

酶的凝胶电泳检测

Handbook of Detection of Enzymes on
Electrophoretic Gels

(原著第二版)

手册

[俄] G. P. 曼琴科 (Gennady P. Manchenko) 著

华子春 郑伟娟 等译



化学工业出版社

Q55-62
6012

酶的凝胶电泳检测

Handbook of Detection of Enzymes on
Electrophoretic Gels
(原著第二版)

手册

[俄] G. P. 曼琴科 (Gennady P. Manchenko)

华子春 郑伟娟 等译



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

酶的凝胶电泳检测手册: 第2版. / [俄] 曼琴科 (Manchenko, G. P.) 著; 华子春, 郑伟娟等译. —北京: 化学工业出版社, 2007. 7

书名原文: Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels

ISBN 978-7-5025-9377-3

I. 酶… II. ①曼…②华…③郑… III. 酶-凝胶电泳-检测-手册 IV. Q55-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 099007 号

Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, 2nd edition/by Gennady P. Manchenko.
ISBN 0-8493-1257-4

Copyright© 2003 by CRC Press LLC. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by CRC Press, part of Taylor & Francis Group LLC.

本书中文简体字版由 CRC Press LLC 授权化学工业出版社独家出版发行。
未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2005-4994

责任编辑: 傅四周 孟 嘉

装帧设计: 关 飞

责任校对: 吴 静

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 37¼ 字数 1070 千字 2008 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 99.00 元

版权所有 违者必究

译者的话

受化学工业出版社的委托，我们承担了《酶的凝胶电泳检测手册》中文版的翻译工作。作为南京大学医药生物技术国家重点实验室的一个组成部分，我们研究组长期从事各种酶蛋白的克隆、表达、纯化、性质研究及蛋白质工程改造，简便、快速、灵敏、特异性的酶的检测和分析方法对于我们的研究工作至关重要。《酶的凝胶电泳检测手册》为我们展现了酶的凝胶电泳分析方法在生物学和医学领域的广泛适用性和简便可行性，本书还介绍了400多种不同酶的各种特异性检测方法。《酶的凝胶电泳检测手册》对于研究蛋白质和酶的专业科技人员是一本难得的、具有很好参考价值的工具书。《酶的凝胶电泳检测手册》的翻译对我们来说不仅是一项光荣的翻译任务，而且为我们提供了一个很好的学习和提高的机会，为我们今后的研究提供了很好的方法和工具。因此，我们衷心地希望《酶的凝胶电泳检测手册》中文版的发行能够为国内的同行提供一本新的、有实用价值的参考书和工具书，能够对各位同行的研究有所裨益和帮助，这是我们所有翻译者的初衷和期待。

在翻译过程中，对于原文中出现的拼写错误、疏漏等，如果可以根据上下文能确定正确的意思，我们就在正文中直接进行改正，并在该页下端以“译者注”标明。作为实验手册，文中涉及大量的化合物名称，这些名称的正确翻译将直接影响读者使用该手册的效果。为了方便读者，对于文中涉及的一些不常用化合物名称，我们一般会在初次出现该化合物时，在该化合物的中文名称之后用“()”标出其对应的英文名称，以后再出现该化合物时则省略英文名称。我们同时在全书正文后增加了附录D——非常用化合物中英文名称对照，列出了所有在手册中不止一次出现的不常用化合物的中英文名称，以方便读者查对。

本书的翻译者以青年教师、博士后、博士生为主，由于翻译水准以及专业水平的限制，书中翻译不当、甚至错误之处在所难免，我们诚恳地欢迎大家予以指正。

华子春
2007年2月8日
于江苏南京

第二版前言

用本书介绍的酶谱技术检测的同工酶一直被广泛用作基因标记，但是酶的电泳和酶谱技术的新应用不断出现，在第1章“简介”中对此作了概括，包括：①蛋白质组学研究中的酶蛋白，②在蛋白质水平上检测编码酶的基因的表达情况，③鉴定和研究选择性拼接产生的新的酶蛋白异构体（选择性同工酶）。酶谱技术的原理并没有很大的发展，因此在第2章“酶凝胶电泳检测的基本原理”中只有几点补充。第3章“特异性酶的检测方法”完全更新了，增加了上一版中没有的约100种酶的酶谱技术。总的来说，本版中包含了适用于测定400多种不同酶的900多种不同方法。其中大部分酶的亚基结构的信息也包括在酶的单页中，以帮助阐明酶谱中出现的同工酶模式。酶的名称和编号是根据国际生物化学和分子生物学学会命名委员会制定的最后一版酶的目录（1992）给出的。增加的附录C包含缓冲系统的信息，其中大部分是酶在淀粉、醋酸纤维素和聚丙烯酰胺凝胶电泳中所常用的。全书参考文献的量比第一版几乎翻了一番，因为其中包含了最近十年中出现的大量与酶谱技术有关的新信息。

