

explants of atherosclerotic rabbit aortas have receptors for beta very low density lipoproteins and modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 1983, **3** (1): 2~ 12

2 Bilheimer D W, Ho Y K, Brown M S *et al.* Genetics of the low density lipoproteins receptor. Diminished receptor activity in lymphocytes from heterozygotes with familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest*, 1978, **61** (3): 678~ 696

3 Voyta J C, Via D P, Butterfield C E *et al.* Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated low density lipoprotein. *J Cell Biol*, 1984, **99** (6): 2034~ 40

4 Bennett M W, Caulfield J P. Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. *Am J Pathol*, 1991, **138** (5): 1173~ 82

5 Pitas R E. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters. *J Biol Chem*, 1990, **265** (21): 12722~ 7

6 Teupser D, Thierry J, Walli A K *et al.* Determination of LDL and scavenger receptor activity in adherent and non-adherent cultured cells with a new single-step fluorometric assay. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1303** (3): 193~ 198

**Simultaneous Determination of LDL and Scavenger-receptor Activity in a Single Macrophage.** BIAN Xin, YANG Xiao-yi, HUANG You-guo ( *National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics,*

*The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

**Abstract** By combination of laser scanning confocal microscopy (LSCM) and the highly sensitive fluorescent dyes BODIPY FL-LDL and DiI-AcLDL, it is possible that activities of both LDL and scavenger receptors in a single cell can be measured simultaneously and quantitatively. For example, in C57BL/6J macrophage, it was found that the cells were incubated for 5 h at 37 °C with 5 mg/L DiI-AcLDL and 5 mg/L BODIPY FL-LDL resulted in excellent color imaging under LSCM, the LDL receptor with green and scavenger receptor with red. The high selectivity and visualization of this method provide detailed information on the localization and activity of both receptors in a single macrophage. The rapidity and accuracy of this assay allows its application for studying receptor-mediated lipoprotein uptake.

**Key words** laser scanning confocal microscopy (LSCM), fluorescence selective labelling, low density lipoprotein receptor, scavenger receptor

# 乳酸脱氢酶与酯酶同工酶同板染色法

余来宁 方耀林 姚雁鸿 许映芳

(长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室, 荆州 434000)

**摘要** 介绍一种在同一块凝胶板上染乳酸脱氢酶 (LDH) 与酯酶 (EST) 的染色方法. 该同板染色法利用两种同工酶显色反应互不干扰和颜色不同的特点, 先染 LDH, 后染 EST, 可以在同一块胶板上得到两种同工酶清晰的酶带, 每一种酶的酶带与单板染色的酶带完全一样. 这种染色法, 能节省同工酶分析所需的试剂、时间和经费, 也便于样品的鉴定与比较, 是一种经济有效的方法. 此方法, 同样适用于苹果酸脱氢酶 (MDH) 与酯酶等同工酶的同板染色.

**关键词** 乳酸脱氢酶, 酯酶, 同工酶, 同板染色

**学科分类号** Q55

自 50 年代以来,同工酶分析技术发展十分迅速,并在分子遗传学、发育生物学、品种鉴别和遗传育种等方面得到广泛的应用.近年来我们以同工酶作为遗传标记在鱼类种质鉴别和生化分类方面,作了大量的研究<sup>[1]</sup>.但由于同工酶凝胶电泳分析,从样品制备、制胶、点样、电泳到染色全过程工作量很大.特别是在作群体大样本多种同工酶分析时,工作量就更大且费用高.

为了提高工作效率,在实验中,我们摸索出了一种能在同一聚丙烯酰胺凝胶板上染上两种同工酶的方法.目前,国内外尚未见到这种同工酶同板染色的报道.在此,我们以乳酸脱氢酶(LDH)与酯酶(EST)为例,介绍同板染色的方法.

## 1 材料和方法

### 1.1 样品

取银鲫、野鲫、白鲫、鲢鱼、大口鲶、长吻鮠等鲜活鱼的肝脏,先用 0.8% 生理盐水漂洗干净,按重量比加 5 倍磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4),在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆.4℃, 10 000 g 离心 30 min,取上清液点样,或置于 -20℃ 冰室备用.

