

生物学研究概说

同工酶

C. C. 赖德 C. B. 泰勒 著



科学出版社

·生物学研究概说·

同工酶

C. C. 赖德 C. B. 泰勒 著

范培昌 译

顾季琰 童坦君

科学出版社

1987

内 容 简 介

本书是《生物学研究概说》丛书中的一册。书中除简要介绍同工酶的结构、分类、鉴定、分离提纯外，还阐明了同工酶与发育、分化、遗传、进化、代谢调节等方面的关系，以及它在癌症与其它疾病诊断中的意义和应用。

可供生物化学、分子遗传学、细胞学、免疫学、组织胚胎学、植物生理学、医学等方面的科技人员及大专院校和医学院校师生参考。

C.C.Rider C.B.Taylor
Outline studies in Biology
ISOENZYMES
Chapman and Hall 1980

• 生物学研究概说 •

同 工 酶

C. C. 赖德 C. B. 泰勒 著

范培昌 译

颜季琼 童坦君 校

责任编辑 吴铁双

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院科技印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年4月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1987年4月第一次印刷 印张：3 1/4

印数：0001—3,800 字数：71,000

统一书号：13031·3496

本社书号：4994·13—10

定价：0.85元

目 录

第一章	绪 言	(1)
第二章	同工酶的结构概貌	(3)
2.1	酶的多样性的 成因	(3)
2.2	遗传成因或原发性成因同工 酶 类	(4)
2.3	转译后成因或继发性成因同工 酶 类	(6)
2.4	酶的表面多 样 性	(7)
2.5	同工 酶 组	(8)
2.6	杂交 实 验	(10)
2.7	同族蛋 白 质	(11)
2.8	同工酶的 命 名	(12)
第三章	遗传与进化中的 同 工 酶	(16)
3.1	作为遗传标志物的同 工 酶	(16)
3.2	同工酶在遗传学中的重 要 性	(19)
3.3	酶的多态性与进化 理 论	(24)
3.4	多基因座同工酶的 进 化	(28)
第四章	发育与分化中的 同 工 酶	(35)
4.1	引 言	(35)
4.2	同工酶在发育研究中的 应 用	(35)
4.3	个体发生学的研究 结 果	(36)
4.4	粘菌中的发育 变 化	(37)
4.5	在植物发育研究中有关的同 工 酶	(38)
4.6	脊椎动物的发育 研 究	(39)
4.7	组织培养研究中有关的同 工 酶	(51)
4.8	小 结	(53)

第五章 代谢调节中的同工酶	(55)
5.1 引言	(55)
5.2 在细菌合成氨基酸中的同工酶	(56)
5.3 同工酶与代谢可逆性	(57)
5.4 肝和肌肉糖酵解的同工酶	(60)
5.5 代谢途径区域化的同工酶	(63)
第六章 癌的同工酶	(67)
6.1 致癌转化	(67)
6.2 有关肿瘤同工酶的早期研究	(68)
6.3 实验性肿瘤的代谢	(68)
6.4 实验性肿瘤的同工酶变化	(70)
6.5 癌胎抗原	(74)
6.6 异位内分泌活性	(75)
6.7 肿瘤特异性抗原	(76)
6.8 小结	(76)
第七章 诊断与疾病中的同工酶	(80)
7.1 作为组织损伤标志物的血清酶	(80)
7.2 血清同工酶的测定	(83)
7.3 诊断上重要的同工酶	(85)
7.4 同工酶缺陷症	(89)
第八章 同工酶的分离与测定	(93)
8.1 同工酶的提纯	(93)
8.2 分析方法	(93)

第一章 绪 言

二十年前就发现了同工酶，当时认为，同工酶很有意义但极少存在。从此以后，有关酶异质性的信息大量递增。现在已能说，至少有半数的酶是作为同工酶而存在的。同工酶在生物学和医学的许多领域中甚为重要，对它的研究为遗传和进化中的所谓中性漂变说 (neutral drift) 的论战提供了主要实验物质；它极大地扩展了我们有关动物、细菌和植物中代谢调节的知识；它的存在使我们能够得到众多的、适用于研究分化和发育的高灵敏度的标志物，也为致癌过程和其它病理学过程中畸形基因的表达提供指征。同工酶在诊断性的临床生化中的应用也越来越多。

