

中国科学院遗传研究所

研究工作年報

《研究工作年報》編輯委員會

1987-1988

(第9年出版)

科學出版社

1989

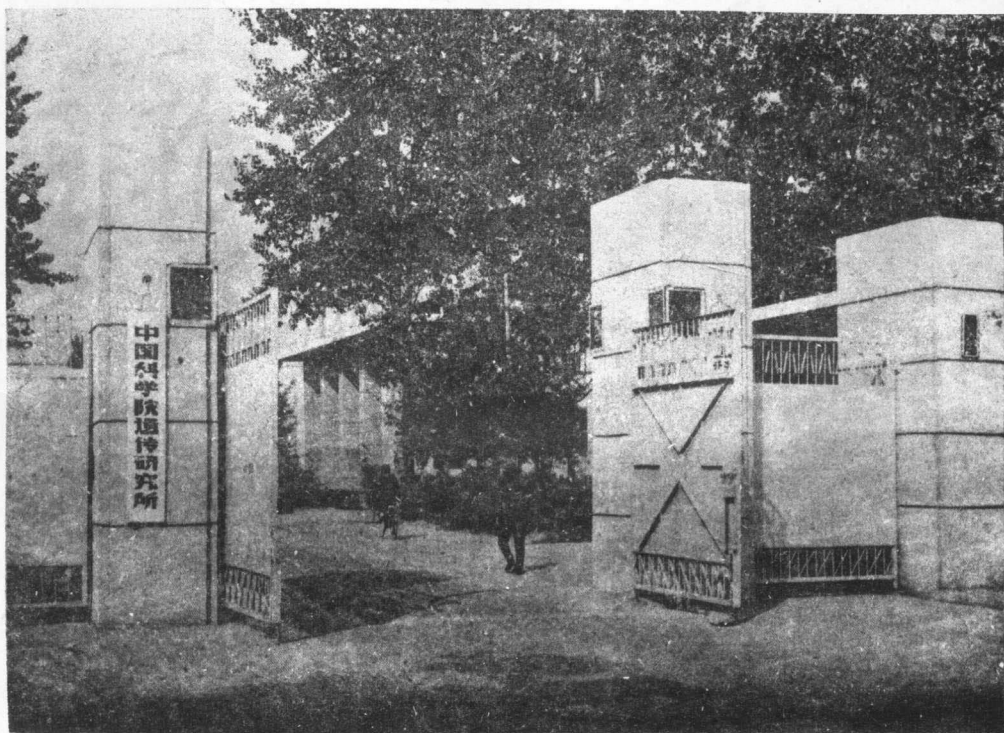
22

4

中国科学院遗传研究所

研究工作年报

(1987—1988)



《研究工作年报》编辑委员会

科学出版社

1989

中国科学院遗传研究所

- 《研究工作年报 (1979)》(1980 年第 1 年出版)
《研究工作年报 (1980)》(1981 年第 2 年出版)
《研究工作年报 (1981)》(1982 年第 3 年出版)
《研究工作年报 (1982)》(1983 年第 4 年出版)
《研究工作年报 (1983)》(1984 年第 5 年出版)
《研究工作年报 (1984)》(1985 年第 6 年出版)
《研究工作年报 (1985)》(1986 年第 7 年出版)
《研究工作年报 (1986)》(1988 年第 8 年出版)
《研究工作年报 (1987—1988)》(1989 年第 9 年出版)

中国科学院遗传研究所

《研究工作年报 (1987—1988)》

《研究工作年报》编辑委员会

*

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

北京通县中西印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1989 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1989 年 8 月第一次印刷 印张: 8 1/2

印数: 0001—2,000 字数: 195,000

ISBN 7-03-001474-X/Q · 212

定价: 7.40 元

獻始建所
王十周年

李振學

一九八九·二·十五

《研究工作年报》编辑委员会

主	编:	李振声					
副	主	编:	王恢鹏	王	斌		
编	委:	王苏生	孙勇如	朱立煌	杜若甫	李向辉	李继耕
		陈 英	林建兴	周宪庭	杨庆林	邵启全	胡 含
		梁正兰	梁 宏	黄华梁	童克忠	蒋耀青	欧阳俊闻
年报编辑部:		孙怀祖	袁开文	陈恩深			

前 言

一九八七、一九八八年,我所承担了七五国家攻关任务课题 62 项,国家生物高技术跟踪“863”课题 10 项,自然科学基金 32 项,并积极组织力量承担了黄淮海平原农业开发项目。在分子遗传和遗传工程、植物单倍体及其遗传变异、植物体细胞遗传学、植物细胞质遗传学、动物发育遗传学、人类医学遗传学及人类群体遗传学和应用遗传学等领域均取得了一批研究成果和进展。

