

同工酶与植物遗传育种

张维强 唐秀芝 编著

北京农业大学出版社

同工酶与植物 遗传育种

张维强 唐秀芝 编著

北京农业大学出版社

(京) 第164号

图书在版编目(CIP)数据

同工酶与植物遗传育种/张维强, 唐秀芝编著. —北京: 北京农业大学出版社, 1993.12

ISBN 7-81002-538-4

I. 同…

II. ①张…②唐…

III. 同工酶—遗传育种—应用

IV. S3.312

北京农业大学出版社出版发行

(北京市海淀区圆明园西路二号)

北京市海丰印刷厂印刷 新华书店经销

1993年12月第1版 1993年12月第1次印刷

开本: 850×1168毫米1/32 印张: 6.625

字数: 166 千字 印数: 0~1050册

定价: 7.00元

前 言

早在20世纪初，一些学者就开始注意在动植物中进行遗传方式的分析，并涉及到各种各样的特征特性。随之，基因的概念逐渐演变为以某种方式表达为个体的形态和生理特性的遗传信息。分子遗传学的问世，揭示了遗传信息如何编码，以及密码又如何 在生长发育过程中译读出来，揭示了遗传信息，在生物进化的历史长河中的形成与传递，这就是时间矢量上的遗传信息流。从而使基因→蛋白质、酶→植物生长发育、特征、特性构成统一的遗传信息体系。

蛋白质、酶是基因的直接表达者。在DNA分子上储存的遗传信息转移到RNA是以DNA基因链作为模板，通过转录作用，使每一个基因链产生几个或一个以上的自身RNA拷贝单位。每一个RNA的拷贝单位，保持了亲代DNA分子的碱基顺序，并记录下了全部的无误的遗传信息。这些新的RNA拷贝单位经过剪接加工，形成mRNA，tRNA，rRNA分子，它们在蛋白质合成过程中各自起到不同的引导或模板作用。

蛋白质的合成，在细胞核的DNA模板上的mRNA，扩散到核外，在核蛋白体上形成一个合成蛋白质的模板。较小的tRNA复合体向mRNA模板靠拢，找到一个正确的“位点”。mRNA辨认tRNA上与之相符的反密码子。这样tRNA正确地将不同的氨基酸一个一个地带到mRNA的相应位置上，最后靠肽键将氨基酸连接起来，形成氨基酸链，多肽链，并释放出tRNA，可再利用。在核蛋白体上合成的多肽链，进一步正确地加工、组装成蛋白质或酶分子。在蛋白质合成的全过程中，分子的识别、结合、连接、加工、组装等步骤，能正确无误地进行，都决定于由DNA记录在

mRNA, tRNA等遗传信息分子上的指令。

植物在生长发育, 细胞在分化、分裂、扩张以及对外来的侵入, 不良条件的抵抗等过程中, 基因能否尽其可能的速度制造转录本, 转录本又尽其可能的速度翻译成蛋白质, 酶又尽其可能的速率进行催化作用。实际上这是不可能的。在生物体内各条生化反应途径间, 在时间空间上存在相互联系, 相互制约的关系, 通过底物、中间产物、最终产物的利用, 通过酶的反馈调节机制, 即使在有限的逆境条件下, 使这些不同的作用力达到一个平衡协调点, 使植物代谢、生长、发育乃至各项植物学特征特性仍保持在最佳状态。

植物在生长发育过程中基因的调节作用。细胞虽含有整套的基因, 细胞的全能性, 但极大部分的基因处在不活性状态。当细胞处于不同分化阶段时, 基因有序地相继活化, 在特殊的时间和特殊的空间细胞中特异性蛋白质的出现和消失。在豌豆子叶中, 染色质转录形成的RNA能作为模板, 合成球蛋白(子叶中的贮藏蛋白), 而茎端染色质转录形成的RNA却不能; 矮牵牛子叶中在诱导花芽形成前后, 合成的mRNA碱基成分不同; 花粉粒在柱头上能识别不同种属的植物, 决定于二者由S-基因拷贝合成的S-蛋白质。不同种属的植物S-蛋白质的结构不同。说明细胞分化为不同的组织、器官, 其实质是改变了基因的表达。植物细胞的发育分化, 有时可在翻译水平上调节。种子在萌发过程中, 有些蛋白质的模板, mRNA是预先形成的。棉花种子萌发时, 子叶中羧肽酶和异柠檬酸裂解酶, 参与蛋白质的水解和脂肪的转化。合成这二种酶的mRNA, 早在胚形成期已合成, 但不表达, 直到种子吸水萌发时才表达。这种在转录和翻译水平上的调节作用, 可能是植物生长发育中的普遍现象, 但是植物基因的表达有时需要特定的条件(光、温、激素等)作为诱发信号。春化阶段必须在低温下完成, 并在严格的光周期下, 才能诱导开花。

