

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

1985

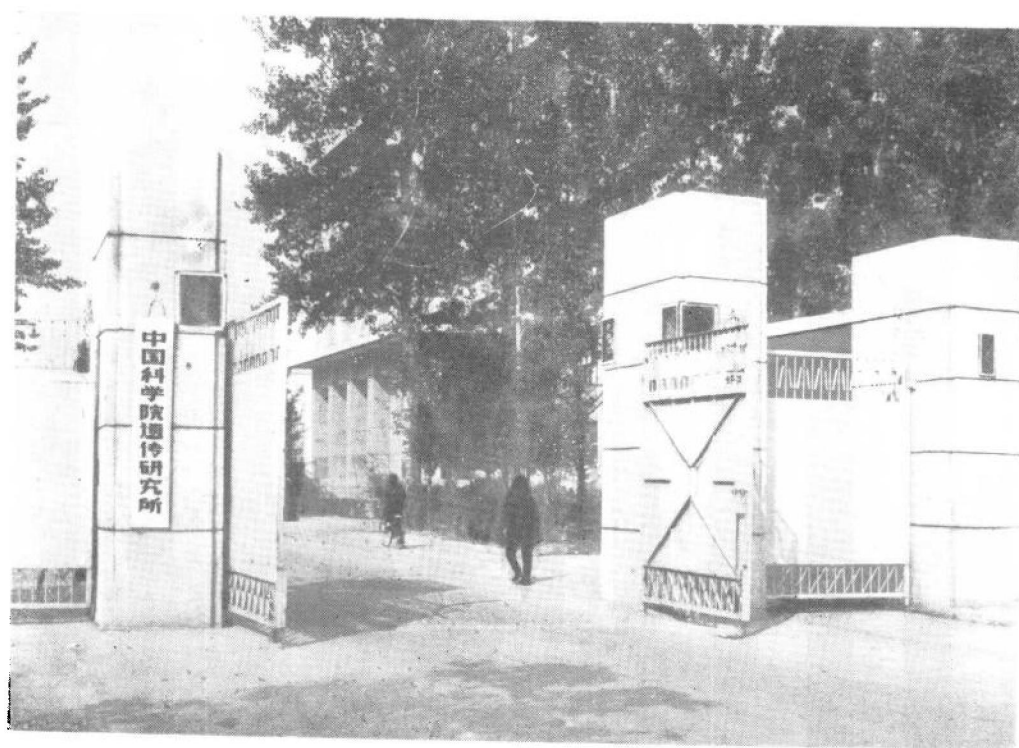
(第7年出版)

科學出版社

1986

57275

中国科学院遗传研究所
研究工作年报
(1985)



《研究工作年报》编辑委员会
科 学 出 版 社
1986

C0129804



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)

中国科学院遗传研究所
《研究工作年报 (1985)》
《研究工作年报》编辑委员会

*

科学出版社 出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂 印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1986 年 9 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1986 年 9 月第一次印刷 印张: 10 1/4 插页: 1
印数: 0001—2,400 字数: 230,000

统一书号: 13031·3332
本社书号: 5395·13—6

定价: 2.50 元

《研究工作年报》编辑委员会

胡 含 邵启全

(以下按姓氏笔划)

王苏生 叶 晓

孙永华 朱立煌

杜若甫 李向辉

李继耕 陈 英

周宪庭 欧阳俊闻

梁正兰 梁 宏

童克忠 蒋耀青

前 言

一九八五年,我所科研工作改革的基礎上向前发展。全所在分子遗传学和遗传工程、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、群体遗传学与进化遗传学、医学遗传学、动物发育遗传学和应用遗传学诸领域开展研究工作,取得了成果与进展。在科研成果的开发方面,取得了较大的效益。本期年报共收集报告 139 篇。

在分子遗传学和遗传工程领域,克隆和鉴定了龙葵抗除莠剂基因;建立了 Ti 质粒和菠菜叶绿体 DNA 的基因文库;研究了 SF-38 蛋白质因子的性质和对 DNA 离体转录的影响;获得了大豆花叶病毒和 H-Y 抗原的单克隆抗体;通过对 λ 成斑率的影响的研究,说明核糖体蛋白质 S12 影响 λ 噬菌体 N 基因的表达;初步探明了 L615 细胞的癌化基因可能是 *ras* 基因。

