

中国科学院遗传研究所《研究工作年报》(一九九一)

中国科学院遗传研究所

研究工作年报

《研究工作年报》编辑委员会

1991

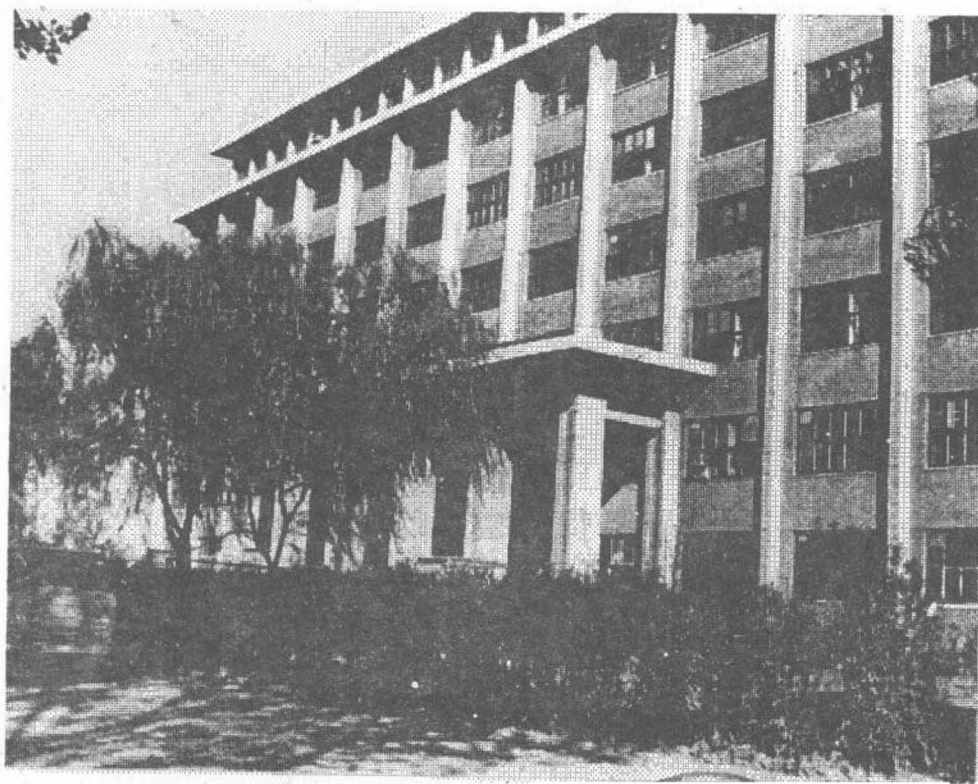
(第12年出版)

北京工业大学出版社

1992



中国科学院遗传研究所
研究工作年报
(1991)



《研究工作年报》编辑委员会
北京工业大学出版社
1992

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)》(1987年第8年出版)
《研究工作年报(1987-1988)》(1989年第9年出版)
《研究工作年报(1989)》(1990年第10年出版)
《研究工作年报(1990)》(1991年第11年出版)
《研究工作年报(1991)》(1992年第12年出版)

**中国科学院遗传研究所
《研究工作年报(1991)》**

主编 陈受宜

*

北京工业大学出版社 出版发行
全国各地新华书店 经销
北京工业大学印刷厂 印刷

*

1992年8月第1版 1992年8月第1次印刷
787×1092毫米 16开本 8.75印张 214千字
ISBN 7-5639-0244-9/Q·7
印数: 001-1000

定价: 7.00元

(京)新登字 212号

前 言

1991 年是两个五年计划相互衔接,科研工作承上启下的一年。在全面完成了“七五”期间科研任务的基础上,本所在争取“八五”国家各项科研计划任务和已有任务的组织实施两方面都取得了令人鼓舞的成绩。

我们已经分别从国家自然科学基金,国家科技攻关计划,863 高技术发展计划及中科院重大科研项目等渠道争取到了上百项任务,同时通过国际间的合作与交流,争取到了多项国际资助与合作。在争取到的任务项目数和经费数两个单项上都刷新了本所原有的纪录。

与此同时,科研工作的成绩也令人鼓舞。全所 9 个研究室及两个开放实验室的 39 个课题组都在各自的科研工作中获得了不同程度的新进展。分子遗传、细胞及染色体工程、动物发育遗传、人类群体遗传、植物遗传与育种及黄淮海平原综合治理开发等方面均取得了新的成绩。特别值得一提的是,我们在不同生物来源的基因的分离、重组、转移、表达调控及定位等项研究有新的突破:在植物分子生物学和基因工程方面,已经完成了 3 个水稻基因的定位,初步建起了几种植物的转化体系,获得了几种重要农作物的抗性转基因植株,并为此类技术的进一步发展和应用奠定了良好的基础。本期年报所收录的 118 篇文章,从不同层次不同角度展示了本所 1991 年度科研工作的现状,也是我们在各项科研工作中取得显著进展的一个缩影。

