

奶水牛血清碱性磷酸酶同工酶的研究

A Study on Serum Alkaline Phosphomonoesterase Isoenzymes in Milk Buffaloes

韦莉莉

栾桂龙

蒋艳明

Wei Lili

Luan Guilong

Jiang Yanming

(广西农业大学实验中心 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Research Centre, Guangxi Agricultural University, 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳和光密度扫描法,对摩拉 (Murrh)、尼里 (Nili-Ravi) 及三品系杂交 $[Ni \hat{\times} (Mu \hat{\times} Nanning \hat{\times}) \hat{\times}]$ 母奶水牛血清碱性磷酸酶 (ALP) 同工酶进行研究。结果表明: ALP相对总活力为,摩拉 (196 200) > 尼里 (153 400) > 三品杂 (150 300), 尼里为高产奶量组 > 低产奶量组, 摩拉和三品杂为低产奶量组 > 高产奶量组; ALP三种同工酶的特点, 尼里为 $ALP_2 > > ALP_1 > ALP_3$, 摩拉和三品杂为 $ALP_2 > > ALP_3 > ALP_1$; 种间比较, ALP_1 为尼里 > 摩拉 > 三品杂, ALP_2 为摩拉 > 尼里 > 三品杂, ALP_3 则为三品杂 > 尼里 > 摩拉; 种内比较, ALP_1 在尼里和三品杂为低产奶量组 > 高产奶量组, 在摩拉则为高产奶量组 > 低产奶量组, ALP_2 则均为高产奶量组 > 低产奶量组, 而在 ALP_3 则均为低产奶量组 > 高产奶量组。实验证实了两性载体电解质为水牛血清 ALP 的强烈抑制剂。

关键词 奶水牛 血清碱性磷酸酶 同工酶 相对活力 抑制剂

Abstract The total relative and relative activity of serum alkaline phosphomonoesterase (ALP) isoenzymes from three breeds of female milk buffaloes, Murrh (Mu), Nili-Ravis (Ni) and a triple crossbred $[Tc \hat{\times} Ni \hat{\times} (Mu \hat{\times} Nanning \hat{\times}) \hat{\times}]$, was analysed using polyacrylamide disc gel electrophoresis and optical density scanning method. The results showed that the total relative activity of ALP in the three breeds was in the order of Mu (196 200) > Ni (153 400) > Tc (150 300). the isoenzyme activity in the high-milk-yield group was higher than that in the low-yield group in Ni, while the opposite was true in Mu and Tc. $ALP_2 > > ALP_1 > ALP_3$ in Ni and $ALP_2 > > ALP_3 > ALP_1$ in Mu and Tc; ALP_1 : Ni > Mu > Tc, ALP_2 : Mu > Ni > Tc and ALP_3 : Tc > Ni > Mu; the activity of ALP_1 from low-yield group was higher than that from high-yield group in Ni and Tc, and opposite was true in Mu; the activity of ALP_2 from high-yield group was higher than from low-yield group in all the three breeds; the activity of ALP_3 was opposite to that of ALP_2 . The experiment demonstrated that ampholyte carriers were strong inhibitors of serum ALP of buffaloes.

Key words milk buffalo, serum alkaline phosphomonoesterase, isoenzyme, relative activity, inhibitor

关于碱性磷酸酶 (Alkaline phosphomonoesterase, 简称 ALP, EG 3. 1. 3. 1) 同工酶的研究较多, 涉及到物质代谢 (特别是钙、磷代谢和骨骼的生长发育)^[1], 疾病的诊断^[2,3]和动物的遗传育种^[7]。特别使我们感兴趣的是该酶与产奶量之间的关系^[6]。

我们在 1988 年对 ALP 进行了初步的研究^[7], 与

之相比本文采用了光密度扫描, 使结果定量化程度更高。我们试图用同工酶的相对总活力和相对活力而不是用同工酶活力的相对百分含量来研究 ALP, 特别是该同工酶与产奶量的关系。同时也对两性载体电解质对 ALP 的抑制作用进行了直接测定。

