

中国大鲵乳酸脱氢酶同工酶研究^{*}

II 动力学性质

马 成 仓

(淮北煤炭师范学院生物系, 淮北 235000)

王 子 浩

(陕西师范大学生物系, 西安 710062)

提 要

利用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离大鲵 [*Megalobatrachus davidianus* (Blanchard)] 乳酸脱氢酶同工酶。研究了各同工酶的最适 pH、最适温度、热稳定性、米氏常数、底物抑制等动力学性质。

关键词 LDH 同工酶, 动力学性质, 大鲵

乳酸脱氢酶 (LDH) 是由 H 及 M 两种亚基组成的一组四聚体分子, 催化乳酸与丙酮酸之间的相互转化。各种动物的 LDH 有其不同的动力学特性, 即使是同一动物的不同种同工酶, 其性质也不尽相同。动物可依靠各同工酶相对含量不同及其动力学性质的差异来调节各组织、器官的代谢活动。关于大鲵 LDH 同工酶动力学方面的研究国内至今尚未见报道, 本文除了讨论大鲵 LDH 同工酶的一些动力学性质外, 并就大鲵本身各同工酶之间进行了比较。

1 材料和方法

1.1 制备性电泳 采用 2 mm 厚的凝胶板, 点样 2.5 ml, 其它操作方法与 I^[1] 相同, 电泳完毕后, 取下凝胶板, 切下其中间的一条凝胶, 用前述染色法^[1] 染色作为对照, 然后根据此染色的酶带位置确定并割下未染色板上的酶带, 用 0.1 mol/L pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液提取, 提取液用作同工酶动力学研究。材料来源及处理同本研究 I^[1]。

1.2 酶活力测定 NADH₂-丙酮酸体系 (L-P 法)^[2]: 由 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液组成的混合物, 其中包括新鲜配制的 NADH₂ 0.167 mmol/L, 0.5 mmol/L 丙酮酸钠。NAD-乳酸体系 (P-L 法)^[2]: 由 0.05 mol/L 缓冲液组成的混合物, 其中包括新鲜配制的 NAD 5 mmol/L, 50 mmol/L 乳酸钠。

^{*} 本文是根据马成仓研究生毕业论文整理而成, 是在兰天鹤教授指导下完成的, 谨此致谢!

1993年6月28日收到; 1996年10月8日修回。

反应在 37 ℃ (除特殊说明外) 下进行, 用 7520 型分光光度计在 340 nm 波长处测定 3 min。光密度变化值, 酶活性用光密度值的减少或增加值表示。

2 结果与讨论

2.1 pH 对酶活性的影响

同一种同工酶, 对于不同底物有不同的最适 pH, 而且相差很大, 对于同一底物来说, 不同同工酶的最适 pH 却很相近, 如图 1 及 2 所示, LDH₁ 以丙酮酸钠作底物时的最适 pH 是 7.2, 以乳酸钠作底物时的最适 pH 是 9.6, LDH₅ 以丙酮酸钠作底物时的最适 pH 是 6.4, 以乳酸钠作底物时的最适 pH 是 10.0。Winer 和 Schwert^[3] 在研究 pH 对牛心肌 LDH 动力学的影响时曾指出, LDH 在把丙酮酸转变成乳酸时, 组氨酸上的咪唑环必须质子化, 在把乳酸转变为丙酮酸时, 组氨酸上的咪唑环必须去质子化, 所以, LDH 在以丙酮酸为底物时, 最适 pH 偏酸, 以乳酸作为底物时, 最适 pH 偏碱, 这与本研究结果完全一致。

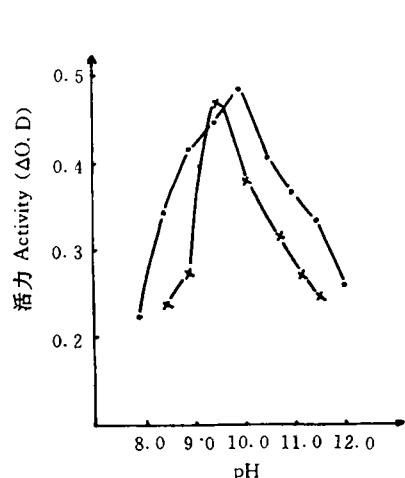


图 1 pH 对 LDH₁(×) 及 LDH₅(·) 活力的影响
反应在 37 ℃, 0.05 mol/L 乳酸和 5 mmol/L NAD⁺ 下进行

Fig.1 Effect of pH on activities of LDH₁(×) and LDH₅(·)