### 1.2 电泳方法

采用北京六一仪器厂生产的垂直夹芯板电泳槽和 DYY III 型电泳仪.聚丙烯酰胺凝胶浓度为 7.5%,凝胶缓冲液为 pH 8.9 的 Tris-HCl.电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸.电压 400 V,电泳 2 h.

### 1.3 同板染色方法

**1.3.1** 将电泳后的凝胶板取下来,先用蒸馏水冲洗干净,放入染色盘中,加入乳酸脱氢酶(LDH)染色液(配方见表 1).在 37℃ 保温 10~15 min 至蓝色酶带显出.

**1.3.2** 将 LDH 已染色的凝胶板,用蒸馏水稍稍冲洗后,放入染色盘中,加入酯酶(EST)染色液(配方见表 2),在 37℃ 保温至红色酶带出现.

表 1 乳酸脱氢酶同工酶染色液配方

| 染色液成分                           | 含量    |
|---------------------------------|-------|
| 辅酶 I (NAD <sup>+</sup> )        | 50 mg |
| 氯代硝基四氮唑蓝 (NBT)                  | 30 mg |
| 吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS)                  | 2 mg  |
| 1 mol/L 乳酸钠溶液 (pH 7.0)          | 10 ml |
| 0.1 mol/L 氯化钠                   | 5 ml  |
| 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.1) | 15 ml |
| 双蒸水                             | 70 ml |

表 2 酯酶同工酶染色液配方

| 染色液成分                              | 含量     |
|------------------------------------|--------|
| 1% $\alpha$ 、 $\beta$ -醋酸萘酯 (溶于丙酮) | 2 ml   |
| 固紫 B                               | 50 mg  |
| 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.1)    | 10 ml  |
| 加双蒸水至                              | 100 ml |

## 2 结果和讨论

a. 同板染色首先应该注意的是,选择同染的两种酶的显色反应不互相干扰,而且两种酶带的颜色应不一样.经过多次摸索发现 LDH 和 EST 是符合上述条件的两种酶,LDH 酶带为蓝色,EST 为红色,很容易区别.图 1 为银鲫等几种鱼的 LDH,EST 同板染色结果(见图版 II).

b. 同板染色尤其重要的是染色的次序,LDH 与 EST 同板染色时,必须先染上 LDH,后染上 EST,否则,不能成功.这可能与两种酶的显色反应原理有关,LDH 的染色原理是:在辅酶 I 存在下,LDH 催化乳酸脱 H<sup>+</sup> 变成丙酮酸,脱下的 H<sup>+</sup> 由 PMS (吩嗪二甲酯硫酸盐) 传递给 NBT (四氮唑蓝),使之变成蓝色的 NBTH, NBTH 结合在 LDH 酶带上,形成蓝色的区带<sup>[2]</sup>,此反应对酯酶活性无影响;而酯酶 (EST) 属于水解酶类,它的显色原理是:EST 先将底物  $\alpha$  和  $\beta$ -醋酸萘酯,水解成苯酚后;偶氮染料便与这些产物反应生成相应的有色物质<sup>[3]</sup>.在 EST 的染色剂中有丙酮,产

物中有苯酚这都对酶活性有影响, 因此, 不能先染 EST, 只能先染 LDH 再染 EST.

c. LDH 和 EST 同板染色的酶带与两种酶单板染色的酶带是全一样的, 即同板上染的 LDH 与单板上染的 LDH 酶带一样. 同板上染的 EST 与单板上染的 EST 酶带一样. 因此同板染色不仅可以对每种酶单独进行分析, 还可以对两种酶同时分析, 为品种鉴别提供更多的信息. 例如银鲫等几种鱼的 LDH, EST 同板染色图 (图 1 见图版 II), 可以看出: A、B 二尾银鲫的 LDH 酶谱是基本一致的, 但 EST 酶谱却不同: A 有四条带, B 只有二条带, 反映了银鲫种内个体间的差异; 而野鲫 C、D 与白鲫 E 的 EST 酶谱是一样的, 但 LDH 酶谱却有差异. 白鲫 F 和银鲫 A 的 EST 酶谱是一样的, 但 LDH 酶谱却有差异. 可见, 如果只分析一种酶, 很难把这三种鱼分别开来. 而同板染色能将两种酶同时分析, 提供了更多的遗传标记, 能更快更准确鉴别品种.

