

46-50

维普资讯 http://www.cqvip.com

# 应用血清 LDH 同工酶对宁强矮马亲缘关系的分析

侯文通 李相运

(西北农业大学畜牧系, 陕西杨陵 · 712100)

李勤荣

(宁强县畜牧兽医站, 陕西宁强 · 724400)

L S821.2

A

**摘要** 检测宁强矮马和中型马血清, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 一般可获 5 条 LDH 同工酶酶带。薄层自动扫描仪扫描、计算酶谱曲线活力区带的百分含量, 经  $t$  检验差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。将 5 个马种血清 LDH 同工酶活力区带百分含量, 采用标准化欧氏平方距离的最小非类似值, 以最短距离法聚类, 西南马系统的 4 个马种在 4.0197 值时聚为一类 (宁强矮马和中型马为 0.2296, 建昌马和安宁果下马为 3.2315), 而伊吾马在 13.659 值时才与西南马聚为一类。

**关键词** 矮马, 亲缘关系, LDH 同工酶, 聚类分析  
中图分类号 S821.89, S821.2

乳酸脱氢同工酶(简称 LDH)是一种参与糖代谢过程的重要酶, 广泛分布于各组织和器官中, 每一种 LDH 同工酶都是由一种或两种不同亚基(H 亚基、M 亚基)构成的四聚体。由于 LDH-M 亚基是由 Ldn-1 结构基因产生, LDH-H 亚基则是由 Ldn-2 结构基因所生成, M 亚基的量受 LDH 调节基因 Ldr-1 控制, 并由 Ldr-1<sup>a</sup> 和 Ldr-1<sup>b</sup> 两个等位基因所确定, 因此说, LDH 同工酶是基因表达的直接产物<sup>[1]</sup>。生物在进化过程中形成的基因不同, 必然反映在 LDH 同工酶的酶谱上, 从而构成了 LDH 同工酶的种属特异性。目前, 对 LDH 同工酶活力区带的百分含量及酶谱分析, 已日益广泛地应用于临床诊断和遗传学的研究, 并在植物和低等动物分类方面取得了很好的效果。国内近 10 年来, 在研究家畜品种资源时, 一些畜牧科学工作者<sup>[2-6]</sup>对家畜血清 LDH 同工酶测定方法和酶谱分析均作了积极的探讨, 也有人<sup>[1, 6, 7]</sup>试图用其鉴定驴和牛等家畜品种间的亲缘关系。

我国矮马标准体高在 106 cm 以下, 广泛散布于西南马各主产区。揭示矮马与当地中型马(体高大于 106 cm)的亲缘关系, 是探讨矮马种质特性和成因的重要内容。我们在 1992 年 4~5 月研究宁强矮马和宁强中型马血液蛋白质多态性(另有专文)的同时, 也首次将血清 LDH 同工酶作为一种基因标记性状, 对宁强矮马的亲缘关系进行了分析。

## 1 材料与方 法

**采样** 在陕西省宁强县燕子砭乡和八海乡, 对两个矮马中心产区进行系统随机整群抽样, 共采得 70 匹健康马的血样, 其中宁强矮马 42 匹, 宁强中型马 28 匹。制成血清备用。

**测定方法** 采用垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[7]</sup>, 经底物染色液染色, 孵育 30 min, 用 2% 醋酸溶液固定。血清 LDH 同工酶区带的面积曲线和百分含量, 用波长为

收稿日期: 1992-07-28

191694

550 nm 的 CS-930 型薄层自动扫描仪(日·岛津)直接测算绘印而得。

H 和 M 亚单位计算 用各活力区带百分含量求出:

$$H \text{ 亚单位} = LDH_1 + 3/4 LDH_2 + 2/4 LDH_3 + 1/4 LDH_4$$

$$M \text{ 亚单位} = LDH_5 + 3/4 LDH_4 + 2/4 LDH_3 + 1/4 LDH_2$$

聚类分析 5 个马种血清 LDH 同工酶不同区带的百分含量<sup>[2,3]</sup>, 计算标准化欧氏平方距离, 进而得出最小非类似度的值, 再依最短距离法聚类分析, 绘出系统树。上述过程均用 Basic 语言程序在西北农业大学奶山羊研究室浪潮计算机上完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 电泳酶谱和典型活力区带扫描曲线

