

同工酶在农业上的应用

陆士伟 赖天斌 编著



广东科技出版社

同工酶在农业上的应用

陆士伟 赖天斌 编著

广东科技出版社

内 容 简 介

本书概述了近二十多年来国内外对同工酶研究的情况和动态,重点介绍了植物同工酶在农业方面的应用,如植物的发育与进化、杂种优势与杂交水稻种子纯度的预测、种子生活力的测定以及作物特性的鉴定等方面。书中还介绍了植物同工酶的电泳原理和电泳分析方法,并提出了在电泳中一些值得讨论的问题和看法。书后附有多种同工酶的显色分析法和常用缓冲液的配方。

本书可供大专院校生物学、农学等有关专业的教师、学生和从事农业研究的科技人员阅读参考。

同工酶在农业上的应用

TONGGONGMEI ZAINONGYESHANG
DE YINGYONG

陆士伟 赖天斌 编著

广东科技出版社出版发行

广东省新华书店经销

广东阳春印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 4.5印张 100,000字

1987年9月第1版 1987年9月第1次印刷

印数 1-1,210册

统一书号 16182·140 定价 0.85元

前 言

同工酶这一概念自1959年由Markert和Møller命名以来,由于生物化学技术的发展,特别是蛋白质淀粉凝胶电泳分析方法的进一步建立和特殊的组织化学染色技术的配合应用,使同工酶的研究逐步深入和有了很大的进步。随着同工酶分析技术的发展,对同工酶认识便逐步提高,目前同工酶已成为动物、植物、微生物学、农学及医学领域中广为研究的课题。

酶是生物体内催化各种生化反应的重要物质。生物体内所含的酶种类很多,它们各有特殊的功能。其中有一类酶叫做同工酶,所谓同工酶是指那些生物功能相同或接近相同,但其蛋白质分子组成不同的酶类。如乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、过氧化物酶等。

根据近二十多年来的研究,许多学者认为同工酶蛋白质分子组成的这种多样性与决定生物性状遗传的基因有密切关系,它可作为一种有效手段,从分子水平上鉴别许多从外部形态上难以鉴别的遗传变异。它也是细胞生化研究的一个重要方面。因此,同工酶的研究越来越引起人们的重视,有数以千计的研究工作者皆集中到同工酶的研究上,他们的论文从不同观点对同工酶进行论述与分析。总之,这二十多年来对同工酶的探讨已成为研究发育生物学、细胞生物学、生物化学、农学遗传育种学以及物种起源、遗传和进化的重要内容,它有助于这些学科的进展。

当前，在生物化学与遗传学的交界处产生了一门新的学科——同工酶遗传学。全世界不少实验室，每年都发现有新的同工酶体系，并对其遗传控制进行了研究。国内应用同工酶的分析法，在农业植物生理、病理、品种资源的鉴定与分类、品种起源、遗传育种以及遗传变异和进化等问题的研究也正在逐渐增多。在农业科学研究方面亦趋于广泛应用。作者近几年来对水稻、花生、蔬菜等作物的同工酶做过一些研究，在应用同工酶分析法预测杂交水稻杂种种子纯度的研究已取得了成果鉴定，认为这是目前一种比较有效的方法。在开办这方面的学习班中，省内外的学习者都反映很好，两年来陆续收到许多单位和读者来函索取学习资料。为此，作者编写了本书，比较系统地介绍植物同工酶的理论知识、应用方法、分析技术和研究展望等，供有关人员应用和参考。由于作者水平所限，书中不善之处，恳请读者批评指正。

