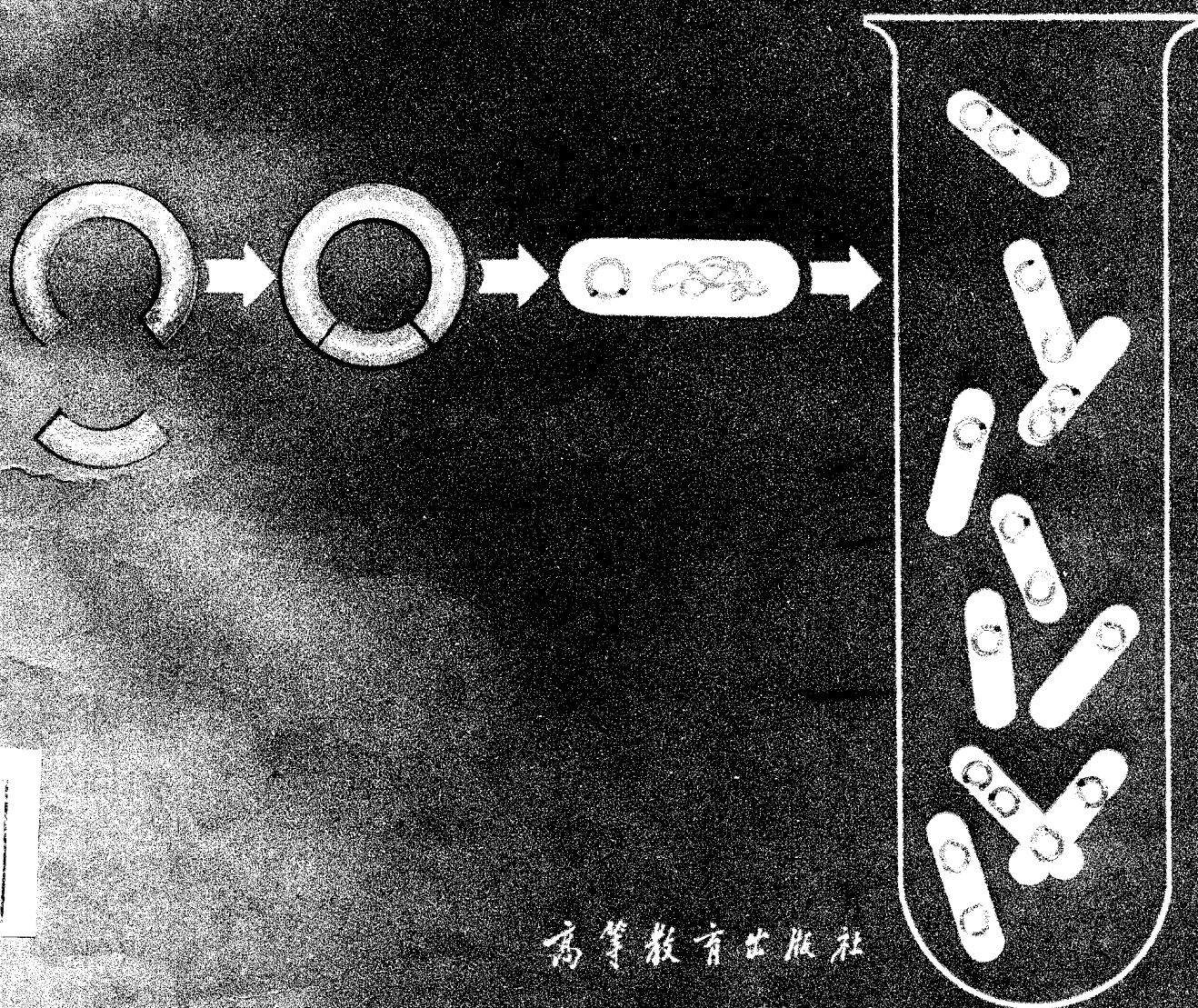


高等学校试用教材

遗传学实验方法 和技术

北京大学生物系遗传学教研室编



高等教育出版社

内 容 提 要

本实验教材包括细胞遗传、生化遗传、微生物遗传、分子遗传、免疫遗传和数量遗传等方面的52个实验技术。基本上适应了不同水平的需要,也反映了学科发展的趋势。

本书是综合性大学遗传学专业及有关专业高年级学生和研究生的教材,也可供师范院校、医学院校、农林院校有关专业师生和科研人员参考。

责任编辑 杨松涛

高等学校试用教材

遗传学实验方法和技术

北京大学生物系遗传学教研室 编

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷一厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 19.75 字数 453,000

1983年11月第1版 1984年5月第1次印刷

印数 00,001—10,000

书号 13010·0924 定价: 1.90 元

前 言

本实验教材是为已学过普通遗传学实验和普通生物化学实验的遗传学专业及有关专业的本科生和研究生而编写的,包括细胞遗传、生化遗传、微生物遗传、分子遗传、免疫遗传和数量遗传学等方面的基本实验技术;为了反映发展趋势,适应不同水平的需要,我们还编写了一些难度较大的分子遗传学实验技术。通过这些实验的学习,可以加强高年级大学生和研究生在遗传学基本实验技能方面的训练,提高他们分析问题和解决问题的能力,为进入遗传学的研究领域作好技术准备。

