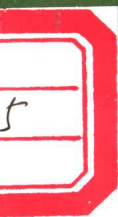
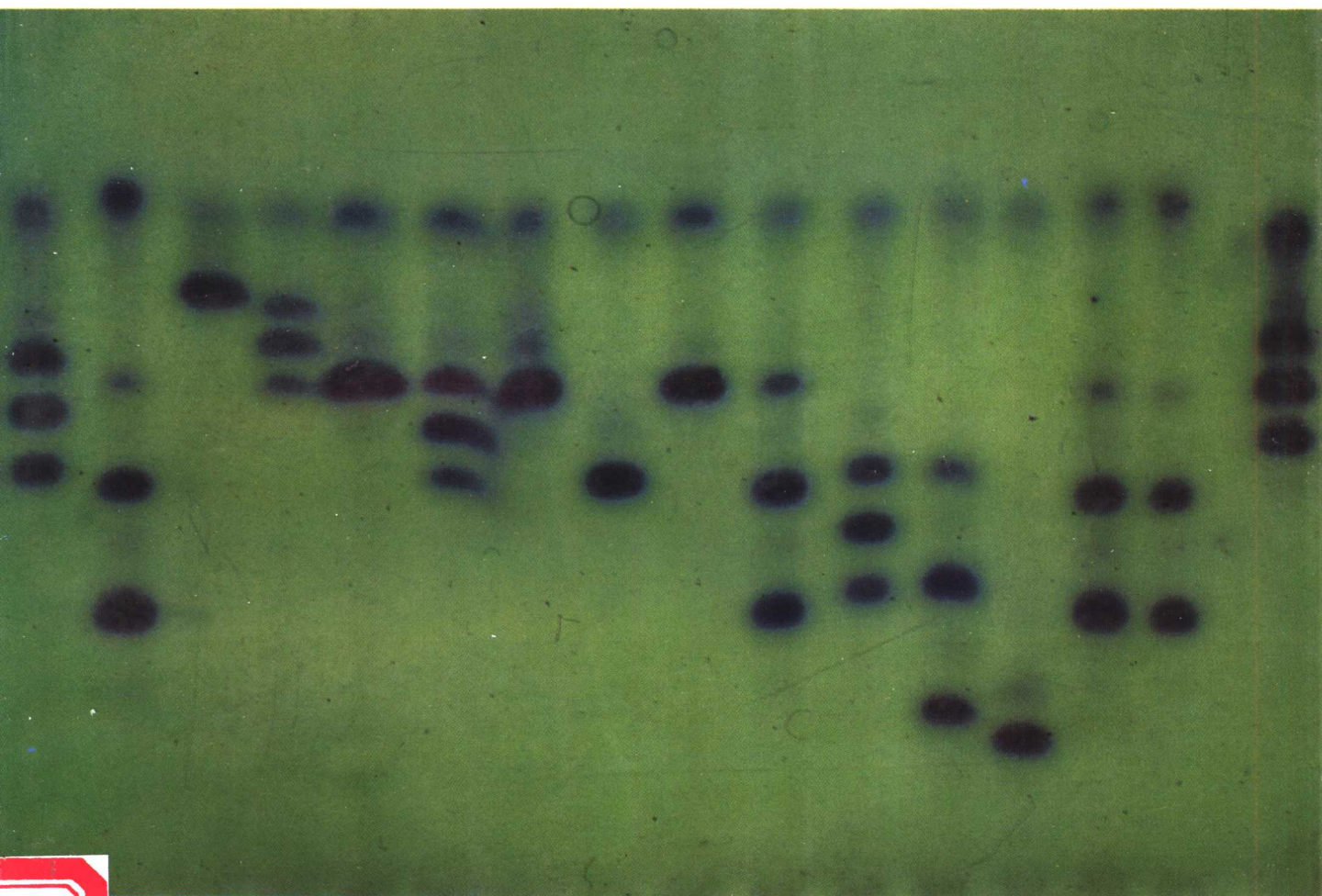
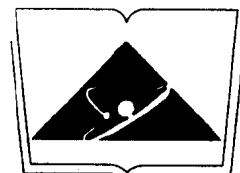


王中仁 编著

植物等位酶分析



科学出版社



国家自然科学基金委员会资助出版

植物等位酶分析

王中仁 编著

科学出版社

1998

内 容 简 介

等位酶是有机体等位基因转录和翻译的直接产物,通过等位酶分析可以探测个体间的遗传差异和居群的遗传学结构,它已被广泛地用于生物学各分支领域的大分子水平遗传学研究。本书介绍了植物等位酶分析的基本概念和原理,并详细地介绍了“水平切片淀粉凝胶电泳等位酶分析”的方法、酶谱的遗传学解释,以及居群遗传学中一些主要指标的计算等。

本书可供从事植物学、遗传学、农业、林业、种质资源保护等专业研究人员以及大专院校生物学有关专业师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物等位酶分析/王中仁编著. -北京:科学出版社,1996