在单倍体及其遗传变异和植物体细胞遗传学研究方面,通过远缘杂种的花药培养,除获得多种变异体外,还获得了相对稳定的 $2n=46$ 异源代换附加系小麦新类型;研究了杂种中染色体的传递与重组;建立了麦类幼穗、豆科牧草原生质体和芥菜型油菜原生质体再生植株的培养方法;探讨了胚性细胞无性系的保持及保存过程中倍性及结构的变异。

植物细胞质遗传学,主要从叶绿体 DNA、膜蛋白、热激蛋白和同工酶等方面探讨了雄性不育的机理;研究了细胞质对杂种某些性状的影响。

群体遗传学与进化遗传学研究,继续进行我国少数民族多项指标的调查;从核型、同工酶分析以及叶绿体 4.5S RNA 的核苷酸顺序诸方面探讨了生物进化问题。

医学遗传学,研究了核苷酸对染色体热点的影响,并探讨其分子机理;用细胞学方法检测环境中遗传毒理因子的影响;试验了用激光激光束照射单细胞的技术,比较了各光敏剂的药效。

此外,从棉酚对大鼠精子蛋白组成和对 LDH-X 活性的影响探讨了其节育机理。培育了玉米新品种。试验成功了甘薯、马铃薯优健高增产法。改良并建立了同位素快速荧光自显影方法。试验了用三维电泳分析绒毛和蜕膜细胞蛋白质。

一九八五年,我所科研人员在国内外近 30 种刊物上共发表论文 73 篇。参加国内外各种学术会议 49 人次,提供论文和报告 56 篇。来自美国、西欧、日本、加拿大以及朝鲜、泰国、孟加拉、菲律宾、匈牙利、塞内加尔和墨西哥等 21 个国家和地区的 106 名科学家访问了我所,其中 11 位科学家在我所作了学术报告。这些都促进了我所与国内外的学术交流。

一九八五年,我所与协作单位合作,共获各种奖励的科研成果有 17 项;申报请奖的成果有 12 项。

胡 含 邵启全

1985 年 12 月

目 录

一、分子遗传学和遗传工程

- Ti 质粒 pGV2206 基因文库的建立及含 2,020 pb T-DNA 片段克隆的筛选.....朱 祯、李向辉 (1)
- 利用反转克隆的方式克隆出广泛寄主型质粒 pSa秦长乐、李向辉 (2)
- 荧光法鉴定龙葵的阿特拉津抗性植株及其叶绿体 DNA 的初步分析朱立煌、李 诺、岳绍先、翟文学、朱荣焕 (3)
- 龙葵抗阿特拉津基因的克隆.....朱立煌、胡乃璧、李 诺、翟文学、岳绍先 (4)
- 甘薯对阿特拉津抗性的研究.....李 诺、朱立煌、翟文学、李小兵、胡乃璧 (5)
- 菠菜叶绿体 DNA 基因文库的建立.....朱荣焕、李小兵、翟文学、朱立煌、胡乃璧、李 诺 (6)
- 菠菜叶绿体基因组的两个 *Sal* I 片段的克隆及其初步研究李小兵、胡乃璧、翟文学、朱荣焕、朱立煌、李 诺 (7)
- 菠菜 *atp* A 基因的探针制备和克隆胡乃璧、翟文学、李小兵、朱荣焕、朱立煌 (8)
- 高等植物细胞器 DNA 和原核生物 DNA 的同源性王 斌、高 浩、刘连瑞、李继耕 (9)
- 克隆化玉米线粒体 DNA 离体转录因子的研究.....王 斌、程 文 (10)
- 抗三株大豆花叶病毒的单克隆抗体.....宁益华、陈 艾、黄华樑、柏慧霞、张性坦、林建兴 (11)
- 植物毒蛋白和免疫毒刘连瑞 (12)
- 蓖麻毒蛋白的分离和性质测定.....刘连瑞、王恢鹏、冯 尚、杨涛兰、王 刚 (13)
- 用双重抗体法提取半野生大豆 7S 贮藏蛋白 mRNA陈建南、杨晓辉、冯国宏、李海民 (14)
- 从鹅绒委陵菜中发现一组高赖氨酸植物蛋白.....舒群芳、王苏生、杜保兴 (15)
- 核糖体蛋白质 S12 影响 lambda 噬菌体 *N* 基因的表达.....童克忠、王 玮 (16)
- 改建穿梭质粒 pRW101.....朱小荣、章银梅、汤慧斌 (17)
- 筛选枯草杆菌 Ki-2-132r⁻m⁻ 突变株指示噬菌体的选择汤伏生、汤慧斌 (18)
- 抗 H-Y 抗原单克隆抗体的研究黄华樑、宁益华、陈 艾、陈秀兰、谭丽玲、孟春玲 (19)
- 蛋白酶缺陷型的分离.....李明凤、汤慧斌、范树田 (20)
- L615 细胞的癌基因研究.....刘连瑞、杨涛兰 (21)
- 苜蓿根瘤菌固氮基因转入水稻根系菌.....王毓琦、周 枫、刘良式 (22)