遗传学是一门历史悠久的基础学科和发展迅速的前沿学科,目前正处于鼎盛时期,这主要归功于数理化的渗透和先进的实验技术的应用。遗传学是一门实践性很强的学科,每个从事遗传学科研和教学的人员,在掌握了基本的经典遗传学技术基础上,了解和学习一些新的遗传学实验方法是十分必要和有益的。

遗传和变异是最基本的生命特征之一。遗传学是一个十分广泛的知识领域,它的理论渗透生物学各门学科,它的实验方法涉及各个部门。现代遗传学是从分子、细胞、个体、群体和生态系统各个水平进行研究并探索遗传的本质。因此,我们在编写教材时注意到不同需要,安排了不同水平和不同领域的实验方法。

本教材的所有实验都是经过教学实践或在科研工作中经常使用,并由有实践经验的教师在总结经验基础上编写而成的。全书包括 52 个实验。考虑到各院校的客观条件,所编实验有大有小,有单一的和综合的;要求设备有精密一些的也有一般的。某些实验中列出几种方法和实验材料,读者可根据自己的设备条件和专业不同特点,选择使用。

参加本书编写工作的,有北京大学生物系遗传学教研室吴鹤龄、林锦湖、尚克刚、陈月仙、陈永南、戴灼华、王素云、马继霞、李薇锦;细胞生物学教研室潘惟钧;生化教研室谭慎操、马树义。全书的统一编撰是在吴鹤龄副教授主持下,由林锦湖担任。教研室的其它同志、历届的大学生和研究生参加了其中部分实验工作,并提出了宝贵的建议。高等教育出版社杨松涛为本书责任编辑,在编写过程中给予我们不少帮助,编者在此表示感谢。

由于时间仓促和我们实践不足,某些常用基本实验技术如细胞杂交、 cot 值的测定等未曾编入;另有一些技术如酶切图谱的制作,考虑到目前国产试剂的困难,也没有编写有关实验。有些实验设计和编写可能有不妥和错误,请读者批评指正。

编 者

1983 年 9 月

目 录

实验一	细菌结合和基因定位	1
实验二	基因互补测验	4
实验三	基因精细结构定位(缺失定位)	6
实验四	化学诱变剂的细菌检测法(Ames 法)	9
实验五	转导实验之一——枯草杆菌噬菌体普遍性转导	14
实验六	转导实验之二——大肠杆菌 λ 噬菌体局限性转导	17
实验七	地衣芽孢杆菌染色体 DNA 的提取	20
实验八	细菌质粒 DNA 的提取	22
	〈附〉琼脂糖凝胶电泳检查 DNA	30
实验九	转化实验之一——枯草杆菌感受态细胞转化	32
实验十	转化实验之二——大肠杆菌转化	35
实验十一	转化实验之三——枯草杆菌原生质球转化	37
实验十二	DNA 体外重组技术——地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因的无性繁殖	40
	* * * * *	
实验十三	细胞核的分离	46
实验十四	染色质的分离	53
	〈附 1〉从细胞核分离染色质的方法	56
	〈附 2〉高等真核生物染色质分离的参考资料	60
实验十五	染色质的组成成份分析	64
	〈附 1〉Folin 酚法测定蛋白质含量	67
	〈附 2〉二苯胺法测定 DNA 含量	68
	〈附 3〉地衣酚法测定 RNA 含量	70
实验十六	染色质组蛋白的分离和乙酸-脲电泳分析	71
实验十七	高盐-脲法分离染色质非组蛋白(羟基磷灰石柱层析)	75
实验十八	酚溶性染色质非组蛋白制备和 SDS 电泳	78
实验十九	染色质非组蛋白的双向电泳分析(IF-SDS-PAGE)	82
实验二十	高迁移率非组蛋白(HMG)的分离和电泳分析	86
	* * * * *	
实验二十一	四膜虫 rRNA 基因(rDNA)的选择性提取与纯化	89
实验二十二	DNA 分子杂交(Southern 法)	95
实验二十三	核外基因组——线粒体 DNA 的制备	108