1 材料和方法

1.1 由中国农业科学院水牛研究所水牛场提供产犊

10胎的母奶水牛；平均产奶量的计算方法为，总产奶量 (kg)除以总产奶天数 (d)。在 44头摩拉 41头尼里和 82头三品系杂交 [Ni♂× (Mu♂× Nanning♀)♀] 母奶水牛中，各随机挑选 20 (22, 23) 头，其中高、低产奶量组各 10 (10 12; 11 12) 头，总数共 65头。产奶量高低由相对比较决定。颈静脉采血，离心分离血清 (3 000 r/min, 10~ 15 min)，置于 4℃ 冰箱中备用。

1.2 ALP总活力的抑制实验 按文献 [5]操作，作为对照管的在酶总活力测定液中加入 2%两性载体电解质 (Ampholyte Carrier pH值 3.5~ 10)，即在 3 mL的反应液中加入 60 μ L两性载体电解质，其他操作同文献 [5] 酶活性单位为： μ mol/min \cdot mL。使用上海第三分析仪器厂生产的 721型分光光度计测定光密度值，保温时间为 5 min

ALP同工酶的分离亦按文献 [5] 进行。电泳后的凝胶条经染色固定后，用日本岛津 CS-930双波长薄层色谱扫描仪 (波长 400 nm) 扫描，求出同工酶的相对总活力和各自同工酶的相对活力，由迁移速度的快

慢分别定为 ALP₁、ALP₂和 ALP₃

1.3 实验重复 4次。实验时间，1993年 6~ 7月，1994年 6~ 7月。

2 结果与分析

2.1 三个品种母奶水牛血清 ALP同工酶相对总活力正常值

由表 1和图 2可知，所测水牛血清 ALP同工酶相对总活力为：摩拉 (196 200) > 尼里 (153 400) > 三品杂 (150 300)，与产奶量呈负相关趋势，此与文献 [7] 相异而与陆曼珠等的结论^[6]相似；这可能与胎次、个体、测定方法以及测定时间等因素不同有关，另外也表明水奶牛与黄奶牛有一定的亲缘关系。

各种内高、低产奶量组血清 ALP同工酶相对总活力：尼里为高产组 (158 582) > 低产组 (148 220)，与文献 [7] 相似；摩拉和三品杂均为低产组 (196 740和 153 820) > 高产组 (195 620和 146 728)，与陆曼珠等的结果^[6]相似；这既反映了黄奶牛与水奶牛有相似之处，也反映了它们之间的差

表 1 三种母奶水牛血清 ALP同工酶相对总活力、相对活力正常值

Table 1 Normal values of the total relative-and relative activity of serum alkaline phosphomonoesterase (ALP) isoenzymes in three breeds of female milk buffaloes

品种 Breed	头数 (头) No. milk buffaloes	产奶量 Milk yield (kg/d)	相对总活力 Total relative $\bar{x} \pm s$	相对活力 Relative activity $\bar{x} \pm s$		
				ALP ₁	ALP ₂	ALP ₃
尼里 Nili-Ravis (Ni)	22 (总 Total)	6.9229	153400 \pm 67470 (43.98)	15010 \pm 6833 (45.52)	127200 \pm 64760 (50.91)	11180 \pm 5701 (50.99)
	10 (高产 High yield)	7.9847	158582 \pm 81757 (51.55)	13470 \pm 3213 (23.85)	134712 \pm 74373 (55.21)	10397 \pm 7698 (74.04)
	12 (低产 low yield)	5.4978	148220 \pm 59088 (39.87)	16556 \pm 9422 (56.91)	119690 \pm 61360 (51.27)	11972 \pm 3509 (29.31)
三品杂 Ni♂× (Mu♂× Nanning♀)♀	23 (总 Total)	7.2428	150300 \pm 60080 (39.97)	9423 \pm 4754 (50.45)	108400 \pm 50720 (46.79)	32480 \pm 16100 (49.57)
	11 (高产 High yield)	8.1791	146728 \pm 80625 (54.95)	9086 \pm 4247 (46.74)	113886 \pm 68270 (59.95)	23770 \pm 18190 (76.53)
	12 (低产 low yield)	5.6505	153820 \pm 39863 (25.92)	9761 \pm 5704 (58.44)	102870 \pm 32433 (31.53)	41192 \pm 7907 (19.20)
摩拉 Murrah (Mu)	20 (总 Total)	6.4836	196200 \pm 57530 (29.32)	12460 \pm 12080 (96.95)	168600 \pm 53230 (31.57)	15190 \pm 10800 (71.10)
	10 (高产 High yield)	7.3703	195620 \pm 56512 (28.89)	12620 \pm 8475 (67.16)	172776 \pm 56180 (32.52)	10250 \pm 6503 (63.44)
	10 (低产 Low yield)	5.2254	196740 \pm 65204 (33.14)	12290 \pm 16010 (130.27)	164338 \pm 56333 (34.28)	20120 \pm 12620 (62.72)

