

家鸡 LDH 同工酶的发生遗传学分析

马建岗 邱 怀

(西北农业大学畜牧系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 采用不连续缓冲系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE法), 结合组织特异性染色和酶谱区带活性扫描技术, 对家鸡胚胎期和生后期不同生长发育阶段各组织器官的乳酸脱氢酶(LDH)同工酶进行了测定。结果表明, 鸡胚胎期B型LDH同工酶占优势(51.4~99.8%), 生后期则有3种不同表现: 心、眼、脑组织继续保持B亚基的优势地位; 肝、肾组织呈现B型酶含量的微弱上升; 胸肌则发生B型酶到A型酶的颠倒转换。LDH同工酶的这种表达特征是 *ldh a* 和 *ldh b* 基因实施调控的结果, 有利于家鸡各组织在代谢过程中产生足够的能量。

关键词 家鸡, LDH 同工酶, PAGE, 颠倒转换, 基因调控

乳酸脱氢酶(LDH)同工酶是生物体内能量代谢过程中一种非常重要的酶类, 过去几十年间已对其遗传基础、亚基组成及生物学特征^[1~3]等方面进行了广泛的研究, 近年来又成为人们进行动物发生过程中基因表达与调控分析的良好模型^[4,5]。研究中所涉及的动物包括模型动物^[6]、水生动物^[4]和哺乳类动物^[7,8], 虽也有对鸟类动物LDH同工酶发生遗传学分析的报道^[9], 但国内对家鸡不同生长阶段和不同组织器官LDH同工酶的研究却非常少见。本文报道了对家鸡同一生长阶段不同组织器官LDH同工酶的分化表达模式和鸡胚不同发育时期和不同生长阶段LDH同工酶的差别表达模式的分析结果, 旨在从分子角度为LDH同工酶与家鸡组织代谢特征和个体发生中同工酶的基因调控提供依据。

1 材料与方法

1.1 鸡胚培养 调恒温培养箱至 37.8℃, 内加水盘保持一定湿度, 一次上罗斯鸡种蛋 500 枚, 于次日开始每天定时取样, 即可得到发育 1~21 日龄的胚胎。

1.2 样品制备 将鸡的生长阶段划分为胚胎期、1 日龄、1 月龄、5 月龄和 500 日龄等阶段。1~16 日龄取全胚, 17~21 日龄胚胎以及生后 1 日龄和 1 月龄取心、肝、肾、胸肌、眼晶体、脑共 6 种组织; 5 月龄和 500 日龄再增加卵巢、睾丸、脾脏 3 种组织。每一阶段均取 5 个个体(3♂, 2♀), 制备 5 个重复样品, 取样量均为 1 g。样品先用生理盐水冲净血污, 后加等量 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 7.0)置玻璃研磨器内在冰浴上匀浆, 匀浆液置离心管中以 3000 r/min 在 4℃下离心 30 min, 倾上清液于小瓶中待测。

1.3 同工酶分离 采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE)对 LDH 同工酶进行分离。电泳条件、染色方法参照文献^[9~11]进行。

1.4 定量扫描 采用岛津 CS-930 型双波长薄层扫描仪对 LDH 同工酶进行 OD 值扫描,

* 马建岗现在厦门大学细胞生物学研究室工作。

** 收稿日期 1993-05-11。

记录扫描曲线与各吸收峰下相对面积。

2 结果

2.1 鸡胚早期发育过程中 LDH 同工酶表达的一般模式

鸡 1~16 日龄胚 LDH 同工酶的带型分布和 A、B 型酶所占的百分比如表 1 所示。由表 1 可见,在整个鸡胚的早期发育过程中,一直以 B 型酶占优势,尽管在幅度上有所波动。这种特征与一般鸟类动物相似^[5],而有别于其它哺乳类动物。

表 1 LDH 同工酶在鸡胚早期发育中的分布
Table 1 Distribution of LDH isozymes in the early developmental stage of chick embryo (%)