Assays were performed at 37 ℃, 0.05 mol/L L-lactate and 5 mmol/L NAD⁺

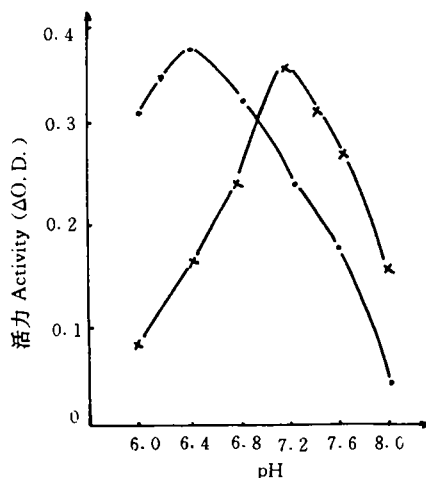


图 2 pH 对 LDH₁(×) 及 LDH₅(·) 活力的影响
反应在 37 ℃, 0.5 mmol/L 丙酮酸和 0.167 mmol/L NADH 下进行

Fig.2 Effect of pH on activities of LDH₁(×) and LDH₅(·)

Assays were performed at 37 ℃, 0.5 mmol/L pyruvate and 0.167 mmol/L NADH

2.2 温度对酶活性的影响

如图 3、4 所示, 温度对酶活性的影响与所用底物无关, 不论是用丙酮酸或乳酸作底物, LDH₁ 的活性在 20 ℃—40 ℃ 之间呈直线上升; LDH₅ 的最适温度都是 37 ℃, LDH₁ 的最适温度大于 LDH₅。最适温度是酶在加热时失活与酶促反应速度增加两个相

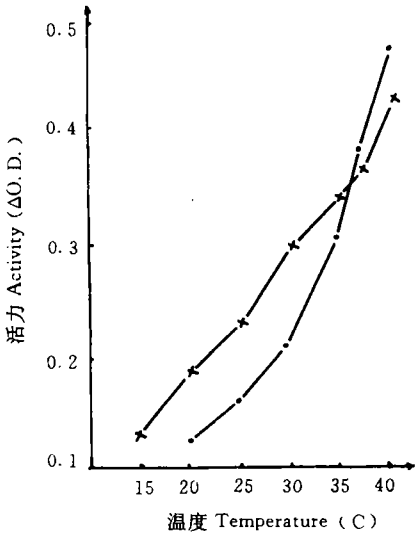


图3 温度对LDH₁活性的影响
反应在0.05 mol/L乳酸和5 mmol/L NAD⁺(x)或
0.5 mmol/L 丙酮酸和0.167 mmol/L NADH(·)
下进行

Fig.3 Effect of temperature on LDH₁ activity
Assays were performed in 0.05 mol /L L-lactate
and 5 mmol /L NAD⁺(x) or 0.5 mmol /L
pyruvate and 0.167 mmol /L NADH(·)

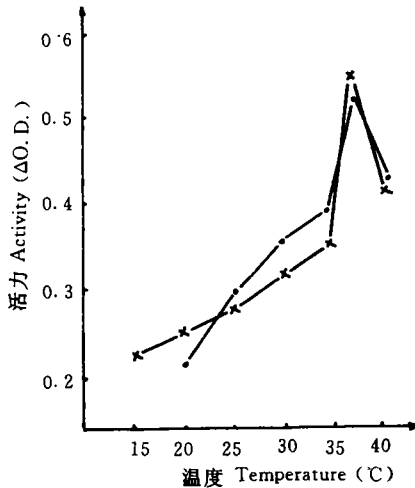


图4 温度对LDH₅活性的影响
反应在0.05 mol/L乳酸和5 mmol/L NAD⁺(x)
或0.5 mmol/L 丙酮酸和0.167 mmol/L NADH
(·) 下进行