令人惊奇的现象是，影响如此之多的酶类，且在生物化学中显然很重要的同工酶，在一般生化教科书中竟如此不受重视，就其处理形式而论，同工酶在这些书中所占篇幅很少超过 1—2 页。也许，这是由于“正统的生化学家”倾向于把不同组织中酶性质的变异，看作在制造不必要的混乱，而不是把它看作一种可能洞察生物功能多样性的潜在来源。因此本书的目的在于填补这一空白，使学生不仅能了解他自身特定命题中与同工酶学有关的方面，也使他对酶异质性的较广泛的含义感到兴趣。同工酶学 (isoenzymology) 跨越了生物学科传统界线。将来，这一领域很可能会有新的突破和应用，就象过去通过多学科途径已曾达到的那样。

显然，由于本书的篇幅所限，我们在论述同工酶时，不论是广度还是深度会受到限制。为此，我们决定节省在阐述

第二章 同工酶的结构概貌

2.1 酶的多样性的成因

酶的多样性的成因是多方面的，可区分为两大类：
 (a)遗传成因或原发性成因(genetic or primary causes)，
 由于生物体携带着多种基因，每种基因为酶的一种亚单位编
 码；(b)转译后成因或继发性成因(post-translational
 or secondary causes)，由于同样的酶亚单位，经过不同
 的化学修饰，以致从单一基因编码而来的酶的同亚单位，
 变成了一群不同的亚单位。由遗传原因引起的多样性又分为
 两类：第一类为单一基因座的多等位基因 (multiple al-
 leles)；第二类为多基因座 (multiple genetic loci)。酶
 多样性的成因示于图2.1。

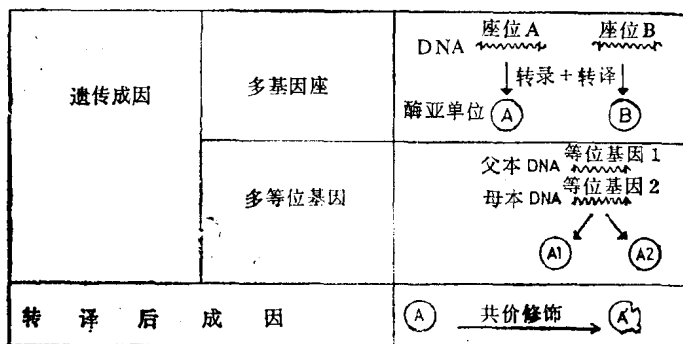


图2.1 酶的多样性的成因

2.2 遗传成因或原发性成因同工酶类

2.2.1 由单基因座多等位基因引起的同工酶

在二倍体基因组中,每一基因座有两份。对一个基因座而言,每一个体或者是有两个相同等位基因的纯合子 (homozygous),或者是有着两个不同等位基因的杂合子 (heterozygous)。就基因座为一个酶亚单位编码而论,纯合子个体仅能产生一种类型亚单位。但是,有着两个不同等位基因变种的杂合子个体,将产生两种不同的亚单位类型。在个体范围内,由多等位基因产生的酶的多样性是有限的。这种类型所产生的最大限度遗传变异是,二倍体的每个基因座只有两个不同的等位基因。但是,对物种基因库中的同一基因座来说,鉴于可能存在着形形色色的不同的等位基因,因此从一个个体到另一个体,产生的酶亚单位的类型会有很多变种。

由多等位基因所产生的酶亚单位型,彼此间大概仅有微细的差异,就如DNA核苷酸顺序中因为点突变 (point mutation) 所引起的个别氨基酸置换而造成的微细差异。在那里,一种基因座有了活性,通常就有两个等位基因被表达。因而在同一个体中,虽说不同种类的细胞其酶的总活性可能有颇大变化,但同工酶谱将始终不变。纯合子个体只显出一种亚单位型,而杂合子则具有两种不同的亚单位型。