同工酶 Isozyme	胚龄 Age of embryo															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
LDH ₁	52.2	40.0	39.2	54.9	40.8	26.4	99.4	12.4	90.0	41.7	92.1	38.9	70.1	58.6	22.7	47.6
LDH ₂	10.4	56.6	60.3	44.6	57.1	66.4	0.6	82.5	10.0	15.4	1.0	60.1	29.4	14.7	21.6	3.5
LDH ₃	37.4	3.4	0.5	0.5	1.8	7.2	0	5.1	0	36.9	4.9	1.0	0.5	25.2	26.5	38.4
LDH ₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.0	2.0	0	0	1.5	21.3	2.0
LDH ₅	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.9	8.5
A 型酶 A type enzyme	21.3	15.8	15.3	11.3	15.3	20.2	0.2	23.1	20.5	26.7	4.1	15.5	7.7	17.4	42.6	30.1
B 型酶 B type enzyme	78.7	84.2	84.7	88.7	84.7	79.8	99.8	76.9	79.5	73.3	95.9	84.5	92.3	82.6	57.4	69.9

2.2 LDH 同工酶在不同组织器官中的发育表达模式

肝、心、肾、脑、眼、肌等 6 种组织不同发育阶段 LDH 同工酶 A 亚基和 B 亚基所占比例见表 2。与 1~16 日龄全胚相类似,胚胎期各组织继续保持 B 亚基的优势地位,但生后期各组织器官同一亚基的变化以及同一组织胚胎期与生后期亚基所占比例各不相同。胸肌从胚胎期到成年期表现 B 亚基到 A 亚基的颠倒转换,肝脏和肾脏表现生后期 B 亚基含量的微弱上升,而心脏、眼、脑组织则以优势的 B 亚基含量保持至成年。

2.3 LDH 同工酶在成年鸡不同组织器官中的分化表达模式

LDH 同工酶在成年鸡不同组织器官中表现很大差异(表 3),具有明显的组织器官特异性。如卵巢中表现 LDH₁>LDH₂>LDH₅>LDH₃、LDH₄,肝脏表现,LDH₂>LDH₃>LDH₁>LDH₄>LDH₅,胸肌则表现 LDH₅>LDH₄>LDH₂>LDH₁>LDH₃。从组成 LDH₁₋₅ 的 A 型酶和 B 型酶来看,除胸肌外,其它各组织均表现 B 型酶占优势地位。

3 讨论

3.1 家鸡 LDH 同工酶表达的一般特征 LDH 同工酶在家鸡不同生长发育时期和不同组

表 2 LDH 同工酶 A、B 亚基在家鸡各组织不同发育时期所占比例
Table 2 The relative value of A and B type LDH in the tissues
with different developmental stages of chicken (%)

组织与亚基 Tissue and subunit		胚胎期 Stage of embryo					生后期 Stage after incubation			
		17日 17day	18日 18day	19日 19day	20日 20day	21日 21day	1日 1day	1月 1month	5月 5month	500日 500day
肝 Liver	A 型酶 A type enzyme	46.0	42.8	47.4	43.3	49.0	49.2	54.4	42.1	36.2
	B 型酶 B type enzyme	54.0	57.2	52.6	56.7	51.0	50.8	45.6	57.9	63.8
心 Heart	A 型酶 A type enzyme	27.2	20.8	30.7	38.7	24.7	28.0	21.7	21.2	29.4
	B 型酶 B type enzyme	72.8	79.2	69.3	61.3	75.3	72.0	78.3	78.8	70.6
肾 Kidney	A 型酶 A type enzyme	33.4	29.5	32.1	31.7	35.1	33.2	42.5	39.3	36.3
	B 型酶 B type enzyme	66.6	70.5	67.9	68.3	64.9	66.8	57.5	60.7	63.7
脑 Brain	A 型酶 A type enzyme	37.0	27.2	24.1	33.0	31.9	29.2	23.6	33.7	38.0
	B 型酶 B type enzyme	63.0	72.8	75.9	67.0	68.1	70.8	76.4	66.3	62.0
眼 Lens	A 型酶 A type enzyme	47.6	43.0	45.9	44.7	46.4	47.2	37.6	36.8	40.2
	B 型酶 B type enzyme	52.4	57.0	54.1	55.3	53.6	52.8	62.4	63.2	59.8
肌 Breast	A 型酶 A type enzyme	28.7	37.3	33.9	32.0	29.7	32.2	43.3	66.7	79.5
	B 型酶 B type enzyme	71.3	62.7	66.1	68.0	70.3	67.8	56.7	33.3	20.5