编写本书第二版在很大程度上得益于我的三次短时间进修（1995年、1999年和2001年）：Bodega海洋实验室（BML）、加州大学和Davis，在那里我可以使用Cadet Hand图书馆的文献。图书馆还为我提供与Web-of-Science（科学引文检索数据库，科学信息学院，费城，宾夕法尼亚州）的链接。这些访问得到给BML的尤金·加菲尔德（Eugene Garfield）基金的资助。我对BML的同事、秘书和技术人员的慷慨和热情表示由衷的感谢。特别感谢我在那儿的导师Dennis Hedgecock，他关心我的生活和工作，我总能感受到他的支持。我深感受惠于BML的导师Jim Clegg和Susan Williams，他们在实验室对我的欢迎我一直铭记在心。在Davis校园实验室工作时，我两次感受到Abdrei和Irina Zalensky的热情，他们从在俄罗斯海参崴海洋生物学院（IMB）开始就是我的老朋友了。真的，“老朋友和陈酒是最好的”。我也很乐意感谢我的年轻朋友们，IMB遗传学实验室的原同事：Dmitri和Svetlana Zaykin（Raleigh, NC），Dmitri Churikov（Bodega Bay, CA），Andrei和Olga Tatarenkov（Irvine, CA）。我在美国进修时，他们无私地帮助我、鼓励我。在进修期间，我也有机会在西雅图华盛顿大学的实验室工作。在这个美丽的城市，我受到Robin Waples和他可爱的一家以及Fred Utter的热情招待。在我短暂进修期间与Dick Koehn（那时在盐湖城犹他大学）以及Oleg Serov（那时在巴西里约热内卢大学）相处的美好记忆，不断振奋我的精神，并鼓励着我写作。Anton Chichvarkhin和Victoria Pankova都来自IMB，在完成本书的最后阶段为我提供了技术上的支持。我感谢IMB主任Vladimir Kasyanov的支持和理解。特别感谢IMB的Alexander Pudovkin，他的帮助和支持使我在这个项目工作期间以及我的整个科学生涯期间感受到乐趣。本版的编写受到（俄罗斯）政府基础研究的一项基金的部分支持。我最后要感谢来自不同国家的许多同事，寄来他们发表论文的复印件，给本书补充了许多新材料。现在呈上这本书，等待他们的评价。

第一版前言

酶的凝胶电泳是一种非常有用的分析方法，目前被广泛用于生物学和医学的各个领域，并成功地应用于人类实践活动的不同领域。该方法的广泛推广主要归功于其简便性和分离同工酶及等位基因酶的能力，这些酶已被证明是非常有用的遗传标记。

酶凝胶电泳的关键步骤是在电泳凝胶上检测酶，即获得酶的电泳图谱或酶谱的过程。自从为了获得电泳酶谱而对组织化学法作第一次修改以来的这 35 年中，在这一领域已有许多显著的进步，与其他新技术相比，这一领域非常活跃。一些大家熟知的手册和指南中有关酶检测技术的信息不能反映这些新进展，在这一方面是过时了。

本书的目的是将最近这 35 年里发展起来的许多酶检测技术集中到一起。本书不仅介绍了酶凝胶电泳检测的一般原则，也介绍了 300 多种不同的酶的各种酶特异性检测方法。因此本书不仅对这一领域的专业工作者有用，也会对那些刚开始掌握电泳酶谱技术的人有帮助。

作者简介

G. P. 曼琴科 (Gennady P. Manchenko) 博士是俄罗斯海参崴科学院海洋生物学院遗传学实验室的高级研究员。

Manchenko 博士 1973 年毕业于新西伯利亚大学，获细胞遗传学博士学位。1973 年进入海参崴的海洋生物学院，1975 年晋升为副研究员。1981 年在列宁格勒大学获得博士学位。1983 年起被聘为海参崴海洋生物学院遗传学实验室的高级研究员。

Manchenko 博士是美国遗传学会 1978~1983 年的会员，俄罗斯瓦维洛夫 (Vavilov) 遗传学和畜牧学学会会员，海参崴海洋生物学院科学委员会成员。

他曾经获得来自乔治·索罗斯 (George Soros) 基金、尤金·加菲尔德 (Eugene Garfield) 基金、国际科学基金和俄罗斯基础研究基金的研究支持。目前的研究兴趣集中在同工酶学理论和应用方面。

致 谢

Alexander I. Pudovkin 博士（海参崴海洋生物学院）和 Robert P. Higgins 博士（Smithsonian Institution, Washington, D. C.）阅读了部分手稿并修正了我的英文，在此表示感谢。我也想感谢我的俄罗斯同事给我的鼓励，感谢外国同事帮我复印了原始文献，原始文献在书中已经给出。但是在致谢列表中最先和最重要的位置必须给予我的第一个同工酶学老师：Oleg L. Serov 博士（新西伯利亚大学细胞和遗传学院），20 年前当我还是新西伯利亚大学本科生的时候，他引导我进入了分子遗传学这个激动人心的领域。

本书的完成受到乔治·索罗斯（George Soros）基金的部分资助。

谨以此书
献给 Clement L. Markert!

