


# 同工酶遗传学引论

毛盛贤 向华 编著



TONGGONGMEI  
YICHUANXUE YINLUN

首都师范大学出版社

# 同工酶遗传学引论

毛盛贤 向 华 编著

首都师范大学出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

同工酶遗传学引论/毛盛贤, 向华编著. —北京: 首都师范大学出版社, 2000. 9

ISBN 7-81064-035-6

I. 同… II. ①毛… ②向… III. 同工酶-遗传学  
IV. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 07835 号

TONGGONGMEI YICHUANXUE YINLUN

同工酶遗传学引论

首都师范大学出版社

(北京西三环北路 105 号 邮政编码 100037)

北京首师大印刷厂印刷 全国新华书店经销

2000 年 9 月第 1 版 2000 年 9 月第 1 次印刷

开本 850×1168 1/32 印张 5.375

字数 129 千 印数 0,001~1,000 册

定价 10.00 元

## 内 容 简 介

本书介绍了同工酶遗传学的原理、方法和应用，主要内容有：蛋白质凝胶电泳的基础及其谱带的遗传解释；同工酶的提取、贮存、分离和染色的原理和技术；同工酶遗传学在研究群体遗传变异、群体间遗传距离、群体固定指数和育种上的应用。最后还简要介绍了核苷酸的进化和系统发育树重建的原理和方法。

本书可供生物学、农学和医学有关专业的本科生、研究生和科学工作者参考。

## 前 言

同工酶遗传学的进展，取决于 20 世纪 50 年代中叶的两个发展：一是，在理论上，Watson 和 Crick (1953) 两人提出的 DNA 双螺旋分子结构，使得最终阐明了基因和蛋白质间的关系；二是，在技术上，Hunter 等 (1957) 提出的把凝胶电泳和组织化学染色相结合的酶谱分析方法，使快速可靠地鉴别蛋白质的变异成为可能。

由于这两方面的发展，同工酶遗传学的理论和技术应用到遗传学领域的不同分支——如群体遗传、进化遗传和生态遗传，以及与其有关的其他领域——如育种学和医学，在从分子水平解决各自的理论和应用问题上，已显得越来越广泛、深入和成熟，引起了广大生命科学工作者的极大关注。

然而，在我国，从理论到方法较系统地介绍同工酶遗传学且适合于教学需要的书籍还未见过。我们根据多年来的研究生教学和科研实践，编写了这本《同工酶遗传学引论》，以供从事这方面教学和科研的人员参考。

全书分三部分：原理，涉及蛋白质凝胶电泳的基础知识及其遗传解释；方法，主要涉及同工酶的提取、贮存、分离和染色技术；应用，主要涉及同工酶遗传学在群体遗传、进化遗传和育种方面的应用。

由于该书主要是教学过程的产物，还要继续为教学服务，所以编写时力求反映如下三个特点：一是教学性——全书的三部分，原理、方法和应用，虽有一定的独立性，但也是相互关联的，体现了基础理论、基本方法和基本应用的一个较为完整的科学知识链，以便于教和学。二是科学性——力求正确地阐述同工酶遗传

学的基本理论和概念，以及恰当地反映国内外的水平。三是实践性——前两部分的原理和方法，旨在为第三部分的应用服务。

本书第一、三和第二部分分别由毛盛贤和向华执笔，全书由毛盛贤统稿。

由于我们水平有限，加之同工酶遗传学这方面的理论和技术都在突飞猛进发展，书中内容难免有挂一漏万和错误之处，敬请读者批评指正。

编著者

于 1999 年 9 月

# 目 录

## 第一章 原理

|                        |      |
|------------------------|------|
| 第一节 蛋白质电泳基础 .....      | (1)  |
| 一、遗传密码和蛋白质合成 .....     | (2)  |
| 二、影响蛋白质电泳的因素 .....     | (5)  |
| 三、蛋白质鉴定原理 .....        | (9)  |
| 四、凝胶电泳的基本部分和过程 .....   | (10) |
| 第二节 蛋白质凝胶电泳的遗传解释 ..... | (12) |
| 一、单个基因座的电泳表达 .....     | (12) |
| 二、多个基因座的电泳表达 .....     | (15) |
| 三、多倍体基因的电泳表达 .....     | (21) |
| 四、电泳表达的复杂性 .....       | (23) |
| 五、电泳解释的注意事项 .....      | (26) |