	〈附〉紫外吸收法测定核酸含量·····	113
实验二十四	染色质核小体的电镜制片方法·····	115
实验二十五	核酸的电子显微镜技术——DNA的碱性蛋白膜展层方法·····	117
实验二十六	细胞核和染色质的体外转录活性测定·····	123
实验二十七	鸭卵清蛋白 mRNA 的分离和纯化·····	127
实验二十八	用麦胚无细胞体系测定卵清蛋白 mRNA 的翻译活性·····	130
	〈附〉兔网织红细胞溶胶体外翻译体系 (RLL)·····	134
	* * * * *	
实验二十九	免疫沉淀技术纯化免疫 mRNA·····	135
实验三十	免疫 mRNA 的体外翻译体系——细胞学方法检测抗体形成·····	139
	〈附〉溶血空斑法检测免疫 RNA 或免疫 mRNA·····	144
	* * * * *	
实验三十一	乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	147
	〈附 1〉LDH 同工酶淀粉凝胶电泳·····	152
	〈附 2〉LDH 同工酶醋酸纤维薄膜电泳·····	154
	〈附 3〉LDH 同工酶琼脂糖凝胶电泳·····	155
实验三十二	LDH 同工酶亚带的电泳分析·····	156
实验三十三	LDH 同工酶的亲和层析·····	161
	* * * * *	
实验三十四	骨髓细胞染色体的制备与观察(小鼠与鸡)·····	167
实验三十五	外周血淋巴细胞的培养与染色体的制备(人类与两栖类)·····	170
实验三十六	从组培细胞中制备染色体(恶性肿瘤细胞的核型分析)·····	175
实验三十七	结构性异染质与功能性异染质(C带技术与X染色质的显示)·····	177
实验三十八	核仁组成区的显示及其多态现象·····	180
实验三十九	染色体的G带核型·····	182
实验四十	姐妹染色单体区分着色和姐妹染色单体交换(SCD和SCE)·····	186
实验四十一	染色体的复制顺序·····	188
实验四十二	小鼠减数分裂标本的制备与观察·····	190
实验四十三	用标记有丝分裂细胞追踪法测定细胞周期及各时相的时长·····	191
实验四十四	果蝇唾腺染色体与神经节染色体的比较观察·····	197
实验四十五	摇蚊多线染色体的转录实验之一——摇蚊多线染色体的 斑带和“泡”(松散区)·····	206
实验四十六	摇蚊多线染色体的转录实验之二——“泡”(松散区)的转录活性·····	210
实验四十七	果蝇(<i>D. melanogaster</i>)基因连锁关系的测验与基因定位·····	212
	* * * * *	
实验四十八	遗传毒理技术之一——果蝇X染色体隐性致死突变的检出·····	217

实验四十九 遗传毒理实验技术之二——用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核测定法检测染色体畸变	222
---	-----

* * * * *

实验五十 环境因素对果蝇(<i>D.melanogaster</i>)发生量的影响——基因型与环境的互作分析	224
--	-----

实验五十一 数量性状的遗传参数——遗传力的估计	228
-------------------------	-----

实验五十二 果蝇某数量性状对于选择的反应	234
----------------------	-----

* * * * *

附录

一 器物和溶液的灭菌	241
二 微生物实验的常用器材和培养基	243
三 组织和细胞培养的几种合成培养基	249
四 组织和细胞培养的常用溶液	253
五 常用的限制性核酸内切酶的特性	256
六 常用的质粒及其衍生物(载体分子)的一些性质	258
七 聚丙烯酰胺凝胶电泳的常用系统	260
(一) 试剂的物化性质	260
(二) 凝胶系统	261
(三) 分离区带的染色法	270
(四) 常用参考蛋白质分子量	271
八 常用的同工酶的检验法	272
九 常用缓冲液的配制方法	275
十 硫酸铵饱和度的常用表	281
十一 某些生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数	282
十二 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算	283
十三 层析法常用数据表	284
十四 氨基酸的一些物理常数	291
十五 核苷、核苷酸及其衍生物的一些物理常数	293
十六 实验室中常用酸碱浓度和比重的关系	299
十七 一些常用化合物的溶解度(20°C)	301
十八 某些有机溶剂的主要物理常数	302
十九 冷却剂和干燥剂	302
二十 化学试剂的分级和保存方法	304
二十一 一些常用单位	305

实验一 细菌结合和基因定位

J. Lederberg 和 E. L. Tatum 在大肠杆菌(*Escherichia coli*, 简称 *E. coli*) K₁₂ 菌株中发现一种相当于高等生物雄性配子的质粒, 称为性因子或致育因子 (fertility factor, 简称 F 因子)。有 F 因子的菌株为 F⁺, 没有 F 因子的菌株为 F⁻。

F 因子有三个区域组成, 第一段是控制自主复制区段; 第二段是控制细胞间传递感染的 *tra* 基因区段; 第三段是重组区段。F 因子重组区段的 IS (insertion sequence) 有时可以将 F 因子插入在染色体的一定位置上, 成为 Hfr (high frequency recombination) 菌株。Hfr 菌株和 F⁻ 菌株结合后, Hfr 菌株将宿主染色体基因大量地移入 F⁻ 缺陷型菌株中, 发生基因重组。Hfr 菌株重组频率可以高于 F⁺ 菌株 1,000 倍以上。但是, 宿主染色体上各个基因转移数量不同, 重组频率也不同。根据重组频率就可以定出 *E. coli* 环状染色体上各个基因的位置。通过本实验, 可以掌握微生物基因的一种定位方法, 并有助于理解在染色体上基因呈直线排列的原理。

原 理

F 因子一般以游离状态存在于染色体之外, 也可能整合在宿主染色体上(这种质粒被称为附加体)。由于 F 因子整合在染色体上的位置不同, 可以形成不同的 Hfr 品系菌株。当 Hfr 菌株和 F⁻ 菌株结合时, Hfr 菌株表面的性伞毛, 形成特殊的“结合管”。Hfr 菌株的双链 DNA 中的一条链以直线方向通过“接合管”向 F⁻ 菌株转移, 此时 Hfr 菌株双链环状 DNA 进行单向复制。由于复制时间较缓慢, 即使在稳定条件下, 若把 *E. coli* K₁₂ 菌株染色体上的基因全部移入 F⁻ 缺陷型菌株中, 需将菌株结合过程维持 100 分钟。可是, 由于转移过程中受各种条件的影响, 结合过程有可能中断。Hfr 菌株转移时, F 因子总是在染色体末端, 因此 Hfr 菌株转移性因子频率是很低的。靠近转移起点的染色体基因进入 F⁻ 缺陷型菌株机率多, 重组频率高; 远离转移起点的基因进入 F⁻ 缺陷型菌株机率少, 重组频率低。我们可以根据 F⁻ 缺陷型菌株中重组子多少, 测定各个基因的位置。