科技改革的步伐在不断加快。在新的一年里我们将面临新的挑战:完成科研工作任务,努力提高研究工作的质量和水平,做好科技成果的转化和开发工作,在为国民经济建设主战场服务的同时不断提高科研工作自身的活力,所有这一切都是形势对我们提出的新要求。相信我们会迈出更大的步伐,取得更多的新成绩,新进展。

陈受宜

王恢鹏

王 斌

1991 年 12 月

目 录

一、分子遗传

IgY-Ricin 对晚期胃癌患者的治疗作用

..... 王恢鹏、刘连瑞、杨涛兰、冯 尚、冯之凡(1)

禾谷类植物固氮菌 3795 抗氨实验

..... 杨涛兰、刘连瑞(2)

玉米根系联合固氮菌固氮酶活性的气相色谱测试

..... 文玉香、杨涛兰、梁玉梅、刘连瑞(2)

PCR 扩增抗乙脑病毒单抗重、轻链可变区基因

..... 熊曦明、杨 青、桂 进、熊 伟、陈 艾、林 晴、徐乃正、黄华梁(3)

抗乙型脑炎病毒单克隆抗体轻链可变区基因的分离和鉴别

..... 黄发灿、黄华梁、熊曦明、桂 进、熊 伟、林 晴、宋海燕、陈伯权(4)

定点突变改造 M13 噬菌体

..... 杨 青、熊 伟、桂 进、熊曦明、宋海燕、徐乃正、黄华梁(5)

大肠杆菌核糖体蛋白质 L24 和 L27 突变对 λN 和 λQ 基因表达的影响

..... 翁曼丽、李沐阳、童克忠(6)

高效启动子的克隆和启动子功能的检测

..... 张秀媛、童克忠(6)

枯草杆菌分泌表达系统的构建

..... 刘永亮、童克忠(7)

枯草杆菌抗铬基因的定位

..... 陈玲爱、童克忠(8)

枯草杆菌分泌真核蛋白质的初步研究

..... 孙国富、刘永亮、童克忠(8)

碱性蛋白酶工业生产菌地衣芽孢杆菌 2709 的转化

..... 章银梅、李心治、许素心、党本元、汤懋 Hong(9)

碱性蛋白酶基因在枯草杆菌质粒 pBC16 上的亚克隆和表达

..... 许素心、章银梅、李心治、居金良、汤懋 Hong(10)

degR, hpr, degU / S, degQa, degQ36 基因对枯草杆菌 Ki-2-132

胞外蛋白酶的调控

..... 潘学峰、胡 兰、汤懋 Hong(11)

碱性蛋白酶基因(apr)在 Ki-2-132hpr(Hy)菌株更高表达的突变

..... 潘学峰、汤懋 Hong(12)

二、动物遗传

用激光微束将荧光物质钙黄素导入植物细胞的研究

..... 王兰岚、郭延德、宋桂英、张健、徐正平、田文忠(14)

一种高效的植物细胞转化方法

..... 郭延德、王兰岚、宋桂英、张健、徐正平、田文忠(14)

从公牛基因组扩增 SRY 的同源序列

..... 翟文学、陈秀兰、吴德国、朱立煌(15)

三、体细胞遗传

不同基因型花生对 EMS 的诱变反应

..... 谷爱秋、朱保葛、耿玉轩(17)

DES 诱变大豆合丰 25 育成宝诱(85)12-1-17

..... 谷爱秋、钟立梓、耿玉轩、朱保葛、吴风华(18)

新育成的大豆化诱高产突变系 89LD₄E182

..... 朱保葛、谷爱秋、耿玉轩、邓向东(18)

化学诱变剂 EMS 对大豆品系遗诱一号重复处理的 M₁ 代效果

..... 耿玉轩、谷爱秋、朱保葛、邓向东(19)

EMS 对大豆稳定品系 Co2 的化学诱变研究

..... 邓向东、谷爱秋、耿玉轩、朱保葛(20)

大豆化诱突变体 86YD₂E180 的过氧化物酶同工酶分析

..... 朱保葛、谷爱秋、耿玉轩、邓向东(21)

大豆化诱新品系 86YD₂E180 在不同种植密度下的产量表现

..... 朱保葛、谷爱秋、袁润喜、耿玉轩、周广杰、邓向东(21)

小麦转基因植株的获得

..... 曾君祉、王东江、吴有强、张健、周文娟、朱小平(22)

外源基因在小麦细胞中的稳定表达

..... 杨书礼、曾君祉、吴有强、王东江、朱小平、周文娟、张健(23)

抗除草剂 *bar* 基因的真核细胞表达载体的构建

..... 杨书礼、曾君祉、王东江、吴有强、张健、周文娟、朱小平(24)