在分子遗传和遗传工程领域,成功地把阿特拉津抗性基因导入大豆叶绿体基因组,获得了抗阿特拉津的大豆植株;1987 年首次报道了水稻线粒体 DNA 较精确的分子量约为 300kb;完成了正常水稻和光敏核不育水稻核基因文库及线粒体基因文库的构建及特定基因的筛选;研究了核糖体蛋白质对信使 RNA 的翻译特异性的分子遗传学,证实核糖体蛋白质对信使 RNA 是有选择性的,丰富了分子遗传学理论的研究;为构建乙型脑炎病毒单抗的人-鼠嵌合体,提取了乙脑病毒单抗(IgG 2a,K)mRNA,合成了 K-ds-cDNA 和 γ_{2a} -ds-cDNA,证实是乙脑病毒单抗轻、重链可变区的 cDNA;成功地将人的 α -干扰素基因导入烟草细胞中,证实转化烟草植株能产生人的 α -干扰素活性;用新霉素磷酸转移酶(NPTII)结构基因 DNA 转化水稻原生质体,获得转化的愈伤组织,并证实 NPTII 基因整合到水稻染色体上,转化愈伤组织的植株再生工作正在进行中。

在单倍体及其遗传变异和植物体细胞遗传学研究领域,用栽培小麦种子的无性系细胞得到原生质体,建立分化培养程序,成功地由愈伤组织分化成完整的再生植株;从橡胶树的体细胞得到胚状体,建立了胚性细胞无性系的悬浮体系,并对离体培养的成熟胚状体进行了人工种子实验;玉米及其远缘杂种经药剂处理均能得到孤雌生殖的纯合二倍体,可作为改良玉米的一种新方法;用细胞工程技术得到抗烟草黑胫病的突变系,抗玉米小斑病的突变系,建立了筛选鉴定体系;建立了北京唐菖蒲去病毒快繁种苗的新技术。

在植物细胞质遗传学和植物杂交育种领域,用幼胚培养法克服小麦异源细胞质不亲和性,得到了抗赤霉病兼抗叶锈病的小麦异源细胞质新品系;从色素蛋白质复合体、类囊体膜蛋白以及叶绿体超微结构系统地分析了大麦、玉米、小麦、水稻叶绿体突变体,证实了水稻、小麦花药培养产生白化苗与前基粒阶段发育受阻有关;对 BT 型水稻雄性不育研究,在世界上首次发现不育水稻细胞质中存在的双链病毒 RNA,其与植株孕性的关系正在探讨中;已鉴定出抗大豆花叶病毒的 12 个抗原,为大豆抗花叶病毒育种提供了种质资源。

在动物发育遗传学领域,奶牛胚胎分割移植技术的研究,在国内首次获得两对同卵双犊;在黄盖鲮鱼发现有抗冻肽存在,克隆了抗冻肽基因,构建了黄盖鲮 DNA 基因文库。

在人类医学、人类群体遗传学和进化遗传学研究领域,以染色体畸变和 SCE 为指标,对石油化工区的工人和居民进行了遗传学效应检测,为环境保护和预防医学提供了资料;甘肃民乐县东灰山新石器遗址农业遗存研究,发现普通小麦、大麦、高粱等炭化籽粒 C^{14} 年代为 5000 ± 159 年,这在追踪中国栽培作物起源上是一个重要发现。

在应用遗传学研究方面,新育成的大豆科丰六号、甘薯遗 306、小麦科成号正在黄淮海

平原试种推广，表现了明显的增产效益。

1988年“863”工作年会上，我所有两个项目被评为A类，6个项目被评为B类。“七五”任务检查时，在24个被检查的项目中，12个项目被评为A类，7个项目被评为B类，5个被评为C类。两年中我所科研人员在国内外各种刊物上发表论文144篇，获奖的科研成果12项。

在改革开放政策的指引下，在以往工作的基础上，我所的国际合作和对外交流在过去的两年中有了较大的进展。到目前为止，从国外学习归来的科技人员共达40人，其中27人担任了实验室负责人（占68%）；39人承担了“863”任务和“七五”攻关项目（占97.5%）；30人成为研究生导师（占75%）。他们在科研和培养人才方面都起了骨干作用。

除了长期出国学习的访问学者和研究生以外，我所研究人员获得国外资助短期出国访问、参加国际会议、短期合作的人数不断增加，尤其中青年科技人员的比例有了较大幅度的提高。1988年我所通过外事部门出国人员达45人次，在国际会议上提供研究报告32篇。同时，来我所访问和短期工作的外国科学家人数也增加，1988年我所接待的外宾超过200人，其中15位科学家共作学术报告35次；来自日本、保加利亚等国的五位科学家在我所进行了合作研究，其中，3人停留时间都在一个月以上。在洛克菲勒基金会的资助下，我所正式出版了英文杂志“Genetic Manipulation in Plants”，并参与了由美国阿林顿出版公司出版中文版《遗传学报》的英译选编版“Chinese Journal of Genetics”的组织和劳务工作，这为广大科技人员用英语发表论文，勾通与外国科学家的交流起了积极作用。随着科研工作的深入和对外交流的发展，在过去两年中，我所有五个项目得到了洛克菲勒基金会的资助；有一个项目得到了日本麒麟啤酒公司的资助；美国Good Year橡胶公司资助的一个项目又续延了两年。在进行合作研究中不少项目得到了国外有关单位资助的仪器设备和化学试剂。