据以上原理, 实验中必须选择靠近转移起点的基因为选择性标记, 这些基因是 100 % 发生重组的。然后在不同培养基中逐个地选择 Hfr 菌株其它的基因(非选择性标记)。为了证实 F⁻ 缺陷型菌株通过 Hfr 菌株的转移后产生的菌落均是重组子, 实验中还必须将 F⁻ 缺陷型菌株的链霉素抗性标记作为反选择性标记, 这样对链霉素敏感的 Hfr 菌株就从重组子中排除了。为了使 Hfr 菌株的基因出现在 F⁻ 缺陷型菌株中的频率高, 反选择性标记应在染色体后端。为了使 Hfr 菌株有较高的结合频率, 一般 F⁻ 菌株是过量的, 将一个 Hfr 菌株细胞配 10—20 个 F⁻ 菌株细胞。

器材和试剂

一、器材

灭菌牙签,其它的器材见附录二。

二、试剂和培养基*

1. 生理盐水(0.85 %NaCl);
2. 10×A缓冲液;
3. L-肉汤液体培养基;
4. 基本培养基;
5. 不同基因的选择性培养基(表1-1)。

表 1-1 选择性培养基配制表

编号	选择性标记	碳 源	基 本 培 养 基 (A) 中 补 充 物 质								
			str	rif	arg	ilv	met	leu	ade	trp	his
A	<i>met leu str</i>	葡萄糖	+	—	+	+	—	—	+	+	+
B	<i>(met leu str) arg</i>	葡萄糖	+	—	—	+	—	—	+	+	+
C	<i>(met leu str) trp</i>	葡萄糖	+	—	+	+	—	—	+	—	+
D	<i>(met leu str) his</i>	葡萄糖	+	—	+	+	—	—	+	+	—
E	<i>(met leu str) lac</i>	乳 糖	+	—	+	+	—	—	+	+	+
F	<i>(met leu str) gal</i>	半乳糖	+	—	+	+	—	—	+	+	+
G	<i>(met leu str) rif</i>	葡萄糖	+	+	+	+	—	—	+	+	+

A组平板 8 个, 其余各组平板各 2 个。

三、实验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株:

受体菌: FD 1004 F^- *leu pur E try his met A ilv arg thi ara lac Y xyl mtl gal*
 T_6^+ str_r rif^r

供体菌: CSH 60 Hfr sup *strs*

实 验 步 骤

第一天:取斜面分别接一环供体菌和受体菌于盛有 5 毫升 L-肉汤的 2 个三角瓶内。置 37°C 培养 10—12 小时。

第二天:清晨从 2 瓶菌液中各取 1 毫升,分别加入 2 个盛有 5 毫升 L-肉汤的三角瓶内,置 37°C 培养 2—3 小时。吸 0.5 毫升供体菌于盛有 4.5 毫升 L-肉汤的 250 毫升三角瓶内,置 37°C 摇床上摇 100 分钟,然后将菌液用生理盐水稀释 10 倍 (即成 10^{-1} 菌液)。取接合 100 分钟

* 微生物的常用培养基的具体配制,见附录二,下同。

后的原菌液 0.1 毫升； 10^{-1} 菌液 0.1 毫升涂布在 4 个选择性培养基 [A] 平板上。另取 4 个选择性培养基 [A] 平板作为对照组，其中 2 个 [A] 平板涂布供体菌 0.1 毫升，另外 2 个 [A] 平板涂布受体菌 0.1 毫升。将以上 8 个 [A] 平板置 37°C 培养 48 小时。用白纸按下面图样划 100 个小格，将圆片贴在 [B]、[C]、[D]、[E]、[F]、[G] 各个选择性培养基平板的底部 (图 1-1)。

第四天：观察和计算选择性培养基 [A] 平板上杂交组和对照组的菌落生长状况，然后在杂交组选择性培养基 [A] 平板上用灭菌牙签随机挑选 100 个菌落对号点种在 [B]、[C]、[D]、[E]、[F]、[G] 各个选择性培养基平板的 100 个小格中。将所有的平板置 37°C 培养 48 小时。

第六天：将各组平板上的菌落生长情况记录。计算和比较各个标记的重组频率，绘制这些基因在染色体上排列的顺序图 (表 1-2)。

$$\text{重组频率}(\%) = \frac{\text{每组选择性培养基平板上菌落数}}{\text{点种总菌落数}} \times 100\%$$

表 1-2 每组选择性培养基菌落生长记录表

菌落号	[B] arg	[C] trp	[D] his	[E] lac	[F] gal	[G] rif
1						
2						
3						
4						
5						
⋮						
⋮						
100						
总 数						

生长：+ 不生长：—

参 考 文 献

Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. P. 93—98, Cold Spring Harbor Laboratory.