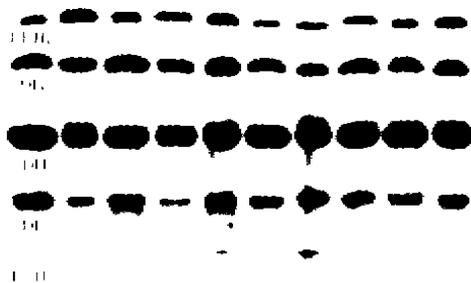


图1 宁强矮马和中型马电泳酶谱

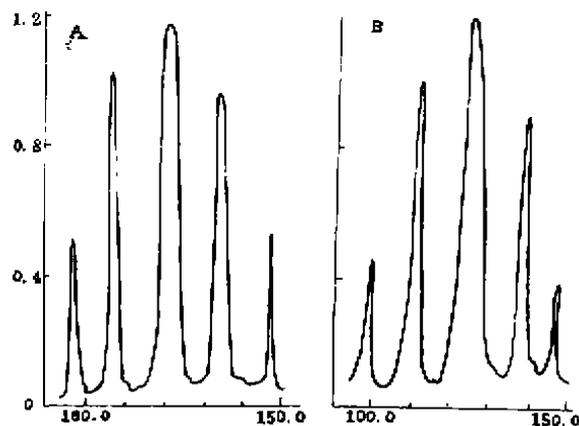


图2 血清 LDH 典型扫描曲线

A. 宁强矮马, B. 宁强中型马

从图1和图2可以看出, 宁强矮马和中型马一般均显示5条活力区带。虽个体间有所差异, 但就整体而言, 宁强矮马血清 LDH 同工酶的特点是  $LDH_3 > LDH_4 > LDH_2 > LDH_1 > LDH_5$  (少数马呈现  $LDH_2 > LDH_4$ ); 宁强中型马的特点是  $LDH_3 > LDH_2 > LDH_4 > LDH_1 > LDH_5$  (少数马呈现  $LDH_4 > LDH_2$ )。通过显著性  $t$  检验, 两品种 LDH 各活力区带的百分含量差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 活力区带扫描曲线的变异型

本试验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和薄层自动扫描仪, 大大提高了血清 LDH 同工酶的分辩率, 发现了1例宁强矮马 LDH<sub>4</sub> 带明显拖后, 8例(宁强矮马3例, 宁强中型马5例)在 LDH<sub>4</sub> 与 LDH<sub>5</sub> 区带间出现了1条新的酶带, 见图3。

