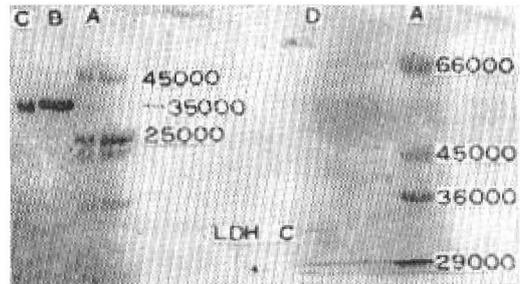


图 2 由 SDS-PAGE 测定的 LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 的分子量

Fig. 2 Molecular weights of LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, by SDS-PAGE

A. 标准蛋白, B. LDH-A<sub>4</sub>,  
C. LDH-B<sub>4</sub>, D. LDH-C<sub>4</sub>

表1 LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 氨基酸组成分析(MW = 140000 道尔顿)Table 1 Amino acid compositions of LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, by HPLC (MW = 140000 Da)

氨基酸 数目	氨基酸							
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val
LDH-A <sub>4</sub>	111	54	81	88	101	68	—	104
LDH-B <sub>4</sub>	105	60	90	94	99	67	—	97
LDH-C <sub>4</sub>	102	92	74	104	106	56	2	63
氨基酸 数目	氨基酸							
	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
LDH-A <sub>4</sub>	22	32	89	15	14	165	79	69
LDH-B <sub>4</sub>	0	38	107	36	14	111	109	55
LDH-C <sub>4</sub>	18	81	89	23	41	100	17	39

酸碱度对酶促反应的影响 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 的最适 pH 分别为 pH7.4、pH10.0、pH7.0。这表明了它们活性中心微环境的带电状况不同。

温度对酶促反应影响 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 三者最适反应温度均为 55°C, 高于生理温度, 说明该酶系分子具有很大的耐热性, 利用这一特点, 我们在样品电泳前, 先在 60°C 情况下将样品加热 2 分钟, 以增加染色后的清晰度。

脲对酶促反应的影响 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 对脲的抑制敏感性均一致, 从脲浓度高于 3M 起,

酶促反应急剧下降, 脲的解聚作用使四聚体分子解聚成无生物活性的单体亚基, 表明这三种亚基在各自间相结合的方式和程度上的一致性。

## (二) 免疫化学测定

当 LDH 不同亚基和相应的抗体在一定温度、浓度条件下进行免疫化学反应, 形成抗原-抗体复合物沉淀。经离心去除后, 反应的上清液经电泳及染色后, 相应的 LDH 亚基将不显示, 因而达到鉴定酶谱的目的。下面是不同的 LDH 同工酶抗体和不同种类鱼及不同组织的免疫吸附图。

图 3 中显示凡含 A 亚基的聚合体均被吸附, 留下的为 B<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub> 四聚体带。

图 4 中显示凡含有 A 亚基的聚合体酶

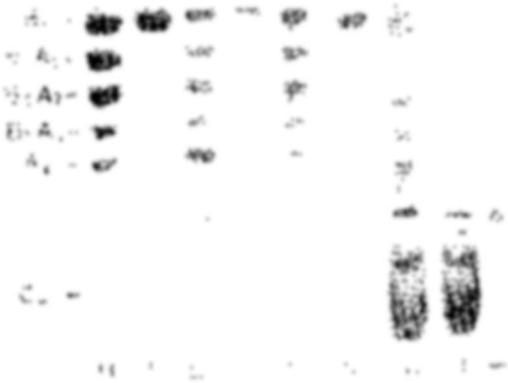


图3 团头鲂组织LDH和A<sub>4</sub>抗体IgG免疫吸附图

Fig. 3 Electrophoretogram of LDH from megalobrama amblycephala after immunoadsorption by IgG of LDH-A<sub>4</sub>

免疫吸附前: H—心肌, E—眼, B—脑, L—肝;