植物是个开放系统, 外界环境条件对植物的生活有深刻的影

响。植物在系统发育过程中形成一套接受外界信号并立即作出反应的生理生化系统。光是个重要的物理信号，它能调节植物的生长、发育、形态建成以及光合作用等许多生理过程。植物体内有许多感受不同波长光的色素受体和反应机制；叶绿素吸收红光和蓝光进行光合作用；胡萝卜素等吸收蓝光后，改变一些酶的活性；光敏色素感受红光和远红光后，通过光敏色素二种状态的可逆转化，发出控制发育、生长的信号。温度是植物赖以生存必备条件，但温度又是通过调节植物体内一系列酶的活性，对高温或低温逆境条件，作出防御反应。热处理诱导红色面包霉和黄瓜幼苗中过氧化物酶活性的提高，抑制番石榴中多酚氧化酶的活性。热处理能诱导核糖核酸酶的形成和蛋白酶的活化。热处理能改变烟草根瘤培养物、瑞香茎端愈伤组织、玉米幼苗初生叶、四季豆叶组织、梨悬浮培养细胞等中各类内源激素的水平。热处理大豆、玉米、四季豆等能诱导产生热击蛋白（HSP），有的蛋白结合在高尔基体、内质网、质膜、线粒体、乙醛酸循环体上，这对细胞器的保护和损伤修复有关。植物在缺水或盐渍条件，植物体内的激素、酶发生一系列的变化。离体小麦叶片，由于失水脱落酸含量增加，气孔关闭；大麦叶片缺水时烯醇式磷酸丙酮酸羧化酶活性显著增加，加强C₄光合途径。

总之，植物在生长发育过程中，一方面，靠着在系统发育过程中形成的，细胞中基因预先编码好的指令，调控生长发育的全过程；另一方面，靠着植物体内的多条代谢途径，多层次的，在不同水平上进行调节，即在基因水平、酶促水平、转录和翻译水平、酶的合成和分解水平、酶的修饰和变构水平，诱导和反馈水平以及在细胞质、细胞核、细胞、组织、器官，整体等不同水平上进行调节（见图1-1）。因此研究DNA—酶和蛋白质—植物的生理特性和形态特征的遗传信息的传递过程是一个十分复杂问题。但是近年来，发展起来的基因工程，能将一种植物的基因，转移到另一种植物，并能部分地或全部表达，获得转基因植株。苏芸金

芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的毒蛋白对一些昆虫具有很强的毒杀力。将编码毒蛋白的基因转移到烟草、番茄、棉花上表现出明显的抗虫效果。将豇豆胰蛋白酶抑制物基因转移到烟草、马铃薯后,提高了转基因植株的抗虫性。将人工合成的基因片段 (HEAAE DNA) 292kb长编码的蛋白质中,80%是必需氨基酸,导入马铃薯后,获得转基因植株。我国陈受宜等从黑麦中分离克