二、单倍体及其遗传变异

- 六倍体小黑麦与普通小麦杂种 F₁ 花粉植株中黑麦染色体的传递与重组.....陶跃之、胡 含 (23)
- 通过花药培养得获 2n = 48 小麦植株新类型.....陶跃之、胡 含 (24)
- 六倍体小黑麦与普通小麦杂种混数体植株后代的细胞遗传学研究苗中和、周新松、陶跃之、廖兰杰、郗子英 (25)
- 由远缘杂种花药培养快速获得带有异源染色体的遗传变异体.....苗中和、王亦兵、胡 含 (26)
- 普通小麦 (6x) × 硬粒小麦 (4x) 杂种 F₁ 代花药培养的研究景健康、郗子英、胡 含 (27)

去氧葡萄糖促进小麦愈伤组织的形成	曾君祉 (28)
一些因素对籼稻花药培养诱导率的影响	田文忠、郑世文、陈 英 (29)
小麦未传粉子房培养及其单倍体植株无性系的保存与繁殖	祝仲纯、吴海珊、乔跃民 (31)
由未传粉马铃薯子房培养获得双单倍体植株	陶自荣、刘敏领、祝仲纯 (32)
来源于不同基因型玉米的花粉胚性细胞系的倍性变异	谷明光、丁玉澄 (33)
在长期继代培养的玉米花粉胚性细胞系的染色体上异染色带变异	谷明光、丁玉澄 (34)
油菜花粉植株的加倍处理及移栽技术	张丽华、张铁汉、陈正华、李文彬 (35)

三、植物体细胞遗传学

离体幼穗培养高频率获得小麦再生植株	赵铁汉、胡 含 (36)
麦类植物幼穗培养诱导植株再生及再生能力保持的研究	陈 英、张小玲、李良材 (37)
小麦幼胚培养体细胞胚胎发生及再生能力保持的研究	陈 英、张小玲、李良材 (38)
利用液体振荡培养保持及恢复水稻愈伤组织再生为植株的能力	李良材、陈一明、陈 英 (39)
小冠花原生质体和外植体植株的再生	吕德扬 (40)
豆科牧草百脉根原生质体培养体系的建立	吕德扬、颜岐山、陈一明、陈 英 (41)
芥菜型油菜原生质体培养体系建立的初步结果	吕德扬、王 超、李良材、陈 英 (42)
紫苜蓿选株 MS9-6 性状的初步观察	吕德扬、孙 彤、颜岐山、张 涛 (43)
芥菜型油菜原生质体再生成完整植株	李文彬、陈正华、宋玉华、张大卫 (44)
重瓣和单瓣矮牵牛的快速繁殖	郑万珍、王保华 (45)
重瓣大岩桐的快速繁殖	关月兰 (46)
花叶芋组织培养的研究	黄娇香、关月兰 (47)
Neocarjinstatin 诱发植物细胞染色体畸变	谷爱秋、耿玉轩、周祉祺 (48)
普通烟草和拟矮牵牛体细胞杂种无性后代的分析	黄美娟、张 伟、李向辉 (49)
抗链霉素的烟草 SRI 叶肉原生质体再生植株	张 伟、黄美娟、李向辉 (50)
由根癌农杆菌转化烟草原生质体再生植株	张俊龙、李向辉 (51)
西洋参花蕾体细胞再生植株的诱导	李安生、邵启全、傅志明、杜令阁、陈艳华 (52)
含 T-DNA 的龙葵不定芽发生的细胞学研究	蒋兴邨、邓万银、李金国、王小林、张 敬、陈永强、邵启全 (53)
根癌农杆菌对中国大白菜的致瘤效应及其瘤组织的体外培养的结果初报	冯新华、邵启全、蒋兴邨 (54)
烟草叶肉原生质体电诱导融合研究	赵世民、陈家玉、徐金相、刘祥昌、李 陶 (55)
马铃薯不同部位愈伤组织的诱导及植株再生	左秋仙、李淑媛、林自安、以 凡 (56)

