

综合评述

植物同工酶的研究和应用

吴文瑜

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

RESEARCH AND APPLICATION OF PLANT ISOZYMES

Wu Wenyu

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

关键词 植物同工酶; 酶谱; 同工酶技术

Key words Plant isozyme; Zymogram; Isozyme technique

同工酶作为生物界存在的一种普遍现象受到了广泛的研究。同工酶学 (Isozymology) 虽然不是一个确定的学科, 但它已渗透到生物学的每一个领域, 尤其是对酶学、物理生物化学和比较生物化学、生理学、发育生物学、细胞和分子生物学、遗传学、进化论等学科更加完善起了并将继续起着重大作用。在科学史上, 很少有象同工酶的概念及其技术那样对生物科学产生如此重大的影响^[33]。本文仅对同工酶在植物中的研究和应用作一概述。

一、历史回顾

1949年 Malletle 和 Dawson 从普通蘑菇 (*Psalliota campestris*) 中得到了 5 个纯化的酪氨酸酶制剂, 为植物酶以多分子形式存在提供了一个最早的证据; Smithies (1955) 的淀粉凝胶电泳为研究酶的多分子形式作出了第一个重大贡献; Hunter 和 Markert (1957) 把组织化学染色法与蛋白质的淀粉凝胶电泳法结合起来, 由此建立了酶谱法技术; 1959 年 Markert 和 Møller 首先提出了同工酶的概念, 用以描述同一有机体内具有相似或同一底物特异性的一种酶的多分子形式^[28, 32]。自此以后, 同工酶学很快就在许多生物学的研究中成为一个重要领域。到目前为止, 已有数千种刊物报道同工酶的研究情况。关于同工酶的第一次国际会议于 1961 年 2 月召开, 距同工酶问世还不到两年; 第二次国际会议于 1966 年 12 月举行; 第三次于 1974 年 4 月举行; 1982 年 6 月又召开了第四次国际会议^[24]。同工酶学领域的工作者组成了一个庞大的团体, 他们的研究横跨生物学的大多数领域。

同工酶概念的产生主要有两个基础^[26]: 生物化学和遗传学。“酶是蛋白质分子, 蛋白质分子能被纯化”, 这是同工酶产生的生物化学基础; 40 年代 Beadle 和 Tatum 提出的“一个基因一种酶”的观点则为同工酶的产生奠定了遗传学基础。但是一个“纯”生

物化学家和一个“纯”遗传学家在当时完全不可能提出同工酶的概念。因为生物化学家,尤其是酶学家受“酶纯化只应产生一种分子”这一思想的限制,当他们发现有一个以上的酶分子形式时,他们仅取酶的主要形式,而把其它形式摒弃为人工臆象;“纯”遗传学家深信“一个基因一种酶”的假说,这一偏见也使他们不能认识到同工酶的存在。Markert涉足于遗传、发育和生物化学这几个研究领域,因此才认识到同工酶的存在,而成为“同工酶学之父”(Father of Isozymology)^[30]。

二、同工酶的形成

同工酶的产生具有重要的生物学意义,它表明了一个基本事实,即有机体已经产生了复杂的代谢方式,由此需要不同的蛋白质分子来催化同一生物化学反应^[26]。所以同工酶的产生是生物有机体的一种适应性反应,我们现在发现的同工酶系统代表了在系统发育中进化成功的部分,不成功的部分则在进化过程中被淘汰。

生物有机体可通过多种机理产生同工酶,根据同工酶形成的分子基础,一般分为两大类,即非遗传(渐成epigenetic)机理和遗传(genetic)机理^[33]。

由非遗传机理产生的同工酶是在翻译或翻译后水平形成的,它们包括以下几种情况:①单个的多肽链上结合不同数目的辅基或辅酶;②分子中活性基团(如氨基、羧基、氨基酸残基的羟基)的连接或缺失;③一级多肽结构的三级或四级结构变化;④由一个亚单位形成的一系列多聚体;⑤初生多肽的部分蛋白水解作用;⑥由制备、提取、贮藏、pH等因素产生的结果。(有的认为此类情况不属于同工酶范畴。)