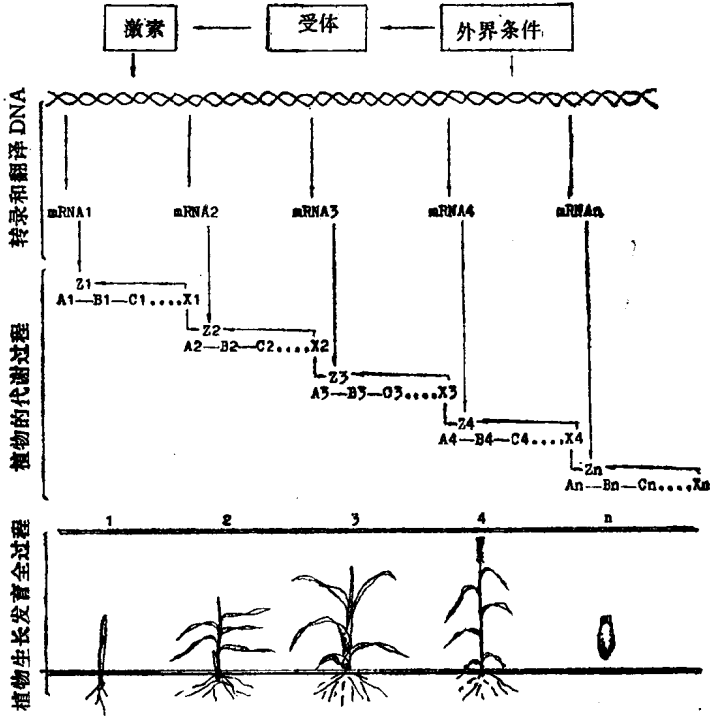


图 1-1 外界条件、基因、酶、代谢与植物
生长发育关系的示意图

注: 外界条件包括光、温、水、理化因子等。
受体包括色素、蛋白、酶等。

隆得—DNA片段，导入烟草后，转基因植株在一定阶段游离脯氨酸含量增加，耐盐性提高。用反义RNA抑制基因的表达。细胞壁水解酶PG的反义基因导入番茄后，转基因植株的果实中，PG反义基因的表达，使PG活性降到正常植株的5%~50%。自交纯合子的PG活性不足正常的1%。总之，植物基因工程的研究，不仅为育种研究提供了新型的育种资源，而且为“基因—蛋白质、酶—植物特征特性”遗传信息传递研究开辟了新的领域。

同工酶作为基因的直接产物，研究它在植物遗传育种中的应用，目的在于用来作为遗传标志，研究与植物起源、分类、地理分布、植物学特征特性以及经济性状等的关联性及其调控作用，为遗传育种者提供重要的遗传信息。

编 者 张维强 唐秀芝

责任编辑 方雨岚

封面设计 郑 川

版式设计 方雨岚

目 录

第一章 氨基酸、蛋白质的遗传信息	(1)
一、氨基酸	(2)
二、蛋白质	(6)
三、酶、蛋白质的结构与功能	(11)
第二章 植物同工酶的遗传学基础	(21)
一、植物同工酶的生物学意义	(21)
二、植物同工酶的遗传学基础	(39)
第三章 同工酶在植物遗传育种中的应用	(71)
一、植物种、品种分类中的同工酶	(71)
二、植物抗性研究中的同工酶	(77)
三、植物种子纯度检验中的同工酶	(93)
四、同工酶与作物农艺性状	(113)
五、同工酶在作物选育过程中的应用	(126)
第四章 同工酶电泳技术	(138)
一、基本原理	(138)
二、电泳技术	(140)
附表 I . 淀粉凝胶电泳缓冲系统	(162)
附表 II . 样品提取液缓冲液	(166)
附表 III . 同工酶的染色方法	(167)
参考文献	(190)

第一章 氨基酸、蛋白质的遗传信息

DNA是如何控制蛋白质的结构功能？又如何将遗传信息传递给蛋白质？在自然界中，生物的种类有千千万万，构成各种生物的蛋白质更是千变万化，五光十色，但自从遗传学家、生物化学家研究将遗传密码破译后，人们才明白，成千上万的遗传信息全部存储在仅由4个碱基为基本组成单位的DNA中，而且正确无误地将遗传指令传递给仅由20种氨基酸组成的形形色色的蛋白质、酶，控制着生物的全部代谢过程，生物的代谢、繁育是个十分复杂的生命过程。然而，构成遗传信息分子的基本单元，却如此的简单似乎不好理解，实际上这在生物学中是一个效率最高的灵活性最大的、稳定性最好的自我控制系统，保持着物种的多样性、稳定性和连续性。这种控制系统是通过多级控制来实现的。由4个碱基按照不同的排列顺序，构成的DNA序列，它的复制从头到尾完整无缺的复制过程，保证存储在DNA分子上的全部遗传信息，正确无误地传递给子细胞或子代。而蛋白质的转录装置部分，RNA的合成，却是另一种方式，遗传信息由DNA转移到RNA是分段进行的，即不同基因的转录各自独立的，每一个基因或基因小群产生一个或若干个RNA拷贝单位。也就是说在一个基因组内可以转录成能合成多种分子形式的蛋白质的RNA拷贝，并对调节信号能有效地作出反应。在蛋白质的合成过程中，由RNA转译的多肽链，经过进一步的切除，修饰、加工处理，捲曲构成蛋白质亚单位，由同一位点或不同位点等位基因编码合成的不同的蛋白质亚单位，组装成不同分子形的有活性的蛋白质分子。若二种不同的蛋白质亚单位，可以自动装配成四种分子形的四聚体结

