

经验交流

一种改进的乳酸脱氢酶同工酶染色法

赵 赣¹⁾ 张守全²⁾ 黄肖武³⁾ 詹福建 何安行

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要 以 N-甲基吩嗪甲基硫酸盐 (PMS) 为介体, 使乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶催化反应产生的 NADH 将铁氰化钾还原为亚铁氰化钾, 利用亚铁氰化钾与三氯化铁反应生成普鲁士蓝的性质, 实现对乳酸脱氢酶同工酶进行染色的目的。

关键词 乳酸脱氢酶, 同工酶, 铁氰化钾, 三氯化铁

学科分类号 Q55

经典的乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶的染色法是以 N-甲基吩嗪甲基硫酸盐 (PMS) 为介体, 使乳酸脱氢酶催化的反应中产生的 NADH 将氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原成蓝色物质 (蓝甲腊), 从而实现染色目的^[1]。这个方法需使用较昂贵难得的 NBT, 对实验教学和科研工作都会因一时买不到 NBT 而受到消极影响。

现在介绍一种新探索的染色法。原理如下: 以 PMS 为介体使乳酸脱氢酶催化的反应中产生的 NADH 将 $K_3Fe(CN)_6$ 还原成 $K_4Fe(CN)_6$ ^[2], 再利用 $K_4Fe(CN)_6$ 与 $FeCl_3$ 生成普鲁士蓝的性质^[3] 来实现染色目的。

这种染色新法用了价廉易得的 $K_3Fe(CN)_6$ 与 $FeCl_3$ 取代了昂贵难得的 NBT, 因而为实验教学与科研工作带来了一定的方便。

1 材料和方法

1.1 试剂

乳酸脱氢酶纯品为华美公司产品, 其余均为分析纯试剂。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照赵永芳^[4]的方法进行。

1.3 染色

1.3.1 经典染色法: NAD⁺ 25 mg、NBT 15 mg、PMS 1 mg、1 mol/L 乳酸钠 (pH 7.0) 5 ml、0.1 mol/L NaCl 2.5 ml、0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.1) 7.5 ml 和蒸馏水 35 ml, 新鲜配制。将电泳后的凝胶条浸入染色液中, 于 37℃ 保温

30~60 min, 即可显示蓝紫色区带。

1.3.2 染色新法: 染色液 A: 仅将经典染色法的染色液中的 NBT 15 mg 换为 61 mmol/L 的 $K_3Fe(CN)_6$ 2.1 ml, 相应地将 35 ml 蒸馏水改为 32.9 ml 蒸馏水。染色液 B: 7.5 mmol/L 的 $FeCl_3$ 。将电泳后的凝胶条于染色液 A 中浸泡 20~30 min 后取出, 放入染色液 B 中浸泡, 直至显出近于蓝绿色区带。

2 结果与讨论

将购置的乳酸脱氢酶制样后于同一块凝胶上进行电泳, 将电泳后的凝胶一分为二, 分别用经典染色法和染色新法进行染色, 结果如图 1a 和图 1b 所示。

图 1a 为经典染色法所得到的酶谱, 图 1b 为染色新法所得到的酶谱。可见, 两种染色方法所得酶谱是一样的, 仅显的颜色不同而已。从照片上可以看出, 染色新法的染色效果略逊于经典法的染色效果, 这可能与所用铁氰化钾和三氯化铁的量有关, 还需进一步探索。由于铁氰化钾和三氯化铁较 NBT 价廉易得, 因而在教学和科研工作中染色新法可作为一种参考使用的方法。