开展国际交流和国际合作大大推动了我所科研工作的进展。

1989年是改革继续深入的一年，是我国建国40周年，也是我所建所30周年，让我们全所同志共同努力，在新的一年里在科研战线上做出更大的成就，向建国40周年，向建所30周年献礼。

李振声 王恢鹏 王 斌

1988, 12

目 录

一、分子遗传学和遗传工程

- 玉米根系联合固氮细菌的分离、鉴定与回接效果..... 杨涛兰 胡文锋 曾孟潜 文玉香 刘连瑞 (1)
- 水稻线粒体 *atpA* 基因的定位、克隆及其在两系中的差异 李大东 王 斌 (3)
- 流感病毒表面抗原血凝素基因在枯草杆菌中的克隆和表达..... 章银梅 朱小莱 杨月琴 汤懋斌 龚新昌 张 珍 皮国华 (5)
- 地衣芽孢杆菌高温 α -淀粉酶基因的克隆和表达 张裕梅 杨月琴 汤懋斌 (7)
- 使用 LacZ 融合蛋白质研究大肠杆菌依赖链霉素突变对不同基因表达的影响 翁曼丽 童克忠 (9)
- 光敏核不育水稻农垦 58 S 核基因文库的构建 郑洪刚 徐琼芳 张 宇 王 斌 (10)
- PS II P₆₈₀chl_aAP 基因在水稻叶绿体基因组中的定位 朱嘉晖 李继耕 孔繁瑞 (11)
- 抗乙脑病毒单抗轻、重链可变区的 cDNA 克隆 王艳丽 尚芙蓉 宁益华 林 晴 宋海燕 陈 艾 黄华梁 (12)
- 抗乙脑病毒杂交瘤细胞基因文库的构建与重链可变区基因的筛选 黄华梁 宋海燕 王艳丽 尚芙蓉 宁益华 林 晴 陈 艾 (13)
- 黄盖鳞抗冻肽基因 cDNA 的克隆及其在原核生物中的表达 陈雄风 蒋耀青 (14)
- 鲫鱼一个高度重复序列的克隆 刘澎湃 蒋耀青 (15)
- 泡桐基因文库的构建及其与菠菜 26S rRNA 基因、动物肌动蛋白基因同源性的鉴定 孙 成 孔繁瑞 林友刚 李继耕 (16)
- 小冰麦 TA1-26 抗锈基因产物某些特性的研究 陈建南 左建儒 刘根齐 黄永照 傅鸿仪 (17)
- 地衣芽孢杆菌 H-1 的鉴定、产木聚糖酶性质的研究 刘 巍 李明凤 汤懋斌 刘植义 (18)
- 水稻线粒体 DNA 基因文库的构建和特定基因的筛选 张 宇 王 斌 (19)
- 嗜热 β -半乳糖苷酶的研究 曾伟强 杨秀琴 (19)

二、单倍体及其遗传变异

- 花药培养转移异源染色体创造小麦新类型..... 胡 含 郝子英 景健康 陶跃之 王 罡 (20)
- 大麦花粉粒培养体系的初步建立 周俭民 唐晓艳 景健康 胡 含 (23)
- 啤酒大麦花药培养及后代选育的进展 景健康 唐晓艳 胡 含 (24)
- 提高籼稻花药培养诱导率的研究 陈 英 田文忠 郑世文 (25)

三、植物体细胞遗传学

- 小麦长期保持高分化潜力的细胞无性系的建立与其再生植株变异的研究..... 陈 英 张小玲 杨 明 (26)
- 小麦未授粉子房诱导频率的研究 吴海珊 唐于富 祝仲纯 (27)
- 大麦未授粉子房培养诱导频率的研究 吴海珊 祝仲纯 (28)
- 利用细胞工程技术诱发抗小麦根腐病突变体的研究..... 郭丽娟 胡启德 康绍兰 张 浩 黄梧芳 (29)
- 水稻单细胞培养的初步探讨 吴基日 李良材 (30)
- 水稻原生质体的转化(初报) 陈一明 翟文学 李小兵 胡乃璧 朱立煌 李良材 陈 英 (31)
- GUS 基因在水稻原生质体和悬浮细胞系中的瞬时表达 李良材 宋文源 刘 清 陈一明 邱并生 裴美云 翟文学 胡乃璧 朱立煌 (32)
- 在玉米体细胞培养中不同来源外植体对诱导和分化的影响 郑银洲 谷明光 (33)
- 玉米体细胞组织培养再生植株及其后代形态和生物学变异 郑银洲 谷明光 (34)
- 青饲多秆多穗玉米体细胞突变体筛选的研究 IV. 8501 自交系的选育 刘纪华 施介村 (35)
- 大豆愈伤组织的悬浮培养及抗盐(NaCl)细胞系的筛选 李大玮 J.Schmid (36)
- 植物激素对大豆茎尖组织培养的影响 李大玮 J.Schmid (37)
- 大豆鲁豆 4 号的化学诱变研究 朱保葛 谷爱秋 耿玉轩 (38)
- EMS 对豫豆 2 号大豆的诱变效果..... 谷爱秋 耿玉轩 朱保葛 (40)
- 马铃薯花粉粒的分离、培养和愈伤组织的形成..... 左秋仙 李淑媛 林自安 金德敏 (41)
- 马铃薯单倍体育种新途径——未传粉子房培养 陶自荣 (42)
- 试管马铃薯培养的研究 陶自荣 (43)
- 烟草胚囊单倍体植株的未传粉子房再生植株的根尖染色体和植株形态观察..... 吴海珊 祝仲纯 (44)
- 人参茎段、叶柄、叶片组织离体培养及植株再生..... 付志明 李安生 杜令阁 李方元 邵启全 (45)
- 桉树易再生的体细胞无性系的获得 姚渝光 陈正华 (46)
- 桉树的悬浮细胞培养及胚状结构的形成 姚渝光 陈正华 (47)
- 华腺萼木形态发生的研究 陆永林 梁月群 陈正华 关月兰 (48)
- 唐菖蒲花瓣培养去毒复壮新技术及其原理的研究..... 郑万珍 何传启 汪永祥 张纯花 徐绍华 蔡文启 赵淑珍 奚仲兴 莽克强 (49)