织器官一般表现 B 型酶占优势地位, 这一特征构成家鸡及其近缘鸟类动物与鱼类^[4]、哺乳类^[7,8]的典型差别。LDH 同工酶是由 *ldha* 和 *ldhb* 两个基因编码的 A 亚基和 B 亚基以相同或不同方式构成的四聚体。其中 LDH₁ 由 4 个纯 B 亚基构成, LDH₅ 由 4 个纯 A 亚基构成。前者主要催化乳酸脱氢转变为丙酮酸, 后者则催化丙酮酸还原成乳酸。家鸡与鱼类、哺乳类相比, 无论是在胚胎期还是在生后期, 其氧饱和程度均较高, 从而可以利用 B 亚基的优势地位在体内将乳酸转变为丙酮酸, 然后经三羧酸循环途径 (行有氧呼吸) 高效率地产生机体所需要的大量能量, 其生理意义是非常明确的。

3.2 LDH 同工酶在发生过程中的颠倒转换 胸肌 LDH 同工酶在家鸡胚胎期至生后期发生 B 型酶到 A 型酶的颠倒转换, 即由胚胎期 B 型酶的优势地位转变成成年期的 A 型酶为主。B 亚基由胚胎期 17 日龄的 71.3% 下降至成年的 20.5%, 相反, 同一时期 A 亚基由 28.7% 上升至 79.5%。转换从 1 日龄开始, 至成年结束保持稳定。类似的转换曾在哺乳类^[9]和鸟类^[5]的组织中发现。导致转换发生的原因似乎与胚胎期和生后期所处的特殊环境有关。家鸡有机体

表3 成年鸡不同组织器官 LDH 同工酶的分布
 Table 3 Distribution of LDH isozymes in the different tissues
 and organs of adult chicken (%)

同工酶 Isozyme	肝 Liver	心 Heart	肾 Kidney	脾 Spleen	睾丸 Testis	卵巢 Ovary	眼晶体 Lens	脑 Brain	胸肌 Breast
LDH ₁	12.3	33.1	31.6	20.6	11.4	43.4	23.8	46.0	0
LDH ₂	41.7	37.8	16.3	33.3	13.0	37.8	19.8	1.2	20.3
LDH ₃	38.7	7.1	38.9	28.3	20.0	1.8	29.3	20.9	0
LDH ₄	7.3	22.0	1.6	10.5	13.4	1.8	25.4	18.3	21.0
LDH ₅	0	0	11.6	7.3	9.2	15.2	1.7	13.6	58.7
A 型酶 A type enzyme	36.2	29.4	36.3	37.7	40.1	27.0	40.2	38.0	79.5
B 型酶 B type enzyme	63.8	70.6	63.7	62.3	59.9	73.0	59.8	62.0	20.5

在氧饱和程度高的肝脏、心脏等组织中利用 LDH₁ 起乳酸脱氢酶的作用，通过三羧酸循环途径产生能量；在氧饱和程度较低的骨骼肌中又通过 LDH₅ 起丙酮酸还原酶的作用，从酵解途径获得能量，体现了家鸡有机体的高度协调统一。同时，家鸡这种能量的不同产生途径也从一定程度上对其体温高、新陈代谢旺盛等生理特点作了解释。

3.3 LDH 同工酶表达的阶段性和组织器官特异性 LDH 同工酶在家鸡个体发生过程中，既呈现阶段性表达，又具备组织特异性表达。这是同工酶基因在家鸡不同发育时期和不同组织器官实施调控的结果。有时表现 ldha 基因开放，ldhb 基因关闭，有时表现 ldhb 基因开放，ldha 基因关闭，有时虽然 ldha 和 ldhb 基因均开放，但在表达的量上并不相同。LDH 同工酶基因的阶段性和组织特异性表达，最后通过 A 亚基和 B 亚基发挥一定的生理功用。尽管我们目前对 LDH 同工酶基因调控的细节还知之甚少，但随着研究手段的改进，相信基因调节性状发育的证据将愈来愈多。