免疫吸附后: h—心肌, e—眼, b—脑, l—肝

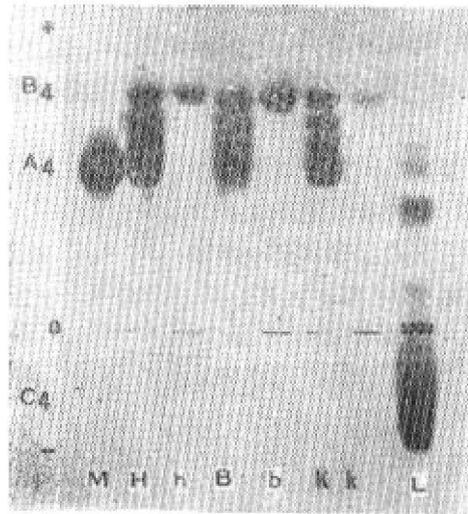


图4 白鲢几种组织中 LDH 与草鱼 LDH-A<sub>4</sub> 抗体 IgG 免疫化学反应前后酶谱

Fig. 4 Electrophoretogram of LDH from *Hypophthalmichthys molitrix* after immunoadsorption by IgG of LDH-A<sub>4</sub>

M. 正常肌(白肌)LDH, H. 正常心肌 LDH, B. 正常脑 LDH, K. 正常肾脏 LDH, L. 正常肝脏 LDH, h. 正常心肌 LDH + LDH-A<sub>4</sub> 抗体 IgG, b. 正常脑 LDH + LDH-A<sub>4</sub> 抗体 IgG, k. 正常肾脏 LDH + LDH-A<sub>4</sub> 抗体 IgG

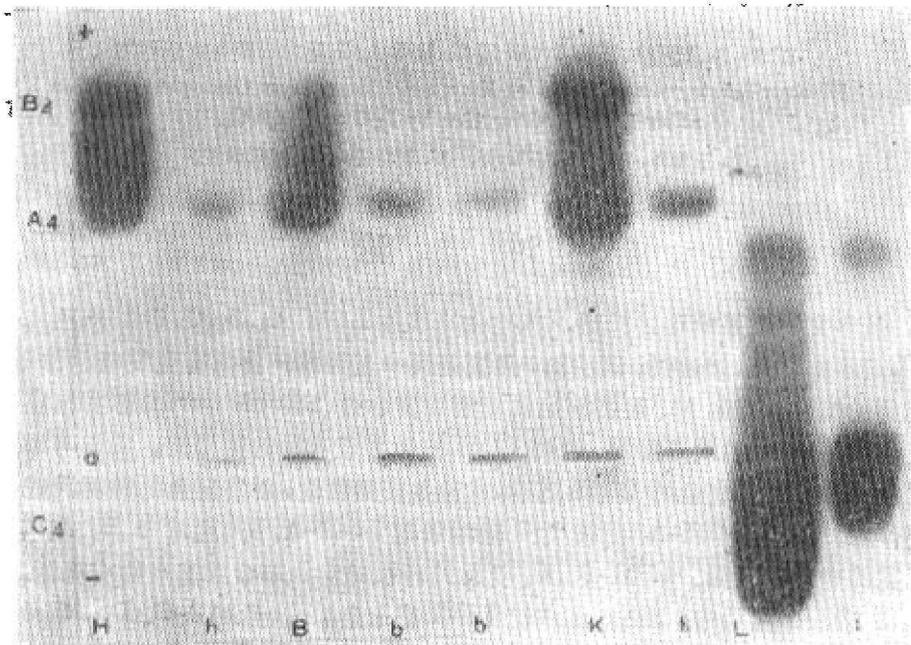


图5 白鲢组织 LDH 和 B<sub>4</sub> 抗体 IgG 免疫吸附图

Fig. 5 Immunoadsorption pattern from *Hypophthalmichthys molitrix*

吸附前: H—心, B—脑, K—肾, L—肝;