## 第二章 方法

|                         |      |
|-------------------------|------|
| 第一节 同工酶提取和样品贮存技术 .....  | (31) |
| 一、影响酶蛋白降解和变异的因素 .....   | (31) |
| 二、同工酶提取和样品贮存的基本原则 ..... | (32) |
| 三、同工酶检测的生物组织的选择 .....   | (33) |
| 四、同工酶提取和样品贮存的基本步骤 ..... | (34) |
| 五、三类动物组织同工酶的提取 .....    | (36) |
| 第二节 同工酶的电泳分离技术 .....    | (38) |
| 一、水平板淀粉凝胶电泳技术 .....     | (39) |
| 二、垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 .....  | (46) |

|                        |      |
|------------------------|------|
| 三、醋酸纤维薄膜电泳技术简介 .....   | (57) |
| 第三节 同工酶染色技术 .....      | (59) |
| 一、同工酶染色的基本原理和方法 .....  | (59) |
| 二、染色缓冲液及有关贮存液的配制 ..... | (62) |
| 三、常见同工酶的染色技术 .....     | (65) |
| 第四节 凝胶酶谱的保存和分析 .....   | (93) |
| 一、固定液保存法 .....         | (94) |
| 二、干板保存法 .....          | (94) |
| 三、摄像保存法 .....          | (95) |
| 四、酶谱的基因型表示法和遗传分析 ..... | (95) |

### 第三章 应用

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| 第一节 Hardy-Weinberg 群体 .....       | (98)  |
| 一、等位基因频率和 Hardy Weinberg 平衡 ..... | (98)  |
| 二、等位基因频率的估算 .....                 | (101) |
| 三、Hardy-Weinberg 遗传平衡的检验 .....    | (106) |
| 第二节 遗传变异的测量和估算 .....              | (116) |
| 一、多态基因座比率 .....                   | (117) |
| 二、基因多样度和基因一致度 .....               | (117) |
| 第三节 群体间遗传距离 .....                 | (123) |
| 一、群体分类的距离测量 .....                 | (124) |
| 二、研究进化的距离测量 .....                 | (127) |
| 三、遗传距离的估算 .....                   | (130) |
| 第四节 遗传趋异 .....                    | (135) |
| 一、Wahlund 氏效应 .....               | (136) |
| 二、套层群体结构和固定指数 .....               | (138) |
| 三、固定指数的估算 .....                   | (141) |
| 四、固定指数与遗传育种 .....                 | (145) |
| 第五节 核苷酸序列进化与系统发育树重建 .....         | (148) |



|               |       |
|---------------|-------|
| 一、核苷酸替换 ..... | (148) |
| 二、系统树重建.....  | (149) |
| 主要参考文献 .....  | (158) |

# 第一章 原 理

在遗传学和育种学研究中,一般都认识到鉴别原种间差异和控制遗传变异的重要性,但未认识到原种间差异、蛋白质变异与孟德尔遗传变异间的联系。

为了建立这三者间的联系,我们先讨论与蛋白质电泳有关的遗传问题。

## 第一节 蛋白质电泳基础

19世纪末,人们就认识了电泳(electrophoresis)的原理。液体介质中第一个可溶性蛋白质电泳,是在第二次世界大战的前几年进行的;其中的不同蛋白质,是根据它们对光吸收的差异鉴别的。20世纪50年代后,富有弹性和多孔的蛋白质支持介质,如醋酸纤维素、琼脂、淀粉和聚丙烯酰胺的引入,使电泳技术更为简便。