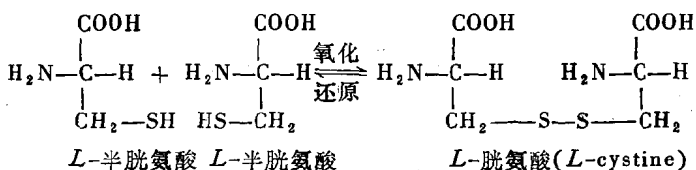
构的蛋白质分子。这种不同蛋白质分子的自动装配指令，仍然是由DNA上的遗传信息所规定的氨基酸排列顺序所决定的。总之，DNA上的遗传信息，通过转录、翻译、加工组装在不同层次上传递、调控保持自然界物种的多样性，遗传性的稳定性，系统发育的连续性。其中氨基酸是构成传递遗传信息的基本单位型之一。

一、氨基酸

1. 非极性R基氨基酸 这一组有8种氨基酸。其中带有脂肪烃侧链的氨基酸有5种，即：丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸，带有芳香族侧链的氨基酸有二种，即：苯丙氨酸和色氨酸；含硫的氨基酸一种，即：甲硫氨酸。这一组氨基酸在水中的溶解度比极性R基氨基酸小。其中丙氨酸的疏水性最小，依次为缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸。

2. 不带电荷的极性R基氨基酸 这组氨基酸比非极性R基氨基酸易溶于水。它们的侧链中含有不解离的极性基，能与水形成氢键。丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸中侧链的极性是由于它们的羟基造成的；天门冬酰胺和谷氨酰胺的R基极性是它们的酰胺基引起的；半胱氨酸则是由于含有巯基（ $-SH$ ）的缘故。甘氨酸的侧链介于极性与非极性之间。它的R基只含有一个氢原子，对极性强的 α -氨基和 α -羧基影响很小。

这一组氨基酸中半胱氨酸和酪氨酸的R基极性最强。半胱氨酸中的巯基和酪氨酸中的酚羟基，在pH7.0时，电离很弱，但与这一组中的其它氨基酸的侧链相比失去质子的倾向要大得多。半胱氨酸在蛋白质中经常以氧化型的胱氨酸存在。胱氨酸是由两个半胱氨酸通过它们侧链上的 $-SH$ 基氧化成共价的二硫桥连接而成。



3. 带正电荷的R基氨基酸 这是一类碱性氨基酸，在pH7.0时，携带净正电荷。有赖氨酸、精氨酸和组氨酸。赖氨酸除去 α -氨基外，在脂肪链的 ϵ 位置上还有一个氨基；精氨酸含有一个带正电荷的胍基；组氨酸有一个弱碱性的咪唑基。在pH6.0时，组氨酸分子50%以上质子化，但在pH7.0时，质子化的分子不到10%。组氨酸是R基的pK值在7附近的唯一氨基酸。

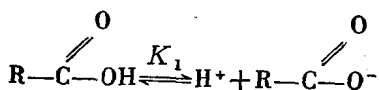
4. 带负电荷的R基氨基酸 属这一类的是两种酸性氨基酸，即天门冬氨酸和谷氨酸。含有两个羧基，第二个羧基pH6~7之间完全解离，因此分子带负电荷。

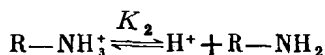
氨基酸R基团的结构和它的化学性质。

1. 氨基酸的旋光性和吸收光 除甘氨酸外，所有氨基酸都具有不对称碳原子，说明这些氨基酸，都有可能存在二种构型，即L型和D型二种旋光异构体。但在自然界，大多数的氨基酸属L型。D型氨基酸极少，一般只存在于细菌的细胞壁和低肽抗菌素中。