ISBN 7-03-005095-9

I. 植… II. 王… III. 植物-酶-分析 IV. Q946.5:Q55

中国版本图书馆CIP数据核字(95)第19164号

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1996年7月第一版 开本:787×1092 1/16

1998年8月第二次印刷 印张:13 1/4

印数:1401—3400 字数:284 000

定价:32.50元

前 言

生物多样性的研究和保护是目前世界普遍关注的问题,其实,这项研究已经进行了几个世纪,系统学(分类学)就是探索、描述和解释生物多样性的最早的学科,进化研究自从达尔文 1859 年提出进化论以来也进行了 100 多年了,只不过是在种的水平罢了。每次技术上的进步都使我们的认识能力提高和研究领域扩大,20 世纪初期,由于显微镜的发明,促进了细胞和染色体的研究,积累的细胞学资料对动植物生物学研究形成过一次冲击,形成了“细胞遗传学”等学科,起了巨大的推动作用,使生物多样性的研究从种的多样性深入到了种下和种内的细胞水平;本世纪 50 年代以来,生化分析,特别是蛋白质和 DNA 分析技术的提高,分子水平的研究方法所积累的资料对生物学和医学的各个领域都产生了深刻的影响;并正在形成一次新的、巨大的冲击,一些新的概念和学科应运而生,遗传学也深入到了分子水平,产生了“分子遗传学(molecular genetics)”、“分子进化遗传学(molecular evolutionary genetics)”等学科(盛祖嘉,沈仁权,1988; Nei, 1987)。其中等位酶资料作为基因变异的标记首先作出了贡献,自从 60 年代同工酶凝胶电泳被用于研究动植物天然居群的遗传变异以来,大大扩展了我们对种的遗传过程的认识,对居群遗传学、系统学和进化研究产生了巨大的影响,因为它第一次用比较简单而直观的方法识别出了大量的基因位点和每个位点的多态性(等位基因),并能把遗传变异数量化。在此之前,只能通过杂交实验来鉴定个别形态上能观察到的隐性或显性突变,这些形态性状的表达可能会是多基因位点控制,在其他类群中又往往没有,所以无法互相比较。而许多酶则是生物所共有的,大都是单基因位点控制的,在凝胶上同一位置的同工酶带又基本上反映了编码该酶蛋白质的 DNA 顺序是相同的,有较好的同源性和可比性。目前,等位酶电泳分析已经成为检测遗传变异的主要手段,它大大地扩展了我们对植物及其他生物中存在的遗传结构和变异情况的了解。正如 Stebbins 所说,“1957 年以后酶一直在生物学各分支学科中起着关键的作用”(Soltis 和 Soltis, 1989a)。

生物多样性研究可以看作是对生物在空间上存在的现状和相互关系的研究,它包括生态系统、区系种类和遗传构成等不同水平上的多样性研究。其中,遗传多样性是丰富多采的生物类群保持和发展的基础,因此,可以说遗传多样性是生物多样性研究的中心环节。遗传多样性可以从“形态”、“细胞”和“分子”等不同水平上来进行研究。虽然形态特征的变化容易观察,但它们往往是遗传和环境、结构基因和调控基因综合作用的结果,有的形态特征并非稳定遗传的;研究染色体对遗传多样性的了解是非常重要的,但它作为多基因综合表达的结果或作为众多基因的“大包装”,我们看不到在它内部的每个基因的变化细节,对形态相近、染色体数目一样和染色体形态相似的种或种下类群(包括居群和栽培品种),或同一个居群内的不同个体来说,单纯用形态学和细胞学手段研究遗传多样性就失去了分辨能力;而分子生物学则使我们看到这些变化成为可能,其中,等位酶分析还可以出色地确定出等位基因频率或基因型频率,虽然它只是作为一种随机取

样，并不等于整个基因组，但在大多数情况下它可以作为遗传标记反映整个基因组的遗传变异情况。

保护生物多样性，最终还是要保护和利用其遗传上的多样性，没有遗传基础的“生物多样性”是无法保护的。在保护生物学研究中，遗传学和居群动态 (population dynamics) 是两个关键领域 (Falk 和 Holsinger, 1991)。遗传学研究包括遗传构成及繁殖方式等方面的内容；居群动态是居群生态学的核心问题，广义的居群动态也包括遗传动态 (genetic dynamics)。无论是对珍稀濒危的野生植物，还是对农作物、果树或林木等经济植物的野生种质资源，我们只有掌握了它们的居群遗传学和居群生态学情况，才能提出就地保护 [on-site (*in situ*) conservation] 或迁地保护 [off-site (*ex situ*) conservation] 的有效策略。然而，目前对绝大多数的珍稀濒危或其他野生植物种类来说，我们并不了解其遗传变异的水平和分布状况。

至今为止，有关植物天然居群的遗传变异和遗传结构方面的知识几乎全部都是来自等位酶分析的结果 (Schaal 等, 1991)，而且，等位酶分析目前仍然是了解天然居群的遗传结构、基因丰富的程度以及栽培作物种质资源的遗传多样性的最重要的手段。因此，在制订保护种质资源、保护珍稀濒危植物的策略时，最好是直接对它们进行遗传学调查，掌握它们原来的遗传多样性的多少及分布状况，针对性地制定有效的保护策略。在制订最佳保护方案时，要兼顾既要尽可能地保护所有等位基因又要保持原来的基因频率两方面的问题，并监视在就地或迁地保护时基因多样性的变化和丢失情况，尽可能地保护其居群天然的遗传构成，防止内繁育衰退 (inbreeding depression, 也被译为“近交衰退”、“近交退化”或“自交衰退”)。如果不能直接进行遗传学调查，也可以根据要保护植物的居群大小、居群之间隔离的程度、繁殖方式、传粉机制、种子散布机制等，参照已有的、不同习性植物的遗传变异分布规律，例如：Hamrick 和 Godt (1989)，Hamrick 和 Loveless (1989)，Hamrick 等 (1991) 等所提供的总结性资料，粗略地估计出它们的遗传学结构。当然还不要忘记，保护问题的决策还要根据该种的自然历史、生态环境、形态和生理上的地理变异等多方面的资料综合考虑，有时，单纯等位酶变异并不总是与不同习性的植物的形态变异或其他变异正相关 (Hamrick, 1989)。