2.2.2 由多基因座引起的同工酶

许多酶类是由一个以上基因座编码的。此时,每个基因座将产生一种类型的酶亚单位。因为每一基因座的表达是被独立控制的,所以有机体可以在一特定细胞中合成一种类型的酶亚单位,而在别处合成酶的另一种亚单位。此外,基因

座的表达可在发育进程中改变，因此一种组织产生的酶的亚单位型可以发生变化。可见，多基因座允许不同组织，甚至同种组织内的不同发育阶段，其同工酶谱具有一定差异。要是酶的多样性仅由单基因座操纵的多等位基因引起，那末同工酶谱就不会发生这样的变异。但是，鉴于同种生物的所有成员具有同样的基因座，为酶编码的多基因座如缺乏等位基因，就无法解释该种生物各成员之间同工酶的差异。由多基因座产生的同工酶亚单位，大概会因许多氨基酸的置换而有广泛的不同。此时，也会因残基的丢失或加入而发生亚单位间的细微差异。

为了举例说明这两种遗传多样性产生同工酶的方式，让我们来看看人的血红蛋白。虽说这种寡聚态的蛋白质不属于酶，但它却是一种既由多基因座，又由多等位基因产生的蛋白质，是一种已被很好鉴定的一群以不均一分子形态存在的蛋白质。血红蛋白由八个不同基因座编码，每一基因座产生一种亚单位。各种亚单位的多肽顺序密切相关，但又存在着颇大程度的氨基酸置换， α 和 β 亚单位间不相同残基约占50%，由各基因座产生的多肽链长度也存在小的差异： α 亚单位的残基数为141； β 、 γ 和 δ 都是146。从早期胚胎到婴儿期的发育进程中，由于各种基因座活性的改变，所存在的血红蛋白类型也存在着明显的性质上的变化。例如，新生儿中主要血红蛋白的组成为 $\alpha_2\gamma_2$ ，但在几个月内因为 β 基因座活化代替了 γ ，致使 $\alpha_2\beta_2$ 替代了 $\alpha_2\gamma_2$ 。

现在，已列出了一份已经很长而且还在不断加长的异常血红蛋白的名单。它们均由稀有等位基因产生的。这些异常血红蛋白中最著名、传播最广的是镰刀形细胞贫血症基因(sickle cell anemia gene)。这是一种代表血红蛋白 β 亚单位基因座的等位基因，它的多肽产物和正常 β 链的差异

仅在于一个氨基酸的置换,即该多肽链第6位处通常为谷氨酸的残基被缬氨酸所替代。即使在镰刀形贫血症细胞基因盛行的地区,个体间的血红蛋白谱也有差别,这取决于其是正常等位基因的纯合子,还是镰刀形细胞贫血症的纯合子,或是杂合子。

2.3 转译后成因或继发性成因同工酶类

蛋白质可以在其合成后通过种种方式被修饰。这类修饰作用,包括加糖蛋白酶的有限水解,以及氨基酸侧链的共价修饰等。合成后的改变只影响酶的部分亚单位群,以致于修饰过的和未修饰的亚单位能在同一机体中找到,因此形成了同工酶。这方面的一个例子是肌肉醛缩酶的微观不均一性(micro-heterogeneity)。在脊椎动物中,醛缩酶是由三种基因座编码的。虽说仅有A座在骨骼肌中表达,但还是可从此组织中分离出A α 和A β 两类亚单位。实际上从A基因座转译的产物是A α 多肽,后因接近羧基端的一个天冬酰胺残基的脱氨基作用,而缓慢地转变为A β ^[1]。

在某些组织中转译后的修饰作用是十分活跃的,但在另一些组织中不活跃,其后果则是类似于多基因座的效应,出现继发的同工酶的组织特异分布。丙酮酸激酶的一种特殊亚单位即是例子。哺乳动物中丙酮酸激酶有三种主要亚单位类型,每种由一独立的基因座编码^[2]。其中之一名L型(也称为I型),局限于肝脏和红细胞中。但在这两种组织中含有的L型亚单位,无论是分子大小还是电泳时的电荷都稍有差异。最初认为,红细胞所具有的较大的亚单位——L'型的合成中,可能有第四种基因座的参与。现已搞清,这是L型亚单位转译后修饰的结果。在所有组织中,L型基因座的最初产