参与组成蛋白质的20种氨基酸，在可见光区域，没有吸收光，在紫外区域只有酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸具有光吸收能力。酪氨酸的最大光吸收值为278nm，苯丙氨酸的最大光吸收值为259nm，色氨酸的最大光吸收值为279nm。这些氨基酸的吸收光谱对鉴定蛋白具有重要意义。

2. 氨基酸的酸碱性质 在pH值为4~9的溶液中，氨基酸以两性离子存在，这是因为每一种氨基酸至少具有一个羧基和一个氨基，在溶液中解离反应为：





电离常数 K 为:

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]} \quad \frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_1} \cdot \frac{[\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_1 + \lg \frac{[\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]} \quad K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_3^+]}$$

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_2} \cdot \frac{[\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_3^+]} \quad \text{pH} = \text{p}K_2 + \lg \frac{[\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_3^+]}$$

当 $[\text{RCOO}^-] = [\text{RCOOH}]$ 时, $\text{p}K_1 = \text{pH}$; 同样, 当 $[\text{RNH}_2] = [\text{RNH}_3^+]$ 时, $\text{p}K_2 = \text{pH}$ 。所以 $\text{p}K$, 即为氨基酸处于一半电离时的氢离子浓度。不同的氨基酸具有不同的 $\text{p}K$ 值(表1-1), 它被用来反应氨基酸的解离程度, 也可用来鉴定蛋白质特定位置上的氨基酸。

表 1-1 氨基酸的表现解离常数和等电点

氨基酸*	$\text{p}K' - \text{COOH}$	$\text{p}K' - \text{NH}_3^+$	$\text{p}K' (\text{R})$	pI
甘氨酸	2.34	9.60		5.97
丙氨酸	2.34	9.69		6.02
缬氨酸	2.32	9.62		5.97
亮氨酸	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸	2.36	9.68		6.02
丝氨酸	2.21	9.15		5.68
苏氨酸	2.63	10.43		6.53
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86(βCOOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(γCOOH)	3.22
谷氨酰胺	2.17	9.3		5.65
精氨酸	2.17	9.04	12.48(胍基)	10.76

续表

氨基酸*	$pK' - \text{COOH}$	$pK' - \text{NH}_3^+$	$pK' (\text{R})$	pI
赖氨酸	2.18	8.95	10.53 ($e^+ \text{NH}_3^+$)	9.74
组氨酸	1.82	9.17	6.00 (咪唑基)	7.59
半胱氨酸	1.71	8.33	10.78 (SH)	5.02
甲硫氨酸	2.28	9.21		5.75
苯丙氨酸	1.83	9.13		5.48
酪氨酸	2.20	9.11	10.07 (OH)	5.66
色氨酸	2.38	9.39		5.89
脯氨酸	1.99	10.60		6.30

*除半胱氨酸是30℃测定数值外，其它氨基酸都是25℃测定数值。

在一定的pH溶液中，将会出现带有相等的带负电荷的羧基和带正电荷的氨基。这时的pH值称等电点 pI ，不同的氨基酸具有不同的等电点，因此蛋白质的等电点，很大程度上决定于一级结构中酸性氨基酸和碱性氨基酸的比例，酸性氨基酸比例高等电点低。

3. 氨基酸的R基团的特性 半胱氨酸侧链上的巯基($-\text{SH}$)，反应性能高，二个半胱氨酸分子侧链上的巯基，氧化成为二硫键，形成胱氨酸，这种二硫键，在形成蛋白质构象上起很大作用。

氨基酸侧链上 $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}$ 基团的质子能同其它极性基团，多肽链上羰基氧原子或组氨酸侧链环上的氮原子形成氢键。另外，多肽链上的酰胺($-\text{NH}$)质子和主链上的羰基氧原子间形成氢键。