¹⁾ 通讯联系人, 华南农业大学嵩山区 18 栋 202 室, 广州 510642。

²⁾ 华南农业大学动物科学系, 广州 510642。

³⁾ 本校九八届毕业生, 现在深圳卫武光明生物制品厂工作。

Tel: (020) 85281830

收稿日期: 1999-08-09, 修回日期: 2000-01-28

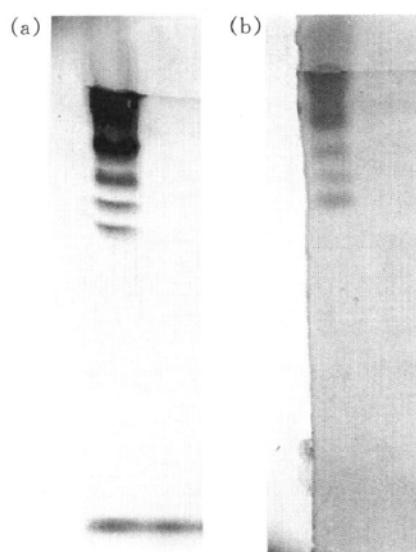


图1 两种染色法所得酶谱
(a) 经典染色法; (b) 染色新法.

参 考 文 献

- 1 吴鹤龄, 林锦湖. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1983. 272
Wu H L, Lin J H. Experimental Methods and Techniques in Genetics. Beijing: Higher Education Press, 1983. 272
- 2 纪学锋, 章咏华. 以铁氰化钾为介体的苹果酸脱氢酶电极的研制. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (4): 301~ 305

Ji X F, Zhang Y H. Prog Biochem Biophys, 1993, 20 (4): 301 ~ 305

- 3 武汉大学, 吉林大学等编. 曹锡章, 张婉蕙, 杜尧国等修订. 无机化学, 下册. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1983. 459

Wuhan University, Jilin University, eds. Revised by Cao X Z, Zhang W H, Du Y G, *et al.* Inorganic Chemistry, Last Volume. 2nd. Beijing: Higher Education Press, 1983. 459

- 4 赵永芳. 生物化学技术原理与应用. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 287~ 321

Zhao Y F. Theory and Practice of Biochemical Techniques. Wuhan: Wuhan University Press, 1994. 287~ 321

Preliminary Researches on New Dyeing Method of

LDH Isozymes. ZHAO Gan¹⁾, ZHANG Shou-Quan²⁾, HUANG Xiao-Wu¹⁾, ZHAN Fu-Jian¹⁾, HE An-Xing¹⁾ (¹⁾ Institute of Biological Technique, ²⁾ Department of Animal Science, South Agricultural University, Guangzhou 510642, China).

Abstract Mediated by PMS, the NADH resulted from the reaction catalysed by LDH isozymes can reduce $K_3Fe(CN)_6$ into $K_4Fe(CN)_6$. Then $K_4Fe(CN)_6$ can react with $FeCl_3$ resulting in Prussian blue which dyes LDH isozymes.

Key words lactate dehydrogenase (LDH), isozyme, $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$

欢迎订阅 2001 年《动物学杂志》

《动物学杂志》1957 年创刊, 它是以普及与提高相结合、基础性和应用性并重为宗旨的综合性学术刊物。力求及时报道动物科学领域具有创造性和重要意义的最新研究成果, 介绍有创见的新思想、新学说, 开展学术交流与争鸣。辟有研究报告、动物资源与管理、珍稀濒危动物、动物养殖、有害动物防治、研究生论文园地、技术与方法、研究简报和快讯、综述与进展等 10 余个栏目。内容丰富、选材严谨、图文并茂、信息量大, 发表周期短, 印刷精美。读者对象: 动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员、大专院校有关学员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》为 16 开, 64 页, 双月刊 (双月 20 日出版), 每期定价 9.80 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 2-422, 国外发行 (Code No.) 代号: BM 58, 全国各地邮局均可订购。如未能在当地订到或错过征订时间者, 亦可到本刊编辑部直接订购, 如需挂号邮寄另加邮费 2.00 元。欢迎广大读者订阅。

联系地址: 北京市海淀区中关村路 19 号《动物学杂志》编辑部, 邮编: 100080

联系电话: 010-62581475

传 真: 010-62565689

E - mail: journal@panda.ioz.ac.cn