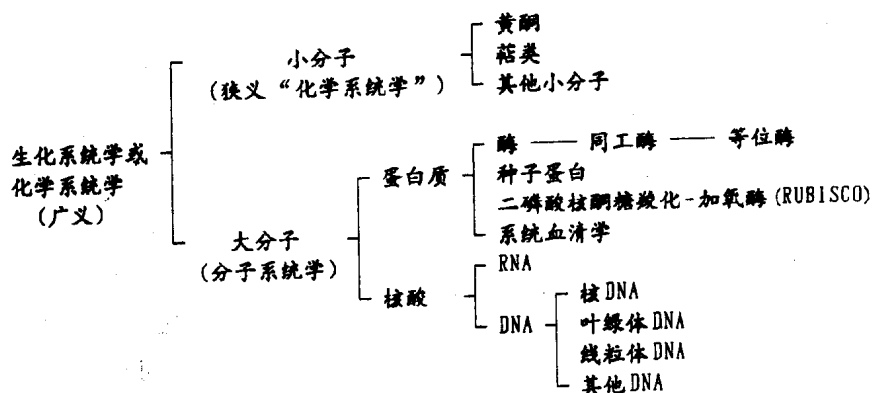
1966 年同工酶电泳分析首次被用于估计人类的遗传变异 (Harris, 1966) 和果蝇天然居群的遗传变异 (Hubby 和 Lewontin, 1966; Lewontin 和 Hubby, 1966; Johnson 等, 1966)。1976 年，Harris 和 Hopkinson 在《人类遗传学酶电泳手册》一书中对酶催反应的化学基础作了详细的总览，使同工酶电泳分析的染色原理、方法和技术更趋于实用和系统化了，这为在其他生物类群中运用同工酶资料也奠定了基础。紧接着就是在动物研究中被广泛使用，随着资料的积累和方法上的需要，Richardson 等 (1986) 出版了《等位酶电泳——动物系统学和居群研究手册》。在植物研究中使用同工酶资料则起步稍晚，Gottlieb (1971a, b) 首次用于种子植物，并于 1977b 和 1981a 作了很好的综述；Soltis, Haugler 和 Gastony (1980) 开始用于蕨类植物，Soltis 和 Soltis (1989b) 作了总结性的论述；自 Cummins 和 Wyatt (1981) 以来，在苔藓植物的遗传多样性、系统学和进化研究中同工酶资料也开始被使用，Wyatt, Stoneburner 等 (1989) 也作了综述。

随着同工酶电泳方法的不断改进，近十几年来，在植物系统学家中也开始迅速普及，形成了高潮，爆炸式积累的等位酶分析资料，连同近十年来迅速发展的 DNA 分析以及其

他大分子研究所获取的资料，对系统学和进化生物学已经开始形成了另一次新的巨大冲击。等位酶分析促进了居群遗传学的发展，居群遗传学的发展使分类学里的“种”从“模式概念”迅速向“居群概念”前进。运用等位酶和 DNA 大分子分析技术研究种下居群的遗传结构和关系，并估计种上类群间的亲缘关系和系统发育重建，使得这两方面的工作已经融合为一个综合的领域，并从“化学系统学 (chemosystematics)”或“生化系统学 (biochemical systematics)”中分化出来，形成了一门新的学科——“分子系统学 (molecular systematics)”，它包括了研究生物种内和种间的遗传多样性以及它们之间的亲缘关系和进化过程。

对于“分子系统学”一词中“分子”的理解，广义的包括所有核酸和蛋白质大分子资料，狭义的只包括核酸资料，本文采用广义的概念。对于“分子系统学”一词的理解，由于分子水平的变异和进化未必都和形态上的变异和进化直接相关或同步，所以，脱离了建立在形态、地理、化石和细胞学等方面资料基础上的系统学，单纯用“分子”资料本身建立的“系统学”将是毫无意义的。正如“化学系统学”并不是“化学”本身的系统学，而是指运用了化学资料的系统学，我们所说的“分子系统学”是指加入了大分子资料的“系统学”，而不能理解为单纯分子资料本身的“系统学”。Soltis 和 Soltis (1989a) 编辑出版了《植物生物学中的同工酶》一书，Crawford (1990) 出版了《植物分子系统学》一书，同年 Hillis 和 Moritz，编辑出版了包括动物学和植物学资料在内的《分子系统学》一书，Soltis, Soltis 和 Doyle (1992) 又编辑出版了有关 DNA 分析资料的《植物的分子系统学》一书，在大分子分析理论和方法不断改进和日趋成熟的情况下，生物学各分支领域的研究正面临着一个新的高潮。

“分子系统学”和“生化系统学”或“化学系统学”的研究对象和关系可示意于下：



等位酶电泳分析技术的应用是近 30 年来现代生物进化论迅速发展的主要原因之一。进化研究可以看作是对生物在时间上的历史状况和进化过程的研究，它包括对系统发育和进化机制的研究，通常被分作属以上的“大进化 (macroevolution, 也被译作‘宏观进化’)”和居群以下的“小进化 (microevolution, 也被译作‘微观进化’)”两个水平的工作，由于“种 (species)”和“宗 (races)”的进化介于二者之间，“种”和“居群”的进化过程和研究方法也有所不同，因此，也可以增加一个“物种形成 (speciation)”水平的工作 (Grant, 1991)。“小进化”及“物种形成”是研究“大进化”的钥匙，小进化主要研究居群水平的遗传变化，也可以说，“进化就是亲代居群和子代居群间的相异性的发

展”(Dobzhansky, 1953)。因为,有了可遗传的变异,进化才会出现,所以,进化的实际过程,在一定程度上可以说就是居群遗传构成上或基因频率上的变化和积累。居群遗传学是研究进化生物学的基础,而等位酶分析在目前仍然是了解居群的基因频率或遗传构成变化的主要手段,因此,它也是研究进化生物学的重要手段。

居群(population)一词在遗传学中也被译作“群体”,如:“群体遗传学(population genetics)”,在生态学中也被译作“种群”,如:“种群生态学(population ecology)”。作者认为,“居群”的译义最为准确,本着对概念相同的同一个英文单词,中文译法应该统一的原则,本书对 population 的概念一律使用“居群”一词,对上述两门学科,本书将分别称之为“居群遗传学”和“居群生态学”。

等位酶分析不仅可以用来揭示生物居群的遗传学结构,了解居群内、种内、种间乃至种上遗传多样性的情况;而且还可以用来判断其繁育系统的性质、生殖方式;结合居群的生态条件进行同工酶和 DNA 分析,则还可以了解生物适应生态环境的遗传学基础,近几年来,另一门新的学科——“分子生态学(molecular ecology)”也已经从“生化生态学(biochemical ecology)”中分离了出来,开始形成。这几方面的工作的结合对生物多样性的研究,对种质资源的调查、保护和利用,特别是对珍稀濒危植物提出有效的保护和复壮方案,都将会起到重要作用。