四、植物细胞质遗传学

萝卜细胞质雄性不育系及保持系叶绿体 DNA 内切酶谱比较	王 虹、周长久、张友良、李继耕 (57)
萝卜不育系和保持系叶绿体类囊体膜蛋白质分析	李 玉、陈湘宁、耿玉轩、张友良、李继耕 (57)
油菜不育系和保持系叶绿体 DNA 酶切图谱比较	高 洁、孔繁瑞、李继耕 (58)

小麦和水稻花药培养中白化突变体叶绿体膜蛋白质的分析	陈湘宁、李玉湘、耿玉轩、李继耕 (59)
高粱雄性不育系的热激反应 I. 高粱雄性不育系经热激处理后蛋白质的变化	李京京、张孔湛 (60)
高粱雄性不育系的热液反应 II. 非高粱雄性不育系热激处理后几种工酶的变化	李景京、张孔湛 (61)
通过非配子融合转移基因的作物育种 III. 非配子融合转移小麦粒色基因试验	张孔湛、刘根齐、李登春、石社民 (62)
小麦不育系与恢复系杂交过程中引入外源 DNA 机理的探讨	李京京、张孔湛 (63)
利用恢复系花粉匀浆处理转移可育基因培育小麦恢复系的研究	刘根齐、张孔湛、郭志远、弓陆身 (64)
不同类型小麦三系的比较 I. 芽、叶、穗中的同工酶变化	王培田、张韶辉 (65)
不同类型小麦三系的比较 II. 花药中的同工酶变化	王培田、张韶辉 (66)
小麦粘型雄性不育性的特征	王培田、张帆、张韶辉 (67)
小麦几种细胞质雄性不育系的比较研究	王培田、张韶辉、张帆 (68)
一对稳性基因控制的节节麦细胞质小麦雄性不育材料的分析	张炎、吴郁文、张翠兰 (69)
小麦品质改良中的细胞质效应	吴郁文、张炎、张翠兰 (70)
种间杂交获得秋播早熟优质小麦	张翠兰、张炎、吴郁文 (71)
小麦种间杂种的成株率和类型形成	张翠兰、吴郁文、张炎 (72)
五种细胞质小麦越冬性的表现	吴郁文、张翠兰、张炎 (73)
尾形山羊草细胞质诱发普通小麦雄蕊心皮化的多型性	吴郁文、张翠兰、张炎 (74)

五、群体遗传学与进化遗传学

湘西苗族五种红细胞血型系统的分布	金锋、赵红、杜若甫 (75)
腺苷脱氨酶、腺苷酸激酶在彝、藏、满族中的多态分布	赵红、杜若甫 (76)
葡萄糖磷酸变位酶-1在彝、藏、满族中的多态分布	赵红、杜若甫 (77)
彝族、藏族、满族的乙二醛酶 I 多态性研究	李实喆、杜若甫 (78)
六个少数民族四种红细胞酶的基因频率	徐玖瑾、赵晓曦、杜若甫 (79)
彝族的红细胞血型分布	艾琼华、袁义达、杜若甫 (80)
白、苗、土家、彝族组特异性成分亚型的研究	徐玖瑾、艾琼华、赵会全、杜若甫 (81)
藏族中红细胞血型系统的分布	艾琼华、赵红、战文惠、杜若甫 (82)
满族的红细胞血型调查	艾琼华、李实喆、杜若甫 (83)
鸡的血型研究 VI. 蛋用鸡品系种群关系分析	程光潮、吴丽城、段章雄、张婷、郑小惠、王力、刘坤凡、单崇浩、常景舍、王恒星 (85)
鸡的血型研究 VII. 边鸡、大骨鸡种群关系分析	程光潮、吴丽城、段章雄、王力、刘坤凡、李生祥、张宏魁 (86)
甘肃省民乐县新石器时代遗址的古代炭化小麦	李璠 (87)
大麦叶绿体 4.5 S rRNA 核苷酸序列测定	张虹、李璠 (88)
中国几种野生稻种和农家稻种的核型分析	吴家馨、李璠 (89)

中国几种野生稻种和农家稻种的同工酶分析	吴家睿 李 璠 (90)
我国几种野生稻种染色体核型观察	李敬仪 李 璠 (91)