由遗传机理产生的同工酶通常是在基因组和mRNA水平或在受调节基因控制的转录后水平形成的,它们包括:①多位点同工酶(Multilocus Isozyme),由不同的基因编码,有相似酶活性的不同蛋白质;②等位同工酶(Allelic Isozyme),由一定位点的突变等位基因产生的同种酶的不同形式;③杂种同工酶(Hybrid Isozyme),酶是多聚体,杂种分子通过亚单位的随机缔合而产生。这种情况可由基因内或基因间的互补导致。

从同工酶形成的分子基础来看,Markert当时提出的“同工酶”术语所包含的内容已不能反映出现今人们对同工酶系统的认识水平,后来,Markert曾提出用等位的、非等位的、同型或异型多聚体的、构象的、杂种的、同源的等形容词来修改同工酶的定义^[22]。

三、植物同工酶的研究

近30年来,尤其是在70年代前后,人们进行了大量的植物同工酶的研究工作,其主要特点有:

1. 植物材料的多样性

进行过同工酶研究的植物有低等植物和高等植物,其中被子植物的种类繁多,有农作物(如玉米、高粱、小麦、大豆、水稻等)、瓜果蔬菜(如苹果、梨子、柑桔、荔枝、白菜、萝卜、黄瓜、番茄等)、饮料作物(如咖啡、茶等)糖料作物(如甘蔗、菜等)、药用植物(如毛地黄等),以及林业中的橡胶等。就所取的植物组织而言,它包括了植物的每一个组织或器官,如根(幼根、老根)、茎(主茎、侧枝)、叶(幼叶、成长叶、衰老叶)、花[雄蕊(花粉、花丝)、雌蕊]、果实、种子(胚、胚乳)等。

2. 同工酶种类的多样性

从理论上讲,每一种酶都有它的同工酶。目前已知有2 000多种酶,但大多数酶还没有进行同工酶的观察^[26]J. G. Scandalios 在 *Isozymes in Development and Differentiation*^[32]一文中提及的同工酶系统有淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酶等共42种。C. Eduardo Vallejos 介绍的同工酶染色方法达57种之多^[23]。在这几十种同工酶中,研究得比较普遍的是酯酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、淀粉酶等,而其中过氧化物酶同工酶是最引人注目的,到目前为止,它已得到了比其它任何一种同工酶都要多的研究^[32]。

3. 同工酶基本特性的分析

70年代和80年代初是同工酶研究的高峰时期。就笔者所知,国内几乎所有研究植物的单位都有人在进行同工酶研究。这段时期主要是对丰富的植物材料进行多种同工酶的酶谱分析。通过酶谱分析,基本上明确了所研究植物的同工酶酶谱形态特征(酶带多少、着色深浅、迁移率等)及同工酶的发育阶段特异性、组织特异性(表1)、和品种特异性等^[32,41]并在理论上探讨了同工酶与基因调控、细胞分化、杂种优势、植物感病、抗病和生物进化等方面的关系^[3,5,7,11,13,19,21,22,24,27,28,32-34,36,39]。

现在人们一方面继续分析不同植物的各种同工酶的酶谱特征,并从组织水平深入到细胞水平和亚细胞水平,另一方面则着手研究同工酶的理化性质(包括同工酶的分子量、酶活性的适宜pH值和温度、等电点等)和结构组成(包括酶的氨基酸组成、碳水化合物组成,以及单体或多聚体等)^[17,22,35,40,41]。如对玉米苗期酯酶同工酶和过氧化物酶同工酶各酶带的分子量比较测定,发现了Est₃^F和Est₃^S、Pox₄^F和Pox₄^S的差异主要是分子量的差异^[17];确定了水稻胚的过氧化物酶同工酶的第6条带是22 500道尔顿,PI接近6.0,第7条带是49 000道尔顿,PI是6.0,第15条带的PI是10.5;水稻的乙醇脱氢酶含2.1个锌原子,12个巯基和3—4个二硫键等^[41]。