科学和技术总是分不开的,在一定情况下,技术水平决定着科学研究水平,正如一个优秀的细胞遗传学家必然精通使用显微镜一样,在生物学进入分子时代的今天,要使自己的研究工作达到分子水平,就必须掌握分子研究技术。凝胶电泳就是研究大分子的一种主要技术(包括 DNA 研究技术和蛋白质研究技术)。国际上,近一二十年来分子生物学资料的应用和迅速积累是与让分子的变化成为可见的实验方法的不断改进分不开的,这些方法越来越变得简单易行、安全、并且花费相对低廉,逐渐走出了专业生物化学家的实验室,为广大生物学工作者所使用。用“水平切片淀粉凝胶电泳方法”进行同工酶分析就是这样,它正在变成生物学研究中的一种常规手段。目前,直接反映遗传信息的 DNA 的研究方法也在不断地改进,例如:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,缩写为 PCR)DNA 扩增仪和 DNA 序列分析仪的使用等,也正在使 DNA 分析走向易于操作成为可能。同工酶和 DNA 两方面资料的结合,将会在探索生物居群的遗传学结构、研究生物遗传多样性,以及在系统与进化生物学的研究工作中显示出前所未有的重要作用。在还没有条件开展 DNA 分析的地方,首先开展对有机体 DNA 的转录和翻译的直接产物——“等位酶”的分析,同样可以获取极有价值的、不可替代的分子水平的遗传学资料。

在我国,近十多年来,已有不少涉及同工酶的文章,尤其近些年来,在遗传、生理或系统学研究中运用同工酶资料的报道渐多,出现了可喜的局面。例如:在植物学(童哲等, 1980; 胡志昂, 1981; 胡志昂等, 1983; 杨自湘, 系声珂, 1989; 赵天榜等, 1991)、居群遗传学与生态遗传学(庄树宏, 仲崇信, 1987; 黄瑞复, 1993; 黄生, 1994)、林业(陈岳武等, 1982; 葛颂等, 1987; 杨一平, 1989; 解荷峰, 1990; 杨一平等, 1991; 张军丽等, 1992; 施季森等, 1993)、农业和果树园艺(程家胜等, 1986; 钟广炎, 叶荫民, 1991; 方德秋, 章文才, 1992; 周伟军, 1992; 张启发等, 1992; 钟广炎等, 1993; 方德秋等, 1993)、水产(吴力钊等, 1991; 吴力钊, 王祖熊, 1992)等研

究, 对同工酶的分析技术和应用也有些介绍 (如: 胡能书等, 1985; 熊全沫, 1986; 葛颂, 1989; 何忠效、张树政, 1990), 虽然有些研究工作或介绍已经深入到了酶谱的遗传学本质, 然而在国内普遍使用的仍然是垂直的板状聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳所检验的酶也大都局限于在个体发育过程中易变的过氧化物酶和酯酶, 对观察到的酶谱大多也只是作表面性的比较或计算, 并没有对酶谱进行遗传学解释和分析, 加上多为个别取样, 而不是居群取样, 从酶谱上很难获取有价值的、规律性的结论, 这也是等位酶分析未能在涉及遗传的研究工作中迅速开展的原因之一。在生物遗传多样性的研究中, 如果直接把酶谱上带的数目作为多样性高低的指标, 或在植物系统学和进化研究中, 直接把酶谱上带的多少、迁移率的差异作为数量性状进行聚类分析, 作为类群间亲缘关系远近的指标, 虽然个别情况下“酶谱的相似性”也会和形态分类的结论偶合, 但往往找不出规律性的关系, 甚至会导致完全错误的结论。

目前, 在我国生物学研究的各个领域, 对同工酶电泳的适用性和可靠性还存在着疑虑, 即使从事同工酶电泳工作的人, 对电泳的方法、概念、术语等多少也存在着迷惑, 这种状况严重阻碍了我国居群遗传学的研究, 进而阻碍了居群生物学的研究及相关的系统与进化生物学研究、居群生态学研究、生物遗传多样性研究和保护生物学研究等等。

对适用于大量取样、多种酶分析的“淀粉凝胶电泳”, 在我国虽然也有人作过尝试 (如: 童哲等, 1980; 张启发、戴先凯, 1992), 在医学上使用的方法也有所介绍 (如: 李玉民, 1990), 但由于所用方法的不成熟、不统一等种种原因, 大都认为效果不好、结果不稳定, 缺乏可重复性和准确性, 就搁置起来不再使用, 市面上也没有合适的淀粉凝胶电泳器具可买。面对在国际上, 经济高效的“水平切片淀粉凝胶电泳等位酶分析”方法正在变得越来越成熟, 并已被广泛使用, 国内遗传学、医学、动物学、植物学、林业、农业、园艺、水产业、保护生物学等许多生物学工作者, 尤其是生物遗传多样性、居群遗传学、系统与进化植物学、生态遗传学、植物繁育系统以及遗传资源保护方面的研究者, 正急切地需要了解和掌握等位酶分析的概念、原理和方法。

作者 1989 年至 1991 年有幸到美国堪萨斯大学, 在世界著名的植物分子系统学家 Dr. C. H. Haufler 的实验室工作了两年, 回国后又建立了自己的等位酶分析实验室, 并开展了工作, 结合自己工作的实际体会, 撰写本书。本书除了阐述概念、原理和应用范围以外, 还详细介绍了“水平切片淀粉凝胶电泳”的设备、操作方法和配方, 以及遗传学计算方法等, 旨在使中国的植物学以及其他生物学工作者都能迅速地建立起“水平切片淀粉凝胶电泳等位酶分析”实验室, 开展工作, 广泛运用等位酶分析所获得的遗传学资料。