所谓电泳,是指带电物质在直流电场作用下,向着与其电性相反的电极移动的现象。由于物质带电的性质和大小不同,在一定的电场中有不同的泳动方向和速度,所以通过电泳可达到分离物质的目的;又由于不同的物质固定和支持介质中,可用不同的试剂在原位染色,所以通过电泳可达到鉴别物质的目的。

所谓同工酶(isozyme),是指催化同一化学反应但其酶分子组成不同的一组酶。乳酸脱氢酶分子是由4条多肽链构成的四聚体,共涉及两种多肽链或两种亚单位( $a$ 和 $a'$ );所以,其酶分子组成可以是 $a^4$ 、 $a^3a'$ 、 $a^2(a')^2$ 、 $a(a')^3$ 或 $(a')^4$ 。这组酶是乳酸脱氢酶同工酶,它们利用的底物相同,即催化同一反应;但生理功能可不完全相同,如有的可能更适应于某一温度或某一pH等,所以称同工酶,

不称同功酶。

凝胶上不同的带谱对应不同的蛋白质或酶。而蛋白质或酶的合成是由一个或少数几个基因座控制的，所以，凝胶中观测到的酶的不同表现型具有质量性状的性质，一般可用酶的不同基因型解释。

在遗传学中，研究编码蛋白质的基因座有如下优点：一是这些基因座一般为多态，因此可广泛用来研究生物的遗传变异。

二是编码蛋白质的各等位基因一般为等显性，即在杂合体中的两等位基因都可得到表达，从而可依个体的表现型确定其基因型。

三是能较快速和较便宜地对一个体的若干基因座同时进行研究的技术，目前只有蛋白质电泳。蛋白质基因座，可看作 1 个个体结构基因组的随机样本。淀粉、聚丙烯酰胺凝胶等电泳技术可同时检验 20~30 个个体，因此可较准确和较快地比较种间或种内样本在遗传上的异同。

四是溶液中的可溶性蛋白质可带电荷。在电场中，依它们带电的性质可向阴极或阳极移动；依它们带电的多少、分子量的大小，有不同的迁移率。因此，不同的同工酶，有不同的电泳酶谱。

下面我们要讨论影响蛋白质电荷，因此也就影响蛋白质电泳迁移率的各因素。为此，先简要介绍蛋白质合成的遗传控制，这对我们以后有效应用蛋白质电泳技术和合理进行蛋白质遗传分析都是有益的。

## 一、遗传密码和蛋白质合成

蛋白质由一条或多条(相同或不不同的)多肽链构成，为简单蛋白；蛋白质若还与非蛋白部分结合，为结合蛋白。

每一多肽链由许多氨基酸通过共价键——肽键结合而成。氨基酸的顺序和本质决定多肽链的初级结构。多肽链中的氨基酸顺序依赖于编码多肽链的基因(DNA 片断)中的核苷酸顺序。蛋白质

中每一氨基酸由核苷酸的三联体编码(表 1.1)。在基因中有四种单核苷酸,其区别在于它们的含氮碱基不同:或是嘌呤——腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);或是嘧啶——胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。