(陈月仙)

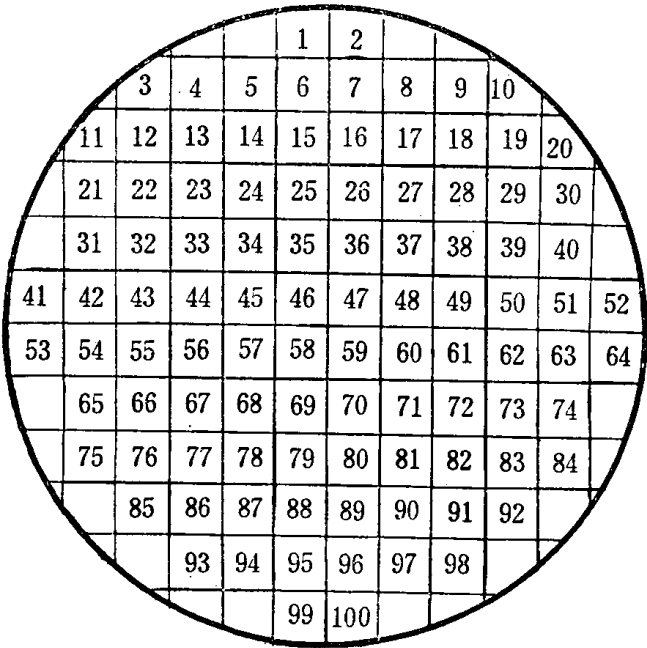


图 1-1 100 格图样

实验二 基因互补测验

一个细胞必须具有全部活性物质才呈现一定的表型,这种遗传特性是由基因决定的。基因是一个功能单位,因此深入了解生物性状表达过程和哪些基因的功能有关是必要的。这个问题是不能通过DNA分子之间的重组解决的,而基因功能等位性互补测验可以给予回答。

功能等位性互补即一个染色体所不能编码的蛋白质由另一个染色体上的基因产物所提供,表现出一个机体的完整性。凡是能够互补,说明它们是属于不同的基因;不能互补,则属于同一个基因。通过本实验可以加深理解基因的概念。

原 理

任何两个表型效应相同的突变型,凡是能够互补说明它们属于不同基因。大肠杆菌 lacZ^- 突变型、 lacY^- 突变型、 lacA^- 突变型,它们的表型效应均属于 lac^- 突变。将这三种 lac^- 突变型彼此进行功能等位性互补测验, Z^- 和 Y^- 所有突变型互补, Z^- 和 A^- 所有突变型互补, Y^- 和 A^- 所有突变型互补。测定结果表明 Z 、 Y 、 A 是大肠杆菌乳糖操纵子三个不同的结构基因。可是 Z^- 突变型中 Z_1^- 和 Z_4^- 突变型不能互补,所以 Z_1 和 Z_4 属于同一个结构基因。

大肠杆菌乳糖操纵子结构基因之间的互补受许多因素的影响:(a) lac 发酵基因发生极性突变,这些突变型同 Z^- 及 Y^- 突变型都不能互补。(b) 调节基因突变 i^s 的表型为超阻遏突变型,这种突变型也不能同 Z^- 及 Y^- 突变型互补。(c) 某些 Z^- 突变型能和另一些 Z^- 突变型发生基因内互补。上述几种情况,增加了基因间互补实验的复杂性。

由于重组两个突变型也可产生原养型,因此基因互补必须排除重组的发生。本实验用的是 rec^- 缺陷型作为受体菌,同时降低菌液的浓度,减少重组的发生。

器材和试剂

一、器材

见附录二。

二、试剂和培养基

1. 灭菌生理盐水;
2. $10\times\text{A}$ 缓冲液;
3. L-肉汤液体培养基;
4. 基本培养基;
5. 乳糖 EMB 培养基。

三、实验材料

大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株;

受体菌:FD 1007 F^- *trp lacZ thi strA recA*

FD 1008 F^- *lacY thi strA recA*

供体菌:CSH 40 F' *lacY proA⁺B⁺/Δ(lac pro)thi*

CSH 14 F' *lacZ proA⁺B⁺/Δ(lac pro)thi supE*

实 验 步 骤

第一天:分别接一环实验菌株于盛有 5 毫升 L-肉汤的 4 个三角瓶内,将 4 瓶菌液置 30°C 培养 12 至 14 小时。

第二天:培养后的供体菌和受体菌各取 1 毫升以 1:1 混合于另一个灭菌三角瓶内,置 37°C 恒温水浴中轻摇 30 分钟(表 2-1)。

表 2-1 供体菌和受体菌混合比例

受 体 菌 \ 供 体 菌	CSH 40	CSH 14
FD 1007	1 : 1	1 : 1
FD 1008	1 : 1	1 : 1

将混合物作 10 倍递增稀释至 10^{-5} 。取混合物 (10^{-4} 、 10^{-5}) 0.1 毫升涂布在 4 个基本培养基平板上,置 37°C 培养 48 小时。

将供体菌和受体菌的原菌液分别作 10 倍递增稀释至 10^{-4} 。各吸 0.1 毫升 (10^{-4}) 的受体菌和供体菌的菌液各涂布在 2 个基本培养基平板上,这 4 个对照组平板置 37°C 培养 48 小时。