为了便于大家使用, 本书尽量使用直观的图解, 深入浅出地解释, 给出了常用酶在各种情况下的带型模式图、主要电泳器具的制作及使用操作图, 而且列举了难记并容易弄错的常用酶的名称、化学药品名称、中英文及英中文名称术语对照索引以及丰富的参考文献等。为了实验室使用方便, 本书列举的所有配方均按卡片大小排版, 以便读者复印后可以直接剪贴成卡片, 放在实验室里使用。有了这本书, 不仅可以了解概念、原理、方法、应用和进展, 而且每个实验室都可以尽快独立开展等位酶分析工作, 这就是本书的宗旨。然而, 在科学技术飞跃发展的今天, 作者的知识面毕竟有限, 书中无论概念或方法如有错误, 恳请批评指出, 以便及时纠正。

能撰写本书,首先要感谢兰州大学郑国锷教授为我奠定了细胞遗传学基础;感谢中国科学院植物研究所秦仁昌教授为我奠定了蕨类植物分类学基础;还要特别感谢美国堪萨斯大学的 Christopher H. Haufler 教授提供条件合作研究,在他的实验室我学习了同工酶电泳技术;感谢美国得克萨斯科技大学的 Charles R. Werth 教授提供了他制备“酶冰凌”染色液的配方;感谢美国田纳西大学 Hesler Award Fund 的基金资助与 Dr. A. M. Evans 一起共同研究阿帕拉契山铁角蕨复合体;感谢美国堪萨斯大学 McGregor 标本馆 Dr. M. A. Lane 和 Dr. R. E. Brooks 提供条件合作研究白花杜鹃和灯心草属植物;能有勇气撰写本书,还应归功于参加 1994 年 3 月“遗传多样性检测方法学习班”的来自全国各地的学员们的热情支持,以及中国科学院植物研究所各级领导及同事们热情关心和从各方面的支持;在建立等位酶分析实验室和撰写本书的过程中,张方、王可青、周世良共同进行实验、绘图和讨论,杜治、杨学健、张泰丽和孙庆山帮助制作照片和部分绘图,在此一并表示真诚的谢意。

有关本书的一些实验研究承中国科学院生物分类区系特别支持费(920101)和中国国家自然科学基金(NSFC, 393915003)资助。

本书承国家自然科学基金委员会优秀研究成果专著出版基金资助出版。

王中仁写于北京

1995 年 4 月

目 录

前言

1. 绪论	1
1.1 “等位酶”概念的产生和历史	1
1.2 酶的名称和代号	2
2. 酶电泳的一般原理	4
2.1 酶蛋白质的结构	4
2.2 电泳原理	6
2.3 染色原理	8
3. 等位酶表现型的遗传学基础	10
3.1 同工酶在亚细胞分室中的分布	11
3.2 二倍体的基因型与酶型	14
3.3 多倍体的基因型与酶型	23
3.4 重复位点与酶型	29
3.5 哑等位基因与酶型	35
4. 等位酶分析应用的范围和优缺点	37
4.1 种下应用	37
4.1.1 了解天然居群的遗传学结构	37
4.1.2 探查种内的遗传多样性	39
4.1.3 探查居群的交配系统	42
4.1.4 父系分析和基因流	44
4.1.5 探查居群间、亚种间分化或亲近的程度	45
4.1.6 生态遗传学与分子生态学	47
4.1.7 鉴定组织培养中再生植株的来源	48
4.2 种上的应用	49
4.2.1 系统学和进化研究	50
4.2.2 进化的速率和推算分化时间	51
4.2.3 测定杂种的起源	52
4.2.4 测定多倍体植物的起源	59
4.2.5 探讨物种形成	65
4.2.6 追溯栽培作物的起源	67
4.3 等位酶分析方法的优缺点	67
4.3.1 等位酶分析方法的优点	67
4.3.2 等位酶分析方法的缺点	69
5. 酶电泳的研究方法	74

5.1 酶电泳的基本步骤	74
5.2 酶电泳主要方法的比较	74
6. 水平切片淀粉凝胶电泳的准备工作	77
6.1 主要仪器设备	77
6.2 水平切片淀粉凝胶电泳槽	77
6.3 提取缓冲液的制备	82
6.3.1 提取缓冲液的作用	82
6.3.2 提取缓冲液的配方	83
6.3.3 提取缓冲液的贮存	85
6.4 电泳缓冲液系统的制备	85
6.5 染色液的制备	90
6.5.1 染色的方法	91
6.5.2 液染配方	95
6.5.3 胶染配方	102
6.5.4 酶冰凌配方	108
6.5.5 染色储备液的制备	112
6.6 沁子的制备	119
7. 水平切片淀粉凝胶电泳的操作	120
7.1 酶与缓冲液系统的选配	120
7.2 采样	121
7.3 制胶	123
7.4 研磨	128
7.5 上样	130
7.6 跑胶	131
7.7 切片	133
7.8 染色	134
7.9 酶谱的记录	134
7.10 带浅和分辨力差的可能原因及克服办法	137
8. 酶谱分析	140
8.1 酶谱的遗传学解释	140
8.2 非遗传性带和人为带的识别	141
9. 遗传学计算	145
9.1 哈迪-温伯格平衡	145
9.2 等位基因频率	147
9.3 居群的遗传多样性的度量	148
9.3.1 多态位点的百分数 P	148
9.3.2 平均每个位点的等位基因数 A	149
9.3.3 平均每个位点的等位基因的有效数目 A_e	150
9.3.4 平均每个位点的预期杂合度 H_e	151
9.3.5 平均每个位点的实际杂合度 H_o	152

9.4 居群或种的遗传学结构的度量	152
9.4.1 对哈迪-温伯格平衡符合度的检测	153
9.4.2 内繁育系数和固定指数 F	153
9.4.3 居群的有效大小 N_e	154
9.4.4 杂合性基因多样度的比率 F_{ST}	155
9.4.5 基因分化系数 G_{ST}	156
9.4.6 居群每代迁移数 N_m	158
9.5 居群间或种间遗传学关系的度量	158
9.5.1 遗传一致度 I	159
9.5.2 遗传距离 D	161
9.5.3 聚类分析	161
9.6 电脑分析	163
参考文献	164
附录1 常用酶目录	173
附录2 主要仪器设备目录	177
附录3 主要化学药品目录	179
英、中文名词索引	185
中、英文名词索引	190