表 1.1 遗传密码

| 第一碱基 | 第二碱基 |     |      |      | 第三碱基 |
|------|------|-----|------|------|------|
|      | A    | G   | T    | C    |      |
| A    | 苯丙氨酸 | 丝氨酸 | 酪氨酸  | 半胱氨酸 | A    |
|      | 苯丙氨酸 | 丝氨酸 | 酪氨酸  | 半胱氨酸 | G    |
|      | 亮氨酸  | 丝氨酸 | 无义   | 无义   | T    |
|      | 亮氨酸  | 丝氨酸 | 无义   | 色氨酸  | C    |
| G    | 亮氨酸  | 脯氨酸 | 组氨酸  | 精氨酸  | A    |
|      | 亮氨酸  | 脯氨酸 | 组氨酸  | 精氨酸  | G    |
|      | 亮氨酸  | 脯氨酸 | 谷氨酰胺 | 精氨酸  | T    |
|      | 亮氨酸  | 脯氨酸 | 谷氨酰胺 | 精氨酸  | C    |
| T    | 异亮氨酸 | 苏氨酸 | 天冬酰胺 | 丝氨酸  | A    |
|      | 异亮氨酸 | 苏氨酸 | 天冬酰胺 | 丝氨酸  | G    |
|      | 异亮氨酸 | 苏氨酸 | 赖氨酸  | 精氨酸  | T    |
|      | 甲硫氨酸 | 苏氨酸 | 赖氨酸  | 精氨酸  | C    |
| C    | 缬氨酸  | 丙氨酸 | 天冬氨酸 | 甘氨酸  | A    |
|      | 缬氨酸  | 丙氨酸 | 天冬氨酸 | 甘氨酸  | G    |
|      | 缬氨酸  | 丙氨酸 | 谷氨酸  | 甘氨酸  | T    |
|      | 缬氨酸  | 丙氨酸 | 谷氨酸  | 甘氨酸  | C    |

基因(或至少基因的编码部分)转录成信使 RNA(mRNA)。mRNA 由细胞核移至细胞质后,通过一系列过程,其中涉及核糖体、运转 RNA(tRNA)和不同的酶,转译成蛋白质(图 1.1)。mRNA 中的一个三联体(密码子)是编码多肽链中的一个氨基酸。蛋白质合成继续时,首先,多肽链本身螺旋化(形成  $\alpha$  螺旋),成为二级结构;然后本身折叠,成为三级结构(折叠形成依赖于多肽链中氨基酸的物理化学性质);最后,某些蛋白质由一个或多个基因编码的若干多肽链结合在一起,成为四级结构。

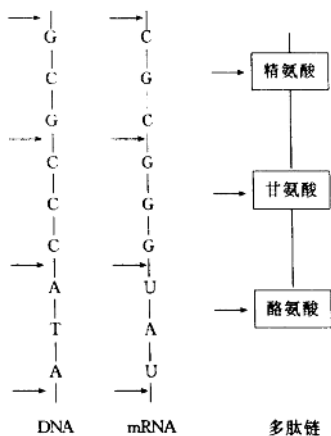
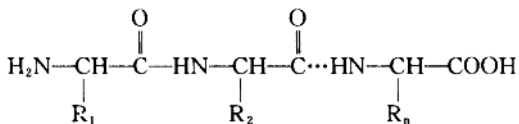


图1.1 遗传密码的转录和转译

多肽链可图解如下：



其中  $\text{R}_1, \text{R}_2, \dots, \text{R}_n$  代表氨基酸侧链。即肽链由一个规则重复的骨架和变化多端的侧链组成。蛋白质中的某些残基可带电荷——正电荷或负电荷，而蛋白质的净电荷是这些电荷的代数和。一定的蛋白质有一定的净电荷，其净电荷的大小依赖于蛋白质的初级结构、溶液的 pH 大小、离子浓度和组成以及是否存在同蛋白质结合的离子体。

在生物中，普遍存在 20 种氨基酸。根据氨基酸残基的性质，可把氨基酸分成四类：

——具有非极性(疏水)残基的氨基酸。这类氨基酸可离子化，它们是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨

酸和蛋氨酸。

——具有极性残基的无电荷氨基酸。这类氨基酸比前一类更易溶于水，因它们的残基可与水形成氢键。它们是甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。

——具有负电荷残基的氨基酸。在细胞内 pH(6~7)条件下，这些氨基酸呈酸性，它们是天冬氨酸和谷氨酸，都是含二羧基一氨基的氨基酸。

——具有正电荷残基的氨基酸。在细胞内 pH 条件下，这些氨基酸呈碱性，它们是赖氨酸、精氨酸和组氨酸。在 pH6.0 时，有 50% 的组氨酸分子带正电荷；在 pH7.0 时，不足 10% 的组氨酸带正电荷。