物都是L'型亚单位，但在肝脏中，它通过蛋白酶裂解很快修饰成了L型。在红细胞中，这种修饰作用未能广泛发生。在糖原酵解的调节中丙酮酸激酶具有重要作用。其L和L'型亚单位在调节功能中显示出差异，这在生理学上大概是重要的〔3〕。

2.4 酶的表面多样性

必须承认，术语同工酶常被不严格地用于操作上的意义。也就是说，每当表面地看到酶多样性，就倾向于用同工酶一词来称呼之。通常，从看到酶异质性起，到最后阐明其成因，常需经历很长一段时期。酶的多种形式可能作为同工酶引入文献，而此时因种种原因还不应使用这一术语。因为这样的多种形式很可能是由于细胞和细胞抽提物的实验室操作所致的矫作物；非生理性的离子浓度会导致配体(ligand)的非特异结合，使酶的表面性质随之改变；或者，在破碎细胞时因释放出蛋白水解酶类，致使受检的酶部分降解。由上可见，在完整细胞中原来并不存在的酶的多样性，可因种种原因人为地造成。例如，糖酵解酶类的磷酸葡萄糖异构酶的异质性，就会因该酶巯基人为地氧化而显示出来〔4,5〕。

由于检验酶的方法常常使酶处于非生理状态而会造成进一步的问题。例如，为了在体外获得最佳酶活性，所用底物浓度常常高于活体中所能找到的浓度。如此高的底物浓度必然导致底物被结合，被酶的活性部位所作用，而酶的活性部位与这种底物的亲和力不高。例如，细胞质中一种非主要的酪氨酸氨基转移酶，后来发现它原来就是天冬氨酸转氨酶，此酶具有广泛的底物特异性〔6〕。与此类似，最初报道葡萄糖磷酸变位酶以三种形式同工酶存在，但其后的研究表明，其中

之一对葡萄糖-1-磷酸的亲合力很低，所以它不象在细胞中有葡萄糖磷酸变位酶的功能。它更可能是另一种底物的变位酶^[7]。

酶异质性的大多数例子，还未经受上述实例所用的这种精细分析的分辨，而这种分辨对于将生理性的酶的多样性与人为矫作物相区别是必要的。

2.5 同工酶组

许多酶是以多肽亚单位寡聚结合的形式存在的，其中二聚和四聚态的四级结构是很普遍的。在细胞中，只要存在着一种以上的酶亚单位，那末不同的亚单位型就会在那里以所有可能的组合方式结合在一起，从而产生一组同工酶。图2.2所示为两种亚单位，随机结合产生寡聚态同工酶组的情况

二聚态酶



三种可能存在的同工酶

实例：脊椎动物中的肌酸磷酸激酶

三聚态酶



四种可能存在的同工酶

实例：大肠杆菌中的鸟氨酸氨甲酰基转移酶

四聚态酶



五种可能存在的同工酶

实例：脊椎动物中的乳酸脱氢酶

图2.2 同工酶组。不同的酶亚单位随机结合将产生决定酶寡聚态性质的一组同工酶。这里出示的虽然仅有用黑圈和白圈代表的两种亚单位型，但同工酶组可以含两种以上亚单位型，此时同工酶组会复杂很多

况。在每一同工酶组，存在着一种或多种同时含两种亚单位的同工酶，它们称为杂合同工酶 (hybrid isoenzymes)。杂合同工酶具有居间的物理和化学性质。以鼠脑醛缩酶同工酶的电泳分离为例 (见图2.3)。脑醛缩酶具有两种亚单位A

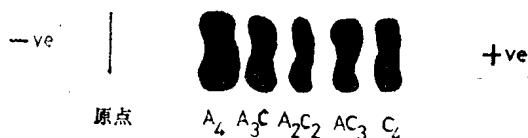


图2.3 鼠脑醛缩酶同工酶的电泳分离谱。在pH6.8的乙酸纤维素上电泳之后，电泳条浸渍于含醛缩酶底物——氮蓝四唑 (nitro blue tetrazolium) 和其它试剂的检验介质中，醛缩酶同工酶的位置以深色区带显示出来。在此反应中，醛缩酶活性导致四唑盐的有颜色的甲腈衍生物之形成 (看第八章)