第四天:观察实验组和对照组平板上菌落生长情况,计算菌落数(表 2-2)。

表 2-2 菌落生长记录表

菌落数 \ 组 别	FD1007:CSH40	FD1007:CSH14	FD1008:CSH40	FD1008:CSH14	对 照 组
平 板 数					
1					
2					
3					
4					
总 数					

在实验组平板上,任挑 2 个菌落在乳糖 EMB 培养基上作划线分离,将 EMB 平板置 37°C 培养 24 小时。

第五天:观察乳糖 EMB 培养基上所长出的单菌落是否有分离现象。分析出现分离现象的原因。

参 考 文 献

Miller, J. H. 1972, Experiments in Molecular Genetics, P.153—158, Cold Spring Harbor Laboratory.
(陈月仙)

实验三 基因精细结构定位(缺失定位)

每个基因在染色体上有一定的座位,每个座位上的不同位点发生突变而形成同一功能不同突变体,这些突变位点称为突变子(muton)。基因内也有可能发生重组的重组子(recon)。换言之,基因内存在着精细结构。分析基因内精细结构的方法甚多,缺失定位是一种简易、快速、准确性较高的方法。但这方法必须有一套缺失菌株,使应用该法受到很大的限制。

原 理

基因发生缺失突变,就意味着该基因不在染色体上,所以缺失突变体不能回复突变,也不可能同等位基因发生重组。

在一个缺失杂合子中,如果某一个点突变的位置恰恰是在同源染色体缺失的范围内,那么就不可能得到原养型重组子。相反,点突变的位置在缺失范围之外,就得到原养型重组子。

本实验采用一套对链霉素抗性的,而且已知在染色体 *lacZ* 基因内不同位置上已发生了无义点突变的 F^- 菌株和另一套对链霉素敏感的,在 F' 上带有 *lac pro* 染色体片断,而且其中 *lacZ* 基因上又发生了不同长度缺失的菌株。在含有链霉素和色氨酸乳糖培养基上用滴加杂交技术,就可以得到重组菌落。根据实验结果,并对照附图就很方便地将这二套菌株 *lacZ* 基因中发生点突变或缺失位置进行定位(图 3-1)(表 3-1)。

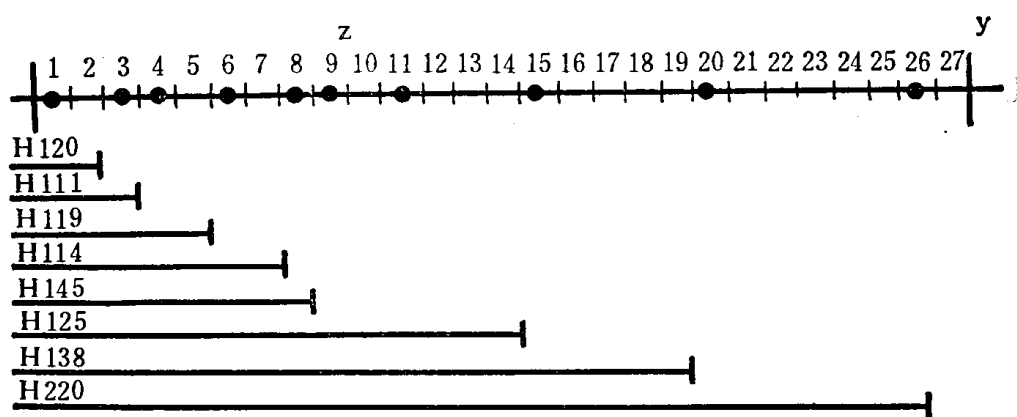


图 3-1 *lacZ* 基因点突变和缺失部位图

表 3-1 点突变发生部位和缺失发生部位表

菌 株	点 突 变 发 生 部 位 (见图 3-1)	菌 株	缺 失 发 生 部 位 (见图 3-1)
CSH-1	1	CSH-12	H 120
CSH-2	3	CSH-13	H 111
CSH-3	4	CSH-14	H 119
CSH-4	6	CSH-15	H 114
CSH-5	8	CSH-16	H 145
CSH-6	9	CSH-17	H 125
CSH-7	11	CSH-18	H 138
CSH-8	15	CSH-19	H 220
CSH-9	20		
CSH-10	26		
CSH-11	未精确定位		

器材和试剂

一、器材

见附录二。

二、培养基

1. L-肉汤液体培养基。
2. 乳糖色氨酸链霉素基本固体培养基。

三、实验材料

大肠杆菌(*E. coli*)菌株:

受体菌: CSH-1, CSH-2, CSH-3, CSH-4, CSH-5, CSH-6, CSH-7, CSH-8, CSH-9, CSH-10, CSH-11。

$F^{-}trp\ lacZ\ str^r A\ thi$, 在染色体 *lacZ* 基因的不同位点上存在无义突变。

供体菌: CSH-12, CSH-13, CSH-14, CSH-15, CSH-16, CSH-17, CSH-18, CSH-19。

$F' lacZ\ proA^+ B^+ / \Delta(lac\ pro)sup\ E\ thi$

F' 的 *lacZ* 基因内具有不同长度的缺失。

实验步骤

第一天: 分别接种受体菌和供体菌于盛有 5 毫升 L-肉汤的试管中, 将 20 支试管的菌液置 37°C 培养 14 小时。

第二天, 取 12 个已在 37°C 放置过夜的含有乳糖色氨酸链霉素和维生素 B₁ 的基本培养基平板, 在这些平板上进行滴加杂交试验。先将每个平板按附图分成 9 格, 第 1 格至第 8 格各标上供体菌的符号 12、13、14……19。在第 9 格标上受体菌的符号 1 或 2 或 3……或 11, 第 9