四、植物细胞质遗传学

- 水稻细胞质双链 RNA 和细胞质雄性不育 王 斌 王京兆 胡 兰 (51)
- 水稻线粒体的分离、纯化和蛋白质分析 王苏生 刘文静 舒群芳 刘 诚 (52)
- 水稻热激蛋白诱导合成的研究 左建儒 刘根齐 陈建南 傅鸿仪 张孔颖 (53)

珍汕 97 三系线粒体和叶绿体基因组翻译产物的分析	刘祚昌 张桂权 詹庆才 赵世民 (54)
籼稻雄核发育的研究	杨 明 陈 英 (55)
利用节节麦细胞质小麦雄性不育材料的新途径	吴郁文 张 炎 张翠兰 (56)
小麦核质杂种在生产中利用的可能性	张翠兰 吴郁文 任树新 张 炎 (57)
小麦 K 型不育系的保持系及其选育方法	王培田 (58)
光照及温度对 K 型小麦不育系花粉育性的影响	王培田 (59)
棉花自交及种间杂交胚乳细胞发育过程的电镜观察	邱仲锦 吴莲英 徐 伟 (60)
高粱细胞质雄性不育系及其保持系的细胞色素氧化酶基因亚基 I 的 <i>EcoR</i> I 酶切分析	左建儒 陈建南 傅鸿仪 刘根齐 冯国宏 张孔糯 (61)
金属离子 (Cu^{++}) 诱导高粱雄性不育系、保持系热激反应的研究	张孔糯 赵林爱 (62)
大葱雄性不育自然突变体的研究 II、同源染色体配对及染色体头尾相接现象的分析	王玉元 (63)

五、群体遗传学与进化遗传学

中国人群遗传结构的分析	翁自力 袁义达 杜若甫 (65)
红细胞血型十九种抗原在黑龙江汉族人群中的分布	郝露萍 刘 杰 杜若甫 (67)
汉族五个人群及三个少数民族腺苷脱氨酶的多态分布	张 志 赵 红 杜若甫 (68)
中国十四个民族红细胞血型座位的遗传分化	翁自力 袁义达 杜若甫 (70)
中国人群红细胞血型座位的杂合度	翁自力 杜若甫 袁义达 (71)
中国汉族人群中补体 C_6 的遗传多态性研究	张 志 杜若甫 (72)
陕西汉族八个红细胞血型系统的分布	郝露萍 杨粉莲 李琳琳 杜若甫 (73)
福建汉族八个红细胞血型系统的分布	郝露萍 金 锋 谭 茜 杜若甫 (74)
贵州汉族八个红细胞血型系统的分布	郝露萍 郑周英 杜若甫 (75)
中国汉族的红细胞乙二醛酶 I 基因多态性	李实喆 杜若甫 (76)
Hisex 祖代鸡群群体遗传学分析	程光潮 吴丽城 段章雄 张 婷 郑小惠 吕 华 刘坤凡 王 力 (77)
鸡的血型研究 X. 我国 11 个地方鸡种的血型和蛋白质多态分析	程光潮 周德旺 吴丽城 段章雄 张 婷 王 力 郑小惠 刘坤凡 吕 华 (78)
家禽遗传育种中综合评判方法的探讨	段章雄 程光潮 (79)
甘肃省民乐县东灰山新石器遗址古农业遗存的新发现	李 璠 李敬仪 (80)

六、医学遗传学

用 $\text{Y}^{3.4}$ 特异探针在间期细胞中进行原位杂交的探讨	沈光平 孙永明 曾伟强 周宪庭 (82)
竹红菌素加激光辐照对体外培养细胞杀伤效应的研究	梁 宏 王兰岚 陆仲康 宋桂英 (83)
叶绿素衍生物对体外培养细胞的光灭活效应的研究	