六、医学遗传学

两个人群中脆性 X 综合征的发病率	周庭亮、肖桂芳、许碧珍、王 会 (92)
人类染色体热点 IV. 尿苷对热点和脆性 X 染色体的影响	李 宁、周宪庭 (93)
人类染色体热点 V. 四种核苷对染色体的影响	李 宁、吴 晔、周宪庭 (94)
石油化学工人的姐妹染色单体交换 (SCE) 的研究	崔梅影、于瑞芳、阎祖安、周宪庭 (95)
石油化学工人染色体畸变的研究	李立容、李 琳、周宪庭 (96)
服用抗癫痫药物对人体染色体的影响	李 宁、周宪庭 (97)
利用激光微束照射单细胞技术测定叶绿素衍生物的药效	
..... 梁 宏、王兰岚、陆仲康、宋桂英、金秀莲 (98)	
HcLa 细胞摄入几种 HPD 后的扫描电镜观察	欧笑兰、邓燕华、梁 宏、陆仲康 (99)
HPD 加激光照射单细胞的扫描电镜观察	邓燕华 欧笑兰、梁 宏、陆仲康 (100)
用激光微束照射单细胞技术对扬州光卞喹的药效测试及合理生产工艺条件的探讨	梁 宏、王兰岚、陆仲康、宋桂英、欧笑兰、邓燕华、徐正平 (101)
激光微束照射对几种 HPD 药效的比较研究	
..... 梁 宏、王兰岚、陆仲康、宋桂英、邓燕华、欧笑兰、徐正平 (102)	

七、动物发育遗传学

金鱼异柠檬酸脱氢酶的多态性与基因加倍	罗荆中、王春元 (103)
紫外线诱导金鱼雌核发育的研究	王春元、李延龄、金瑞菱、王长城 (104)
激光照射金鱼早期胚胎的致畸作用	陆仲康、梁 宏、王春元、徐正平 (105)
男用节育药棉酚对大鼠精子蛋白质组成的影响	吴 鉴、蒋耀青 (106)
男用节育药棉酚对鼠类 LDH-X 活性的影响	吴 鉴、蒋耀青 (107)
小鼠 8 细胞期胚胎超低温 (-196℃) 冷冻保存	白琴华 (108)

八、应用遗传学

玉米与二倍体多年生大刍草杂种后代的过氧化物酶同工酶的电泳分析	
..... 何德浩、谷明光 (109)	
青饲多秆多穗玉米体细胞突变体筛选的研究 II. 体细胞胚胎发生的研究	
..... 刘纪华、施介村、王亚辉、周文娟 (110)	
粮饲兼用玉米单交种——科单 102 号进入生产试验	曾孟潜、杨太兴 (111)
青饲青贮玉米“京多 1 号”的选育及其在生产上的应用	
..... 施介村、叶 晓、覃作干、王绪田、刘纪华、周文娟 (112)	
马铃薯离体花药培养成株的研究	李淑媛、左秋仙、林自安、以 凡 (113)
甘薯、马铃薯优健高增产法在北京连续试验成功	以 凡、杜述荣、林自安、许丽萍 (114)
甘薯淀粉形态特征的遗传趋势	王文质、许丽萍、杜述荣、以 凡 (115)
利用种子分类法探索马铃薯选种后代的早期鉴定	林自安、金德敏、以 凡 (116)

^{60}Co γ 射线辐射甘薯配子诱导变异·····	魏秀玲、许丽萍、以 凡 (117)
实验小鼠结合珠蛋白的研究·····	王东江、白琴华 (118)