“8885”返地卫星搭载水稻种子遗传性的变化

..... 蒋兴村、李金国、南雨斌、许飞、陈芳远、卢升安、彭月华、易小平等(25)

高空条件处理培育出能恢复籼稻不育性的粳稻材料

..... 蒋兴村、李金国、南雨斌、许飞、陈芳远、卢升安、杨存义、易小平(26)

大麦种子搭载高空气球后的生物学效应

..... 南雨斌、李金国、许飞、蒋兴村、顾逸东(27)

空间条件处理西红柿种子获得优良的新品系

..... 蒋兴村、李金国、南雨斌、邓立平、郭亚华、于志明(28)	我国首次搭载植物无性繁殖材料——大蒜成功
..... 李金国、南雨斌、许 飞、蒋兴村(29)	空间条件对棘孢小单孢菌(<i>M.echinopora</i>)的诱变效应
..... 李金国、许 飞、蒋兴村(29)	药物诱导玉米孤雌生殖植株的倍性
..... 谷明光、何懿洁、樊连春、毛宁辉、颜春洪(30)	通过远缘杂交创造玉米抗大、小斑病的新种质
..... 何懿洁、谷明光、刘国胜、黄悟芳、杨太兴(31)	利用农杆菌共培养法获得芜菁花叶病毒外壳蛋白基因转基因油菜
..... 孔令洁、王文富、张丽华、方荣祥、陈正华(32)	农杆菌二元载体转化子鉴定方法的改进
..... 孔令洁、汤玉红、王文富、陈正华(32)	桉树不定芽大量培养及人工种子播种试验
..... 关月兰、姚渝光、陈正华(33)	从嵌合体转基因油芽中快速获得正常转基因植株
..... 孔令洁、张丽华、姚渝光、陈正华(34)	大白菜转化系统的研究
..... 张丽华、孔令洁、汤玉红、姚渝光、陈正华(35)	鲁棉六号胚状体的诱导和利用 Ti 质粒转化胚状体的初步研究
..... 汤玉红、陈正华、刘桂珍、孔令洁、王文富、姚渝光、关月兰、张丽华等(35)	高效液相色谱法 ODS 反相柱测定哈密瓜内源激素吲哚-3-乙酸含量
..... 文玉香、于为常、梁玉梅、郑万珍(36)	

四、植物细胞质遗传学

甜玉米杂交种的选育及其生化遗传的测定

I. 甜玉米杂交种的品质分析

..... 曾孟潜(38)	
---------------	--

甜玉米杂交种的选育及其生化遗传的测定

II. 甜玉米杂交种选育进展

..... 刘雅楠、曾孟潜(39)	
-------------------	--

丰产早熟玉米单交种遗长 101 号

..... 曾孟潜、戴顺洪、刘雅楠、陈明生(40)	
---------------------------	--

干旱处理对玉米品种的影响

..... 刘雅楠、曾孟潜(41)	
-------------------	--

优质蛋白玉米胚乳醇溶蛋白的双向电泳分析

..... 陈明生、曾孟潜(41)	
-------------------	--

黄粒黄早四玉米自交系的选育

.....	杨太兴(42)
关于激动素促进烟草培养细胞 mRNA 的转录作用的研究	
.....	陈建南(43)
新型高粱不育系的同工酶鉴定	
.....	刘根齐、傅鸿仪、陈建南、陈宝善(44)
应用花粉匀浆转化技术改良高粱不育系的研究	
.....	刘根齐、冯家瑞、王桂兰(45)
各种因素对杉木愈伤组织的影响	
.....	赵世民、李向冬、徐金相、刘祚昌、郑义和、陈 昱(46)
杉木愈伤组织的诱导	
.....	李向冬、赵世民、徐金相、刘祚昌、郑义和、陈 昱(47)
松科树种愈伤组织的诱导及原生质体游离	
.....	徐金相、赵世民、李向冬、刘祚昌(47)
提高花粉管途径转基因频率的研究	
.....	孔繁瑞、朱嘉晖、钟启宏、孙 威(48)
外源基因导入泡桐树中获得表达	
.....	钟启宏、孔繁瑞、孙 威、朱嘉晖(48)
一种快速、灵敏、简便检测 <i>NPTII</i> 基因表达的新方法	
.....	钟启宏、孔繁瑞、孙 威、王文富、朱嘉晖、孙桂华、李继耕(49)