格作为受体菌的对照(图 3-2)。其中 1 个平板第 9 格是空白,该平板作为供体菌的对照。

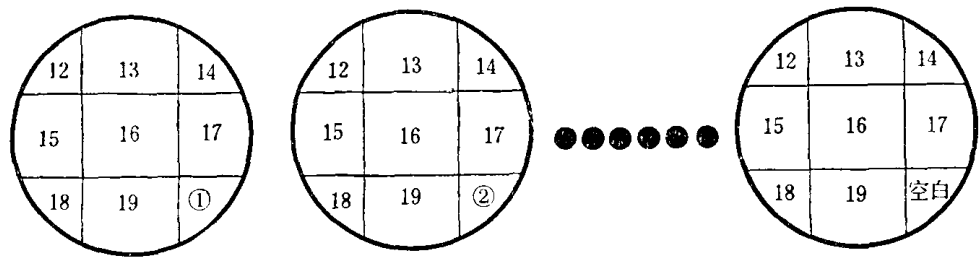


图 3-2 滴加杂交试验图

用接种环取一滴受体菌CSH-1菌液,滴加在第 9 格标上①的平板的 9 个方格上,待干。接着再用接种环取一滴受体菌 CSH-2 菌液,滴加在第 9 格标以②的平板的 9 个方格上,直到 CSH-11。

用接种环在原先已经滴过受体菌的地方再滴上供体菌的菌液。但是,滴加杂交一定按照每格供体菌的符号加。每加 1 次接种环必须重新用火焰灭菌。注意:第 9 格不加任何供体菌的菌液。

第 9 格标以“空白”的平板,只按照供体菌的符号加供体菌的菌液,不加任何受体菌的菌液。

待以上各平板表面滴加的菌液被吸乾后,置 37℃培养 48 小时。

第四天:观察并记录各个平板菌落生长情况,绘制 *lacZ* 基因内点突变和缺失的基因图(表 3-2)。

表 3-2 滴加杂交结果记录表

受体菌 供体菌												
	CSH-1	CSH-2	CSH-3	CSH-4	CSH-5	CSH-6	CSH-7	CSH-8	CSH-9	CSH-10	CSH-11	对 照
CSH-12												
CSH-13												
CSH-14												
CSH-15												
CSH-16												
CSH-17												
CSH-18												
CSH-19												

参 考 文 献

Miller, J. H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, p. 159—165, Cold Spring Harbor Laboratory.
(陈月仙)

实验四 化学诱变剂的细菌检测法(Ames法)

近几年来,对食品添加剂、药物、环境污染中的化学物质的诱变性进行检测的主要方法之一,是采用鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)-微粒体系统(简称Ames法)。由于化学物质对微生物的诱变作用间接地反映了它对哺乳动物有潜在致癌的可能性,同时这种方法简便、快速,准确性高达百分之九十以上,所以日益引起人们的重视,现已成为国际上公认的化学诱变检测常规方法。该方法还可用来探索化学物质导致遗传物质突变的分子基础,为研究遗传毒理、基因突变提供了一种有效手段*。

原 理

1975年美国Ames等人用紫外线照射诱导鼠伤寒沙门氏菌LT₂菌株,筛选出若干不同的组氨酸营养缺陷突变菌株为测试标准菌株。它们除了组氨酸(histidine)和生物素(biotin)缺陷以外,还有紫外线切割修复系统(excision repair)缺失突变(Δ UVrB)和脂多糖屏障(lipopolysaccharide barrier)突变,形成细菌表面粗糙突变体(rough face, 简称rfa)。TA 98和TA 100菌株还带有抗氨苄青霉素(ampicillin) R因子。这些突变特性和R因子可作为鉴定菌株生物学性状的标记。

组氨酸营养缺陷突变菌株在不含组氨酸和生物素基本培养基中是不能生存的。当待测化学物质加入培养基中,组氨酸营养缺陷突变菌株发生了回复突变,在含有生物素基本培养基平板内长出菌落。若诱发回复突变菌落数超过自发回复菌落数一倍以上为阳性反应,即待测化学物质是一种化学诱变剂。

许多化学物质体外检测是阴性反应,它是非诱变剂。但是经过体内肝脏某些酶的作用可以转变为诱变剂。于是Ames等人在检测化学物质过程中,加入由9,000 × g高速离心处理后获得的大鼠肝脏提取液(简称为S-9),建立了鼠伤寒沙门氏菌-微粒体系统,大大地提高了检测的准确性(表4-1)。

表 4-1 不加S-9和加S-9化学物质的诱变性

待测化学物质	每皿含量 (微克)	不 加 S-9		加 S-9	
		诱变性	检 测 菌 株	诱变性	检 测 菌 株
灭 菌 丹	100	—	TA 98 TA 100	+	TA 98 TA 100
黄曲霉毒素 B ₁	0.3	—	TA 98 TA 100	+	TA 98 TA 100