参 考 文 献

- [1] Hunter R L, Markert C L. Histochemical demonstration of enzymes by zone electrophoresis in starch gel. *Science*, 1957, 125:1294~1295.
- [2] Markert C L, Moller F. Multiple forms of enzymes: tissues, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1959, 45:753~756.
- [3] Ridder C C, Taylor C B. Isoenzymes. Chapman and Halt. New York, U. S. A. 1980, 14~17.
- [4] Shaklee J B. Lactate dehydrogenase isozymes of gadform fishes: divergent patterns of gene expression indicate a heterogeneotis taxon. *Copeia*, 1981, 3:563~578.
- [5] 吴鹤龄, 李士鹏. 北京鸭 LDH 同工酶的研究 III. *遗传学报*, 1987, 14(2):135~141.
- [6] Alahiotis S N, Onoufriou A, Fotaki M et al. *Drosophila* lactate dehydrogenase: developmental aspects. *Biochem. Genet*, 1983, 21:199~211.
- [7] Stambaugh R, Post D. Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase heart (H₄) and muscle (M₄) isozymes. *J. Biol. Chem*, 1966, 24(7):1462~1467.
- [8] Markert C L, Ursprung H. The ontogeny of isozyme, patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Devel. Biol*, 1962, 363~381.
- [9] 方丁, 房世荣. 同工酶在医学上的应用. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 268~272.
- [10] 马建岗, 路兴中. 家鸡血清脂酶同工酶研究. *西北农业大学学报*, 1991, 19(4):43~46.
- [11] Shaw C R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. *Biochem. Genet*, 1970, 4:297~230.

**ANALYSIS OF DEVELOPMENTAL GENETICS
FOR LDH ISOZYMES IN DOMESTIC FOWL**

Ma Jiangang, Qiu Huai

(Department of Animal Science, Northwestern Agricultural
University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract

The discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with the tissue specific staining and zymogram band activity screening techniques was used to detect the LDH isozymes of the different stages of chick embryo and various tissues and organs with different growth and developmental stages. The result showed that the B-type LDH had the higher relative value (51.4~99.8%) in the stage of embryo period. After incubation, there were three kinds of expressions for LDH isozymes, i. e., the advantageous B-type LDH was continuously maintained in heart, lens and brain; the relative value of B-type LDH slightly raised in liver and kidney; and the inversion transforma-

tion from the B-type LDH to the A type LDH was took place in breast. The expression of LDH isozymes above mentioned is the result of gene regulation by *ldh a* and *ldh b*, which has the advantage of producing enough energy in the metabolic process of chicken's various tissues.

Key words Chicken, LDH isozyme, PAGE, Inversion transformation, Gene regulation

中国畜牧兽医学会九届理事会会议召开

中国畜牧兽医学会于1994年7月6日至10日在青海省西宁市召开。全国学会理事、学科分会秘书长及各省市区学会秘书长109人出席了会议。学会理事长陈耀春在会上作了工作报告,报告指出自1991年上海会议之后,在学术会议、组织建设、编辑出版、国际交流以及办事机构等方面有了长足的进步,对于促进我国畜牧兽医科学的发展做了许多有益的工作。报告还指出,编辑出版工作是学会活动的重要内容之一,也是学术交流的主要手段之一,《畜牧兽医学报》、《中国畜牧杂志》、《中国兽医杂志》编辑工作有了较大的改进,进一步满足作者和读者的要求,更好地适应社会发展的情况,1992年期刊编辑学分会的成立,对全国畜牧兽医类学术刊物学术水平的提高及系统化的横向合作起到良好作用。报告还指出学会的工作要围绕党和国家的中心工作,充分发挥科学技术是第一生产力的作用,促进科学技术与经济相结合,促进科学技术的提高和普及。突出科技工作者在学会中的主体地位,更好地发挥学术团体的桥梁和纽带作用,为中国的畜牧兽医科学和畜牧生产作出新的贡献。会上收到100余篇论文选出5篇优秀论文,对优秀论文作者颁发了证书和奖金。

(本刊讯)