括号内数字为 C.V 值 Values in brackets are C. V.

图 1 水牛血清 ALP同工酶扫描曲线
Fig. 1 Scanning curves of serum ALP isoenzymes in buffaloes

异,同时也表明三种奶水牛之间的品种差异

三个品种母奶水牛种间及种内高、低产奶量组之间血清 ALP同工酶相对总活力虽有不同程度的差异,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。这可能表明产奶量的高、低是多种因素影响的结果

2.2 三种母奶水牛血清 ALP同工酶谱型及正常值

由表 1 图 1和图 2可知,三种水牛血清 ALP同工酶谱的基本特点:共有三种同工酶,这与文献 [7]完全一致;其中 ALP_2 占绝对优势,而 ALP_1 和

ALP_3 的值则较小,在尼里为 $ALP_2 (127\ 200) \gg ALP_1 (15\ 010) > ALP_3 (11\ 180)$,而在摩拉和三品杂则为 $ALP_2 (168\ 600 \text{ 和 } 108\ 400) \gg ALP_1 (15\ 190 \text{ 和 } 32\ 480) > ALP_3 (12\ 460 \text{ 和 } 9\ 423)$ 。

ALP_1 : 在种间为,尼里 ($15\ 010$) $>$ 摩拉 ($12\ 460$) $>$ 三品杂 ($9\ 423$),差异不显著 ($P > 0.05$)。在种内高、低产奶量组比较是,尼里和三品杂为低产奶量组 ($16\ 556$ 和 $9\ 761$) $>$ 高产奶量组 ($13\ 470$ 和 $9\ 086$),与产奶量呈负相关趋势;摩拉为高产奶量组 ($12\ 620$) $>$ 低产奶量组 ($12\ 290$),与产奶量呈正相关趋势;以上差异均不显著 ($P > 0.05$)。

ALP_2 : 在种间为,摩拉 ($168\ 600$) $>$ 尼里 ($127\ 200$) $>$ 三品杂 ($108\ 400$),与产奶量呈负相关趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$)。而在种内则均与产奶量呈正相关趋势,差异也不显著 ($P > 0.05$)。

ALP_3 : 在种间为,三品杂 ($32\ 480$) $>$ 摩拉 ($15\ 190$) $>$ 尼里 ($11\ 180$),三品杂与尼里、三品杂与摩拉之间差异高度显著 ($P < 0.01$),而摩拉与尼里之间差异不显著 ($P > 0.05$);对于三品杂来说是与产奶量呈正相关,表现出强烈的杂种优势。在种内,则均与产奶量呈负相关趋势,差异亦均不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 两性载体电解质对 ALP的抑制作用

加入 2% 的两性载体电解质后的对照管的酶反应液对酶活力产生强烈的抑制作用,其顺序为尼里 (由 $0.0925 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$ 降至 0.0032 ,为原活力的 3.24%) $>$ 摩拉 (0.148 降至 0.0093 ,为原活力的 6.28%) $>$ 三品杂 (0.0258 降至 0.0051 ,为原活力的 19.77%)。即酶活力被抑制 80% 以上。此种抑制作用与文献 [7] 间接估测的结果是一致的。我们在水牛奶和猪血清中也观察到该酶类似的抑制作用,但不

(下转第 80页 Continue on page 80)