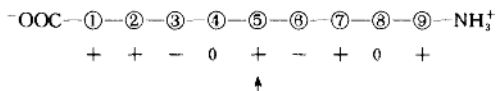
## 二、影响蛋白质电泳的因素

### 1. 蛋白质结构

蛋白质的一级结构和高级结构的变化对其电泳迁移率都会产生影响。

(1) 蛋白质一级结构对其迁移率影响

假定由一多肽链构成的蛋白质(1)有如下 9 个氨基酸：



在给定 pH 下，氨基酸残基 1、2、5、7 和 9 带正电荷，3 和 6 带负电荷，4 和 8 不带电荷。所以，该蛋白质的净电荷为  $3(=1+1-1+0+1-1-1+1+0+1)$ 。假定氨基酸残基 5(如箭头所示)是由基因中的密码子 TTC 编码的赖氨酸(见表 1.1)。该密码子可发生不同类型的点突变：

——如果密码子 TTC 突变成 TCC，则位置 5 的赖氨酸成为精氨酸。也就是说，该基因座由于突变产生一新等位基因，可编码一新的等位蛋白；若该蛋白具有酶的功能，称为等位酶

(allozyme)。这一新的氨基酸(精氨酸)与老的氨基酸(赖氨酸)一样,都带电荷。所以,这一新蛋白(Ⅱ)与原蛋白(Ⅰ)具有相同的正电荷(+3)。

——如果密码子 TTC 突变成 TGC,则新的等位蛋白(Ⅲ)在位置 5 为苏氨酸。苏氨酸为电中性,所以等位蛋白(Ⅲ)的净电荷为+2。

——如果密码子 TTC 突变成 CTC,则它编码带负电荷的谷氨酸,其新的等位蛋白(Ⅳ)的净电荷为+1。

现把这些等位蛋白(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ)进行电泳,则它们以正比于其带电荷的速度向阴极移动。经一定时间后,它们在支持介质上的位置如图 1.2 所示:Ⅰ和Ⅱ迁移最远(Ⅰ和Ⅱ离原点距离相等);其次是Ⅲ;再次是Ⅳ。

总之,控制蛋白质合成的基因——DNA 片断发生突变时,可导致具有不同电荷的氨基酸替换,从而导致蛋白质净电荷的变化。上例的四种突变中有两类引起了净电荷的变化。一般说来,约有 1/3 的氨基酸替换可用电泳法鉴别出来。电泳法低估实际存在的多态性是有些氨基酸替换不能鉴别的最重要原因。

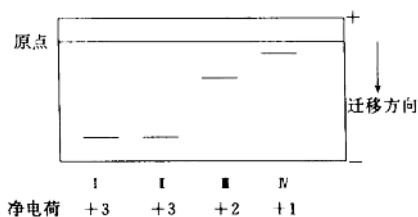


图1.2 四种蛋白的电泳

## (2) 蛋白质高级结构对其迁移率的影响

构成蛋白质的多肽可产生二级或三级结构。在这过程中,疏水基团倾向于多肽的内部,而亲水基团位于多肽的外部。其结果使得某些离子基团不能直接“滴定”,从而减少了蛋白质的净电荷。

构成三级结构的化学键越稳定,蛋白质结构就越稳定。一些长的多肽链可有两个或更多个稳定形式,所以具有同一初级结构的分子可有不同的三级结构。蛋白质三级结构的变化可导致电荷的变化。

以上所述是由一条多肽链构成的蛋白质,即单聚(一聚)蛋白质的情况。

许多蛋白质是由两条或更多条多肽链构成的,形成多聚蛋白质。多肽链相同的,称为同聚蛋白质;不同的,称为异聚蛋白质。各多肽链(各亚单位)结合构成特定蛋白质分子的四级结构。但是,对于特定分子的四级结构,其多肽链数未必都相同。一般说来,只有当分子在正常多聚态时才具有酶活性,例如哺乳动物的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase),只有四聚体具有活性;不过也有例外,苹果酸酶(malate enzyme)或  $\text{NADP}^+$  依赖性苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase— $\text{NADP}^+$  dependant)正常时为四聚体,但在二聚体甚至一聚体时也具有一定活性。可以预料,亚单位不同的分子有着不同的迁移率。