编 者

目 录

第一章 同工酶的研究概况	(1)
1.1 生物的同工酶	(1)
1.2 同工酶的形成	(3)
1.3 同工酶的功能	(7)
1.4 同工酶的分类	(9)
1.5 同工酶的进化	(11)
1.6 同工酶电泳分析	(12)
第二章 植物同工酶分析法在农业研究中的应用	(14)
2.1 同工酶的遗传控制与基因定位	(14)
2.2 发育与分化的探讨	(22)
2.3 植物进化及其亲缘关系的研究	(29)
2.4 杂种优势的预测	(31)
2.5 杂交水稻杂种纯度的预测	(34)
2.6 测定种子生活力	(43)
2.7 在选育种工作中的应用	(44)
2.8 雄性不育性机理的探讨	(45)
2.9 作物抗病特性的鉴定	(47)
2.10 体细胞融合杂种和远缘杂种的鉴定	(51)
2.11 植物对异常温度的抗性理论的研究	(54)
2.12 外源植物激素作用的探讨	(57)
2.13 在蔬菜研究中的应用	(59)
第三章 植物同工酶电泳分析原理	(64)
3.1 电泳分析原理	(64)

3.2	不同支持物的几种电泳	(67)
3.3	盘状电泳原理	(72)
3.4	同工酶显色原理	(79)
第四章	植物同工酶电泳分析方法	(82)
4.1	垂直管型盘状电泳	(82)
4.2	垂直板型电泳	(89)
4.3	几种植物同工酶分析法	(93)
4.4	样品制备	(113)
4.5	结果和记录	(114)
第五章	同工酶电泳分析技术问题讨论	(116)
5.1	酶量与酶活性	(116)
5.2	同工酶基因表达	(117)
5.3	植物同工酶分析技术的局限性	(119)
5.4	分析技术中可能发生毛病和假象的原因 及纠正办法	(120)
附 录		(124)
	几种酶的同工酶显色方法	(124)
	几种缓冲液	(127)
	参考文献	(131)

第一章 同工酶的研究概况

1.1 生物的同工酶

酶学是现代分子生物学的一个分支，酶学中对同工酶的认识和研究为时较晚。虽然Theorell在1940年就看到了酶有多重分子形式的存在，但当时认为这是酶的变性现象，或者是酶分子的降解，而未认识到它的生物学意义和作用。1950年Meister发现从牛心中提取的乳酸脱氢酶(LDH)有异质性，再次证实其在细胞中是以杂合型的分子形式存在。1952年Neilands证实乳酸脱氢酶结晶品有两种类型。1957年Hunter和Markert用淀粉凝胶电泳法揭示人血清中LDH酶的多型现象。LDH制品电泳得到五个有活性的峰，将五个峰分离，分别命名为：LDH—1、LDH—2、LDH—3、LDH—4、LDH—5。发现每个峰的酶蛋白分子量相同，约为14万，而各自的氨基酸组成却不同，LDH—1富含酸性氨基酸，而LDH—5富含碱性氨基酸，但它们在蛋白质链上的C端和N端的氨基酸是相同的。同时还证明了每个酶分子是由四个分子量为35,000的肽键(亚基)所组成。

酶蛋白是由很多氨基酸按一定顺序排列而成的一条多肽链组成。在同一有机体，同一器官，甚至同一细胞，某些酶虽然有相同的催化活性，但它们分子中的氨基酸顺序却有相当大的差异。酶学上把这种催化活性相同(即做同一工种)但分