和C型，它们结合而成五种四聚体： A_4 、 A_3C 、 A_2C_2 、 AC_3 和 C_4 。C亚单位比A酸性强，因此 C_4 是向阳极迁移最快的同工酶， A_4 则是迁移最慢的成分，而杂合同工酶显示出居间的迁移速率，并取决于它们的亚单位组成。因此这种由五个成员组成的同工酶组可被分离得到一种有序而间距匀称的电泳谱。

这里所列出的所有实例，虽是以存在两种基因座为依据，但不同的亚单位型在任何地方都可以组合成同工酶组，而不必顾及亚单位异质性的原因。在存在着两个以上亚单位型的地方，同工酶的复杂性增加。例加，在大多数脊椎动物中，存在着A、B和C三种乳酸脱氢酶亚单位型，由此可随机形成的四聚体，产生十五种不同的同工酶，其中有十二种属于杂合同工酶。

除了多基因座外，如果还发生了等位基因的变异，那末复杂性又将进一步成倍地增加。再用脊椎动物的乳酸脱氢酶为例，但在此时，其亚单位A和B又存在着等位基因的变异。

对这些变种来说，有机体将有成倍的杂合子。也就是说，乳酸脱氢酶亚单位类型不是三个而是五个；即：A、A'、B、B'和C，由此可能随机产生一群达七十个四聚态的同工酶。假定亚单位是随机结合的，那末可由下式得到不同的同工酶数 i ：

$$i = (s+n-1) ! / n! (s-1) !$$

式中 n 是酶分子中的亚单位数， s 是可得到的亚单位型的数目^[8]。

对研究者来说，幸运的是，同工酶组的复杂性常常是有限度的，不会所有可能产生的杂合同工酶全被碰到。对此的解释通常是，在同种细胞中各基因座不会同时一起表达。实际上，某些基因座的表达极为有限。乳酸脱氢酶亚单位C仅在初生的精母细胞中合成。在那里，A和B亚单位是找不到的。这种基因表达的空间分隔意味着含C亚单位的杂合同工酶不会在活体内碰到，虽说它们在体外能因各种亚单位的随机结合而形成。

一个细胞中的同工酶谱取决于所存在亚单位的相对比例，富含主要亚单位的那些同工酶最为常见。常常发现，同工酶的分布符合 $(p+q)^n$ 类型的二项式分配规律。这里， p 是某亚单位存在的函数； q 是另一亚单位型存在的函数； n 则是酶分子中亚单位的数目。对此，亚单位的结合必须完全是随机的，以便不会优先形成特定的同工酶。

2.6 杂交实验

如果发现一种有机体含有几种同工酶，那末同工酶间的相互关系可以通过Market引入的一种杂交实验技术^[9]来确定。这种试验将确认该同工酶是该同工酶组的成员或者不

是。在这类实验中，要显示出两种同工酶性质的最大不同（通常由电泳迁移率来判别）。这两种同工酶先提纯为没有中间类型同工酶的纯品，然后把两类同工酶混合，再处理之，使酶解离为其亚单位组分。此时，可以采用各种解离条件，包括冰冻与融化、高盐浓度、极端pH以及加入脲或盐酸胍等。已解离的制品在一种能使之重新结合的缓冲液中透析，使这些亚单位重新组合。最后，对混合物进行分析，确定它们是否已经形成了杂合同工酶，是否和活体内找到的中间类型同工酶相当。杂交试验对进一步证实同工酶是以多亚单位形式存在这一论点是有帮助的。甚至，它还能确定某些酶类的亚单位结构。例如，醛缩酶曾一度认为是四聚态，为此，把两种各由一种亚单位组成的同工酶杂交，电泳后得到了五条区带的同工酶谱，这就证明它确是一种四聚态结构^[10]。此后，其它研究也都证明醛缩酶确是四聚态结构。