目 录

第 1 章 简介	1
参考文献	3
第 2 章 酶凝胶电泳检测的基本原理	5
2.1 显色反应	5
2.1.1 能还原四唑盐的产物	5
2.1.2 能与重氮盐偶联的产物	7
2.1.3 引起 pH 值变化的产物	7
2.1.4 正磷酸	8
2.1.5 焦磷酸	9
2.1.6 过氧化氢	9
2.1.7 碳酸根离子	10
2.1.8 有色产物	10
2.1.9 带有还原型巯基的产物	11
2.1.10 影响淀粉-碘反应的产物	11
2.1.11 聚合酶的产物	12
2.1.12 解聚酶的产物	12
2.2 荧光生成反应	12
2.2.1 NADH 和 NADPH	12
2.2.2 4-甲基伞形酮	13
2.2.3 形成发光钼系金属螯合物的 产物	13
2.2.4 其它	14
2.3 放射自显影	14
2.4 生物自显影	15
2.5 二维凝胶光谱分析	16
2.6 蛋白质印迹	16
2.6.1 固定化基质	16
2.6.2 蛋白质的转移	16
2.6.3 特异性的抗体和标记的抗 抗体	17
2.6.4 检测印迹中被转移的蛋白质	18
2.7 其它方法	19
2.7.1 将不溶于水的底物掺入分离 凝胶进行检测	19
2.7.2 脂代谢酶的检测	19
2.7.3 通过二维电泳进行检测	19
2.7.4 用特异性探针检测酶蛋白	20
2.7.4.1 以标记的适配体和适配体	

信标作为特异性探针	20
2.7.4.2 以标记的抑制剂作为 特异性探针	20
2.7.5 一些非酶蛋白的特异性检测	20
2.7.5.1 用反向酶谱检测蛋白酶和 核酸酶的抑制蛋白	20
2.7.5.2 以生物素标记的蛋白酶为 特异性探针检测蛋白酶抑 制蛋白	21
2.7.5.3 生物素标记的乙酰透明质 酸作为特异性探针检测乙酰 透明质酸结合蛋白	21
2.7.5.4 转铁蛋白	21
参考文献	21
第 3 章 特异性酶的检测方法	24
3.1 酶单页的结构	24
参考文献	25
3.2 一般原则、评价和建议	26
3.2.1 酶电泳和检测的支持介质的 选择	26
3.2.1.1 醋酸纤维素凝胶	26
3.2.1.2 聚丙烯酰胺凝胶	26
3.2.1.3 淀粉凝胶	27
3.2.2 凝胶染色的策略	28
3.2.2.1 酶谱方法的选择	28
3.2.2.2 染色液的制备	28
3.2.2.3 染色液的使用方式	29
3.2.2.4 增强酶活性条带染色 强度的方式	30
3.2.2.5 酶谱方法的特异性和 一些相关问题	32
3.2.3 记录和保存酶谱	34
3.2.4 节省资源的策略	35
3.2.4.1 在同一块凝胶上同时 检测几种酶	35
3.2.4.2 在同一块凝胶上连续 检测不同的酶	36
3.2.4.3 染色液的重复使用	36
3.2.4.4 在一块凝胶上使用几个 原点	36

3.2.4.5 用电印迹法对电泳凝胶 进行多次复制	37	附录	559
3.2.4.6 使用半制备凝胶产生 连接酶制备物	37	附录 A-1 <i>Escherichia coli</i> 的基本培 养基	559
3.2.5 疑难解答	37	附录 A-2 <i>Pediococcus cerevisiae</i> 的柠檬 酸盐培养基	560
3.2.6 安全规则	38	附录 B-1 酶的目录 (中文)	562
参考文献	38	附录 B-2 酶的目录 (英文)	568
3.3 酶单页	40	附录 C 酶的电泳所用的缓冲系统	574
酶单页中常用的缩写	40	附录 D 非常用化合物中英文名称对照	578

第1章 简介

在电泳凝胶中检测酶就是显示电泳分离后特定的酶分子所处的凝胶区域。

电泳是指带电颗粒(如蛋白质分子)在电场的影响下在电解液中迁移。也许可以视Tiselius为蛋白质电泳之父。他建立了“移动边界”的方法来分离溶液中的血清蛋白^[1]。进一步发展的结果,发明了一种改良的方法,称为“区带”电泳,即不同的蛋白质分子在固定的介质中被分离成不同的区带。1955年Smithies引入了淀粉凝胶作为电泳分离蛋白质的固定(或支持)介质^[2]。1957年Kohn报道使用醋酸纤维素作为非常有用的支持介质^[3]。2年后Ornstein和Davis^[4]、Raymond和Weintraub^[5]引入了聚丙烯酰胺凝胶。目前,这些支持介质广泛用于电泳分离蛋白质。淀粉和聚丙烯酰胺凝胶基质的孔径大小与蛋白质分子的大小在一个数量级,这导致了“分子筛效应”,可以更有效地电泳分离带电性质相似而大小和形状不同的蛋白质分子。因此在区带电泳时,每一种蛋白质分子按照其特定的性质、沿着凝胶以不同的速度移动。用不同浓度的聚丙烯酰胺或淀粉(这将影响凝胶基质的孔径大小)和不同的电泳缓冲液系统(这将影响蛋白质分子的净电荷),可以得到几乎每一种蛋白质在电泳凝胶中的不同区带。完整地给出蛋白质电泳的理论原理超出了本书的范围。在这方面Andrews做得非常好^[6]。

1939年在Gomori的开创性努力下,建立了检测特异性酶的基础,他建立了显示动物组织中碱性磷酸酶活性的不同位置的组织化学方法^[7]。进一步的发展奠定了酶的组织化学作为独立的生物研究领域的基础^[8~10]。