1. 绪 论

1.1 “等位酶”概念的产生和历史

酶——“酶 (enzyme)”这个名称是 Liebig 等人 1878 年根据发酵现象提出的, 所以中文也曾被译为“酵素”, 本世纪 30 年代 Northrop 确定了酶的蛋白质本质。酶是生物体内普遍存在的生物催化剂, 能在有机体内的条件下, 迅速而高效率地起催化作用, 完成许多复杂的生化过程, 在生命活动中占有极其重要的位置, 已鉴定出的酶约有 3000 种以上。电泳技术始于 30 年代 (Tiselius, 1937), 1955 年 Smithies 开始使用淀粉凝胶来电泳蛋白质, 1957 年 Hunter 和 Markert 采用组织化学的染色方法使得特定酶的位置在凝胶上能够被看见, 从而发现了在同一个体内各种酶的多种分子形式, 对于这些不止一条的“带 (band)”, 当时被认为都是污染或人工因素造成的降解的分子, 并未给予注意, 更未能给予这些带以正确的遗传学解释。但电泳加组织化学染色显带, 这就是“酶谱 (zymogram)”技术, 为研究酶蛋白质的变异奠定了方法基础。

同工酶——1959 年 Markert 和 Moller 报道了乳酸脱氢酶在不同组织、不同个体以及不同种里的不同形式的存在, 这就导致了“同工酶 (isozyme, 英文也被写为 ‘isoenzyme’)”概念的产生。“isozyme”一词在中文里也被译为“同功酶”或“同功酵素”, 就其催化同一种化学反应来说可以叫“同功”, 但编码同一种酶的不同基因位点往往只在不同的亚细胞分室、不同器官、不同发育阶段或不同生理状态下才表达, 这些同一种酶的不同分子形式的“功能”看来并不是完全相同的, 因此, 通常认为“同工酶”的译法比较妥当 (周光宇, 1983)。也可以说: 对一个材料进行电泳, 并进行组织化学染色以后, 在胶上所看到的一组带, 它们是催化同一生化反应的、在电场中的运动性质有所不同的酶的多种形式, 它们就是“同工酶”。当时并不知道它们的遗传学基础, 后来随着研究的深入, 对酶谱上的带的遗传学内容有了认识, 了解到它们实际上是构成酶蛋白质的亚基 (肽链) 的氨基酸顺序和亚基的组成有所不同而造成的, 因此, 对术语的概念有了更精确的要求。

等位酶——1969 年 Prakash 等提出了把同一基因位点的不同等位基因所编码的一种酶的不同形式叫做“等位酶 (allozyme)”, 把它从广义的“同工酶”的概念中分了出来。从此, 对酶基因的表型——酶谱的遗传学分析具有了更深的意义, 除去生理的和人为因素的干扰, 酶谱作为基因编码的产物, 由于模板作用, 酶蛋白质中多肽链上的氨基酸顺序 (通过 RNA) 直接反应了 DNA 链上碱基对的顺序, 其变化能很好地代表 DNA 分子水平上的变化, 表明等位基因和位点变化的存在。因此, 同工酶分析方法在系统学研究中正式列入分子系统学的方法。“allozyme”一词的中文译法在字典中过去被译为“(同种) 异型酶”、“异构酶”或“异酶”, 但实际上这里的词头“allo-”是来自等位基因

“allele”，而不是一般所说的“异”，意思是“等位基因酶 (allelic enzyme)”，为了方便，这里我们简称其为“等位酶”，以便强调其遗传学含义。了解到酶蛋白可以作为基因变异的标记后，等位酶电泳作为一个很实用的工具，可以帮助回答居群遗传学结构分析、系统学研究或标本鉴别等工作中的许多问题，因此，它在遗传学和其他有关生物学各分支学科中都迅速地发展了起来。

有机体中存在的酶蛋白质在结构或组成上的多态性，即催化同一种化学反应的不同分子形式，是在长期进化中的一种适应。除了在不同亚细胞分室、不同组织或不同发育阶段需要有不同的酶蛋白质分子（同工酶）以外，正因为有机体常常产生酶的多种分子形式（等位酶），当一种酶分子形式受到抑制或破坏，另一种酶分子形式可以保证代谢的正常进行，这样当环境或代谢发生了变化时，同工酶和等位酶的存在为有机体提供了适应的可能。

早期“同工酶”的概念是广义的，该术语的复杂性在于它不仅指各位点内的不同基因之间的产物，而且指所观察到的全部带，它包括了同一位点的不同等位基因和不同基因位点所编码的同一种酶，以及转录后的酶变体等所有电泳后酶的表现型。例如：一个二倍体的编码二聚体酶磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 的基因位点，如果它是杂合的，具有两个不同的等位基因，可以产生 3 条带，即 3 种“同工酶”；一个具有重复的细胞溶质磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 基因位点的二倍体，具有 2 对不同的杂合等位基因，可以产生 10 条带，即有 10 种“同工酶”；有 2 个基因位点分别编码 PGI，一个在细胞溶质里表达，另一个在质体里表达，在酶谱上表现为两组带，这两组带都称“同工酶”。但近期的文献（如：Gottlieb 1983；Buth 1984；Weeden 和 Gottlieb, 1979；Weeden 和 Wendel, 1989；Werth, 1989）使用的“同工酶”定义则是狭义的，它仅指由不同基因位点所编码的同一种酶的不同形式。主张用“同工酶位点”代替“同工酶”来表示一个产生给出的表现型的最少或最基本的位点数；由同一个基因位点的不同等位基因所编码的同一种酶的不同形式则称为“等位酶”，等位酶只是同工酶中的一部分；对转录后产生的酶变体，属次生的“同工酶”，它们中有的可能是由实验条件引起的分子变化，未必都存在于天然生物体内，没有相对应的编码基因，不再处理为同工酶。