五、生物技术与育种

马铃薯未传粉子房培养获得再生植株	
.....	左秋仙、林自安、李淑媛、金德敏(50)
甘薯开花习性观察	
.....	仇光星、杜述荣、左秋仙(51)
甘薯自然开花亲本遗 2002、遗 1135 的配合力分析	
.....	王文质、仇光星、侯 宁、左秋仙(52)
甘薯品种抗旱性鉴定研究	
.....	仇光星、杜述荣、侯 宁、左秋仙(53)
不同间作结构的产量与生理生态条件的关系	
.....	任治安、刘桐华、潘 毅、林建兴、王恢鹏(54)
葡萄试管苗光自养培养快速繁殖	
.....	朱有光、孟树兰、马 梅、王双石(55)
新型细胞质雄性不育系的选育	
.....	吴郁文、张翠兰、任树新、张 炎(56)
小麦优良品种科春 14 和科春 5 号在生产上和育种上应用的新进展	
.....	吴郁文、张翠兰、任树新、张 炎、韩文愈(57)
偏凸山羊草细胞质诱发小麦雄蕊心皮化	

- 张翠兰、吴郁文、任树新、张 炎(57)
细胞质对小麦幼穗愈伤组织诱导率及生长速度的影响
- 任树新、张翠兰、吴郁文、张 炎(58)
异源细胞质对小麦赤霉病抗性的影响
- 任树新、张翠兰、吴郁文、张 炎(59)
小麦与玉米及小麦与球茎大麦的杂交亲和性及胚的形成
- 李大玮、邱纪文、欧阳平、姚庆筱、郭丽娟(60)
小麦抗根腐病突变体的获得及其过氧化物酶同工酶的分析
- 姚庆筱、郭丽娟、张 春、李大玮、邱纪文、欧阳平(62)
诱导小麦单性生殖的研究
- 邱纪文、李大玮、欧阳平、胡启德、姚庆筱、郭丽娟(63)
棉花杂种 F_1 紧凑株型遗传性初步观察
- 姜茹琴、孙传渭、何鉴星、钟文南(64)
棉花种间杂交种质资源选育
- 姜茹琴、钟文南、何鉴星、梁正兰、孙传渭(65)
无腺体陆地棉 $\times$ 比克氏棉 F_1 腺体延缓形成基因的表达
- 何鉴星、梁正兰、孙传渭(67)
植物激素对棉属种间杂种胚乳细胞超微结构发育的影响
- 邱仲锦、梁正兰、吴莲英、徐 玮(68)
“遗棉矮早一号”新品系早熟矮秆等遗传性状的初步观察
- 池建义、袁润喜、孙传渭、郭朝忠、潘 毅、王恢鹏(69)

六、植物遗传操作

- 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的缺失及在转基因烟草中的表达研究
- 刘春明、朱 桢、周兆嫫、孙宝林、李向辉(70)
用亲和层析法由豇豆中提取胰蛋白酶抑制剂
- 何志军、孙正忻、朱 桢、刘春明、孙宝林、李向辉(70)
籼稻小孢子再生植株的遗传与变异
- 陈 英、徐云碧、陆朝福、田文忠、曹守云(71)
水稻细胞悬浮系的快速建立
- 储成才、田文忠、陈 英、陈一明、孟宪越、孙 庆、曹守云(72)
豆科牧草营养成分——单宁的生化检测
- 徐晓明、吕德扬(73)
百脉根高含硫氨基酸转基因植株再生的研究
- 吕德扬、邵嘉红、徐晓明、张 军、汪 清、俞梅敏、范云六(74)
紫花苜蓿外植体胚状体和植株高频再生的研究
- 汪 清、吕德扬、邵嘉红、张 军(76)

七、染色体工程

小麦花药培养中麦芽糖的效果

..... 俞春江、贾旭、胡适全、庄家骏(78)

诱导小麦-黑麦-簇毛麦三属杂种花粉植株的研究

..... 胡适全、庄家骏、贾旭、俞春江(79)

小麦-黑麦-簇毛麦三属杂种 F_1 的细胞遗传学研究初报

..... 胡适全、贾旭、俞春江、庄家骏(80)

小麦条锈病抗性新种质的创制及其细胞遗传学研究

..... 聂道泰、庄家骏、贾旭、胡适全、俞春江、王剑雄(81)

中间偃麦草条锈病抗性基因的染色体定位

..... 聂道泰、庄家骏、贾旭、胡适全、俞春江、王剑雄(82)

小麦花粉植株的染色体操作

..... 胡含(83)

染色体操作结合花药培养向小麦转移黑麦基因

..... 张文俊、魏荣 Xuan、胡含(83)

黑麦 6R 染色体在小麦背景中的细胞遗传学研究

..... 张文俊、姚根怀、胡含(84)

八倍体小黑麦与普通小麦杂种 F_1 花粉植株配子组成及染色体变异

..... 王亦兵、胡含(85)

影响大麦高频率雄核发生的诸因素

..... 李文泽、景建康、胡含(85)

野生稻 *O.alta* 和栽培稻 *O.sativa* 的远缘杂交

..... 周清、毛龙、朱立煌、胡含(86)

培养温度和光照强度对小麦花粉愈伤组织分化能力的影响

..... 梁辉、贾双娥、张驰、欧阳俊闻(86)