1957年Hunter和Markert首先将组织化学染色过程应用于电泳分离组织粗提物后的淀粉凝胶,显示含有酯酶活性的凝胶区域^[11]。结果,酶所处的位置直接在凝胶中显示为染色条带(或者区带)。酶在电泳凝胶中的这种可见的显示称为酶谱(zymogram)^[12]。自此,凝胶电泳中酶的检测方法也被称为酶谱技术。

名词同工酶(isozymes或isoenzymes)是1959年由Markert和Möller引入,描述单独

或作为同一种属中的不同成员存在的、同种酶的不同分子形式^[12]。对不同酶的大量研究表明酶的多种分子形式的形成有三个主要原因:①存在一种以上的基因位点编码同一种酶;②在单个基因位点存在一种以上的等位基因编码同一种酶;③酶多肽链的翻译后修饰形成非遗传的或称作“次级”同工酶^[13~19]。根据国际纯粹化学和应用化学联合会的生物学命名委员会以及国际生物化学联合会(IUPAC-IUB)的推荐,同工酶定义为由遗传决定的、酶的多种分子形式^[20]。名词同工酶(isozymes)通常用于描述从不同遗传位点衍生的多种分子形式,而名词等位基因酶(allozymes)则用于描述从同一个遗传位点的不同等位基因衍生的多种分子形式。也有一些同工酶学家使用等位同工酶(allelic isozymes)这个名词。

自从出现酶谱法和发现同工酶以来,酶的电泳技术越来越多地应用于生物学和生物化学的广泛领域,以及人类实践活动的不同领域,提供有用的信息。同工酶和等位基因酶用作基因标记大大推进了我们对群体和进化遗传学、发育遗传学、分子进化学和酶学等这些领域的了解。同工酶和等位基因酶不仅被广泛用于重建相关种属之间的系统发育关系,也被广泛用于解决系统学中的无数问题。对于临床和诊断医学及医学遗传学、农业有机体的繁殖控制、农业昆虫学、渔业管理、环境污染的遗传监测、遗传资源的评价、法医学等,同工酶和等位基因酶也相当重要。

很长一段时间里,酶的电泳技术的主要局限性是只建立了极少量酶的特异性酶谱方法。到20世纪70年代中期,只有约50种酶可以用电泳分析^[21]。Harris和Hopkinson在70年代末编写的酶的凝胶电泳和检测手册^[14]是比较流行和经常被引用的,其中只包括国际生物化学和分子生物学学会的命名委员会(NC-IUBMB)1992年确定的3200种酶^[22]中的80种酶的特异性酶谱方法。之后,时不时地因为不同的目的建立新的酶谱方法(主要是组织化学和放射自显影),这些方法积累的速度很慢,而且经常隐藏在特定的期刊中,因此研究同工

酶的人不容易找到。从 70 年代后期和 80 年代早期以来,建立了几种新的途径,大大丰富了电泳和酶的检测,分别是:①生物自显影法,凝胶电泳后利用微生物试剂定位特定的酶活性^[23];②电泳凝胶的二维光谱分析法,用特定的光学设备,以类似溶液的一维光谱分析的方式,分析二维凝胶^[24];③免疫印迹法,利用对某种酶特异性的单克隆抗体,通过免疫组化方法显示酶蛋白^[25]。在理论上,这些方法可以检测几乎所有已知酶的同工酶形式,但是生物自显影和二维光谱分析法从首次引入酶的电泳后,没有得到进一步的发展。印象最深的是免疫印迹技术的扩展。现在约 50 种不同的酶的单克隆和多克隆抗体已经商品化(参见 Sigma 公司 2002/2003 抗体目录)。当然由于一些客观原因(参见第 2 章 2.6 免疫印迹),免疫印迹技术还没有像其它酶谱技术一样得到广泛应用。

编写本书的目的是将自 Hunter 和 Markert 1957 年的开创性工作以来,建立的所有特异性的酶谱技术汇总到一起,因此它不包括凝胶电泳的应用、酶谱中显示的条带模式的遗传学解释,以及凝胶电泳和酶谱技术在生物学和医学研究中的无数应用实例。这些内容在其它出版物^[14,17~19,26~32]中涉及到,是本手册的优秀参考文献。

第 2 章概括了在电泳凝胶中显示酶的基本原理,包括组织化学、放射自显影、生物自显影、二维光谱分析、免疫印迹和其它方法的介绍。第 3 章包括 3 节:3.1 节介绍 3.3 节中给出的酶单页的编写结构;3.2 节给出选择支持介质和酶谱技术、记录和保存酶谱、节省资源的策略、疑难解答和安全控制的一般原则、评价和建议;3.3 节组成了本书的主要和最大的部分,含有检测 400 多种不同酶的 900 多种酶谱技术的详细介绍和要点。

酶的电泳仍然是分离和鉴定结构基因产物的最简单有效的工具。尽管在过去 20 年中 DNA 技术和 DNA 标记有了极大的扩展,但是酶的电泳和同工酶作为基因标记仍有一些重要的、显而易见的优越性^[33]。首先,凝胶电泳和酶谱技术在技术上比较简单而且省时。其次,可以用这些技术更方便、快速、省钱地研究分散在基因组中的大量核基因位点的遗传多态性。再次,考虑到等位基因同工酶(等位基因酶)的共显性表达和酶的亚基结构的高