九、技术与方法

动物组蛋白及其氨基酸的高分辨核磁共振研究·····	袁传照、吴 军、陈德俊 (119)
血红素蛋白质的高分辨核磁共振研究·····	袁传照、程光潮、戴培林、肖圣前、陈德俊 (120)
核酸甲基化的高分辨核磁共振研究·····	袁传照、曾伟强、肖圣前 (121)
银染蚕豆核仁组织形成区的细胞学观察·····	袁淑安 (122)
凝胶中 ^1H 、 ^{13}C 及 ^{35}S 同位素测定的快速荧光自显影方法·····	王苏生、周 芬 (123)
用双向电泳和硝酸银染色法对糖尿病人血清蛋白的电泳分析·····	程 文、王 斌、袁绍仁 (124)
绒毛和蜕膜细胞蛋白质的三维电泳分析·····	林友刚、汤火顺 (125)
FPLC、NMR 及 IEF 在生物工程后工序中的应用·····	曾伟强、袁传照、杨秀琴 (126)
Percoll 不连续密度梯度离心分离生精细胞·····	吴 鉴、蒋耀青 (127)
微型计算机 TRS-80 在遗传学某些课题中的初步应用·····	吴 军、袁传照 (128)
一种检测 H-2 抗原的微量细胞毒试验方法·····	魏志强 (129)
百脉根子叶结构的扫描电镜研究·····	贾敬鸾、吕德扬 (130)
甘薯提取物治疗白血病疗效的初步观察·····	
····· 刘连瑞、王 刚、冯 尚、杨涛兰、以 凡、林自安、魏秀玲、王文质、许丽萍 (131)	
植物高分子量核 DNA 的简易分离纯化·····	朱 祯、秦长乐、李向辉 (133)
油菜单位体苗形成过程中硫苷含量及芥子酸活性测定·····	桑建利、陈正华、张大卫、李文彬 (134)
油菜离体培养物硫苷含量测定方法的研究·····	桑建利、陈正华 (135)
油菜离体培养物芥子酶活性测定方法的研究·····	桑建利、陈正华 (136)
四倍体宁夏枸杞绿枝扦插繁殖实验·····	牛德水、蒋兴邨、邵启全 (137)
几种枸杞抗病性的人工接种鉴定·····	牛德水、邵启全、秦金山、王 莉、郭晋华、王大桢 (138)
小麦一年繁殖三至五代的简易方法·····	王培田、张 帆、潘湘民 (139)
331 型薯粉生产新工艺的研制·····	以 凡、林自安、杜述荣 (140)
246 型薯脯生产新工艺的研制·····	以 凡、林自安、杜述荣 (141)
已发表的论文及著述·····	(142)
成果和奖励·····	(146)

国际国内学术交流

国内学术活动·····	(149)
国际性学术活动·····	(152)
外国专家来我所做的学术报告·····	(154)

Ti 质粒 pGV2206 基因文库的建立及含 2,020 pb T-DNA 片段克隆的筛选

朱 祯 李向辉

用 Kado 的 PEG 沉淀法及 CsCl 梯度离心法分离和纯化了 Ti 质粒 pGV2206 (它是由 pTiB6S3 衍生来的质粒, 是由 *E. coli* 质粒 pGV1106DNA 取代了 pTiB6S3 的 *Eco*RI-32 片段构成的)。又用碱性 SDS 法及 CsCl 梯度离心法分离和纯化了 *E. coli* 质粒 pBR322。用 *Bam*HI 限制性内切酶分别对二者进行酶解。将二者酶切片段混合, 连接成重组 DNA。

以重组 DNA 转化受体 *E. coli* SK1592。用氨苄青霉素 (Ap^r) 筛选得到 1.8×10^4 Ap^r 转化子/ μ g 重组 DNA。由 1,876 个 Ap^r 克隆中检出 320 个具有 Ap^r 标记和对四环素敏感 (Tc^s) 标记者。证明 Ap^r Tc^s 转化子载有重组的质粒。

又用卡那霉素 (Km) 对上述 320 个有 Ap^r Tc^s 的克隆进行筛选, 从中得到了 4 个 Ap^rKm^r 克隆。对其中之一 pAK 重组质粒进行限制性内切酶分析, 并构成了它的物理图谱。用 *Bam*HI 酶切 pAK, 产生两个片段, 分子量均为 4,360pb。用 *Eco*RI/*Bam*HI 酶解, 产生 4 个片段, 其分子量分别为 3,990、370、2,340 及 2,020pb。重新连接、转化, 得到两类重组体。其中一类在 pBR322 的 *Eco*RI/*Bam*HI 位置内插入了 2,340pb 片段; 另一类插入了 2,020pb 片段。前者含有 2,340pb 片段的重组体, 具有 Ap^r Km^r 标记; 后者只具有 2,020pb 片段的重组体, 只有 Ap^r 标记。所以表明, 2,020pb 片段系来自 pTiB6S3 *Bam*HI-8 片段右端序列, 而 2,340pb 片段系来自 pGV1106 序列。

利用反转克隆的方式克隆出广泛寄主型质粒 pSa

秦长乐 李向辉

Ti 质粒 pGV 2206 含有一个完整的微型 pSa 质粒——pGV1106。pGV1106 分子量为 5.8Md, 具有卡那霉素(Km)和链霉素(Sm)抗性, 并具有 *EcoRI*、*BamHI*、*KpnI* 等 6 种内切酶的单一酶切点。其中 *EcoRI* 酶切点位于 Sm^R 区域内, *KpnI* 酶切点位于 Km^R 区域内。由于在 pGV2206 中, pGV1106 是以 *EcoRI* 酶切点的两端与 T-DNA 相连, 所以 pGV2206 的表型为 $Km^R Sm^s$ 。pGV1106 既可以在大肠杆菌体内也可以在农杆菌体内复制, 是植物遗传工程中一个有价值的基因载体。