子结构不同的酶叫做同工酶。就拿乳酸脱氢酶来看，这种同工酶在动物细胞代谢中起着丙酮酸与乳酸的相互转换作用。葡萄糖代谢的氧化产生二氧化碳和水，使能量得以释放，丙酮酸是重要的中间产物。能量释放都需要氧，在无氧情况下，丙酮酸被还原成乳酸并释放少量能量，当再度有氧时，乳酸脱氢酶催化乳酸脱氢，变成丙酮酸，然后进一步氧化为二氧化碳和水，使能量得以释放。很明显，这种同工酶能使细胞在一时缺氧的情况下继续进行其代谢活动，维持正常生命活动。乳酸脱氢酶是由四条多肽链盘绕而成，这四条多肽链，都受细胞核内两种不同的基因控制。一旦合成之后，它们就会随机组合形成上述五种乳酸脱氢酶同工酶。在心脏细胞中，只有控制合成H型多肽的基因在活动，并产生四条H型多肽组成的H型多肽乳酸脱氢酶（ LDH_1 ）。而在骨骼肌细胞和肝细胞中，只有控制合成M型多肽的基因活动，因此，这些细胞中的乳酸脱氢酶（ LDH_5 ）是由四条M型多肽链组成的。大多数细胞的核都有控制这种酶的基因在活动。除了上述几种细胞外，都能合成H型和M型两种多肽链，两者以不同比例组合，形成不同种类的乳酸脱氢酶同工酶。例如由三条H型和一条M型多肽链组成的称 LDH_2 乳酸脱氢酶同工酶，由二条H型和二条M型组成的称 LDH_3 ，由一条H型和三条M型组成的称 LDH_4 。这五种同工酶在人体各器官中含量也有不同，在心脏细胞中 LDH_1 最多， LDH_2 次之，肝细胞和骨骼肌细胞中 LDH_5 最多， LDH_4 次之。各器官组织中乳酸脱氢酶同工酶含量分布有不同，其他生物也有类似情况。

1957年以前文献中报道的同工酶大约有十多种，至70年代前后已发现有一百多种酶都有同工酶。如乳酸脱氢酶、磷酸酶、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、磷酸肌激酶、核糖核酸

酶、过氧化氢酶和胆碱酯酶等都有同工酶。几乎生物界都存在同工酶。目前在植物中已发现有四十五种以上的酶具有同工酶，其中包括氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、连接酶类、异构酶类等，而研究较多的是氧化还原酶类和水解酶类。

1959年Markert及møller发表了第一篇关于同工酶的评论，把酶多重分子形式看成是特异基因所产生，首先采用“同工酶”（Isoenzyme）一词，并指出同工酶是指功能相同而蛋白质分子结构不同的酶。1964年国际生化学酶委员会又将Isoenzyme和Isozyme赋予同样的概念。此外，有人将由多等位基因编码的同工酶，单独称之为allozymes。

现在的同工酶概念比较广泛，虽然不同学者赋予它的定义不完全相同，但就同工酶应用于受遗传体系决定的酶的多型性分子来看，按照化学命名法国际委员会的建议，同工酶是专指受遗传体系决定的酶的不同分子形式。现在习惯上常常把来源相同，催化反应大体相同而结构不同的酶的分子类型称为同工酶。

1.2 同工酶的形成

同工酶的种类繁多，并且在许多细胞组织及器官中各有其特征，它们为什么要形成和怎样形成？

生物体内合成的许多酶通常有几种不同的酶分子类型。这可能是为了实现特殊代谢的需要。例如，植物种子中所贮藏的淀粉，一部分是直链淀粉，另一部分是支链淀粉。直链淀粉分子是一条长而不分枝的链，由 α -1,4糖苷键把葡萄糖