d. 苹果酸脱氢酶是与乳酸脱氢酶相类似同工酶, 染色液除底物不同外<sup>[4]</sup>, 其他药品完全一样. 因此, 先染苹果酸脱氢酶 (MDH) 再染酯酶 (EST), 也可以得到 MDH、EST 同板染色酶谱 (图 2 见图版 II).

由图 2 可以看出, MDH 与 EST 酶带是相间. 但由于 MDH 是蓝色, EST 是红色, 仍然可以分清, 也便于分析.

同工酶的电泳凝胶同板染色不仅能节省大量的人力、物力和时间, 还能提供更多的遗传标记, 使品种鉴别和遗传分析更准确. 而且同板染色的方法简单易行. 是值得提倡的一种同工酶分析方法. 至于其他种类的同工酶的同板染色, 我们也试验过一些. 但有些是不能进行同板染色的. 例如, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PHD) 与酯酶 (EST) 不能同板染色. 可以相信, 如进一步摸索和实验, 有更多的同工酶同板染色组合, 即将被发现.

**致谢** 昌永华和龙华同志分别对本文英文摘要及图片处理工作给予了大力支持, 表示谢意.

## 参 考 文 献

- 1 余来宁, 方耀林, 宁宗德等 (Yu L N, Fang Y L, Ning Z D *et al*). 长江白鲢酯酶同工酶的类型与生长的相关性及其在原种保存中的应用. 中国水产科学 (Journal of Fisheries Sciences of China), 1995, 2 (5): 8~14
- 2 吴鹤龄, 林锦湖 (Wu H L, Lin J H). 遗传学实验方法和技术 (The Methods and Techniques in Genetic Experiments). 北京: 高等教育出版社 (Peking: Higher Education Press), 1983. 147~153
- 3 方 丁, 房世荣 (Fang D, Fang S R). 同工酶在医学上的应用 (Application of Isoenzymes to Medicine). 北京: 人民卫生出版社 (Peking: People's Medical Press, 1982. 50~51
- 4 吴鹤龄, 林锦湖 (Wu H L, Lin J H). 遗传学实验方法和技术 (The Methods and Techniques in Genetic Experiments). 北京: 高等教育出版社 (Peking: Higher Education Press), 1983. 272~273

**A Method for Staining Lactate Dehydrogenase and Esterase Isozymes on the Same Slab Gel.** YU Lai-ning, FANG Yao-lin, YAO Yan-hong, XU Ying-fang (Yangtze River Institute of Fisheries, Jingzhou 434000, China).

**Abstract** A method is described for staining lactate dehydrogenase (LDH) and esterase (EST) isozymes on the same slab gel. By utilizing the noninterference of two kinds of isozymes in their staining reaction and the difference in their colour, LDH and then EST were stained successively, resulting in distinct bands of both isoenzymes on the same slab gel. The band patterns of either enzyme on the same slab gel were completely the same as those on separate slab gels. Being able to save reagents, time and cost necessary for isozymic analysis, and convenient for the identification and comparison of different samples, this is an economical and efficient staining method, which can also be applied to staining malate dehydrogenase (MDH) and EST isozymes on the same slab gel.

**Key words** lactate dehydrogenase (LDH), esterase (EST), isozyme, staining on the same slab gel



图1 LDH,EST同工酶同板染色图谱

A、B:银鲫; C、D:野鲫; E、F:白鲫; G:鲢鱼; H、I、J:大口鲶;  
K:长吻鲶. 蓝色为LDH酶带, 红色为EST酶带.



图2 MDH与EST同工酶同板染色图谱

A、B:银鲫; C、D:野鲫; E、F、G:白鲫; H:鲢鱼; I、J、K:大口鲶;  
L:长吻鲶. 蓝色为MDH酶带, 红色为EST酶带.