度保守性,通常可以直接推断同工酶模式不同变化的基因型解释^[34]。最后,同工酶比 DNA 标记最重要的优点是,同工酶的研究可以带领分子进化学家更接近适应性进化的真实情况^[33]。因此对那些习惯在不同的生物学和医学研究领域使用同工酶作为基因标记的人而言,本手册应该非常有用。

除了可以作为很有价值的基因标记,同工酶还是酶蛋白的结构异构体,因此可以作为蛋白质组学查询的对象,蛋白质组学是后基因组生物学研究中最热的领域^[35]。鉴定通过凝胶电泳分离的蛋白质及其异构体是功能蛋白质组学最主要的问题和最费力的工作^[36]。在这儿有必要强调:结合凝胶电泳和酶特异性的酶谱技术,才能在一个操作流程中偶联酶蛋白异构体的电泳分离、检测和鉴定。蛋白质组学的目标是分析一个有机体内的一整套蛋白质(即蛋白质组),包括蛋白质分子的多个异构体的电泳检测、确定其功能以及表达的部位。令人震惊的是,早在 20 世纪 70 年代中期,Clément Markert 就认识到几乎相同的目标并形成了同工酶学的概念^[37]。酶组成了有机体蛋白质的重要部分^[38],因此同工酶学也许可以看成酶蛋白的蛋白质组学。它显然比非酶蛋白的蛋白质组学更优越。实际上,利用凝胶电泳和酶谱技术可以分析未纯化的酶制备物,包括:

① 酶蛋白及其结构异构体(即同工酶)的检测和鉴定;

② 在凝胶内测定同工酶的功能性质;

③ 测定同工酶的空间、时间表达和定位;

④ 从酶谱中测得的条带模式的变化和组织特异性,推断同工酶的遗传学基础;

⑤ 区分具有相似的以及重叠的底物特异性的不同的酶;

⑥ 鉴定具有较宽的底物特异性的酶蛋白,阐明其多种不同的催化功能;

⑦ 从其等位基因酶和同工酶模式,确定酶分子的亚基结构;

⑧ 结合非变性和十二烷基硫酸酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,估算不同同工酶的相对分子质量;

⑨ 通过等电聚焦技术测定同工酶的等电点等。

这些例子可以阐明酶的电泳和酶谱技术在蛋白质组学研究中尚未被完全认识的应用价值。

这些技术的另一种相关的应用是测定编码酶的 DNA 序列在翻译水平上的表达。测定序列的表达通常涉及搜索待测的 mRNA 或 cDNA 中的插入序列、缺失序列或终止密码子^[39]。有时可以用所测酶缺陷的大肠杆菌菌株来测定编码酶的 DNA 序列表达具有催化活性的酶分子的水平。用酶谱技术来进行这种测定更加有效、廉价和省时。利用酶谱技术测定克隆的编码酶的基因的蛋白质表达水平,这种实际应用的数量迅速增加^[40~45]。基因克隆的一种常用策略是用从待测酶的氨基酸序列推出合适的 DNA 探针筛选 DNA 文库。用凝胶电泳分离蛋白质,然后进行 N 端氨基酸测序,是一种快速获得所需氨基酸序列的方法^[46]。其绝对的前提条件就是适合检测凝胶中酶的特异性的、灵敏的酶谱技术。

从单个基因转录而来的 mRNA 前体的选择性拼接可以产生大量的蛋白质异构体,这既是对后基因组生物学的挑战,也是对蛋白质组学的推动力^[47,48]。选择性拼接产生的“选择性”同工酶代表了普通生物学意义的一种现象^[49]。虽然选择性同工酶(由单个基因决定的)的电泳模式类似于传统同工酶(由不同基因决定的)的电泳模式,但是在某些特殊情况下,这种类型的同工酶可以明确地区分^[49,50]。选择性同工酶的多样化电泳研究开辟了酶的电泳和酶谱技术的一种新的很有希望的应用途径。