图 2 三种水牛血清 ALP同工酶比较

Fig. 2 Comparison of serum ALP isoenzymes in three breeds of buffaloes

宜方法,有能力抵抗不同类型野毒的攻击。但国内现有生产 IBDV 疫苗的条件或方法及疫苗保管或运输过程中可能存在的问题,致使有效病毒剂量严重不足,再加上可能存在的免疫程序或方法不当,最终导致免疫失败,致使 IBD 仍不断发生,形成一种 IBD 难以预防的假象。本文提出的在 IBDV 疫苗制备及应用中可能存在的问题和解决办法,希望能得到同行和使用单位的重视。

参考文献

- 1 Brown F. The classification and nomenclature of virus summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, Intervirology, 1986, 25: 141-143.
- 2 Snyder D B, Lana D P, Savage F S et al. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis, 1988, 32: 535-539.
- 3 Jackwood D H, Saif Y M. Antigenic diversity of IBDV. Avian Dis. 1987, 31: 766-770.
- 4 Snyder D B. Changes in the field status of IBD Virus. Avian Pathol, 1990, 19: 419-423.
- 5 Snyder D B, Vakharia V N, Savage P K. Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of IBD viruses in the United States. Arch Virol. 1992, 127: 89-101.
- 6 Vakharia V N, He J, Ahamed B et al. Molecular basis of

- antigenic variation in IBD Virus. Virus Res, 1994, 31: 265-273.
- 7 Jackwood D J, Saif Y M, Moorhead P D. Immunogenicity and antigenicity of IBDV serotypes I and II in chicken. Avian Dis, 1985, 29: 1184-1194.
 - 8 高福,刘文军主译.禽病学.第9版.北京:北京农业大学出版社,1991,554-566. ISBN 7-81002-318-7/s. 319.
 - 9 Ismail N M, Saif Y M. Immunogenicity of IBD Viruses in Chickens. Avian Dis, 1991, 35: 460-469.
 - 10 王笑梅,陈冠春,于大海.牛血清中非特异性抑制因子对几种病毒的抑制作用.中国畜禽传染病,1988,6: 48-50.
 - 11 吴宝成,陈立炎,王桂秋. HSV-1在 Vero 细胞上的噬斑形成条件.武汉大学病毒学系 1984 年毕业生论文集.
 - 12 Wyeth P J, Chettle N J. An agar diffusion test for differentiating between strains of type I IBD Virus. Vet Rec. 1988, 122: 442-443.
 - 13 李树根,黄生,林志雄等.鸡传染性法氏囊病毒血清 I 型病毒亚型毒株的分离.中国畜禽传染病,1991,5: 7-10.
 - 14 Giambrone J J, Closser J. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of IBD virus. Avian Dis, 1990, 34: 7-11.
 - 15 Giambrone J J, Clay R P. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity and immunodepressive potential of four commercial live IBD virus. Poultry Sci, 1986, 65: 1287-1290.

(责任编辑 蒋汉明)

(上接第 73 页 Continue from page 73)
及水牛血清的强烈,这说明此抑制剂对 ALP 的抑制作用在一定范围内具有普遍性

致谢

本文得到黄秀英、胡曦璇老师的帮助,特表谢意。

参考文献

- 1 王秉栋,经荣斌.猪血清碱性磷酸酶与骨骼生长的关系.中国畜牧杂志,1984,(2): 2-3.
- 2 何谓霞,齐顺章.健康乳牛与骨病乳牛血清中碱性磷酸酶酶谱的分析.中国兽医杂志,1982,8(4): 7.

- 3 北京农业大学主编.动物生物化学.第二版.北京:农业出版社,1987.346.
- 4 全国农业生化学术会议筹备组编.中国生物化学学会全国农业生化学术会议论文摘要汇编.江苏农学院,1984.127-128.
- 5 北京农业大学主编.动物生物化学实验指导.北京:农业出版社,1986.62-63,97-100.
- 6 赵浩斌.血液生化指标与产奶性能的关系.黄牛杂志,1993,19(2): 59-60.
- 7 栾桂龙,欧阳柱,庞廷英.四种母水牛血清碱性磷酸酶的研究.广西畜牧兽医,1988,(4): 18-20.

(责任编辑 蒋汉明)