基团联结起来。支链淀粉分子中，各葡萄糖基团不仅以 α -1,4糖苷键相互联结成长链，而且还存在 α -1,6糖苷键的联结，形成分枝状结构。在种子萌发过程中，不论是那一种淀粉均不能直接作为能源物质用于呼吸，也不能直接运输和用于新细胞的构成。淀粉必须通过降解，利用淀粉酶水解淀粉生成大量的麦芽糖，再由麦芽糖酶催化水解生成葡萄糖。然后，葡萄糖作为呼吸基质，在呼吸作用中，为胚的生长提供足够的能量和合成其他重要的物质。因此降解淀粉的淀粉酶很重要。淀粉酶包括几种重要的同工酶，有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、R-酶、Q酶和淀粉磷酸化酶，它们的功能都可降解淀粉。淀粉磷酸化酶还可催化可逆反应。但由于分子量和分子构型不同，所以在催化淀粉降解的过程中又有更细致的分工。如： α -淀粉酶以作用支链淀粉为主，水解淀粉分子中的 α -1,4糖苷键，使淀粉分子从中间部分断裂，一步步地使大分子量的淀粉降解，最后水解成 6—12个葡萄糖基团组成的糊精和少量的麦芽糖。 β -淀粉酶也能促使 α -1,4糖苷键断裂，但以作用直链淀粉为主，能促使直链淀粉完全水解成麦芽糖。对支链淀粉只能使其部分水解为麦芽糖，其余为高分子的糊精。因此当 α -淀粉酶作用淀粉时，主要是生成糊精和少量麦芽糖，而 β -淀粉酶作用淀粉时，主要是生成麦芽糖和少量糊精，不论 α -淀粉酶或 β -淀粉酶，在单独作用淀粉时，都不能使淀粉或糖元完全水解成麦芽糖，只有两种淀粉酶同时作用淀粉时，淀粉水解可达95%。R-酶是催化支链淀粉分子中 α -1,6糖苷键断裂的酶，即专门促使支链分子中的支点破裂的酶。但此酶的催化作用，必须在 α -淀粉酶和 β -淀粉酶使淀粉降解的基础上进行，否则R-酶不能对完整的支链淀粉分子中的 α -1,6糖苷键起作用。这是受基因调控体系中基

因活动规律所决定的。在植物、动物和微生物中含有一类磷酸化酶，淀粉磷酸化酶是个代表，它能催化淀粉或糖元转化为1-磷酸葡萄糖，与水解作用相似，不同之处在于以磷酸代替水去降解淀粉。此外，在马铃薯块茎中还发现一种叫做Q-酶，这种酶不需磷酸参加便能催化直链淀粉转化为支链淀粉。由此可知，生物种类为了发挥最大限度的生物学功能以获取最高额的生物学利益就产生了同工酶，这是在物种长期进化过程中，自然选择逐渐积累有利的遗传变异的结果。

我们知道，酶不是基因的直接产物，从基因到酶，也就是从DNA到蛋白质，中间还要经过转录、翻译一系列复杂的过程。一个酶的多肽结构，即它的氨基酸序列是由DNA中的核苷酸序列所决定的，它又决定着这个酶的二级、三级和四级结构。不同水平的空间结构，在决定一种酶的特异性是极为重要的，修饰二级、三级与四级结构的任何变化，将会产生一种酶的不同的、又密切联系的分子类型，因此产生同工酶。

当然，同工酶形成的机制，并不仅限于上述多肽结构的改变。即使是多肽的改变，也可以通过改变辅酶的分 子 数 目，或其他辅基数目，分子同反应基如氨基、羧基或多肽链氨基酸残基的结合与否而造成。此外，基因重复以及位点突变也可以产生一个以上基因负责一个以上亚基组成的酶的结构，从而形成同工酶。

对活细胞而言，产生任何一种酶分子的多样性可以有不同的作用原理，可能从一个基因复制出一个或者多个拷贝开始，每一拷贝可因为发生突变而产生了差异，从而制造出与原来酶分子有所不同的酶分子。这种情况在乳酸脱氢酶同工

酶系统的进化中是很显著的，至少有三种结构基因编码的乳酸脱氢酶（LDH）的同工酶亚单位。这些同工酶及控制它们的基因都经受着进化的选择作用。也就是使所合成的酶分子的结构以及时间与部位皆适应于每一个细胞特殊的代谢需要。

虽然所有细胞代谢基本上是类似的，但每一种多细胞和单细胞生物中都存在着细胞上的很大差异。这种代谢结构上的差异必然出现在细胞进化的早期，至今则成为现代生物的特征。细胞可以利用多种不同的分子结构来产生同工酶系统，如在最简单的分子中一个氨基酸的置换，以至到多个氨基酸的置换。这是由长期进化中基因的演变而产生。