等位酶和同工酶的概念之间的关系，可参见后面第 3.1 节及图 3：“同工酶在亚细胞分室中的分布示意图”。

1.2 酶的名称和代号

等位酶分析需要从尽量多的酶分析中获取资料，才具有统计学意义，才能作为随机取样反映整个基因组的情况，所以不可避免地要遇到众多酶的名称。而每种酶又有习惯名、系统名、酶委会代号和缩写名等多种名称和代表符号，若不了解它们，常常会被繁多而相似的名称弄得糊里糊涂，所以首先对它们的名称要有一个清楚的认识。

“系统名”和“推荐名”。由于所掌握的酶的数量和其他生物化学名称的不断增加，种类的繁多，很容易产生混乱和重复，国际酶学会议 1961 年提出了一个系统命名及系统分类的原则，被国际生物化学家联合会命名委员会（The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemists，缩写为 I. U. B.）采用，制定了一个国际命名法原

则。每一种酶有一个系统名 (systematic name) 和推荐名 (recommended name, 即“习惯名”)。系统名相当于生物种的拉丁名, 推荐名相当于生物种的英文标准俗名。酶学委员会的英文名称为 Enzyme Commission, 缩写为 E. C. 或 EC, 该酶委会在 1973 年又建立了统一的、严格的命名原则和系统编号, 以后还不断对酶代号进行了修改补充。最新的酶命名版本可见由“国际生物化学及分子生物学命名委员会联合会 (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee)”制定的《酶的名称》(Enzyme Nomenclature, 1992)。

“酶委会代号”。酶的代号是由酶委会缩写“E. C.”起头, 后面再加上 4 个数字组成, 每个数字之间用英文句点“.”隔开, 每个数字代表其在 4 个分类等级中的特定含义。第 1 个数字代表该酶属于哪一类, 按照国际系统分类法, 把所有酶促反应按反应性质分为 6 大类: 氧化还原酶类、移换酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类及合成酶类, 分别用编号 1、2、3、4、5、6 表示; 第 2 个数字代表属于哪一亚类, 每类酶下面按底物中起作用的基团或键分成了一些亚类; 第 3 个数字代表亚类下面的亚—亚类; 第 4 个数字代表该酶在一定亚—亚类中的顺序编号。每种酶都有一个自己特有的编号, 不会和别的酶编号重复。例如: “苹果酸脱氢酶”的酶代号为“E. C. 1. 1. 1. 37”, “磷酸葡萄糖异构酶”的酶代号为“E. C. 5. 3. 1. 9”。

“缩写名”。缩写名在同工酶分析的文章中是最常见的, 我们应该熟悉它们。酶的“系统名”详细而准确, 例如: 天冬氨酸转氨酶的 I. U. B. 名称为 L-Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase; 磷酸葡萄糖异构酶的 I. U. B. 名称为 D-Glucose-6-phosphate ketol-isomerase 等, 但它们的字太长, 不容易记忆使用。所以通常使用的是酶的“推荐名 (英文习惯名)”, 例如: 天冬氨酸转氨酶的推荐名为 Aspartate aminotransferase; 磷酸葡萄糖异构酶的推荐名为 Glucose-6-phosphate isomerase 等。然而, 推荐名也相当长, 为了方便, 又常常使用缩写名来称呼一种酶。酶的缩写名通常用该酶的英文习惯名的三个大写字母组成: 多词根酶名称缩写时常常由主要词根的词头字母组成, 如: “磷酸葡萄糖异构酶 (Phospho-glucose isomerase)”缩写并简称为“PGI”; 单词根酶名称缩写时则由前三个字母组成, 如: “过氧化氢酶 (Catalase)”为“CAT”; 有时为了和近似的名称区别, 酶缩写名可以由 4 个或 4 个以上字母组成, 如: “甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)”为“G3PD”或“G3PDH”, “葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)”为“G6PD”或“G6PDH”。有的酶名很特别, 不易混淆, 也有人用 2 个大写字母代表它们, 例如: “己糖激酶 (Hexokinase)”可被缩写为“HEX”或“HK”。

酶的“异名”。有时同一种酶可能会有两种缩写名, 这是因为该种酶有两种习惯名, 例如: “天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase)”又叫“谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (Glutamate oxaloacetate transaminase)”, 它们分别被缩写为“AAT”和“GOT”, 实际上是同一种酶; “磷酸葡萄糖异构酶 (Phosphoglucosomerase)”缩写为“PGI”, 它又叫“Glucose-6-phosphate isomerase”, 缩写为“GPI”。虽然一种酶的习惯名或缩写名可能有两种, 它们的酶委会系统名和酶编号则是完全一样的, 例如: AAT 和 GOT 的酶编号都是“E. C. 2. 6. 1. 1”, PGI 和 GPI 的酶编号都是“E. C. 5. 3. 1. 9”。

常用酶的系统名、习惯名、代号和缩写名可见本书后面附录 1。

2. 酶电泳的一般原理

2.1 酶蛋白质的结构

蛋白质有酸碱性质和四级结构。蛋白质是由氨基酸通过共价肽键连接在一起的多肽所组成的，这些氨基酸的顺序叫“初级结构”，它是蛋白质基因编码的直接产物，是由遗传所决定的。20种不同的氨基酸各具有一个独特的侧链，这些侧链的形状、大小不同，负荷也不同，有的是碱性的，带正电荷（ $-\text{NH}_3^+$ ），如：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；有的是酸性的，带负电荷（ $-\text{COO}^-$ ），如：天冬氨酸和谷氨酸；有的则是中性的，不带电荷。在电泳时，蛋白质通过凝胶基质运动的动力和速度取决于侧链的负荷。每种蛋白质的净负荷还随其周围pH值的改变而改变，在低pH时，氨基基团呈现正电荷，而在高pH时，羧基基团呈现负电荷。大多数蛋白质有一个“等电点”，即在这个pH点上蛋白质的正电负荷与负电负荷相等，等电蛋白质在电场里不移动，因为它们既不受（正电荷的）阳极的吸引，也不受（负电荷的）阴极的吸引。