脯氨酸侧链上的 α 碳原子连在主链亚氨基的氮原子上，使多肽链的各个脯氨酸位置上，形成特殊的扭曲(图1-2)，这对蛋白质分子三级结构的形成具有重要意义。

氨基酸侧链上 $-\text{OH}$ ， $-\text{NH}$ 基团的质子能同其它的极性基团，多肽主链上羰基氧原子或组氨酸侧链环上的氮原子形成氢

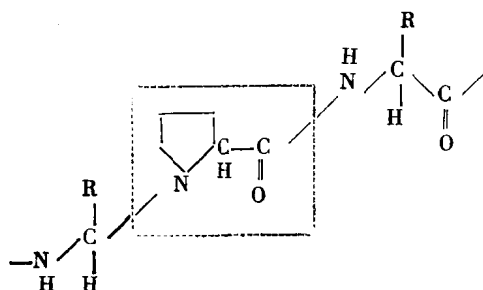


图 1-2 多肽链中的脯氨酸

键。另外多肽主链上的酰胺（—NH）质子和主链上的羰基氧原子之间也会形成氢键。

氨基酸虽不是遗传单位，但不同理化特性的氨基酸在肽链上的排列顺序及其长度构成特定的遗传信息，对蛋白质的结构和理化性质产生深刻的影响。

二、蛋 白 质

在生物体内所有的蛋白质都是在DNA的遗传信息控制下合成的。DNA中存储的遗传信息是线型核酸分子的碱基排列顺序。在蛋白质合成过程中，遗传信息从DNA流入蛋白质分子，首先表现为线型氨基酸顺序。由线型氨基酸序列，肽链折叠成特定的三维构象，这种构象为蛋白质表现其生物功能或活性所必需的。那么，肽链中的线型一维信息怎样表现为具有生物活性的三维构象？

蛋白质的结构 Pauling等人分析了氨基酸，酰胺和一些简单的肽的衍射图案，根据某些晶体结构和化学键的理论提出形成稳定肽键的空间结构原则：（1）肽键—CO—NH—中4个原子和它相邻的两个 α 碳原子都处于同一平面上；它的键长和键角和简单的酰胺及二肽中的键长与键角一样；（2）肽键中的C—N键比大多数其它的C—N键短，具有部分双键的性质，因此不能自由旋转；与C—N键相连的H和O原子是反式的。

根据这些原则，可以把多肽链的主链看成是由一系列坚硬平面组成（图1-3），平面之间被 α -碳原子隔开。主链上有1/3是C-N键，因为它们具有双键性质，不能自由转动。因此，肽键将使得一条多肽的构象数目受到很大的限制。主链上的C α -N和C α -C键可以旋转，但也不是完全自由的。因为，这两个键旋转时将受到 α -碳原子上的侧链R基的空间阻碍影响，影响的程度取决于R基的性质；C α -N或C α -C键自由旋转的最大范围是180°，因为这时C α 相邻的二个肽键上羰基氧原子或亚氨基氢原子将相互重叠，妨碍进一步旋转。这样多肽链的构象数目又受到进一步的限制。尽管肽键的特性对肽链构象的数目产生很大的限制作用，但仍有多种折叠方式的可能模型。实际上肽链的构象，还受氨基酸的组分及其排列顺序两大因素影响很大。

1. α -螺旋式的多肽链构象 Pauling 等研究提出的 α -螺旋体多肽模型。在研究 α -角蛋白衍射图发现，5.0~5.5 Å为一个重复单位。每隔3.6个氨基酸残基形成一个螺旋圈。沿螺旋中心轴每增加一圈，相当于螺旋延长5.4 Å。这与天然 α -角蛋白衍生物推算结果是一致的。在 α -螺旋体中氨基酸残基的侧链，与相邻螺旋圈之间形成链内氢键，这些氢键几乎与中心轴平行。氢键是由于肽键中负电性很强的氮原子上的氢和它后面的第四个氨基酸残基的羰基氧之间形成的。 α -螺旋体的结构允许所有的肽键都能参与链内氢键的形成的，因此， α -螺旋体的构象是相当稳定的。

一条多肽链能否形成 α -螺旋体，以及形成的螺旋体稳定程度怎样，与它的氨基酸组成和排列顺序有极大关系。根据大量多聚氨基酸的研究表明，R基小，且不带电荷的多聚丙氨酸，在pH7的水溶液中能自发地卷曲成 α -螺旋体。但多聚赖氨酸，在同样的pH条件下，却不能形成 α -螺旋体，而以无规则线团形式存在。这是因为多聚赖氨酸，在pH7时R基具有正电荷，彼此间由于静电排斥，不能形成链内氢键。在pH12时，多聚赖氨酸即自发地形成 α -螺旋体。同样，多聚谷氨酸也与此类似。