图3所示变异曲线, 经对样品多次重复测定, 其结果相同, 我们认为这是血清 LDH 同工酶的变异型, 其遗传规律有待于今后进一步研究。

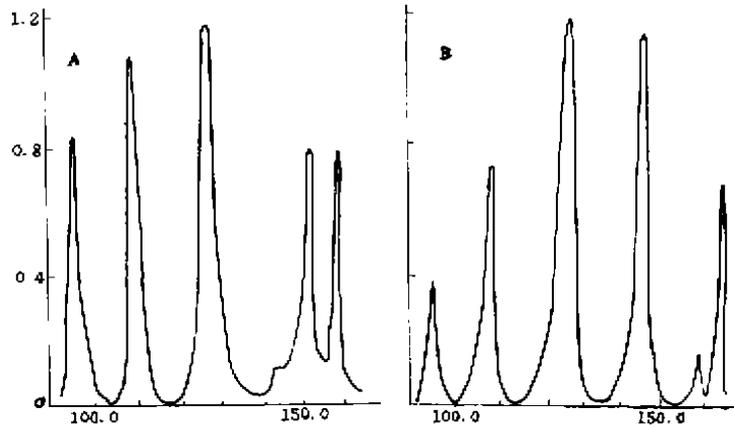


图 3 活力区带扫描的变异曲线

A. 宁强矮马 LDH<sub>4</sub> 拖后; B. 宁强矮马和中型马 6 条曲线

## 2.3 活力区带百分含量和酶谱次序

表 1 活力区带百分含量

酶带	宁强矮马 (n=42)	宁强中型马 (n=28)	建昌马 <sup>(1)</sup> (n=59)	伊吾马 <sup>(2)</sup> (n=38)	安宁果下马 <sup>(1)</sup> (n=30)
LDH <sub>1</sub>	11.40±4.57	12.33±3.87	15.04 (4.95~29.73)	22.67±3.45	15.37±15.66
LDH <sub>2</sub>	21.35±3.49	22.40±3.39	23.84 (16.22~31.88)	29.29±3.61	21.57±14.40
LDH <sub>3</sub>	42.42±5.78	42.80±4.51	28.57 (21.93~34.78)	44.74±4.32	26.52±17.26
LDH <sub>4</sub>	22.29±6.13	19.85±5.94	26.37 (13.04~39.47)	3.34±1.22	19.96±18.40
LDH <sub>5</sub>	2.57±2.65	2.98±2.76	6.56 (0~16.17)	0	16.13±12.80
H 亚单位	54.20	55.49	53.54	67.81	49.80
M 亚单位	45.80	44.51	46.47	32.19	50.20

酶谱次序:

宁强矮马 LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>4</sub>>LDH<sub>2</sub>>LDH<sub>1</sub>>LDH<sub>5</sub>宁强中型马 LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>2</sub>>LDH<sub>4</sub>>LDH<sub>1</sub>>LDH<sub>5</sub>建昌马 LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>4</sub>>LDH<sub>2</sub>>LDH<sub>1</sub>>LDH<sub>5</sub>安宁果下马 LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>2</sub>>LDH<sub>4</sub>>LDH<sub>5</sub>>LDH<sub>1</sub>伊吾马 LDH<sub>3</sub>>LDH<sub>2</sub>>LDH<sub>1</sub>>LDH<sub>4</sub>>LDH<sub>5</sub>

从表 1 和酶谱次序看,血清 LDH 各区带百分含量,宁强矮马与宁强中型马较为接近;酶谱次序宁强矮马与建昌马相同,与宁强中型马仅 LDH<sub>4</sub> 与 LDH<sub>2</sub> 次序稍异。安宁果下马和伊吾马不论活力区带百分含量,还是酶谱次序,与上述三种马相比都有较大差异。H 和 M 亚单位的百分含量,宁强矮马与宁强中型马、建昌马较为接近,与安宁果下马次

之,而与伊吾马则差异较大。

#### 2.4 活力区带百分含量聚类结果

对上述 5 个马种血清 LDH 活力区带的百分含量进行  $\chi^2$  检验,均不符合 Hardy-Weiberg 平衡定律。因而品种间的差异程度,不能通过计算 H 和 M 亚单位的遗传距离来进行估计。我们直接采用百分含量聚类,其结果见表 2 和图 4。

表 2 最小非类似度值

	宁强矮马	宁强中型马	建昌马	伊吾马	安宁果下马
宁强矮马	0	0.230	4.238	17.214	8.827
宁强中型马		0	4.020	13.660	8.370
建昌马			0	17.477	3.232
伊吾马				0	22.734
安宁果下马					0

表 2 列出了按血清 LDH 同工酶 5 条区带百分含量所计算的标准化欧氏平方距离的最小非类似度值。从中看出,我国西南马系统(含矮马)的马种,血清 LDH 位点上的非类似度值相对较小(0.230~8.827),而伊吾马则相对较大(13.660~22.734)。

采用最短距离法聚类,从图 4 可以看出,西南马系统(含矮马)的马种在 4.0197 值时聚为一类,说明它们较伊吾马具有更为接近的亲缘关系。在其内部,宁强矮马与宁强中型马亲缘关系最近(值为 0.2296),其次是建昌马与安宁果下马(值为 3.2315)。伊吾马与西南马系统的上述 4 种马,在 13.6596 值时才聚为一类。

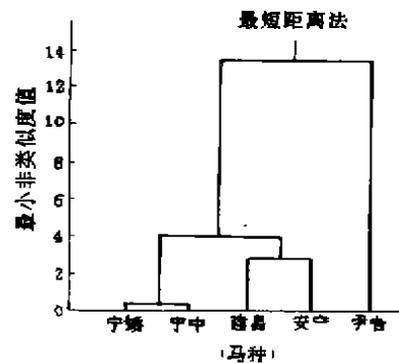


图 4 活力区带百分含量聚类图

### 3 结论与讨论

1) 宁强矮马和宁强中型马血清 LDH 同工酶一般显示 5 条活力区带。其百分含量,经显著性  $t$  检验,均差异不显著( $P > 0.05$ )。通过聚类分析,表明它们有密切的亲缘关系。