Fig.4 Effect of temperature on LDH₅ activity
Assays were performed in 0.05 mol /L L-lactate
and 5 mmol /L NAD⁺(x) or 0.5 mmol /L
pyruvate and 0.167 mmol /L NADH(·)

反作用的平衡点。LDH₅的最适温度低于LDH₁，说明LDH₅的耐热性低于LDH₁，这个结论在下一个研究中得到进一步证实。

2.3 LDH同工酶的热稳定性

如图5、6所示，LDH₅及LDH₁的半衰期均随着温度的上升而减少；LDH₅在45℃下热处理10 min酶活性失去一半，LDH₁在相同温度下处理2 h，酶活力仍未下降，在50℃处理2 h，酶活力仍保留50%以上。可见LDH₁的热稳定性明显高于LDH₅。Plaglman^[2]报道，兔LDH₁在55℃热处理40 min，酶活力不受影响，而LDH₅在55℃热处理6 min，酶完全失活。这说明兔LDH₁的热稳定性明显高于兔LDH₅，此结果与本结果一致。另外，罗莉中^[4]曾报道，金鱼LDH提取液在60℃水浴中处理1 min，不影响实验结果。由此看来，不同动物的LDH热稳定性或同一动物各LDH同工酶之间的热稳定性都有着一定（甚至是很大）的差异，这种差异已被应用于LDH同工酶之间的鉴定^[5]。

2.4 LDH同工酶的米氏常数

LDH同工酶的米氏常数如表1所示，其结果与前人^[6、7]测定其它动物LDH同工酶的米氏常数相似。

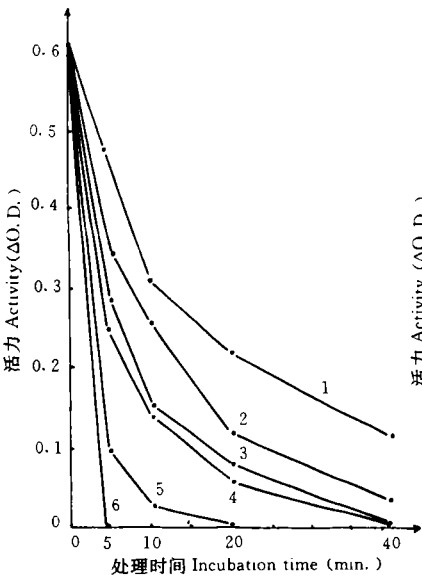


图 5 LDH₅ 的热稳定性

反应在 0.05 mol /L 乳酸、5 mmol /L NAD⁺、37 °C 下进行。热处理温度 1.45 °C, 2.46 °C, 3.47 °C, 4.48 °C, 5.49 °C, 6.50 °C

Fig.5 Thermal inactivation of LDH₅
Assays were performed in 0.05 mol /L L-lactate and 5 mmol /L NAD⁺ at 37 °C. Incubation temperature 1.45 °C, 2.46 °C, 3.47 °C, 4.48 °C, 5.49 °C, 6.50 °C

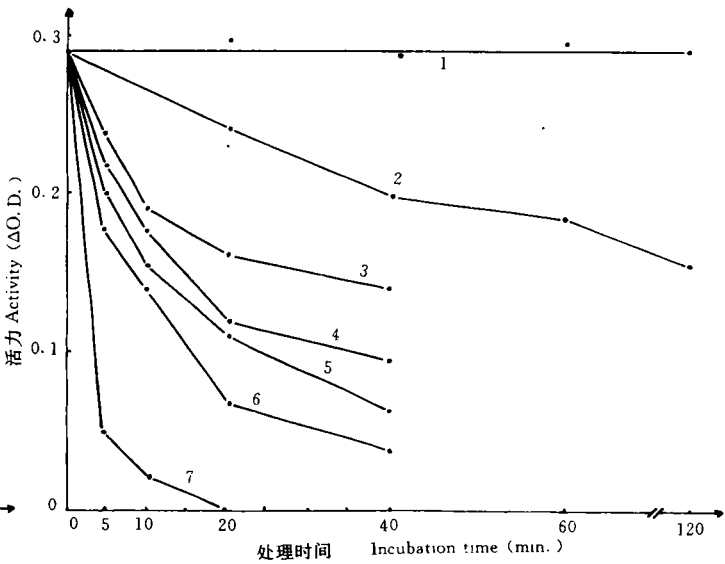


图 6 LDH₁ 的热稳定性

反应在 0.05 mol /L 乳酸、5 mmol /L NAD⁺、37 °C 下进行。热处理温度 1.45 °C, 2.50 °C, 3.52 °C, 4.54 °C, 5.56 °C, 6.58 °C, 7.60 °C