..... 王兰岚 陆仲康 宋桂英 梁 宏 (84)	
HPD 加激光对不同细胞周期 HeLa 细胞杀伤效应的研究	蒋如朗 梁 宏 (85)

七、动物发育遗传学

人类 Y 特异探针在鲫鱼性别问题研究中的应用	刘澎湃 蒋耀青 (86)
鲫鱼雌性蛋白的发现及分析	刘澎湃 蒋耀青 (87)
黄盖鲮抗冻蛋白的研究	陈雄凤 蒋耀青 (88)
显微切割奶牛胚胎获同卵双胞胎	陈秀兰 张 莹 廖和模 吴德国 严忠全 (89)
金鱼蛋白质的研究 I. 鲫鱼与三种珍珠金鱼肌浆蛋白的比较	王长城 王春元 (90)
金鱼蛋白质的研究 II. 鲫鱼和红虎头金鱼的头部表皮组织蛋白质组成的比较	
..... 王长城 毕世华 王春元 (91)	

八、应用遗传学

根癌农杆菌介导的几种植物的转化	虞剑平 邵启全 (92)
细胞选择抗赤霉病小麦新品种	张 炎 张翠兰 吴郁文 任树新 (93)
体细胞诱变获得马铃薯突变体	李淑媛 左秋仙 林自安 金德敏 (94)
特用玉米的选育研究	曾孟潜 王 杉 张玉香 (95)
青饲多秆多穗玉米新品种的选育与应用	施介村 刘纪华 池建义 (97)
甘薯淀粉形态与淀粉含量等性状的相关	王文质 杜述荣 侯 宁 以 凡 (98)
中国人脑髓的核磁共振成像研究及其质子弛豫机理初探	
..... 袁传照 孔令圻 王小蓬 陈大柔 (99)	

九、技术与方法

小鼠卵巢卵母细胞冷冻-解冻的研究	李翠兰 陈秀兰 (100)
激光显微切割高等植物染色体	
..... 梁 宏 陆仲康 王兰岚 黄力全 宋桂英 徐正平 (101)	
一个新的小麦花药培养基——W ₁₄ 培养基	
..... 欧阳俊闻 贾双娥 张 驰 陈学东 冯国宏 (102)	
通过种子培养诱发小麦多芽体	张翠兰 吴郁文 张 炎 (103)
已发表的论文及著述	(104)
成果和奖励	(112)

国际国内学术交流

国内学术活动	(114)
国际性学术活动	(119)
外国专家来我所作的学术报告	(124)

玉米根系联合固氮细菌的分离、 鉴定与回接效果¹⁾

杨涛兰 胡文锋²⁾ 曾孟潜 文玉香 刘连瑞

近些年来, A. Döbereiner 等从禾本科植物根系中分离到多种联合固氮菌。我们最近从甜玉米根系中分离到 300 株玉米联合固氮菌, 其中 3795 菌株固氮酶活性特别强, 菌株保存 4 个月后, 固氮酶活性仍保持在 614.3—959.3 乙烯毫微克分子/瓶/小时, 比巴西的 SP7 提高 80.1—104.8%。回接效果甚佳, 达到 1612.2 乙烯毫微克分子/克干根/小时。本文报道 3795 菌株的形态特征, 生理生化特性的鉴定结果和回接效果。

取 16 个玉米杂交种和自交系根样, 分离根表和根内联合固氮菌。

培养联合固氮菌采用 Döbereiner 苹果酸钠盐固体培养基, 半固体培养基及苹果酸钠无氮培养基等。回接试验玉米种子幼苗采用无氮 MS 培养基。

取健壮植株的根样, 经冲洗、消毒后剪成 0.4—0.5 厘米根段接入苹果酸钠半固体培养基表面上, 在 30℃ 下培养 24 小时, 培养基表面由绿变蓝, 后用美国 Varian 6000 型气相色谱仪测定固氮酶活性。然后按常规法分离纯化单菌落, 测定单菌落酶活性, 做泌氮试验和回接试验。试验结果如下:

1. 形态特征: 在光学显微镜下发现, 3795、3782、37891、37892 菌株, 培养 18—24 小时菌体形态为短杆状; 培养 140 小时以后发育具有 1—2 个半螺旋; 有单生鞭毛, 能运动。革兰氏染色为阴性。它们的形态类似 Döbereiner 的 SP7 菌株。

2. 培养特征: 在加有 B.T.B. 的半固体无氮培养基上, 划线接菌, 经过 30℃ 培养 24 小时后培养液由绿变蓝, 液面形成 2—3 毫米厚的白色菌膜。这是该菌生长的一大特征。

另外在加有 0.04% 酵母汁的苹果酸钠的琼脂培养皿上划线接种 3795 单菌落呈圆形或不规则, 表面白色有光泽, 连续培养 4 天后菌落有淡红色素, 菌落紧贴琼脂, 不易挑起。这种情况也类似 SP7 菌株。3782、37891、37892 单菌落呈圆形, 表面白色, 培养 4 天后菌落呈淡黄色, 较湿润, 易挑起。