啤酒大麦花药培养的若干问题

..... 徐武、李安生、李鸣、曹林藏、张敬、邵启全(87)

用球茎大麦法诱导大麦加倍单倍体及其后代表现

..... 付志明、李安生、曹林藏、邵启全(88)

离体筛选小麦抗赤霉病突变体的研究

..... 李社荣、李安生、孙光祖、王广金、唐凤兰、李忠杰(89)

玉米原生质体再生不育植株及其后代表现

..... 施介村、刘纪华、樊丰林(90)

八、植物分子遗传

鉴定与水稻稻瘟病抗性基因连锁的分子标记

..... 朱立煌、陈英、凌忠专、徐云碧、徐吉臣(91)

利用 PCR 技术分析水稻核糖体基因的第一转录间隔区

..... 宋文源、张耕耘、朱立煌(91)

水稻籼粳间 RFLP 零等位现象的分子基础研究

..... 毛 龙、朱立煌(92)

水稻线粒体 26S RNA 的克隆

..... 徐琼芳、王京兆、王 斌(93)

人类恶性疟原虫重复 DNA 的分离和克隆

..... 郑洪刚、王 斌、黄炳成、刘克义(93)

菠菜与山菠菜甜菜碱醛脱氢酶 3'端顺序分析

..... 肖 岗、张耕耘、刘风华、陈受宜(94)

水稻耐盐突变细胞系在不同胁迫条件下的蛋白组份分析

..... 陆驹飞、郭 岩、王 军、陈少麟、陈受宜(95)

九、医学群体遗传

广东客家人的红细胞血型分布

..... 郝露萍、杜若甫(97)

中苏合作研究东北亚地区人群的遗传多态性

I. Gc、Tf 亚型

..... 徐玖瑾、杜若甫、O.L. Posukh、R.I. Sukernik(98)

中苏合作研究东北亚人群的遗传多态性

II. α_1 -AT 亚型

..... 曾 岚、徐玖瑾、杜若甫、O.L. Posukh、R.I. Sukernik(99)

褐壳蛋鸡三系配套系选育初报

..... 程光潮、段章雄、刘坤凡、王 力、李晓燕(100)

十、其他

人工皮肤的扫描电镜观察

..... 贾敬鸾、张 诚、江利群、李秀玲(101)

青藏高原野生和栽培大麦核型和带型的研究

(图象自动分析与识别)

..... 李 Pan、李敬仪、胡匡祜(102)

中国栽培植物起源与发展简论

..... 李 Pan(103)

核糖核酸的高分辨核磁共振研究

..... 袁传照(104)

酶分子的核磁共振研究

..... 袁传照(105)

懒猴的若干行为特征及其色觉辨认的研究	袁传照(106)
--------------------	----------

懒猴的脑髓、脑电特征与其行为相关性研究	袁传照(107)
---------------------	----------

成果与奖励	(109)
-------	-------

已发表的论文及著述	(110)
-----------	-------

国内国际学术交流

国内学术活动	(116)
--------	-------

国际学术活动	(122)
--------	-------

IgY-Ricin 对晚期胃癌患者的 治疗作用¹⁾

王恢鹏 刘连瑞 杨涛兰 冯 尚 冯之凡

抗胃癌抗体 IgY 对人的胃癌细胞有特异性识别作用。抗胃癌抗体 IgY 与蓖麻毒蛋白连接形成的抗肿瘤导向药物对人胃癌传代细胞 MGC-803 有特异性杀伤作用, 可使细胞膜、细胞核破裂, 但对人的肝癌细胞及乳腺癌细胞无杀伤作用。我们用 IgY-Ricin 对晚期胃癌患者进行了治疗观察, 其结果如下。

抗胃癌抗体 IgY 的 ABC 组织化学染色结果表明, IgY 与胃癌组织反应阳性率为 87.1%, 与正常胃组织不起反应, 与肠癌、肺癌、食道癌组织交叉反应较弱 (0-41.2%), 胃癌抗体 IgY 与胃癌组织反应显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。用免疫荧光法得到与 ABC 组织化学染色法重复性高度一致的结果。

我们比较了 IgY 与单克隆抗体 MG9 的特异性, 在同一批标本上进行 ABC 组织化学染色结果表明, IgY 抗体与 MG9 抗体染色结果无显著差 ($P > 0.05$), 说明 IgY 与单克隆抗体 MG9 特异性相似。

IgY-Ricin 及对胃癌细胞 MGC-803 有强烈杀伤作用, 使 MGC-803 细胞膜和细胞核裂解或融解而在对肝癌细胞 7402 以及乳腺癌细胞 MCF 不起反应。IgY-Ricin A 对 MGC-803 作用的 $TCID_{50}$ 为 0.01 mg/ml, 对肝癌 7402 和乳腺癌 MCF 细胞作用的 $TCID_{50}$ 为 0.22 mg/ml, 显著高于胃癌细胞 ($P < 0.05$)。