为了获得 pGV1106, 采用了反转克隆的方式, 其过程和结果如下。

pGV2206 质粒 DNA 的提取。采用了一种较为快速和简便的方法。离心收集处于对数生长中期的菌体(1,000 ml LB 培养液, 30℃ 下振荡培养), 悬浮于 20ml GTE 缓冲液中(pH8.0), -20℃ 冻融。加入 5ml 0.5M EDTA, 60ml 裂解液(2% SDS, 0.15N NaOH), 在室温下缓慢搅动, 得到清亮裂解液后调 pH 值到 12.6, 然后加入 10ml 2M Tris-HCl (pH5.0) 使 pH 值降至 8.5。加入等体积的酚和氯仿(1:1 V/V)抽提蛋白。上清液经电泳后, 在紫外光下即可见到清晰的质粒带。用 PEG 6,000 或异丙醇沉淀 DNA。将沉淀溶于 12ml TE 中, 再经过两次氯化铯密度梯度离心, 即可得到纯净的质粒 DNA。

pGV2206 质粒 DNA 的酶切、连接和转化均按照《分子克隆》一书给出的方法进行。转化受体菌株为 SK1592 和 C600。选择培养基含有 Km(25 µg/ml) 和 Sm(25 µg/ml)。纯化的 pGV2206 质粒 DNA 用 *EcoRI* 彻底水解再用 T4-DNA 连接酶连接后, 转化受体菌。在 Km 选择培养基上选出 400 多个 Km^R 转化体。这些转化体转接到 Km、Sm 选择培养基上后, 80% 的表型为 $Km^R Sm^R$ 。其余表型为 $Km^R Sm^s$ 。

提取 $Km^R Sm^R$ 转化体 DNA 进行电泳测定, 发现含有 1 个质粒。该质粒分子量为 5.8 Md, 具有单一的 *BamHI* 酶切点。这些都与 pGV1106 的特征相同。对一些 $Km^R Sm^s$ 转化体 DNA 进行电泳测定时发现, 这些转化体所含质粒的分子量大小不等, 但都大于 5.8Md。这些质粒可能含有 Ti 质粒 DNA 片段。

荧光法鉴定龙葵的阿特拉津抗性植株及其 叶绿体 DNA 的初步分析

朱立煌 李 诺 岳绍先¹⁾ 翟文学 朱荣焕

阿特拉津 (Atrazine) 是均三氮苯类除草剂较常用的一种, 在我国北方地区广泛地用于玉米田的除草。这类除草剂对大豆和小麦等作物有药害, 但在一些野草中已发现对阿特拉津有抗性的植株类型 (Biotype)。发现抗性植株的一般途径是直接施用除草剂, 对存活的植株进行进一步的鉴定。已知均三氮苯类除草剂的靶蛋白是叶绿体类囊体膜上的分子量为 32kd 的膜蛋白, 它参与光系统II中光激活的电子转移过程。当除草剂与该蛋白结合时, 这种光能经电子转移的过程就被阻断, 由叶绿素吸收的光又以长波荧光的形式发出。根据这个原理可以用荧光法同时对大量的植株叶片进行筛选和鉴定, 因为在同样的条件下, 抗性植株的叶片能正常地进行光合作用, 不产生荧光。荧光测定法的简单步骤如下。

1. 配制 pH6.6 0.2M 磷酸钠缓冲液, 将阿特拉津稀释成 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 等一系列不同的克分子浓度。

2. 剪取植株光合作用最强的叶片, 在 10°C 以上的温度条件下浸泡在阿特拉津溶液中处理 1—2 个小时, 具体时间随材料而异。

3. 将处理过的叶片经水冲洗后, 置于强的光照下受照 20 分钟。

4. 用滤纸将叶片表面吸干后, 放在 300—360 μm 波长的紫外光下照射, 照射时叶片的下表面朝上。

5. 通过红色滤光片用肉眼观察或用照像机摄影。

用上述方法鉴别的龙葵抗性类型, 在直接施用除草剂时, 确实表现出抗性的特征, 而且这种性状是母体遗传的。用改进的 Gressel 氏的提取方法, 我们从对阿特拉津抗性和敏感的两种植株的叶片中, 分别提取和纯化了叶绿体 DNA。每批用 20 克叶片, 叶绿体 DNA 的收率为 5 微克左右。用 *Xho*I 和 *Bam*HI 等限制性内切酶对这二种类型的叶绿体 DNA 进行限制性图谱分析, 未见任何差异。这与 Goloubinoff 和 Edelman 的报告是一致的, 即龙葵的抗性基因与敏感基因只涉及一个密码子的差异。因此进一步的分析有待于对基因的克隆和序列测定。