3. 生长特性: 生长曲线采用 O.D 值方法。3795 及 37892 菌株对数生长期 6—18 小时, 20 小时以后转向平缓; 而 37891 和 3782 菌株, 对数生长期在 12 小时, 12 小时以后转向平缓。它们的生长最适合温度均为 30℃ 左右。

4. 酶活性与培养基 pH 值关系: 用 0.1MKH₂PO₄ 和 0.1MK₂HPO₄ 磷酸盐缓冲液, 配成为 pH5.5、6.5、7.5 和 8.5 的溶液 (用 HCl 和 KOH 调 pH), 分别加苹果酸钠和琼脂使成

1) 承蒙中国农科院原子能利用所生物固氮室大力协助, 特致谢忱。梁玉梅, 王杉同志参加部分工作。

2) 在华南农业大学植保系工作。

半固体无氮培养基。接种后于 30℃ 培养 24 小时后测固氮酶活力。酶活性最高时的 pH 值为 7.5。

5. 酶活性与培养时间的关系: 3795 菌株培养 18 小时前, 酶活性较低, 培养 18 小时以后, 酶活性直线上升, 直至 39 小时以后, 开始急剧下降, 54 小时以后, 酶活性大体回到培养 18 小时前的水平。

6. 生化特性:

(1) 3795 菌株的 V.P M.R 反应为负反应, 而葡萄糖发酵反应也为负反应。3782、37891、37892 菌株的生化反应与 3795 菌株有差异。此外, 3795 菌株在葡萄糖上不产酸不产气, 生长无需生长素。

(2) 不同碳源对菌株生长的影响。3795 菌株生长最好的碳源和能源是蔗糖和苹果酸钠, 在淀粉上生长最差。3782、37891、37892 菌株生长最好的碳源分别为乳糖、葡萄糖和苹果酸钠。

7. 泌氮能力测定结果: 泌氮能力是根据平皿上接菌的周围有没有大肠杆菌生长作为判断标准的。试验结果表明 3795 菌有泌氮能力。

8. 回接效果:

(1) 试管回接: 处理 (有苗有菌) 平均酶活性比对照极其明显地增高。说明 3795 菌株有能利用根系分泌的碳源的能力。

(2) 盆栽回接: 经过拌菌和追施菌液的玉米植株和不拌菌和追施菌液植株从幼苗叶片、株高观察, 无多大差异, 但接菌处理的根系于减氧分压诱导后, 即能测出较高的固氮酶活性。酶活数值是 1612.18 毫微克分子乙烯 / 克干根 / 小时, 说明 3795 菌株已与玉米苗建立了联合固氮的关系。盆栽、大田的进一步试验尚在进行中。

9. 保存 4 个月后 3795 菌株的酶活测定: 试验分两组, 一组 7 瓶 (7 个重复), 注入乙炔后 1-2.5 小时, 对冰箱保存 4 个月后的 3795 及 SP7 菌株成对测定酶活性, 另一组 10 瓶 (10 个重复), 注入乙炔后 2-7 小时, 对它们成对测定酶活性, 所得数据经数理统计, 差异显著性测定。结果表明, 3795 菌株酶活性较之 SP7 提高 80.1-104.8%。 t 测验差异显著性达到极显著的标准。

根据以上试验结果, 有两个问题值得加以讨论:

1. 关于 3795 菌株的划分问题: 从上述 3795 菌株的形态、培养特征、生长特性及回接效果看来, 把 3795 菌株归入 *Azospirillum* 属是合理的。那么, 它应是该属中 *A.lipoferum* 种还是 *A.brasilense* 种呢? 从 3795 菌株在葡萄糖上不产酸、不产气、它的生长无需添加生长素这个生长特性上分析, 可以把 3795 菌株暂定为 *Azospirillum brasilense*。

2. 玉米联合固氮菌与杂种优势的关系问题: 众所周知, 杂种优势的产生与基因互作和外在环境都有紧密的联系。玉米杂交种对其亲本表现的优越性中, 也包括杂交种根系的有利微生物区系。这个现象已有人报道过。罗孝扬等在从玉米品系分离固氮菌中也发现, 具有酶活性的杂交种占杂交种总数的 50.9%, 具有酶活的农家品种和亲本自交系仅占其总数 9.2% 和 28.6%。本试验从 16 个玉米材料 (其中 5 个杂交种, 11 个品系) 中分离联合固氮菌, 而 3795 菌株正是从杂交种 379 号中分离到的。

Joachim 估计, *Azospirillum lipoferum* 与玉米根系联合固氮率为 2 公斤 / 公顷 / 天, 而我们分离到 3795 菌株固氮率会比这个数字大, 约为 3.4 公斤氮 / 公顷 / 天。