用抗胃癌抗体 IgY-Ricin A 对 20 例经胃镜检查及病理切片确诊的胃癌的晚期患者进行了治疗。用药途径为肌肉注射, 或结合胃镜检查在胃内病变部位采用多点注射, 注射剂量为 2-4mg。经 IgY-Ricin A 治疗后, 患者病情缓解, 精神状态好, 食欲增加。如患者张 × ×, 55 岁, 临床诊断为胃癌晚期 Borrmann IV 型。病理诊断为胃低分化腺癌, 胃后壁有 4.0 × 5.0cm 病变, 表面出现糜烂溃疡, 胃前壁有 3.0 × 3.0cm 病变, 波及幽门部。在胃镜下对病灶进行多点注射, 患者经治疗后缓解。后由于经济困难出院, 半年后死亡。注射 IgY-RicinA 后患者有发烧, 恶心, 呕吐等副作用, 采作对症处置可以解除。有关临床应用需进一步探索。

1) 本研究为国家自然科学基金资助项目。

本研究与辽宁中医学院隋文作、刘辉、许世厚、张永志、郝宏党、刁容芳、崔连静、曲巍和二零五医院马野、冯丹书、郭继孔、杨柏泉、王冰、薛秉文、左连章、徐殿国合作完成。

禾谷类植物固氮菌 3795 抗氨实验

杨涛兰 刘连瑞

具有固氮能力的微生物在缺乏氨态氮的情况下能从空气中固定氮分子, 当有微量氨存在时, 多数固氮菌会停止固氮, 这种现象称为“氨关闭”效应。但是, 也有些固氮菌具有一定抗氨能力, 在有一定量氨分子存在时, 仍有固氮能力, 在实际应用中, 这种固氮菌更有意义。

为了测定禾谷类植物固氮菌 3795 菌株的固氮能力, 我们做了抗氨实验。固氮菌施在无土盆栽小麦上, 盆栽小麦分别施入 0、10、30、60、90、120mmol/L 氯化铵, 在小麦苗期分别取样测根和茎叶的含氮量。在无氨的盆栽小麦上, 根的含氮量为 100ppm, 茎叶含氮量为 40ppm; 在含 10-60mmol/L 氯化铵的盆栽小麦中, 根的含氮量为 200ppm, 茎叶含氮量为 30ppm, 氯化铵在 90mmol/L 以上时, 则对固氮菌的固氮能力有一定抑制作用, 根和茎叶的含氮量下降, 在含 90-120mmol/L 氯化铵时根含氮量为 80ppm, 茎叶为 10ppm 以下。

我们从 30 和 60 mmol/L 氯化铵培养的氮菌 3795 中提取了固氮酶, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果表明施氮和不施氮固氮菌的固氮酶在结构和含量上没有显著差异。

同样在大田实验中, 施固氮菌的小麦在拔节后期施尿素按每亩 17 千克, 结果每亩小麦增产 86 千克, 比对照提高产量 11.9%。

上述实验结果表明, 我们筛选的禾谷类植物固氮菌 3795 菌株, 具有一定的抗氨能力, 在田间施用中可以施入一定量氮素肥料后不抑制固氮菌的固氮能力, 从而达到节省化肥并增产的目的。

玉米根系联合固氮菌固氮酶活性的 气相色谱测试

文玉香 杨涛兰 梁玉梅 刘连瑞

以前报道豇豆族根瘤菌在特定培养基上可以将乙炔还原成乙烯, 根据这种特性, 采用气相色谱方法测定固氮酶活性, 并证明固氮基因存在于根瘤菌中。

我们从甜玉米根际分离到多株联合固氮菌, 为了鉴别其固氮能力, 我们对应用气相色谱测定固氮酶活性进行了探索。首先我们对 Varian 6000 型气相色谱的工作条件进行了测试, 认为柱长 2 米, 内径 3 毫米的柱子以 Porapa K-N 80-100 为担体, 装柱后在 180℃ 下活化 24 小时, 分析时载气为氮气, 流量为 30ml/min, 柱温 50℃, 检测器为 120℃, 注射器为

110℃, 测试后乙烯峰保留 1 分 8 秒钟, 乙炔峰为 3 分 6 秒钟为最佳工作条件。

测定固氮菌的固氮酶活性是将分离到的单菌落接种在固体无氮培养基上做为种子菌种培养过夜。将 4 环种子菌种于 3ml 无氮培养基上, 在 30℃ 培养 24 小时, 然后注入 0.7ml 乙炔, 1 小时后取 100 μ l 气体在气相色谱仪上测试, 测试结果按以下公式计算固氮菌固氮能力。

$$\text{乙烯峰浓度}(\%) \times \frac{\text{培养瓶体积(ml)}}{\text{进样量}(\mu\text{l}) \times 22.4} \times 10^3 = \text{乙烯毫微克分子数}$$