## 2. 试验条件

我们从电化学和支持介质的不同试验条件这两方面,讨论它们对蛋白质电荷有何影响。

### (1) 电化学条件

蛋白质净电荷依赖于其氨基酸残基的离子化程度,所以,蛋白质溶液的 pH 以及浓度和组成,都可影响蛋白质所带的净电荷。

——pH 的影响。电泳液为缓冲液,含有过量的阴离子或阳离子。还以前述的含有 9 个氨基酸的多肽为例,假定把它分别放入溶液  $S_1$  (pH=5)、 $S_2$  (pH=6) 和  $S_3$  (pH=7) 中(图 1.3)。在溶液  $S_1$  中,由于阳离子量足够大,使得原来可以成为阴离子的而不能离子化(设原溶液 pH=5.5),所以该分子的净电荷为 +5;在溶液  $S_2$  中,只有原来可成为阳离子的那些碱性更强的氨基酸带正电荷(例如氨基酸 2、5 和 7),而部分酸性较弱的氨基酸也开始解离带负电



(如 8), 所以净电荷为零; 在溶液  $S_3$  中, 由于溶液 pH 更高, 可成为阳离子的氨基酸数目更为减少(如只有氨基酸 5 和 7 带正电荷), 所以该多肽的净电荷为 -2。

|   |          |
|---|----------|
| - ① - ② - ③ - ④ - ⑤ - ⑥ - ⑦ - ⑧ - ⑨ - + | pH = 5.5 |
| + + - 0 + - + 0 +                       |          |
| - ① - ② - ③ - ④ - ⑤ - ⑥ - ⑦ - ⑧ - ⑨ - + | pH = 5   |
| + + 0 0 + 0 + 0 +                       |          |
| - ① - ② - ③ - ④ - ⑤ - ⑥ - ⑦ - ⑧ - ⑨ - + | pH = 6   |
| 0 + - 0 + - + - 0                       |          |
| - ① - ② - ③ - ④ - ⑤ - ⑥ - ⑦ - ⑧ - ⑨ - + | pH = 7   |
| 0 0 - - + - + - 0                       |          |

图 1.3 多肽的净电荷与溶液 pH 的关系

该多肽在上述不同 pH 溶液中进行电泳, 可向阴极迁移(在  $S_1$ )、向阳极迁移(在  $S_3$ )或停留在原点(在  $S_2$ )。使蛋白质净电荷为零的溶液 pH 值称为等电点或等离子点。显然, 在等电点(记作  $pH_i$ )时, 蛋白质的电泳迁移率为零。

因此, 在电泳前, 可调节溶液 pH, 以使样本中不同的蛋白质都同时带正电或负电。这样, 电泳时, 样本就可放在靠近阳极或阴极的凝胶端。在直流电场作用下, 所有蛋白质都可向同一方向泳动。

——溶液浓度和组成的影响。溶液中存在中性盐, 可影响多肽链侧链的离子化水平, 从而可影响蛋白质的等电点。在低浓度, 可增加多数蛋白质的溶解度, 从而增加蛋白质分子可离解基团的离子容量; 在高浓度, 蛋白质溶解度降低, 甚至还可出现沉淀。

溶液中若有  $Ca^{++}$  和  $Mg^{++}$  等阳离子或有  $Cl^-$  和  $PO_4^{3-}$  等阴离子存在, 蛋白质还可与它们结合, 从而使蛋白质净电荷发生变化。

(2) 支持介质条件。大多数蛋白质电泳是在惰性介质中进行的。现在利用的介质(以凝胶形式利用)有四类:

——醋酸纤维素。蛋白质迁移基本上是在凝胶表面的缓冲膜(buffer film)上进行的, 所以, 该介质对电泳迁移率无影响。