水稻线粒体 *atpA* 基因的定位、 克隆及其在两系中的差异

李大东 王 斌

植物线粒体内膜上的 ATP 合成酶在能量产物形成过程中起重要作用, 合成酶由 F_1 和 F_0 两部分构成, F_1 是酶蛋白的膜外区域, 具有催化 ATP 合成的功能, 由 5 个亚基组成(α , β , γ , δ , ϵ)。在酵母和动物细胞中, F_1 部分的所有亚基均由核基因编码; 在高等植物中则不同, ATP 酶 α -亚基由线粒体基因组编码。对玉米线粒体 *atpA* 基因的研究结果表明, *atpA* 基因在正常可育类型的玉米线粒体基因组中有两个拷贝, 而在 3 种不育类型 CMS-C、CMS-T、CMS-S 玉米线粒体基因组中只有 1 个 *atpA* 基因的拷贝。

水稻是重要的粮食作物, 研究其线粒体 *atpA* 基因的结构、表达及其在不育系和可育系中的差异, 对全面了解核质间基因的协调表达和水稻细胞质雄性不育分子机制都是非常有意义的。本研究以水稻 BT 型细胞质雄性不育系秋光 A 和相应的保持系秋光 B 为材料, 利用玉米线粒体 *atpA* 基因和菠菜叶绿体 *atpA* 基因为探针, 对水稻线粒体 *atpA* 基因作初步研究。

首先, 将提取的水稻线粒体 DNA(mtDNA)作电泳分析, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳结果显示秋光 A 和秋光 B 线粒体 DNA 都具有 1 条主带, 分子量在 20kb 以上, 又各有两条小的质粒带, 分子量为 1.5kb 和 1.2kb。在秋光 A 线粒体中特异存在 1 条 19kb 左右的大质粒带。其次, 利用限制性内切酶图谱, 定位 *atpA* 基因。将纯化的秋光 B 线粒体 DNA 进行限制性内切酶完全降解, 1%琼脂糖凝胶电泳后将 DNA 片段转移到硝酸纤维素滤膜上, 利用 ^{32}P -标记的 *atpA* 基因探针进行分子杂交。在 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切谱带中各显示出 1 条阳性杂交带, 片段大小都在 3.5kb 左右。*Hind*III 酶切图谱中的杂交片段略大于 *Bam*H I 酶切谱带中的杂交片段。此结果表明, 秋光 B 线粒体基因组中 *atpA* 基因只有一个拷贝存在于 *Bam*H I 和 *Hind*III 3.5kb 左右的片段上。

将 *atpA* 基因定位后, 我们用电转移的方法从凝胶中回收出 3.5kb 左右的 *Bam*H I 酶切片段, 这些 DNA 片段中含有 *atpA* 基因, 以 pBR322 为载体克隆这些片段, 经过抗菌素筛选, 得到重组质粒。由于宿主菌基因组和 *atpA* 基因有一定的同源性, 对分子杂交有干扰, 因此无法用菌落原位杂交的方法进行筛选。只好快速提取质粒 DNA 分子, 经电泳检查, 确认含有插入片段, 然后将质粒 DNA 分子点印在硝酸纤维素滤膜上, 用 ^{32}P 标记的 *atpA* 基因进行分子杂交, 我们得到了 3 个阳性杂交点。提取这 3 个重组质粒, 酶切后电泳, 证明插入片段的大小都是 3.5kb。将这些 DNA 片段转移到硝酸纤维素滤膜上, 用分子杂交的方法做进一步鉴定。3 条插入片段都显示阳性杂交反应, 因而证明这 3 个重组质粒都含有水稻线粒体 *atpA* 基因。

另外, 我们还对水稻不育系和可育系线粒体 *atpA* 基因进行了比较研究。将提取的两系 mtDNA 用 *BamH* I 完全酶解, 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 将 DNA 片段转移到硝酸纤维素滤膜上, *atpA* 基因探针分子杂交的结果显示出 3 条阳性杂交带, 可育系秋光 B 中有 1 条杂交带, 片段大小为 3.5kb 左右; 不育系中显示两条杂交带, 1 条相当于可育系中的杂交带, 在 3.5kb 左右, 另 1 条为 2.9kb。从 X-光底片上看, 3 条杂交带亮度相同。根据这一结果我们推测在水稻不育系秋光 A 线粒体基因组中有两个拷贝的 *atpA* 基因, 较相应的保持系多出 1 个 *atpA* 基因拷贝。

植物线粒体基因组中基因多拷贝的现象已有很多报道, 如 *Cox* I 基因、*Cox* II 基因、18S rRNA 基因、26S rRNA 基因在某些植物线粒体基因组中都表现多拷贝, 研究表明这时它们都和重复顺序相邻。还有前面提到的, 可育型玉米中 *atpA* 基因有两个拷贝, 并定位在 12kb 同向重复顺序的一端, 而不育型玉米线粒体中 *atpA* 基因只有 1 个拷贝, 研究发现其 12kb 同向重复顺序有部分是缺失的。我们知道, 高等植物线粒体基因组很大, 而且复杂, 基因组内含有非编码的重复顺序, 重复顺序间发生重组是普遍存在的现象, 因此我们认为这种 *atpA* 基因的多拷贝现象很可能是由于线粒体基因组发生重组造成的, 尔后在进化中稳定下来, 使不育系水稻线粒体基因组中 *atpA* 基因表现为两个拷贝, 而可育系线粒体基因组中表现为 1 个拷贝。