试验结果表明, 3795 和 3796 菌株固氮能力最高, 达到 1287-1680 乙烯毫微克分子/瓶/小时。菌株保存 4 个月之后固氮能力仍可达到 614-959 乙烯毫微克分子/瓶/小时。比现在公认的巴西 SP7 的固氮能力提高 80-105%。

为了证明分离的固氮菌 3795 株在施入小麦根上仍保持较高的固氮能力, 我们进行了菌种回接实验。取回接菌的小麦根洗净, 消毒, 剪成 0.4-0.5 厘米的片段, 接入苹果酸钠半固体培养基的表面上, 30℃ 培养 24 小时, 培养基中指示剂由绿变蓝, 然后向培养瓶中注入 0.7ml 乙炔, 1 小时后取气用气相色谱测定固氮菌的固氮能力。结果表明其固氮能力可达 1612 乙烯毫微克分子/瓶/小时。

从我们的研究结果可以得出结论, 用气相色谱测试方法筛选固氮菌, 方法简便, 快速, 为大量筛选固氮微生物提供了一种方便易行的途径。

PCR 扩增抗乙脑病毒单抗重、轻链 可变区基因

熊曦明 杨 青 桂 进 熊 伟 陈 艾 林 晴
徐乃正 黄华梁

由于人、鼠之间物种的差异, 人体在多次注射鼠源性单抗后, 产生抗抗体, 使单体丧失作用, 严重地引起过敏反应, 限制了鼠源性单抗在人类疾病治疗方面的应用。为了解决这个问题, 目前利用遗传工程技术, 通过 3 种途径改造鼠源性单抗, 达到减小或完全消除其免疫原性的目的: 单链抗体, 嵌合抗体, 改形抗体。这 3 种途径的实现, 都依赖于鼠源性单抗可变区基因的获得。而构建免疫球蛋白基因文库和 cDNA 文库的方法均较繁琐, 费时。但是, PCR(polymerase chain reaction) 方法的出现, 使得免疫球蛋白轻、重链可变区基因在短期内克隆或为可能。由于在我国乙型脑炎病毒仍然严重危害人类健康, 因此我们选用分泌抗乙型脑炎病毒单抗的杂交瘤细胞作为实验材料, 利用 PCR 方法, 从抗乙脑病毒杂交瘤细胞 DNA 和 mRNA 扩增免疫球蛋白的重、轻链可变区基因, 以表达单链抗体。

本实验设计并人工合成了两套分别对应于鼠单抗重、轻链 FR₁、FR₄ 两端的通用引

物。按常规方法从杂交瘤细胞中提取总 DNA 和 mRNA。mRNA 以 oligo(dT)为引物反转录成 cDNA。分别以总 DNA, cDNA 第一链为模板, 100 μ l PCR 扩增反应体积还包括 50mmol/L KCl, 100mmol/L Tris HCl (pH9.0, 25 $^{\circ}$ C), 15mmol/L MgCl₂, 0.190 gelatin, 190 Triton X-100, 2 单位 Taq DNA 多聚酶, 引物 1, 2 各 1 μ mol/L, 每一种 dNTP 20 μ mol/L。反应条件: 预变性 96 $^{\circ}$ C、5', 94 $^{\circ}$ C、1', 55 $^{\circ}$ C、1'74 $^{\circ}$ C、1', 30"。最后一圈 74 $^{\circ}$ C 保温 10', 总循环圈数 35 圈。反应产物的分子量大小与所需大小相符。扩增产物经酚、氯仿抽提, 无水乙醇沉淀后, *Sa*II、*Not*I 两酶切, 插入 pGEM-11Zf(+) 多克隆位点, 转化 JM109 菌株。经蓝、白斑筛选, 酶切鉴定, 扩增产物已克隆在 pGEM-11Zf(+)上。由于 pGEM-11Zf(+)在辅助噬菌体帮助下成为单链, 可直接用于测序, 无需再克隆进 M13 噬菌体。目前, 用双脱氧终止测序已测出重、轻链可变区基因各 2/3 的序列, 与已发表的序列相比较, FR₁、FR₂ 区基本相符, CDR₁、CDR₂ 区长短相似。可以肯定此克隆基因确为鼠单抗轻、重链可变区基因, 但有待全序列测定。然而在轻链可变区基因的比较过程中, 发现缺失了 V_k5'引物后面一个碱基。这可能是反转录过程或 PCR 扩增过程中发生碱基缺失现象, 也可能是由于免疫球蛋白基因本身的复杂性。本实验的克隆基因两侧有酶切位点, 故能插入表达载体表达成单链单体, 也可用于构建成嵌合抗体。