* 在实验四十八和四十九,将介绍二种检测化学诱变剂的细胞遗传学方法。

器材和试剂

一、器材

灭菌注射器(1毫升),剪刀;解剖刀;组织匀浆器;滴瓶;解剖盘;圆滤纸片(直径4毫米),以上器材均灭菌。其它的器材见附录二。

二、试剂和培养基

1. 底层培养基:

(1) 磷酸盐贮备液(Vogel 50 X)。

(2) 2%琼脂(含2%葡萄糖)培养基。

(3) 0.5 *mM* 生物素: 称取 12.2 毫克生物素,加蒸馏水溶解,定容至 100 毫升,高压灭菌 8 磅 20 分钟。

(4) 使用时底层培养基混合比例:

Vogel 50 X	4 毫升
0.5 <i>mM</i> 生物素	0.2 毫升
2%琼脂(含2%葡萄糖)	100 毫升

2. 上层半固体培养基:

(1) 0.8%琼脂: 称取 0.8 克琼脂,0.5 克氯化钠,加蒸馏水 100 毫升。高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(2) 0.5 *mM* 组氨酸: 称取 9.6 毫克组氨酸,加水定容至 100 毫升。高压灭菌 8 磅 20 分钟。

(3) 0.5 *mM* 生物素。

(4) 使用时,上层半固体培养基混合比例:

0.5 <i>mM</i> 组氨酸	2.5 毫升
0.5 <i>mM</i> 生物素	10 毫升
0.8%琼脂	100 毫升

3. L-肉汤液体培养基

4. L-肉汤固体培养基

5. 10 *mM* 组氨酸: 称取 L-组氨酸 20 毫克,加蒸馏水溶解,定容至 10 毫升,高压灭菌 8 磅 20 分钟。

6. 0.15 *M* 氯化钾。高压灭菌 15 磅 15 分钟。

7. 大鼠肝脏酶系提取液的制备(S-9 提取液):

成年雄性大白鼠(体重 100—150 克)三只,每公斤体重注入多氯联苯油溶液 2.5 毫升(沿着腹股沟向腹腔注射)。注射后第五天杀鼠取肝脏(杀鼠前禁食 24 小时)。

将大鼠用重棒打晕,浸泡在消毒水中数分钟,断头放血,暴露胸腔,从肝门静脉处注入冰冷的 0.15 *M* KCl 溶液洗涤肝脏 2—3 次。大鼠肝称重后,剪碎,每克肝(湿重)加冰冷的 0.15 *M* KCl 溶液 3 毫升。用组织捣碎机将肝脏制成匀浆。匀浆液经 $9,000 \times g$ 离心 10 分钟,取上清

液,分装小管(每管 1—2 毫升),抽样菌检,低温(-20°C)保存备用。

以上操作要求无菌条件,并在 4°C 下进行。

8. 大鼠肝脏提取液(S-9)混合液的制备:

(1) 盐溶液:称取 3.8 克氯化镁、12.37 克氯化钾,蒸馏水至 100 毫升,高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(2) 0.2 M 磷酸缓冲液(pH 7.4),高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(3) 0.025 M 辅酶 II(NADP):称取 133 毫克国产辅酶 II(氧化型),用无菌水稀释至 5 毫升。如果用进口的辅酶 II,则称取 93 毫克。

(4) 0.05 M 葡萄糖-6-磷酸:称取 165 毫克葡萄糖-6-磷酸钠盐,用无菌水稀释至 5 毫升。

(5) S-9 混合液的混合比例:

S-9 提取液	10 毫升
盐溶液	2 毫升
0.2 M 磷酸缓冲液(pH 7.4)	50 毫升
0.025 M 辅酶 II(NADP)	16 毫升
0.05 M 葡萄糖-6-磷酸	10 毫升
无菌水加至	100 毫升

混合液临用时现配,置冰浴中,实验后将多余溶液弃去。

9. 0.85%灭菌生理盐水

10. 50 微克/毫升亚硝基胍(NTG)(用无菌水配制)

11. 1 毫克/毫升结晶紫(用无菌水配制)

12. 8 毫克/毫升氨苄青霉素(用无菌的 0.02 N NaOH 水溶液配制)

13. 200 毫克/毫升 6-氯联苯油溶液(用玉米油配制)

三、实验材料

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)菌株:

TA 98: 移码突变(*rfa* $\Delta UVrB$ *hisD3052* AP^r)

TA 100: 碱基置换(*rfa* $\Delta UVrB$ *hisG* 46 AP^r)

实验步骤

一、鉴定菌株的生物学性状

1. 组氨酸营养缺陷:

(1) 用接种环分别接种 TA 98 或 TA 100 菌株于盛有 5 毫升 L-肉汤的三角瓶中, 37°C 培养 14—16 小时,浓度达 10^7 — 10^8 /毫升。

(2) 将培养后的菌液倒入离心管, 3,500 rpm 离心 10 分钟,弃上清液,沉淀菌块打匀后用无菌生理盐水离心洗涤二次,最后将沉淀菌块打匀并加 5 毫升灭菌生理盐水制成悬浮的菌液。

(3) 取若干支试管,每支试管分装 5 毫升已熔化的上层半固体培养基,将试管在 50°C 水