表1 水稻13种酶的组织特异性**
Table 1 Tissue specificity of thirteen enzymes in rice

酶	白色胚芽鞘	绿色幼叶	白色幼叶	绿色老叶	绿色剑叶	绿色叶鞘	白色幼根
Enzyme	White coleoptile	Young green leaf	Young white leaf	Older green leaf	Green flag leaf	Green leaf sheath	Young white root
乙醇脱氢酶	ADH	++	++	0	0	0	0
谷氨酸脱氢酶	GDH	+	++	+	+	+	+
苹果酸脱氢酶	MDH	++	++	++	++	++	++
异柠檬酸脱氢酶	IDH	++	+	++	—	—	++
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	PGD	++	+	++	+	—	++
过氧化氢酶	CAT	++	0	++	0	0	0
过氧化物酶	POX	+	++	++*	+	+	+
谷草转氨酶	GOT	+	+	0	++	+	+
磷酸葡萄糖变位酶	PGM	++	++	+	+	+	++
酯酶	EST	+	++	+	+	+	+
酸性磷酸酶	ACP	—	+	+	++	++	—
亮氨酸氨肽酶	LAP	+	++	++	+	+	—
磷酸葡萄糖异构酶	PGI	++	++	+	++	+	++

++: 强活性 +: 活性较弱 0: 无活性 —: 没有测定 *: 缺酸性的同工酶

** 引自Second和Trousnot, 1980; Second, 1982[41]

4. 同工酶的基因定位

在探讨了同工酶与基因活性关系的基础上,人们进一步利用同工酶谱作遗传图谱,进行同工酶的基因定位^[15,38],目前不仅弄清了某些植物特别是玉米的几种同工酶的基因位点和遗传连锁关系(表2),而且还对玉米的两个同工酶基因Adh₁和Adh₂进行了克隆和序列分析^[38]。这些研究标志着对同工酶的研究已经从蛋白质水平深入到了基因水平。

表2 玉米中已知酶位点的染色体定位*

Table 2 Summary of the known chromosomal locations of enzyme loci in maize

符号 Symbol	名称 Name	定位 Location	符号 Symbol	名称 Name	定位 Location
ACP1	酸性磷酸酶	9	Got3	谷草转氨酶-3	5S
Adh1	乙醇脱氢酶-1	1L	Idh1	异柠檬酸脱氢酶-1	8
Adh2	乙醇脱氢酶-2	4S	Idh2	异柠檬酸脱氢酶-2	6L
Amp1	氨基酶-1	1L	Mdh1	苹果酸脱氢酶-1	8
Amp2	氨基酶-2	1L	Mdh2	苹果酸脱氢酶-2	6L
Amp3	氨基酶-3	5S	Mdh3	苹果酸脱氢酶-3	3L
Amy2	淀粉酶-2	5S	Mdh4	苹果酸脱氢酶-4	1L
Cat1	过氧化氢酶-1	5S	Mdh5	苹果酸脱氢酶-5	5S
Cat2	过氧化氢酶-2	1S	Mel	苹果酸酶	3L
Cx1	儿茶酚氧化酶-1	10L	Mmm	修饰的线粒体苹果酸脱氢酶	1L
Est1	酯酶-1	7	Pgd1	6-磷酸葡萄糖 氢酶-1	6L
Est3	酯酶-3	3	Pgd2	6-磷酸葡萄糖 脱氢酶-2	3L
Est4	酯酶-4	3S	Pgm1	磷酸葡萄糖 变位酶-1	1L
Est8	酯酶-8	3S	Pgm2	磷酸葡萄糖 变位酶-2	5S
Est16	酯酶-16	7	Phi1	磷酸己糖异构酶	1L
Enp1	内肽酶-1	6L	Pox3	过氧化物酶-3	7
Glu1	葡萄糖苷酶-1	10L			
Gdh1	谷氨酸脱氢酶-1	1L			
Gdh2	谷氨酸脱氢酶-2	10			
Got1	谷草转氨酶-1	3L			
Got2	谷草转氨酶-2	5L			

*引自Coe等1982^[38]