抗乙型脑炎病毒单克隆抗体轻链 可变区基因的分离和鉴别¹⁾

黄发灿 黄华梁 熊曦明²⁾ 桂进 熊伟
林晴 宋海燕 陈伯权²⁾

为了构建抗乙型脑炎病毒的人-鼠嵌合抗体, 以分泌抗乙型脑炎病毒单克隆抗体的 51-8 杂交瘤细胞株为材料, 从以 λ EMBL-3 为载体构建的基因文库中, 以 J_K 和 V_K 为探针, 分离有功能性的轻链可变区基因。共筛选了 300000 个左右噬菌斑, 经第二次复筛和第三次复筛后, 得到 19 个阳性噬菌斑。将阳性噬菌斑的 DNA 重组体、小鼠肝 DNA 分别用 *Bam*HI 酶切后进行基因重排分析。在分析的 8 个重组体中, 5 个含有 2.8kb 片段, 而肝 DNA 含有 8.9kb、5.6kb、3.6kb 和 3.1kb 4 个片段, 没有 2.8kb 片段。由于肝 DNA 的 4 个片段是未经重排的种系基因, 因此可以推断重组体中的 2.8kb 片段是经过重排的轻链可变区基因。为了进一步鉴定, 又从中选出了 3 个含有 2.8kb 片段的重组噬菌体, 以 V_K 和 J_K 作探针分别进行点杂交, 结果都为阳性, 进一步说明了 2.8kb 片段是经过重排的轻链可变区基因。将这一 2.8kb 片段克隆到 pUC19 中, 得一重组子, 命名为 pVLD24。利用 PCR 扩增技术从 pVLD24 中扩增出预期的 334bp 轻链 V 基因。综合以上实验结果, 证实了所鉴别得到的功能性轻链可变区基因是完整的基因。此外, 还利用不同的限制性内切酶绘制了这一功能性基因的酶切图谱。

1) 本文为国家 863 高科技生物技术领域资助课题。

2) 中国预防医学科学院病毒学研究所。

定点突变改造 M13 噬菌体

杨 青 熊 伟 桂 进 熊曦明
宋海燕 徐乃正 黄华梁

为了构建附着型表达载体,首先要在丝状噬菌体 M13 Gene III N-端改变 3 个碱基,以获得两个限制性内切酶的位点。

按照 Kunkel 的方法,选用 *E.coli dut⁻ung⁻*(即不含脱氧尿苷三磷酸酶 dUTPase 和尿嘧啶 DNA 葡萄糖苷酶)的菌株进行操作。dUTPase 的作用是水解 dUTP 生成 dUMP 和焦磷酸; dUMP 是 TTP 生物合成的前体,因而缺乏 dUTPase 导致 dUTP 的增加和 TTP 的减少。而尿嘧啶 DNA 葡萄糖苷酶是从 DNA 中去除尿嘧啶的酶,它能水解掉 DNA 中 dUMP 残基上的尿嘧啶,产生无嘧啶位点 (AP),然后由另外的酶将之切除,修复成 TMP 残基,这在 *ung⁻*型菌株中则不能实现。所以在 *E.coli dut⁻ung⁻*型菌株中, dUTP 能与 TTP 竞争掺合到 DNA 中,从而使新合成的 DNA 链中含有较多由“U”替代了“T”的核苷酸残基,却不会被除去。这样制备的 M13 单链 DNA 就是含 U 的模板 DNA。对于体外突变反应来说,由于模板中 dUMP 与 TMP 一样都与 dAMP 配对,而且尿嘧啶的存在并不抑制体外 DNA 的合成,因此,这种含 U 的 DNA 可用来作为模板,在体外合成只含有 TMP 而不含 dUWP 的互补链,转染 *E.coli dut⁺uut⁺*菌株,同尿嘧啶 DNA 葡萄糖苷酶水解掉模板链中的尿嘧啶,产生许多无嘧啶位点 (AP),这些 AP 位点阻碍 DNA 合成,因而是致死损伤。由 AP 内切核酸酶切掉这些位点产生很多缺口,模板链因此而失去生物学活性。这样,在 *E.coli dut⁺ung⁺*菌株中, DNA 复制只能以负链为模板,产生的后代为突变型。

根据上述原理,我们用 M13 RF DNA 转染 *E.coli dut⁻ung⁻*型菌株,挑选单个噬菌斑,感染 *E.coli dut⁻ung⁻*型菌株,挑选单个噬菌斑,感染 *E.coli dut⁻ung⁻*菌株,培养基中加入尿嘧啶,提纯的模板经电泳鉴定后,转染 *E.coli dut⁻ung⁻*菌感受态细胞,没有噬菌斑产生,说明模板较纯。将待突变的 M13 单链 DNA 与经磷酸化的 45 个寡核苷酸引物混合,退火,加入 4 种 dNTP、T4 DNA 聚合酶进行负链延伸,电泳鉴定有负链合成;加入 T4 DNA 连接酶连接,转染 *E.coli dut⁺ung⁺*菌株,得到了 30 个噬菌斑,现在正在进行筛选鉴定。