

兔血清中过氧化物酶同工酶在兔分类中的研究^{*}

李延清^{*} 刘长海 孙志宏 和正国 金鑫 李艳
(延安大学生命科学学院 陕西 延安 716000)

摘要:应用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE)对中国白兔、新西兰兔、獭兔血清中的过氧化物酶同工酶进行研究。研究结果表明:这三种兔在血清中的过氧化物酶有着明显的区别,可以利用过氧化物酶的区别对兔种进行分类鉴定。本方法可为过氧化物酶同工酶在动物分类鉴定中提供参考依据。

关键词:兔血清;过氧化物酶同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号:Q959.9 文献标识码:A

Analysis of Peroxidase Isozyme in Identification of Species in Rabbits

LI Yan- qing, LIU Chang- hai, SUN Zhi- hong, et al
(College of Life science, Yan' an University, Yan' an 716000, Shaanxi, China)

ABSTRACT: Peroxidase isozyme was analyzed by method of Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE) in Oryciolagus cuniculus(Chinese albino rabbit), New Zealand Rabbit, Rex Rabbit's blood serum. The results showed that there was significant difference in the sera of the three kinds of rabbits, which means that peroxidase can be used to identify the species of rabbit, and the peroxidase isozyme can offer reference basis in species identification.

Key words: Rabbit blood serum; Peroxidase isozyme; PAGE

同工酶(isozyme)是具有相同或相似催化功能而分子结构不同的一类酶。自从 Hunter 和 Markert 创立了同工酶谱(zymo-gram) 技术以来,同工酶的技术得到了很大的发展,酶谱的变化已作为鉴定物种、研究分类与进化、遗传与变异的重要指标^[1]。对兔的分类传统的鉴定方法是通过外型、体貌等方面的观察来进行的,有时很难把握,具有一定的主观倾向性。本文通过对同龄不同品种兔的血清中过氧化物酶(POD)同工酶的数量及活性进行分析,尝试利用同工酶技术对兔的品种进行分类鉴定,即通过不同品种兔血清中所含同工酶的种类、数量与活性的比较区分出各不同品种,从而为同工酶技术在兔的分类、鉴定及生理生化等研究方面提供客观的参考依据。

1 实验部分

1.1 材料

中国白兔、新西兰兔及獭兔(分别编号为 1、2、3) 均购于延安河庄坪种兔场,均为 5 月兔。

1.2 试剂与仪器

丙烯酰胺(Acrylamide, Acr), 甲叉双丙烯酰胺(N, N' - Methylenebisacrylamide, Bis), 四甲基乙二胺(N, N' , N' , N' , - Tetramethylethylenediamine, TEMED), 过硫酸铵(Ammonium Per-sulfate), 所有试剂均为分析纯。

TGL- 168 台式高速离心机(上海安享科学仪器厂); DYCZ - 28C 型垂直电泳槽(北京市六一仪器厂); DYY- 10 型(ECP3000) 三恒电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.3 样品制备

采用心脏取血法^[2], 清晨取三种兔的血液 3mL 静置于室

温,待血凝固后,取上清液,离心(3000r/ min) 5min, 分装备用。

1.4 实验方法

采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE) 垂直平板不连续电泳^[3,4], 胶板大小 100× 140× 1(mm), 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 7%。各孔加样量为 14μL, 电泳条件为: 浓缩胶稳压 200V, 分离胶稳压 150V, 电泳 11~ 14h, 电极缓冲溶液为 Tris- Gly 体系(pH 8.3)。

1.5 染色与固定

采用改良醋酸联苯胺法染色^[5] 30min, 用蒸馏水反复冲洗, 加入 7% 醋酸溶液固定^[5]。

2 结果与讨论

中国白兔、新西兰兔和獭兔血清过氧化物酶同工酶图谱、模式图谱见图 1, 三种兔血清过氧化物酶同工酶酶带的相对迁移率见表 1。

表 1 三种兔血清过氧化物酶同工酶相对迁移率

Table. 1 Relative Mobility Rate of Serum Peroxidase Isozyme of Three Kinds of the Rabbits

相对迁移率区间	酶带	相对迁移率
A	A1	0.137
	A2	0.189
	A3	0.242
	A4	0.337
	A5	0.421
	A6	0.474
B	B1	0.768

^{*} 基金项目: 延安大学科研计划基金项目资助(YD2005- 212)

作者简介: 李延清(1954-), 女, 陕西延安人, 延安大学副教授

主要从事动物生理学研究。E- mail: lixiaoxia1970@stu. snu. edu. cn

(收稿日期: 2006- 04- 03 接受日期: 2006- 04- 23)