吸附后: h—心, b—脑, k—肾, l—肝。

带均被吸附,而留下  $B_4$ 。

图 5 中显示出经  $B_4$  抗体吸附后,仅留下  $A_4$  和  $C_4$  酶带。

图 6 中表明,肝脏的(-)极区为  $C_4$  带,而在肾脏由→显示的二条带为含有 C 亚基之杂四聚体带。

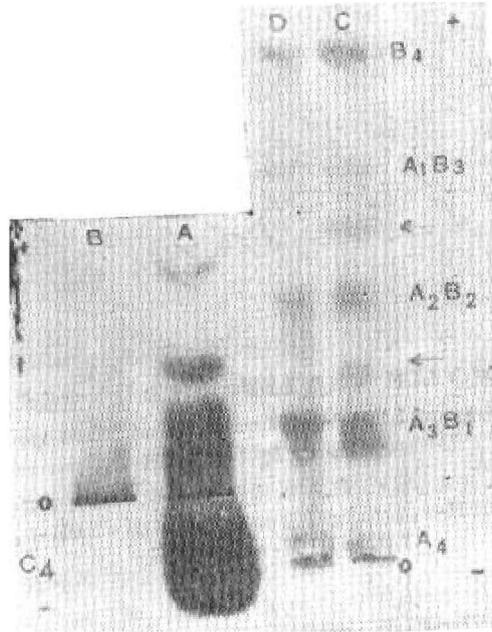


图 6 草鱼肾脏、肝脏 LDH 经  $C_4$  抗体 IgG 反应后的免疫吸附图

Fig. 6 Electrophoretogram of LDH of liver and kidney from *Ctenopharyngodon idellus* after immunoadsorption by IgG of LDH- $C_4$ .

A. 正常肝, B. 吸附后的肝, C. 正常肾, D. 吸附后肾。

## 讨 论

1. 从本文的结果中可以看到,当纯化的草鱼 LDH- $A_4$ 、 $B_4$ 、 $C_4$  同工酶及其相应的抗体 IgG,对不同种鱼,如白鲢、团头鲂,只要是同一基因的产物都有免疫吸附作用。同样,利用这样的抗体,对鲤、鲫、鳊甚至鳊和奥利亚罗非鱼(*Tilapia auria*)都有相应的免疫吸附作用,并且能准确地地区分酶谱,说明 LDH 抗体并没有种的特异性。我们可以利用同一种鱼的抗体来鉴定其它鱼的 LDH 图谱,这种免疫同源性,对鉴定鱼的种群及进化关系将有重要作用。同样,LDH- $A_4$  抗体 IgG 除能吸附 LDH- $A_4$  外,也对  $A_3B_1$ 、 $A_2B_2$ 、 $A_1B_3$  中含 A 亚基的产物有吸附。LDH- $B_4$ 、 $C_4$  抗体同样也对含 B 和 C 亚基产物有吸附。

2. 在我们的实验中,草鱼肾脏组织 LDH 有七条酶带(见图 6-C、D),其中  $B_3A_1$  和  $B_2A_2$  之间的多余带过去称之为 LDH-X,认为可能是 LDH-C 或者是和其它的亚基形成的杂合四聚体<sup>[1,9,14]</sup>。而  $B_2A_2$  和  $B_1A_3$  之间的多余带,有些作者只在少数鱼中观察到,但尚未见到这二条多余带在同一种鱼的同一种组织中出现的报导。我们的实验则表明,只要仔细地做好实验,在绝大多数草鱼肾脏组织中,这二条酶带均会同时出现。利用草鱼

LDH-A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 的抗体 IgG 分别对这二条多余带进行免疫吸附反应, 发现 LDH-A<sub>4</sub> 抗体 IgG 与这些带没有免疫吸附反应, 而用 LDH-B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> 抗体 IgG 分别去吸附, 则发现均有免疫吸附作用。这就证明肾中的多余带只能是 LDH-C 亚基与 LDH-B 亚基的杂合四聚体。

3. 相对说, LDH 同工酶的研究比起其它类型同工酶是很完善了, 但目前仍然有不少的新观点。本文曾提及, 鱼类 LDH-B 亚基是由 A 亚基进化而来, C 亚基则由 B 亚基进化而形成。但在某些低等的软骨鱼类, 有的只有单一型的称之为 A 型的亚基, 它们的理化特性和免疫化学性质相似于高等硬骨鱼类的 C 型亚基。因此有人推断, C 亚基还早于 B 亚基发生<sup>[6,7]</sup>。也有人认为 LDH-A、B、C 三个基因可能都来自同一个原始基因, 由于突变产生了结构和功能上的分化, 基因调控也就产生了分化和特化, 并分别位于不同的染色体上, 因而这三个基因是独立调节的。从哺乳类来看, 小鼠 LDH-A 和 C 基因连锁在 7 号染色体上, B 基因在 6 号染色体上。人 LDH-A 和 C 基因连锁在人 11 号染色体上, B 基因位于 12 号染色体上<sup>[8]</sup>。还证明 LDH-A<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub> 在蛋白质的编码区的同源性高于和 LDH-B<sub>4</sub> 的同源性<sup>[11]</sup>, 因此认为 C 基因由 A 基因进化而来。但在鱼类, 尚无明确的 LDH 基因定位工作。