2) 应用血清 LDH 同工酶分析家畜品种间亲缘关系时,有的学者主张直接用 H 和 M 亚单位的百分含量,计算品种间的差异程度即遗传距离,但截至目前未见实例。王永军<sup>[7]</sup>在试验中发现,4 种驴的血清 LDH 同工酶活力区带百分含量的分布,不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。我们对 5 个马种血清 LDH 同工酶活力区带百分含量的分布,进行  $\chi^2$  检验,也均不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,这说明 H 和 M 亚单位百分含量计算品种间的差异程度,将不会得到完全真实的反映。我们采取王永军的以血清 LDH 活力区带百分含量进行聚类分析,其结果所反映的品种间遗传关系,同样与品种历史、生态学以及血液蛋白多态性的研究比较吻合,再次证实了这一方法的可行性。今后对这一问题,仍有必要作深入探讨。

3) 血清 LDH 同工酶变异型。在检测手段不断改进, 血清 LDH 同工酶分辨率不断提高的情况下, 在人和畜禽<sup>[6~7]</sup>中都发现了血清 LDH 的突变种。我们在宁强矮马和宁强中型马血清 LDH 区带中, 也发现有的 LDH<sub>4</sub> 拖后和 LDH<sub>4</sub> 与 LDH<sub>5</sub> 区带间多了一条带(暂定名 LDH<sub>x</sub>)。对此突变种, 有人假设这与杂合子中, 包含有 H, H' (或 M, M') 两种亚单位有关, 它们在 LDH 这一四聚体内不同的排列组合, 导致了血清 LDH 同工酶出现了多重活力区带。至于其遗传机制, 还有待于进一步研究。

试验中得到马建岗老师的热情帮助, 特此致谢。

#### 参 考 文 献

- 1 胡蓉, 王毅宾, 姚兴慧. 安宁果下马 LDH 同工酶的测定. 养马杂志, 1987(1), 26~29
- 2 喻梅辉, 关小兵, 胡冰等. 家畜血清 LDH 同工酶的分离与测定. 中国畜牧杂志, 1983(12), 7~10
- 3 金星光. 关于延边黄牛血清 LDH 同工酶正常酶谱的研究. 延边农学院学报, 1980(3), 21~24
- 4 朱德高, 邹锡林. 峨边花牛血清 LDH 同工酶测定. 畜牧兽医杂志, 1984(4), 1~2
- 5 武彬. 中国部分黄牛蛋白质多态性和同工酶及其品种间遗传关系的初步研究. [学位论文]. 陕西杨陵, 西北农业大学畜牧系, 1984, 53~59
- 6 杨丽华. 乳酸脱氢酶基因在呈杂 288 鸡中表达. 甘肃畜牧兽医, 1990(3), 1~3
- 7 王永军. 中国部分驴血液蛋白多态性和同工酶及其品种间遗传关系的初步研究. [学位论文]. 陕西杨陵, 西北农业大学畜牧系, 1989, 13~30

## An Analysis of the Blood Relationship Among Ningqiang Ponies with Serum LDH Isozyme Marker Gene

Hou Wentong Li Xiangyun

(Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, China, 712100)

Li Borong

(Animal Husbandry and Veterinary Station of Ningqiang County, Shaanxi, China, 724400)

**Abstract** The serum of Ningqiang ponies and midum horses was detected using the polyacrylimade gel electrophoresis. Generally, 5 LDH isozyme bands were obtained. The percentage of active enzyme band curves was calculated and scanned by the thin automatic scanning. Through T test, there was no significant difference in the percentage. The smallest non-similar values of the standard rorgeris square distance and the shortest distance cluster analysis were adoted to analyse the percentage of the LDH isozyme activity bands of serum of 5 horse breeds. The 4 horse breeds of southwestern horse family with the value of 4. 0197 were clustered into one class (including Ningqiang ponies and medium horses with the value of 0. 2296 and Jianchang horse and Anning pony with the value of 3. 2315 in one class) while Yiwu horses with the value of 13. 659, they can be clustered into one class of southwestern horses.

**Key words** pony, blood relationship, LDH isozyme, cluster analysis