Fig.6 Thermal inactivation of LDH₁
Assays were performed in 0.05 mol /L L-lactate and 5 mmol /L NAD⁺ at 37 °C. Incubation temperature 1.45 °C, 2.50 °C, 3.52 °C, 4.54 °C, 5.56 °C, 6.58 °C, 7.60 °C

表 1 LDH 同工酶的米氏常数
Tab.1 Km of LDH isozymes

底物 Substrate	同工酶 Isozyme	LDH ₁	LDH ₅
	Km (mol /L)		
丙酮酸 Pyruvate		2 × 10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁴
乳酸 L-lactate		8.5 × 10 ⁻³	31.2 × 10 ⁻³

2.5 底物浓度对酶活性的影响

图 7、8 分别是大鲵 LDH₁ 和 LDH₅ 以丙酮酸钠和乳酸钠作底物时,底物浓度与酶反应速度关系曲线。结果表明,达到最大活性时的丙酮酸浓度 LDH₁ 是 0.5 mmol /L, LDH₅ 是 1.0 mmol /L, 达到最大活性的乳酸浓度 LDH₁ 是 50 mmol /L, LDH₅ 是 300 mmol /L。底物浓度超过最大活性浓度后,酶活性都表现出不同程度的降低。

比较酶分别在丙酮酸钠和乳酸钠中的最大活性浓度可知,高浓度的乳酸钠对酶活性的抑制较小,此结果与前人研究结果一致^[8-11]。Richard^[11] 分析了许多研究者报道的不同动物在不同状态下体内丙酮酸和乳酸的浓度后发现,动物体内的丙酮酸可以高于丙酮酸底物抑制浓度,而乳酸则达不到乳酸底物抑制浓度,因此认为,在动物体内,丙

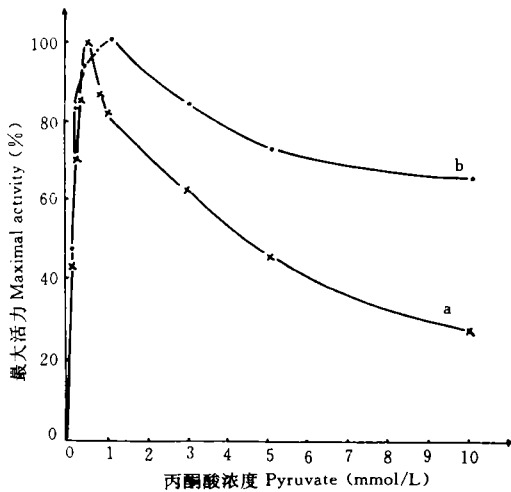


图7 丙酮酸浓度对 LDH 同工酶活力的影响

NADH 0.167 mmol /L, 最适 pH (LDH₁:7.2, LDH₅: 6.4), 37℃. a. LDH₁ b. LDH₅

Fig.7 Effect of pyruvate substrate concentration on the LDH isozymes activities

The NADH concentration was 0.167 mmol /L, the optimum pH (LDH₁: 7.2, LDH₅: 6.4), at 37℃