在正常可育水稻线粒体基因组中只有 1 个 *atpA* 基因拷贝, 说明线粒体基因组中有 1 个正常功能的 *atpA* 基因, 植物即可正常生长繁殖。而在雄性不育的水稻线粒体基因组中有两个 *atpA* 基因拷贝, 这种变异和细胞质雄性不育有怎样的关系, 有待进一步研究。

流感病毒表面抗原血凝素基因 在枯草杆菌中的克隆和表达

章银梅 朱小荣 杨月琴 汤懋斌 龚新昌¹⁾ 张 珍¹⁾ 皮国华¹⁾

流行性感冒仍然是全世界最严重的流行病之一。能有效预防流感的措施是用疫苗免疫。血凝素是流感病毒表面最重要的抗原, 能诱导产生流感病毒中和抗体。从纯化的流感病毒颗粒中提取的血凝素, 其免疫性与灭活的流感疫苗相似, 但作为亚单位疫苗使用, 因生产成本过高, 未能广泛推广。

80 年代初以来, Ching-Juh lai 等人陆续在大肠杆菌、酵母菌中, 以及用 SV40、痘苗病毒为载体, 在其它真核细胞中初步表达了血凝素, 并探索生产单价或多价基因工程抗流感疫苗的可能性。但有报道表明, 血凝素基因在大肠杆菌中的表达产物对细胞有毒性, 而且效价很低。

鉴于枯草杆菌非致病性和胞外表达的优点, 此菌可能是一种理想工程菌。我们曾用穿梭质粒 pRW101 初步表达人- α D 干扰素。但迄今为止, 尚未见在枯草杆菌表达血凝素的报道。

本文报道了流感病毒表面抗原血凝素 HA 基因在枯草杆菌中初步表达。

大肠杆菌质粒 pFV80 是由质粒 pBR332 在 *Pst* I 位点上插入了完整的甲₃ 流感病毒 Aludom / 72 血凝素基因。载体质粒 pAK4 是由穿梭质粒 pRW101 改建而来, 它由枯草杆菌 pUB110、大肠杆菌质粒 pBR332 的含复制起点(Origin)的片段及地衣芽孢杆菌 749 / C 的氨苄青霉素基因所构成。卡那霉素基因来自 pUB110, 氨苄青霉素基因内有一个 *Pst* I 单切点。凡是在 *Pst* I 位点上插入外源基因、使之氨苄青霉素抗性消失的, 只保留单一卡那抗性。常用该特点作为选择外源基因是否插入的标志。

大肠杆菌质粒 pFV88 经限制性内切酶 *Pst* I 消化, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳后, 回收 1.8kb 的 HA 基因, 然后与经碱性磷酸酶处理的载体质粒 pAK4 *Pst* I 水解片段混合, 用 T4 连接酶进行重组, 转化到枯草杆菌 168。获得 250 株抗卡那霉素(Km^r)的转化体。采用影印法, 从 250 株 Km^r 的转化体中筛选 5 株氨苄青霉素敏感株(Km^rAmp^s)。

用热变性快速法提取上述 5 株重组体的质粒, 经内切酶 *Pst* I 消化, 进行琼脂糖凝胶电泳分析。其中 3 株重组菌质粒(编号 pCG1, pCG2, pCG3)都出现两条 DNA 带, 一条 DNA 带和载体 pAK4 DNA 大小一致, 另一条与血凝素(HA)基因 DNA 大小一致, 分子量为 1.8kb。

血凝素(HA)基因的一级结构已经清楚, 在 0.35kb 处有一个 *Hind* III 单切点, 用 *Hind*

1) 中国预防医学科学院病毒研究所。

Ⅲ、*Pst* I 双酶水解分析, 证明 3 株重组体质粒插入的外源 DNA 确为血凝素基因。进一步酶切分析证明插入方向正确。

然后, 3 株重组菌和含质粒 pAK4 对照菌经反复冻化, SDS 裂解后, 用 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 表明这 3 株重组菌均有一个分子量为 67000 的蛋白带。用常规考马氏亮蓝染色明显可见该蛋白质的大小与没有糖化的流感病毒血凝素(HA)相同。

此外, 又采用血凝抑制试验进一步研究, 按常规大量法进行, 1 份血清用 9 份 RDE 处理, 再用结晶胰酶处理, 以完全除去血清中非特性抑制素, 抗原京科 56-1(H₁N₁)、贵 57-1(H₂N₂) Aludom / 72(H₃N₃) 为感染鸡胚的尿囊液。免前血清及对照 pAK4 血清, 各抗原均无血凝抑制抗体, 而重组菌 pCG1、pCG2 免疫血清对 Aludom / 72 抗原有特异性血凝抑制抗体产生, 滴度分别为 17.5 和 20, 说明表达产物具有 Aludom / 72 血凝素抗原性, 但用 H₁N₁ 和 H₂N₂ 抗原均未测出血凝抑制抗体, 表达产物具有亚型特异抗原性。

通过以上各种方法, 证明了甲₃ 型流感病毒血凝素在枯草杆菌中初步表达。