氨基酸侧链的大小、负荷以及亲水或疏水将影响蛋白质的构形，因为初生的多肽链是由不同氨基酸的吸引或排斥而折叠的，这些氨基酸可以通过氢键而形成螺旋（ α -螺旋）或折叠（ β -结构），这就是“二级结构”，在初级和二级结构的基础上再折叠形成“三级结构”。一个蛋白质的大小和构形都将影响它在基质中的移动，当然，移动的快慢还取决于电泳基质（凝胶）的孔隙的大小。由一条多肽链形成的有功能的蛋白质，叫做“单体蛋白质”或“单体（monomer）”，单体蛋白质没有四级结构。有许多蛋白质却是由2条以上多肽链组成的，这些组成蛋白质多肽链叫“亚基（subunit）”，这些亚基通过氢键、离子键、二硫桥以及/或者疏水的相互作用而连结在一起，形成一定的构形，这就是“四级结构”。由2个多肽链（亚基）组成的蛋白质叫“二聚体（dimer）”；由3个亚基组成的叫“三聚体（trimer）”，由4个亚基组成的叫“四聚体（tetramer）”，以此类推（见图1）。

在二聚体蛋白质中，如果这些多肽链是由一个基因或完全相同的等位基因编码产生的多肽链所组成的，叫作“纯合二聚体（homodimer）”（又被译作“同型二聚体”或“同二聚体”，“同”或“同型”的译意不明确，不知指的是谁和谁“同”，很容易被误解为两个二聚体之间相同，“纯合”则准确地表明了是指二聚体的两个组成亚基之间相同的关系），如果是由不同的等位基因编码形成的多肽链所组成的，则叫“杂合二聚体（heterodimer）”（又被译作“异二聚体”，“异”的译意也不明确，很容易被误解为和原二聚体不同的二聚体，“杂合”则准确地表明了是指二聚体的两个组成亚基不同的关系）。

酶都是蛋白质。所有的酶都是起催化作用的特殊蛋白质，因此，酶也是由氨基酸连成的多肽链所组成的，也具有四级结构，也有酸碱性质，即两性电解质性质。不同的酶

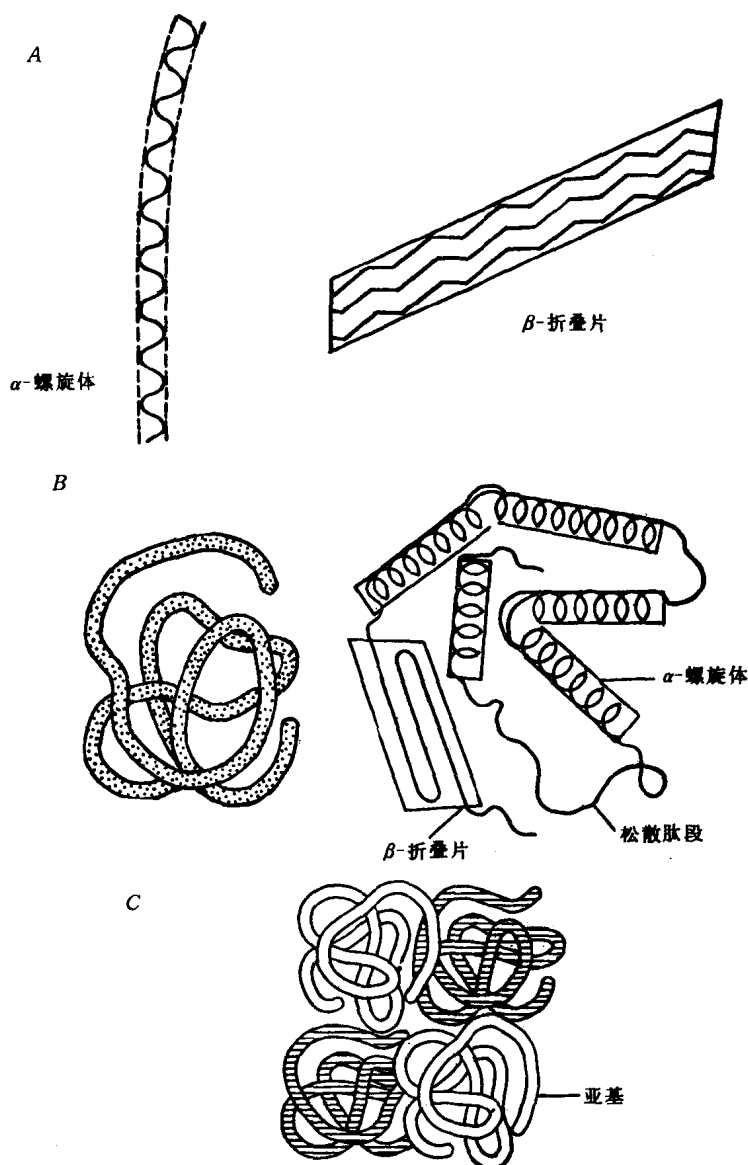


图1 蛋白质的二、三、四级结构示意图 (引自沈同等, 1990)

Fig. 1 The secondary, tertiary and quaternary structures of a protein

蛋白质由不同数目的多肽链所组成, 我们相应地把它叫“单体酶”、“二聚体酶”、“四聚体酶”以及“纯合二聚体酶”和“杂合二聚体酶”等等。酶蛋白质在不同的 pH 环境下也会呈现出不同的酸碱性, 带不同的电荷。了解了每种酶蛋白质的四级结构的性质, 这才使得我们用酶的表现型——“酶谱”作为一种可见的基因标记来进行遗传分析成为可能。通常每一种酶蛋白质的亚基数目是固定不变的, 这就为我们解释酶谱的遗传学本质提供了可能。仅在极个别情况下, 同一种酶也会有 2 种以上的亚基数目, 例如: 动物红细胞中的酸性磷酸酶 (ACP) 是单体酶, 而其他组织中的 ACP 则是二聚体酶。