a. LDH₁, b. LDH₅

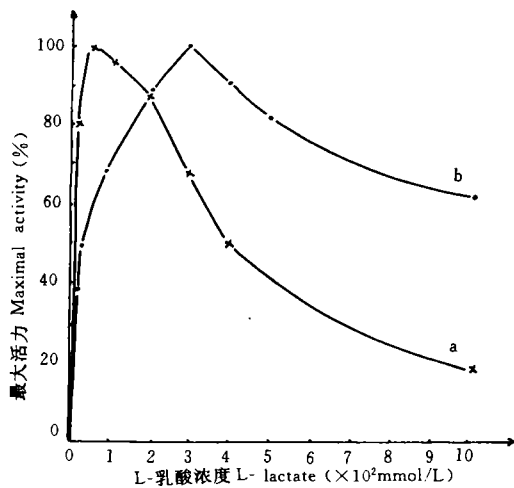


图8 乳酸底物浓度对 LDH 同工酶活力的影响

NAD⁺ 5 mmol /L, 最适 pH (LDH₁:9.6, LDH₅: 10.0), 37℃. a. LDH₁ b. LDH₅

Fig.8 Effect of L-lactate substrate concentration on the LDH isozymes activities

The NAD⁺ concentration was 5 mmol /L, the optimum pH (LDH₁: 9.6, LDH₅: 10.0), at 37℃

a. LDH₁, b. LDH₅

酮酸底物抑制可能起着重要作用, 而乳酸底物抑制的意义不大。本研究结果也支持这一推论。

参 考 文 献

- [1] 马成仓等. 中国大鲵乳酸脱氢酶同工酶研究 I. 组织分布. 水生生物学报, 1996, 20 (3): 265—270
- [2] Plummer, D T, et al. Organ specificity and lactate dehydrogenase activity 2. some properties of human heart and liver preparations. *Biochem. J.*, 1963, 87: 423—429
- [3] Paul J. Fritz. Rabbit lactate dehydrogenase isozymes: effect of pH on activity. *Science*, 1967, 156: 82—83
- [4] 罗莉中等. 金鱼乳酸脱氢酶的同工酶的发生遗传学研究 I. 鲫鱼和金龙睛金鱼各组织器官乳酸脱氢酶的同工酶的比较. 遗传学报, 1982, 9 (5): 375—380
- [5] 李士鹏等. 北京鸭乳酸脱氢酶同工酶的研究 II. 薄层等电聚焦电泳鉴定北京鸭 LDH 同工酶. 遗传学报, 1986, 13 (2): 136—143
- [6] Amadeo Pesce, et al. The comparative enzymology of lactic dehydrogenases III. properties of the H₄ and M₄ enzymes from a number of vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242 (9): 2151—2167
- [7] Erwin Goldberg, et al. Electrophoretic and kinetic properties of rana pipiens LDH isozymes. *J. Exp. Zool.*, 1967, 165: 101—110
- [8] Peter G. W. Piagemann, et al. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase II. properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1960,

235 (8): 2288 — 2293

- [9] Latner, A L. et al. Pyruvate inhibition of lactate dehydrogenase activity in human tissue extracts. *Science*, 1966, **152**: 527 — 529
- [10] Elliot S. Vesell. Lactate dehydrogenase isozymes: substrate inhibition in various human tissues. *Science*. 1965, **150**: 1590 — 1593
- [11] Richard Stambaugh, et al. Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase Heart (H_4) and muscle (M_4) isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241** (7): 1462 — 1467

STUDIES ON LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYMES OF *MEGALOBATRACHUS DAVIDIANUS* (BLANCHARD)

II. KINETICS

Ma Chengcang

(Department of Biology, HuaiBei Teachers College, HuaiBei 235000)

Wang Zihao

(Department of Biology, Shanxi Normal University, Xian 710062)

Abstract

The optimum pH of LDH₁ isozyme of *M. davidianus* was 7.2 (pyruvate as substrate) and 9.6 (L-lactate as substrate) and LDH₅ 6.4 (pyruvate as substrate) and 10.0 (L-lactate as substrate). The optimum temperature of LDH₁ was above 37 °C and LDH₅ 37 °C. The thermal stability of LDH₁ is higher than that of LDH₅. The K_m of LDH₁ was 2×10^{-4} mol /L (pyruvate as substrate) and 8.5×10^{-3} mol /L (L-lactate as substrate) and LDH₅ 3×10^{-4} mol /L (pyruvate as substrate) and 31.2×10^{-3} mol /L (L-lactate as substrate). The LDH₁ reached maximum activity at approximately 0.5 mmol /L pyruvate or 50 mmol /L L-lactate, whereas the LDH₅ reaches maximum activity at approximately 1.0 mmol /L pyruvate or 300 mmol /L L-lactate.

Key words LDH isozyme, Kinetics, *Megalobatrachus davidianus*