四、同工酶技术在植物研究中的应用

同工酶有时是被研究的主题,有时则被用来作为研究其它问题的工具,由此发展成了专门的技术——同工酶技术。

1. 在基础理论研究中的作用

同工酶技术已被应用于植物界的各个不同学科中。生物化学家把同工酶的不同理化性质作为研究细胞代谢调节的一种手段;植物生理学家用同工酶鉴别组织或器官的生理特性,以研究发育与分化;病理学家用同工酶作为研究植物感病状况的生化指标;生物学家从进化的角度研究分子水平上的进化关系;在细胞和组织培养中,利用同工酶研究愈伤组织的形成和分化过程,并把同工酶作为较理想的生化指标在确定体细胞杂交种中应用;在系统发育和分类研究中,同工酶的利用则是对传统上所采用的植物学和细胞遗传学方法的重要补充^[6,11,21,22,25,31,32,38];遗传学领域更是从同工酶的识别中获益不少。同工酶分子已经成为分子、遗传、发育、生理和进化机理的有力探针^[38],下面是一些具体的例子。

①生化表型的鉴定;②发现新位点及其等位基因;③通过体细胞杂种对复杂的真核生物进行基因组作图;④自然群体中多型性位点的估价度;⑤组织培养和体细胞遗传学的遗传标记;⑥种内和种间的遗传相关性;⑦一种基因进化为另一种基因;⑧动植物群体中数量特性的分析;⑨基因剂量对酶结构和功能的效应;⑩基因内和基因间的互补和单基因的杂种优势;⑪发育中的不同基因表达和功能;⑫基因与基因以及基因与基因产物的相互作用;⑬基因组间的相互作用(核质作用);⑭确定研究各种基因——酶系统的模式;⑮基因与环境的相互作用和基因表达的渐成调节;⑯细胞内酶的拓扑结构的遗传学;⑰代谢的遗传调节;⑱鉴别遗传疾病;⑲蛋白质转变和分布的遗传控制;⑳特定同工酶结构基因的克隆。

2. 在农业、林业、食用菌生产中的应用

在植物学的应用领域,使用同工酶技术具有快速、方便的特点。有关这方面的报道很多^[2,13,20,42]在此仅举几例:

在遗传育种中,同工酶技术是预测杂种优势,鉴定杂种后代以及杂种后代纯度的一种手段。我们曾用酯酶同工酶技术,应用杂交水稻“互补酶谱”的特征,鉴定了不同来源的杂交水稻汕优6号种子的纯度,其结果与大田鉴定基本一致,收到了早期鉴定,省力、省钱的经济效益^[8]。

在林业科学中,有人借助酯酶同工酶等位基因分析,研究红松群体遗传组成,为保护红松森林基因资源,划分自然保护区的规模和布局,以及红松资源合理经营与持续利用提供了科学依据^[14];当优良树种的表型选择后,若按常规方法测定所选优树的遗传品质的优劣,需林木1/2轮伐期的时间,因此近几年来人们试图利用同工酶的快速生化测定方法,使成果能早日在生产上推广和应用^[20]。

利用同工酶的差异,对食用菌菌株进行鉴定分类及遗传育种已有许多报道^[1,9,10],人们分别测定了香菇、蘑菇、凤尾菇,侧耳、黑木耳属和光帽鳞伞属等多种菌株的酯酶、蛋白酶、磷酸酶、漆酶同工酶,认为把同工酶谱应用于菌株鉴定分类和选育菌种是一种有意义的方法。

还有其它一些方面的例子,如利用同工酶分析品种的地理分布与亲缘关系、鉴别树种的不同性别、检定烟草的抗病品种等,在此不再赘述了。

五、同工酶研究技术的发展及其前景

“工欲善其事,必先利其器”。纸电泳、淀粉凝胶电泳为酶谱法的建立奠定了基础,然而,只有酶谱技术建立以后,同工酶的研究才得以蓬勃开展。目前研究同工酶的方法和手段有多种:电泳、层析、等电聚焦、凝胶过滤、沉降作用、免疫化学及抑制剂技术等^[34],其中应用最广泛的是聚丙烯酰胺凝胶电泳法。近年来,又有关于薄层等电聚焦技术^[1,18],微型超薄等电聚焦技术^[15]、酶电泳谱的复印技术^[12],以及两种酶在同一凝胶板上显色的报道^[37]。同工酶研究技术正在朝着精细、经济的方向发展,这些发展将使同工酶的研究更加深入和广泛。