参考文献

1. Tiselius, A., A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans. Faraday Soc.*, 33, 524, 1937.
2. Smithies, O., Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults, *Biochem. J.*, 61, 629, 1955.
3. Kohn, J., A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis, *Clin. Chim. Acta*, 2, 297, 1957.
4. Ornstein, L. and Davis, B.J., *Disc Electrophoresis*, Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodak Co.), Kingsport, TN, 1959.
5. Raymond, S. and Weintraub, L., Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis, *Science*, 130, 711, 1959.
6. Andrews, A.T., *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, Clarendon Press, Oxford, 1988.
7. Gomori, G., Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42, 23, 1939.
8. Pearse, A.G.E., *Histochemistry: Theoretical and Applied*, Vol. I, Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.
9. Pearse, A.G.E., *Histochemistry: Theoretical and Applied*, Vol. II, Williams & Wilkins, Baltimore, 1972.
10. Burstone, M.S., *Enzyme Histochemistry*, Academic Press, New York, 1962.
11. Hunter, R.L. and Markert, C.L., Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels, *Science*, 125, 1294, 1957.
12. Markert, C.L. and Möller, F., Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 45, 753, 1959.
13. Kenney, W.C., Molecular nature of isozymes, *Horizons Biochem. Biophys.*, 1, 38, 1974.
14. Harris, H. and Hopkinson, D.A., *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, North-Holland, Amsterdam, 1976 (loose-leaf, with supplements in 1977 and 1978).
15. Korochkin, L.I., Serov, O.L., and Manchenko, G.P., Definition of isoenzymes, in *Genetics of Isoenzymes*, Beljaev, D.K., Ed., Nauka, Moscow, 1977, p. 5 (in Russian).
16. Rothe, G.M., A survey on the formation and localization of secondary isozymes in mammalian, *Hum. Genet.*, 56, 129, 1980.
17. Moss, D.W., *Isoenzymes*, Chapman & Hall Ltd., London, 1982.
18. Richardson, B.J., Baverstock, P.R., and Adams, M., *Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*, Academic Press, Sydney, 1986.
19. Buth, D.G., Genetic principles and the interpretation of electrophoretic data, in *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*, Whitmore, D.H., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, p. 1.
20. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Nomenclature of multiple forms of enzymes: recommendations (1976), *J. Biol. Chem.*, 252, 5939, 1977.
21. Siciliano, M.J. and Shaw, C.R., Separation and visualization of enzymes on gels, in *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. 2, *Zone Electrophoresis*, Smith, I., Ed., Heinemann, London, 1976, p. 185.
22. NC-IUBMB, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego, 1992.
23. Naylor, S.L. and Klebe, R.L., Bioautography: a general method for the visualization of enzymes, *Biochem. Genet.*, 15, 1193, 1977.
24. Klebe, R.J., Mancuso, M.G., Brown, C.R., and Teng, L., Two-dimensional spectroscopy of electrophoretic gels, *Biochem. Genet.*, 19, 655, 1981.
25. Vora, S., Monoclonal antibodies in enzyme research: present and potential applications, *Anal. Biochem.*, 144, 307, 1985.
26. Utter, F., Aebersold, P., and Winans, G., Interpreting genetic variation detected by electrophoresis, in *Population Genetics and Fishery Management*, Reeman, N. and Utter, F., Eds., University of Washington Press, Seattle, 1987, p. 21.
27. Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J., and Britton-Davidian, J., *Practical Isozyme Genetics*, Ellis Horwood, Chichester, 1988.
28. Wendel, J.F. and Weeden, N.F., Visualization and interpretation of plant isozymes, in *Isozymes in Plant Biology*, Solties, D.E. and Solties, P.S., Eds., Dioscorides Press, Portland, OR, 1989, p. 5.
29. Morizot, D.C. and Schmidt, M.E., Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of proteins, in *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*, Whitmore, D.H., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, p. 23.
30. Murphy, R.W., Sites, J.W., Jr., Buth, D.G., and Hauffer, C.H., Proteins: isozyme electrophoresis, in *Molecular Systematics*, Hillis, D.M., Moritz, C., and Mable, B.K., Eds., Sinauer, Sunderland, 1996, p. 51.

31. May, B., Starch gel electrophoresis of allozymes, in *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*, 2nd ed., Hoelzel, A.R., Ed., Oxford University Press, Oxford, 1998, p. 1.
32. Acquaaah, G., *Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research*, Timber Press, Portland, OR, 1992.
33. Avise, J.C., *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, Plenum Press, New York, 1994.
34. Manchenko, G.P., Subunit structure of enzymes: allozymic data, *Isozyme Bull.*, 21, 144, 1988.
35. Lieber, D.C., *Proteomics*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001.
36. Kinter, M. and Sherman, N.E., *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York, 2001.
37. Markert, C.L., Biology of isozymes, in *Isozymes I: Molecular Structure*, Markert, C.L., Ed., Academic Press, New York, 1975, p. 1.
38. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., and 274 coauthors, The sequence of the human genome, *Science*, 291, 1304, 2001.
39. Charlesworth, D., Liu, F.-L., and Zhang L., The evolution of the alcohol dehydrogenase gene family by loss of introns in plants of the genus *Leavenworthia* (Brassicaceae), *Mol. Biol. Evol.*, 15, 552, 1998.
40. Hendriksen, P.J.M., Hoogerbrugge, J.W., Baarends, W.M., De Boer, P., Vreeburg, J.T.M., Vos, E.A., Van Der Lende, T., and Grootegoed, J.A., Testis-specific expression of a functional retroposon encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase in the mouse, *Genomics*, 41, 350, 1997.
41. Pfeiffer-Guglielmi, B., Broer, S., Broer, A., and Hamprecht, B., Isozyme pattern of glycogen phosphorylase in the rat nervous system and rat astroglia-rich primary cultures: electrophoretic and polymerase chain reaction studies, *Neurochem. Res.*, 25, 1485, 2000.
42. May, O., Siemann, M., and Syldatk, C., A new method for the detection of hydantoinases with respect to their enantioselectivity on acrylamide gels based on enzyme activity stain, *Biotechnol. Tech.*, 12, 309, 1998.
43. Okwumabua, O., Persaud, J.S., and Reddy, P.G., Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2, *Clin. Diagn. Lab. Immun.*, 8, 251, 2001.
44. Kee, C., Sohn, S., and Hwang, J.M., Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular cells and rat trabecular meshwork *in vivo*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 2856, 2001.
45. Lim, W.J., Park, S.R., Cho, S.J., Kim, M.K., Ryu, S.K., Hong, S.Y., Seo, W.T., Kim, H., and Yun, H.D., Cloning and characterization of an intracellular isoamylase gene from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287, 348, 2001.
46. Patterson, S.D., From electrophoretically separated protein to identification: strategies for sequence and mass analysis, *Anal. Biochem.*, 221, 1, 1994.
47. Black, D.L., Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology, *Cell*, 103, 367, 2000.
48. Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L., *Drosophila* DSCAM is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity, *Cell*, 101, 671, 2000.
49. Manchenko, G.P., Isozymes generated via alternative splicing of pre-mRNAs transcribed from single genes, *Gene Fam. Isozymes Bull.*, 34, 12, 2001.
50. Manchenko, G.P., Unusual isozyme patterns of glucose-6-phosphate isomerase in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae), *Biochem. Genet.*, 39, 285, 2001.