4. 已有发现, 大鼠肝 LDH-A<sub>4</sub> 具有与单链 DNA 结合能力<sup>[15]</sup>。人、小鼠和牛中也有这种现象, 推测 LDH 分子在 DNA 复制和转录方面起着某种调控作用。还有人发现鸭晶状体  $\epsilon$ -晶体蛋白就是 LDH-B<sub>4</sub>, 具有结构蛋白作用<sup>[10]</sup>。类似的新问题不少, 但均局限在哺乳类, 鱼类也无相似的报道。至今为止尚未有一完整的涉及鱼类 LDH 三种基因的克隆。因此完成鱼类 LDH 理化性质的研究和免疫化学性质的探讨, 显然为研究鱼类 LDH 分子生物学的诸领域开辟了重要途径。

### 参 考 文 献

- [1] 李思发等, 1990. 长江, 珠江, 黑龙江鲢、鳙, 草鱼种质资源研究. 61—101. 上海科学技术出版社.
- [2] 张龙翔等, 1981. 生化实验方法和技术, 145—151. 高等教育出版社(京).
- [3] 吴力钊等, 1987. 草鱼同工酶发生遗传学研究. 遗传学报, 14(4): 278—286.
- [4] 薛国雄, 1981. 从 LDH 同工酶看基因进化. 生物科学动态, (5): 16—21.
- [5] 薛国雄等, 1991. 鱼类 LDH 同工酶 B<sub>4</sub> 性质的研究. 核农学报, 5(1): 81—86.
- [6] Aendris, W. et al., 1988. Duck Lens  $\epsilon$ -crystalline and LDH-B<sub>4</sub> are identical: a single copy gene product with two distinct functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7114—7118.
- [7] Baldwin, J. et al., 1987a. Immunochemical evidence that the single LDH of lampreys is more similar to LDH-B<sub>4</sub> of hagfish. *J. Exp. Zool.* 241: 1—8.
- [8] —, 1987b. LDH Homopolymer of hagfish heart and the single LDH of lampreys display greater immunochemical similarity to LDH-C<sub>4</sub> than to LDH-B<sub>4</sub> of teleost fish. *Ibid.*, 242: 99—102.
- [9] Edwards, Y. H. et al., 1987. Locus determining the human sperm-specific LDH-C is syntenic with LDH-A. *Devel. Genet.*, 8: 219—232.
- [10] Goldberg, E. et al., 1977. *Isozymes: Current Topics in biological and Medical Research*, 1: 79—124. New York: Alan R Liss, 79—124.
- [11] L. S. S. -L, et al., 1989. Structure and expression of mammalian LDH gene A (muscle), B (heart) and C (testis). *J. Cell. Biol.*, 107: 523—526.
- [12] Markert, C. L. et al., 1975. Evolution of a gene. *Science*, 189: 102—114.
- [13] Ryan, L. D. et al., 1974. Rapid purification of LDH from rat liver and hepatoma, a new approach.

*Arch. Biochem. Biophys.*, 169: 279—284.

- [14] Whitt, G. S. *et al.*, 1970. Development genetic of LDH isozymes of fish. *J. Exp. Zool.*, 175: 1—36.  
[15] Williams, K. R. *et al.*, 1985. Identification of nucleic acid helix-destabilizing protein from rat livers as LDH-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5260—5264.

**THE COMPARATIVE ENZYMOLOGY AND  
IMMUNOCHEMICAL PROPERTY OF LDH  
ISOZYMES FROM GRASS CARP  
*CTENOPHARYNGODON IDELLUS***

Xue Guoxiong, Guan Ping, Zhang Yansheng, Yang Jing and Zhao Shuhui

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Wu Tingting and Xia Dequan

(*Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081*)

**ABSTRACT** LDH-A<sub>4</sub> (from muscle), LDH-B<sub>4</sub> (from heart) and LDH-C<sub>4</sub> (from liver) were isolated from grass carp by affinity chromatography. Their purities, amino acid compositions and enzymatic dynamics were comparatively studied. It can be confirmed by the obvious differences of the amino acid composition that they are three different gene's products. In the meantime their relevant antibodies were respectively prepared, and the typical and specific patterns of LDHs from some fish by the results of antigenantibody immunoadsorption reactions were precisely determined, going further into the syngeny between the LDH isozyme molecules of various source and the immunal syngeny of various LDH isozyme molecules.

**KEYWORDS** *Ctenopharyngodon idellus*, grass carp, LDH isozymes, immunoadsorption