2.7 同族蛋白质

多样性不只限于酶类，已知许多非催化性蛋白质（non-catalytic protein）也以多种形式存在。血红蛋白、肌红蛋白、铁蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白都是由于存在着一个以上的多肽亚单位型而显示出多样性。因此，酶只是以同一方式产生的一群特殊类别的蛋白质，同工酶可被看作是特殊类别的同族蛋白质（isoproteins）。人们对非酶蛋白质多种形式的注意要比同工酶少得多，但不能就此认为非催化性的蛋白质的异质性不普遍或不重要。简单地说，这只是因为酶有特异的催化性能，使它们能在细胞粗提液中容易被检出。然而对非酶蛋白质来说，这种检出法是不能实现的。因此，研究同族蛋白质就没有研究同工酶方便。

本书虽是介绍同工酶的，但书中所讨论的大多数概念亦可直接应用于同族蛋白质。例如，在非酶蛋白质中同样存在着异质性的遗传成因和非遗传成因，由此而产生的多种形式也象同工酶那样，可以显示出随发育而变化以及显示组织特异的分布图谱。

2.8 同工酶的命名

2.8.1 定义

同工酶的命名曾是理论和应用化学国际协会与生物化学国际协会 (IUPAC-IUB) 关于生化术语命名的三篇报告的主题^[11]。近来，在包括对同工酶一词的定义予以修改的建议中，限定同工酶一词仅用于由遗传成因所产生的酶的多样性，而不考虑因转译后修饰所形成的多种形式。也就是说，只有那些具有恒定性质的酶的各种类型，才被认为是同工酶。细胞中存在着以各种方式修饰酶的机理，但由此而形成的酶的多种形式仅是暂时的，所以它们不是同工酶。某些转译后修饰作用产生的暂时性的多种形式，是调节机理引起的。许多酶受调节机理的影响，引起了酶的共价或非共价的改变。由此，酶能按照细胞代谢的需要，在其活化型和钝化型之间互相转换。象这样的调节机理已在这套丛书的另一册中由Cohen阐述过^[12]。暂时性酶异质性的其它成因是酶的衰老和降解，在这种过程中它们可能产生一系列部分活化的产物。这些也不应认为是同工酶，因为它们也是容易消逝的。但是，从同工酶的定义中把所有的酶多样性的继发性成因都排除掉，可能过分严格。丙酮酸激酶L型亚单位作为亚单位继发性修饰的实例已在前面讨论过，由此产生的一种具有组织特异性的酶型，具有重要的生理学性质。

而且，把所有转译后修饰成因排斥在外实际上是难以实行的。在证实一种酶存在多样性后，相当大量的工作是确定该多样性是遗传成因，或是非遗传成因引起的。按照上述定义，在遗传成因最后证实前，酶的多种型态就不能称之为同工酶。

因为在上述定义被推荐后出现的这些问题，由转译后修饰引起的酶多样性的某些例子，或许还将继续使用同工酶这一术语。

2.8.2 名称

过去一谈到同工酶总是喜欢以其组织分布情况来称呼，如肝型、肌型等等。这种名称的出现，是因为一种同工酶所处的组织位置，通常即是最初确认其生理性质的部位。此名流传很广。但是下述两项理由说明根据组织分布而定的命名系统是不恰当的。首先，许多同工酶的组织分布不是绝对的，以致于一种同工酶能同时存在于几种组织中。例如，乳酸脱氢酶普遍存在的两种亚单位，最初分别被定为肌型和心型。事实上，这些名称很不合适，因为这两种亚单位在肌肉、心脏以及其它组织中都能找到。其次，同工酶的组织分布不是固定不变的，而是随发育期而变化的。例如，肌酸磷酸激酶是一个由两种亚单位类型组合成的二聚态同工酶组。最初这两种亚单位被分别称为M（肌型）和B（脑型）。这种称呼源于成人骨骼肌仅含MM同工酶，脑仅含BB型。且不说B亚单位也可在心肌和平滑肌中找到，而且早期胎儿的骨骼肌也主要含B型亚单位（参看第4.6.6节）。

这里推荐一种用数码来表示的同工酶命名法。对一套同工酶的各成员，可按规定条件下的电泳迁移率用连续的数字来表示。数字最小的同工酶，向阳极迁移最快。这种用数码