第2章 酶凝胶电泳检测的基本原理

本章介绍凝胶电泳分离后显示含有特定酶的凝胶区域的基本原理。这些原理可以按下述方式分类：产生正染或负染酶谱；化学方法或物理方法；显色或产生荧光；基于化学偶联反应或酶学偶联反应等。但是单纯从实用角度考虑，混合系统分类原则似乎更可取。根据这一分类原则，电泳凝胶中酶显示的主要原理可以分为：

- ① 基于显色反应；
- ② 基于荧光反应；
- ③ 放射自显影法；
- ④ 生物自显影法；
- ⑤ 二维凝胶光谱法；
- ⑥ 免疫印迹法；
- ⑦ 其它方法。

电泳凝胶的二维光谱法及免疫组织化学法前景广阔，对电泳图谱检测的进一步发展有重要价值。但是目前使用的酶谱检测技术主要还是基于显色反应和荧光反应，或放射自显影。

2.1 显色反应

显色反应是指在酶活性位点形成发色团的反应。其中大多数反应由成熟的组织化学或酶学检测的比色法改良而来。在简单的一步显色反应中，无色底物被酶催化生成有色产物。从广义上讲，显色反应包括能够使不连续的酶活性区带（或条带）在日光下可见的任何反应或一组反应。多数情况下酶反应的初级产物不容易被检测，需要在反应混合物中加入补充试剂，通过某种方式与初级产物反应，生成可见的二级产物。这些二级产物可以通过自发反应或化学偶联反应形成。但是有些情况下，通过化学偶联反应无法检测到任何初级产物，需要额外的酶反应，以生成可以检测的产物。这个过程称为酶偶联反应，加到反应混合物中的补充的外源酶称为连接酶或辅助酶。如果颜色是通过与酶活性作用的产物反应而产生的，那么得到的酶谱称为正染酶谱（无色背景上呈现有色条带）；如果颜色是通过与底物反应而产生

的，就会得到负染酶谱（有色背景上呈现无色条带）。

许多不同的酶可以产生相同的产物（如 NADH、NADPH、正磷酸、氨、过氧化氢等），或是具有相同化学性质的不同分子（如醛、酮、还原糖、巯基等）。这意味着可以用非常相似或相同的显色反应来检测不同的酶。因此根据所检测产物的性质对显色反应进行分类更有效、更实用。这种分类方式的优点是允许人们选择合适的显色反应来检测那些尚未在电泳凝胶中检测到的酶的活性条带。

2.1.1 能还原四唑盐的产物

1951 年 Seligman 和 Rutenberg^[1]首次发现利用四唑盐检测酶活性的组织化学方法。Markert 和 Möller^[2]首先将这一组织化学方法改良后用于 NAD(P) 依赖型脱氢酶的凝胶电泳检测。这些脱氢酶产生还原的 NADH 或 NADPH，作为电子供体还原强电子受体四唑盐。四唑盐被还原后产生深色的、不溶于水的沉淀甲臍（formazan）。有电子载体中间物存在时，还原反应非常迅速。起初，人们利用心肌黄酶-亚甲基蓝（diaphorase-Methylene Blue）系统将电子从 NAD(P)H 转移给四唑盐^[2]。后来发现吩嗪甲基硫酸盐（phenazine methosulfate, PMS）作为中间催化剂更合适。PMS 分子可以从 NAD(P)H 接受电子，还原四唑盐，不断重复，因此即使在低浓度下也很有效。许多 NAD(P) 依赖型脱氢酶可以利用 PMS-四唑盐系统在电泳凝胶中检测（如 1.1.1.1—ADH，方法 1；1.1.1.37—MDH，方法 1；1.1.1.40—ME；1.1.1.42—IDH，方法 1 等）^①。

含有 FMN（黄素单核苷酸）或 FAD（黄素腺嘌呤二核苷酸）的黄素蛋白酶类（如许多氧化酶），也可以利用 PMS-四唑盐系统检测，

① 所参考的酶和方法可以在第 3 章 3.3 节中找到，酶按照国际生物化学和分子生物学学会命名委员会 1992 年推荐的 EC 编号的数字序列列出。

机制与上述 NAD(P) 依赖型脱氢酶相似。在氧化酶检测系统中, PMS 分子从黄素蛋白酶中还原的黄素基团接受电子, 转移给四唑盐(如 1.1.3.15—GOX, 方法 1; 1.1.3.22—XOX, 方法 1)。作为辅基, FMN 和 FAD 与酶分子紧密结合, 在电泳过程中不会解离, 因此在检测氧化酶活性的染色液中可以省略。