对于细胞的生物化学，遗传特异方面来说，同工酶是很有意义的，但细胞不受这种产生同工酶方法限制。尤其通过复活的氨基酸、羧基、羰基或氨基酸羧基的巯基，也可能达到翻译后或后生的饰变。磷酸葡萄糖变位酶（PGM）在自然界所出现的几种同工酶彼此间仅有一个单位电荷的差异，这些酶相当于能由巯基氧化产生的PGM同工酶。

二硫键桥、氢键及多肽链间各种形式的相互作用，都可以改变酶的三度空间结构，从而产生显然不同的同工酶。一条多肽链可单独行使功能，或以不同大小的多聚体，或作为一个较大聚合体的一部分，在细胞内发挥最大功能。如纯化的刀豆尿素酶的多种分子形式是由肽链亚单位间的二硫键结合的一系列聚合度不同的多聚体组成，这些同工酶可解离成单体并重新组合成不同的多聚体序列。除此以外，蛋白质还可与其他化合物结合，如与糖类结合，改变其酶学功能，并可决定蛋白质分子在细胞内的定位。最初合成的多肽链还可以经蛋白质水解作用使肽链变短，然后成为功能不同的分

子，如胰蛋白酶原及糜蛋白酶原。所有这些方法，可能还有别的方法在细胞内，产生多种同工酶系统。

Scandalios (1979) 把同工酶的形成归结为两条途径：
①通过基因组水平起作用的机制。基因组转录成 mRNA，并进而编码为不同的多肽，翻译的结果形成有功能的多体，再随机整合为亚单位多肽。
②通过后成论起作用的机制。即作用于翻译水平或翻译后水平去修饰多肽的每个阶段，如共价修饰，构形改变，磷酸化及选择性降解等。这两种机制并非互相排斥的，在很多情况下，两者都起作用。

1.3 同工酶的功能

同工酶的种类这样多，存在这样普遍，它们在生物学上究竟有什么作用？为什么它们在细胞中广泛存在？有人曾一度认为是一个基因决定一种酶，而一种生物化学反应完全取决于这一种酶。简单的公式可列为一个基因——一种酶——一种催化反应。这种公式对于早期的生化遗传学是有用的，曾经引人注目。但是现在我们知道在不同的代谢条件下，或在同一细胞的不同部位，或在不同的细胞内，或在同一细胞的不同分化阶段中，同一种反应常需要有不同型式的酶来催化。同工酶的产生显然是由于在进化过程中为了适应细胞代谢多方面的要求所致。

同工酶在一个细胞中就好象一支合唱队中的歌手们，它们一起唱同样的旋律，但声音各有不同。每名歌手有他自己的音质、发声范围、音色及度力上的特点，每名歌手都占据一定的位置，与其他人配合共同完成整个演出。并且每一名

歌手的演唱还取决于他的音乐素质与外界的需要，当演出节目更换时，每一名演员的相对作用也会随着发生改变，那些具有最适合演出特征的演员被保留，另一些则可能不参加演出，最终选择与决定取决于整个合唱队而不取决于个别演员。细胞内所含的同工酶所起的作用就有类似情况，在不同的情况下，同工酶所起的作用有所不同。

有关同种同工酶特殊功能的认识进展比较慢，目前只对很少几种同工酶系统有所了解。在最早的文献中曾介绍过同工酶在一个细胞内可存在于不同的细胞器及不同的代谢间隔中。以线粒体为例，可很好地说明细胞器内的同工酶的定位，线粒体的酶如苹果酸脱氢酶与胞浆中的同名酶虽然都是由细胞核内同一基因给予编码，但常常是不同的，虽然细胞器与代谢间隔的差异并不是很明确，如RNA聚合酶的同工酶就是如此，有两种同工酶是与核结合存在的，至少有一种是与线粒体结合的，而另一些同工酶在细胞内的定位尚不能确定。所有那些RNA聚合酶的同工酶都必须使用染色体的或线粒体的DNA。