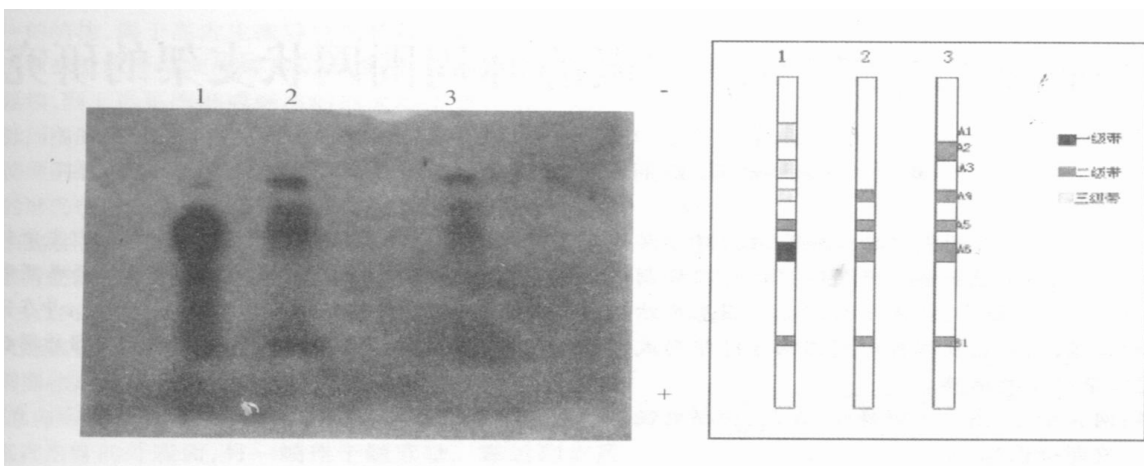


图1 三种兔血清过氧化物酶同工酶图谱、模式图谱

Figure. 1 Icon and Ideograph of Serum Peroxidase Isozyme of Three Kinds of the Rabbits.

由图1可以看出,中国白兔、新西兰兔和獭兔血清中过氧化物酶同工酶,共分离出15条酶带。为了便于分析,从负极到正极分为A、B两个酶区。A区共有12条酶带,各带间相距很近,形成一个活性很高的酶区, $R_f = 0.1370.474$; B区有3条酶带,各带处于相同位置, $R_f = 0.768$ 。

中国白兔分离出6条酶带,新西兰兔分离出4条酶带,獭兔分离出5条酶带。A4、A5、A6、B1是三种兔所共有的酶带,这说明这三种兔之间有某些相似性,它们有一定的亲缘关系,这与形态学分类结果是相吻合的。A1、A3是中国白兔所特有的,A2是獭兔所特有的,A1~A3在新西兰兔中均无。这说明这三种兔之间存在有差异。

图1中A4带在中国白兔的酶带是三级带,而在新西兰兔和獭兔中是二级带,这说明中国白兔此酶带的活性比其它两种兔的要低。A5和B1带在三种兔中都是二级带,这说明这两种酶带的活性在三种兔中是相同的。A6带在中国白兔中是一级带,而在新西兰兔和獭兔的中是二级带,这说明中国白兔此酶带的活性比其它两种的要高。

3 结论

¹ 从实验中看出,不同品种间血清中的过氧化物酶同工酶谱带存在显著差异,由此便于对那些在遗传结构上分化较大而外部形态变化不大的物种之间进行鉴别分类,使家兔分类从宏观的外部形态迈向微观的分子生物学,使动物的分类更加科学和准确。

④动物同工酶中对酯酶(EST)同工酶的研究较多^[6],故本实验同时对三种兔的血清酯酶同工酶也进行了研究实验,但

是在反复的实验中,结果是血清酯酶同工酶在三种兔中都存在,但之间均无明显的差异,而过氧化物酶同工酶在动物研究中所获资料很少(植物研究中还比较多),而通过反复多次实验,均得出过氧化物酶同工酶在三种兔血清中都存在,但是有着显著的酶谱差异。因此认为血清过氧化物酶同工酶在兔种系鉴定和分类中具有重要的参考价值。

④经过多次重复实验,发现样品取好后即刻进行电泳,实验效果最好。冷冻保存后的样品,解冻后,取等量上清液电泳,酶带明显地减少,条纹模糊,实验效果显著降低。据此推测,可能是冷冻保存中有酶失活。因此酶的活性是影响实验结果的重要因素,实验过程中应尽量减少冷冻解冻的次数,避免在此过程中酶的失活。

④在染色过程中,染色时间的控制也是影响结果的因素。在染色时应不停地搅拌、充分振荡染液,使染液与胶面保持充分接触,这样染色能达到最佳效果。

参考文献

- [1] 郭晓霞,郑哲民.酯酶同工酶多态性及其在昆虫分类学中的应用价值[J].昆虫知识,2000,37(2):371~374
- [2] 张才骏,王勇,卢福山,等.青海黄牛血清淀粉酶多态性[J].青海畜牧兽医杂志,2000,37(4):3~5
- [3] 何忠效,张树政.电泳[M].北京:科学出版社,1999:35~46
- [4] 胡能书,万国贤.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985,104~110
- [5] 陈红兵,王金胜,贾俊山.过氧化物酶同工酶谱带染色条件的探讨[J].生物学杂志,2003,20(4):22~23
- [6] 李静,李瑞军.八种盲蝽酯酶同工酶的比较研究[J].河北农业大学学报,2003,5:170~172