具有不同还原电势的四唑盐已经商品化。与低还原电势四唑盐相比, 高还原电势四唑盐更容易被还原。电泳酶谱分析常用的四唑盐中, 甲基噻唑四唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 具有高还原电势, 对光稳定, 通常适合检测 NAD(P)H。四硝基蓝四唑盐 (tetranitro blue tetrazolium, TNT) 的还原电势稍低于 MTT, 但高于硝基蓝四唑盐 (nitro blue tetrazolium, NBT)。三苯基四唑氯 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 的还原电势最低。

含有游离巯基 [如辅酶 A (CoA)-SH] 的酶反应产物, 在 PMS 或另一中间催化剂二氯苯酚靛酚 (dichlorophenol indophenol, DCIP) 存在时, 也可以还原四唑盐 (通常 NBT 和 MTT 比较适合)。如柠檬酸合酶 (4.1.3.7—CS) 的检测方法。

用 DCIP 代替 PMS 时, NAD(P)H 不能有效还原 MTT, 但是巯基 (如谷胱甘肽) 以 DCIP 作为中间催化剂, 可以还原 MTT。NAD(P)H 依赖型谷胱甘肽还原酶 (1.6.4.2—GSR, 方法 2) 和 NAD(P)H 心肌黄酶 [1.6.99.1—DIA (NADPH); 1.8.1.4—DIA (NADH)] 的检测方法利用了 DCIP 的这种性质。

PMS 存在时, 一些酶反应产物如 4-咪唑啉酮-5-丙酸 (4-imidazolone-5-propionate) 和 β -亚磺酰丙酮酸 (β -sulfinylpyruvate) 也可以还原四唑盐 (即 NBT) (2.6.1.1—GOT, 方法 3; 4.2.1.49—UH)。室温下, 5-溴-4-氯-3-吲哚酚 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl) 在没有任何中间催化剂的情况下可以直接还原 NBT (3.1.3.1—ALP, 方法 2)。

还原糖在室温 (己酮糖) 或 100℃ (己醛糖) 的碱性条件下可以还原 TTC。许多产生酮糖 (如 D-果糖) 和己醛糖 (如 D-甘露糖) 的酶可以用这种四唑盐来检测 (2.4.1.7—SP, 方法 1; 4.2.1.46—TDPGD; 3.2.1.24— α -MAN, 方法 3; 3.2.1.26—FF, 方法 4)。

在碱性 pH 条件下, 利用 PMS-NBT 或 PMS-MTT 系统获得的脱氢酶酶谱中, 一些含有巯基的非酶蛋白可能被非特异性染色, 这种富含巯基的蛋白质的非特异性染色有时会被错误地当成所谓的“虚无脱氢酶” (“nothing dehydrogenase”) (1.X.X.X—NDH)。但这与真正的虚无脱氢酶不同, 在不含 PMS 的碱性四唑盐溶液中, 富含巯基的蛋白质也可以被染色。

游离的巯基在碱性条件下还原 NBT (或 MTT) 的能力, 可以用来检测一些生成碱性产物的酶 (详见下文 “2.1.3 引起 pH 值变化的产物”)。

许多酶产物是 NAD(P) 依赖型脱氢酶的底物。这些酶可以通过以外源脱氢酶为连接酶、并与 PMS-MTT 或 PMS-NBT 系统偶联的方法进行检测。例如, 己糖激酶 (2.7.1.1—HK)、磷酸葡萄糖变位酶 (5.4.2.2—PGM, 方法 1) 和葡萄糖-6-磷酸异构酶 (5.3.1.9—GPI) 的染色都以葡萄糖-6-磷酸脱氢酶作为连接酶; 延胡索酸水合酶 (4.2.1.2—FH, 方法 1) 的染色用外源的苹果酸脱氢酶作为连接酶; 顺乌头酸酶 (4.2.1.3—ACON, 方法 1) 的染色用辅助的异柠檬酸脱氢酶 (1.1.1.42—IDH, 方法 1) 作为连接酶等。类似的, 黄嘌呤氧化酶与 PMS-MTT 系统偶联, 可以用作嘌呤核苷磷酸化酶 (2.4.2.1—PNP) 酶联染色中的连接酶。

检测某些酶时, 需要使用一种或多种连接酶反应, 以产生可以用脱氢酶或氧化酶检测的产物。例如, 通过辅助的葡萄糖-6-磷酸异构酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶依次催化的两个连接反应检测甘露糖-6-磷酸异构酶 (5.3.1.8—MPI)。类似地, 利用外源的嘌呤核苷磷酸化酶生成次黄嘌呤, 然后用黄嘌呤氧化酶与 PMS-NBT 或 PMS-MTT 系统偶联检测次黄嘌呤, 进行腺苷脱氨酶 (3.5.4.4—ADA, 方法 1) 的染色。甘露糖激酶 (2.7.1.7—MK) 的检测系统包括 3 个连接酶反应, 依次由辅助的甘露糖-6-磷酸异构酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化。3 种连接酶也用于葡聚糖蔗糖酶 (2.4.1.5—DS, 方法 3) 的检测系统。

需要注意的是, 含有 PMS 和四唑盐的染色液对光敏感, 因此凝胶在 PMS-四唑盐溶液中孵育时须在暗处进行。