然而,在已知的2000多种酶中,大多数酶还没有进行同工酶的观察;而且酶的异质性主要是通过常用且方便电泳和层析方法来解决的,这些强有力的方法,主要是在电

荷或大小差异方面来解决同工酶的多形性问题,这对于解答遗传学、生物化学或生理问题并不是一个有效的终点;此外,所有的基因突变为同工酶系统的建成提供了基本的原材料,在生物进化过程中,几乎每一种酶都将在这个时间或另一个时间内被发现以同工酶的形式存在,所以同工酶学家 Isozymologists^[26]有一个巨大的领域要开拓,同工酶的研究领域正在扩大,而不是缩小,同工酶肯定要为解决生物学领域中的许多问题作出首要贡献,因为同工酶是有机体结构与功能的基本的、普遍的存在形式^[24]。

主要参考文献

- 1 方自若等.真菌学报.1987; 6(3): 178—183
- 2 王海燕.湖北林业科技.1986(4): 2—4
- 3 邓鸿德等.湖南农业科学.1984(3): 1
- 4 李士鹏等.生物化学与生物物理进展.1984(2): 72—74
- 5 李泽炳等.杂交水稻的研究与实践.上海科技出版社.1982
- 6 李继耕.作物学报.1980; 6(4): 245—252
- 7 刘文芳等.武汉植物学研究.1987; 5(3): 267—274
- 8 吴文瑜等.湖北农业科学.1985(12): 6—8
- 9 陈都珍等.真菌学报.1987; 6(1): 34—41
- 10 汤卫真等.广西植物.1987; 7(2): 143—148
- 11 周光宇.植物生理学通讯.1979(1): 1—4
- 12 周树根等.生命的化学.1984; 4(6): 24—26
- 13 张士文等.园艺学报.1987; 14(2): 108—113
- 14 杨一平等.林业科技通讯.1987(7): 5—7
- 15 罗玉坤等.第五届全国生物化学学术会议论文摘要汇编.1984: 182
- 16 罗美中等.植物学通报.1986; 4(1—2): 62—65
- 17 罗美中等.植物学报.1987; 29(2): 178—183
- 18 郭尧君.生物化学与生物物理进展.1983(3): 50—55
- 19 徐乃瑜等.武汉植物学研究.1983; 1(2): 295—302
- 20 涂朝辉,刘恒贵.湖北林业科技.1986(4): 4—7
- 21 梅慧生.植物生理学通讯.1981(3): 1—7
- 22 ИЛИТОВ, А.Ф. (楼士林译)植物同工酶的遗传(单行本).1978
- 23 C E Vallejos. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part A, 1983: 469—510
- 24 C L Markert. Ann N Y Academic Sci, 1968; 151: 14—40
- 25 C L Markert. Proceedings of the XII International Congress of Genetics, 1968; II: 82
- 26 C L Markert. Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research, 1983; 7: 1—17
- 27 Colin Masters. Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research, 1983; 8: 1—21
- 28 C R Shaw. Proceedings of the XII International Congress of Genetics, 1968; II: 76
- 29 David E Mcmillin. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part A, 1983: 3—13
- 30 Gregory S Whitt. Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research, 1983; 10: 1—40
- 31 J G Scandalios. Proceedings of the XII International Congress of Genetics, 1968; II: 79
- 32 J G Scandalios. Ann Rev Plant Physiol, 1974; 25: 225—258
- 33 J G Scandalios. Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research, 1983; 9: 1—31
- 34 J J Burdon, D R Marshall. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part A, 1983: 401—412
- 35 L M Shannon et al. J Bio Chem, 1966; 241(9): 2166—2172
- 36 L M Shannon. Ann Rev Plant Physiol, 1968; 19: 187—210
- 37 Mary Ann Fields et al. Anal Biochem, 1984; 137(1): 146
- 38 M M Goodman, C W Stuber. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part B, 1983: 1—31
- 39 Michael Freeling. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part A, 1983: 61—83
- 40 Shoji Ida et al. Agri Bio Chem, 1972; 36(4): 611—620
- 41 Toru Endo, Hiroko Morishima. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part B, 1983: 129—146
- 42 W T Adames. Isozymes in Plant Genetics and Breedings, Part A, 1983: 381—400