在可以产生两个或更多代谢产物的合成途径中，同工酶起反馈调节作用。例如大肠杆菌的苏氨酸脱氨酶，有两种同工酶型式。在有氧条件下生物合成一种同工酶，这种同工酶受异亮氨酸的反馈抑制，但当细菌在无氧条件下生长时，虽仍处在可以合成那种反馈抑制的同工酶的营养条件下，细菌合成另一种可诱导的同工酶，而这种同工酶是抵抗反馈抑制的。因此，虽然代谢产物的存在，生物也可以逃避前一种同工酶的反馈调节的影响（见Stadtman, 1968, Umbarger 1961）。

同工酶可能是探索细胞在履行它们的生理功能上的代谢活动详情的最好的工具，这是因为不同的同工酶就象不同的

等位基因，可让我们去检查“正常”条件与变化的条件的对比。实际上，等位基因通常以同工酶的形式表现出来，因此可以使遗传学与生物化学互相对照。在分子结构水平上，同工酶可以帮助阐明酶活性与分子结构的关系，酶的稳定性与分子结构的关系和分子间特殊结合与分子结构的关系。总之，研究同工酶将会对细胞的代谢结构提供很有用的见解。

1.4 同工酶的分类

Markert (1978) 在关于《同工酶的遗传性质及其后成性质》的报告中，对同工酶分类的问题进行了详细的阐述。他曾经给以同工酶的定义，并把同工酶分成两类：(1) 单基因决定的同工酶，其特征是氨基酸序列上存在着差异。(2) 后成同工酶，则是在翻译后经再修饰而产生的同工酶。

按照同工酶的物理结构，Whitt (1967) 也将同工酶分为两大类，单体同工酶与多体同工酶。前者指含有一个多肽链的酶，后者指含有一个以上多肽链的酶。根据组成多体的亚基的初级结构是否相同，又可以将多体同工酶分为同质多体同工酶（又称同聚酶）及异质多体同工酶（又称异聚酶）。

Shaw (1968, 1969) 按照同工酶发生的先后，论及同工酶分类的文章有两篇。第一篇将同工酶分为初级结构不同的蛋白质，和初级结构相同，但经过次级改变而产生两种以上不同的蛋白质两类。在第二篇中分为由不同遗传位点产生的，有明显不同的分子组成的和由于肽结构的次级改变而产生的两类同工酶。两文中的两种分法基本相似。

为了分析同工酶的亚基构造，下面列举异质二聚体、三聚体及四聚体分子的组成以供比较。A'及A代表不同亚基或多肽：

二聚体	三聚体	四聚体
AA	AAA	AAAA
AA'	AAA'	AAAA'
A'A'	AA'A'	AAA'A'
	A'A'A'	AA'A'A'
		A'A'A'A'

二聚体由两个亚基组成，它的电泳变体应该有三种。三聚体由三个亚基组成，应该显示四种同工酶分子。同理，四聚体由四个亚基组成，应该显示五种同工酶分子。实际上，已发现不少同工酶的组成为二聚体及四聚体而尚未发现三聚体组成的实例。

一般来说，根据同工酶来源和结构的不同，从遗传学角度看可将它们分为四类：(1)单基因决定的同工酶。产生这类同工酶的基因不同，它们大都是结构差异较大的单肽链酶或同聚体酶，如过氧化物酶即由一条肽链所组成。(2)多基因决定的同工酶。这类同工酶是由两个或多个基因决定，它们多是异聚体酶，如乳酸脱氢酶是四聚体蛋白，由两个基因(LDH^A和LDH^B)决定的两种肽链(H与M)组成。这两种肽链可以通过不同的聚合方式构成五种同工酶，即HHHH、HHHM、HHMM、HMMM、MMMM。(3)由同一个基因位点突变的复等位基因决定的同工酶。(4)修饰同工酶或次生同工酶。这是指多肽链合成以后，再发生结构上的改变而形成新的同工酶。