1) 中国农业科学院作物育种栽培研究所。

龙葵抗阿特拉津基因的克隆

朱立煌 胡乃璧 李 诺 翟文学 岳绍先¹⁾

从抗阿特拉津的龙葵植株的幼嫩叶片中制备并纯化叶绿体 DNA, 用限制性内切酶 *Bam*HI 消化叶绿体 DNA 得到的 *Bam*HI 片段, 与经 *Bam*HI 切割的大肠杆菌质粒 pBR322 DNA 连接, 然后转化大肠杆菌受体菌株 RRI 细胞, 筛选出抗氨苄青霉素和对四环素敏感的克隆 54 个, 在此基础上建立起龙葵叶绿体 DNA 的基因文库。经限制性内切酶的酶解和电泳分析, 证实了 pSB35 克隆的重组体质粒含有一段 5kb 的龙葵叶绿体 DNA。早先的研究已经证明正常的(对阿特拉津敏感的)龙葵植株的 *psbA* 基因, 亦即阿特拉津敏感基因, 是位于这个 5kb 的 *Bam*HI 片段上的。我们用烟草的 *psbA* 基因 DNA 制备 ³²P 标记的探针, 与克隆 pSB35 的插入片段进行分子杂交, 放射自显影的结果表明, pSB35 克隆的重组质粒确实含有抗阿特拉津的 *psbA* 基因。

1) 中国农业科学院作物育种栽培研究所。

甘薯对阿特拉津抗性的研究

李 诺 朱立煌 翟文学 李小兵 胡乃璧

据估计在自然状态高等植物的阿特拉津抗性植株出现的机率是 10^{-10} , 因此在通常的条件下是难以发现这种抗性类型的, 迄今为止未见报道在栽培作物中有天然存在的抗性类型。鉴于阿特拉津的抗性基因在叶绿体基因组中, 推测在以无性繁殖方式传代的作物如甘薯中, 体细胞的突变基因会以更大的机率被保存和繁衍下来。为此我们用荧光法对 15 种不同的甘薯品种和品系进行了初步的研究和比较, 发现在用不高于 $10^{-5}M$ 的阿特拉津处理时, 遗字 138 甘薯的叶片不产生荧光, 而其他品种和品系都产生程度不等的荧光。这种现象在用同一植株的同一叶片(半片作对照, 半片作处理时)尤明显。

为了进一步验证这种荧光现象与植株对阿特拉津抗性的关系, 又进行了盆栽植株的喷药对比试验。试验的品种为遗字 138 (用 $10^{-5}M$ 阿特拉津处理不产生荧光)和丰黄(用 $10^{-5}M$ 阿特拉津处理有明显的荧光)。每个品种各栽 8 盆, 每盆 5 株, 4 盆喷药处理(阿特拉津喷液的浓度为 $10^{-4}M$), 另 4 盆作为不施药的对照。观察表明, 在一次喷药后, 遗字 138 未出现枯黄叶, 丰黄则有枯死叶。多次喷药后, 遗字 138 的长势受轻度影响, 而丰黄植株的叶片全部枯死。由此可见在甘薯中阿特拉津处理后的荧光现象与植株的抗性是有关的。进一步的研究需要比较两者叶绿体 DNA 的差异。

此外在实验中, 我们还意外地发现, 在遗字 138 品种的一次用药组中, 平均每盆薯块的产量为 406.5 克, 而对照组只有 295 克。对于这一现象及其生产意义的验证, 有待于更大范围的试验。

菠菜叶绿体 DNA 基因文库的建立

朱荣焕 李小兵 翟文学 朱立煌 胡乃璧 李 诺

为制备菠菜叶绿体基因组中编码类囊体膜 32K 蛋白质的基因探针, 有必要先建立一个叶绿体 DNA 的基因文库。用限制性内切酶 *SalI* 消化菠菜叶绿体 DNA 共产生 11 个片段, 该基因包含在其中的一个片段中。由于 *SalI* 在 pBR322 质粒 DNA 中只有一个切点, 而且位于四环素抗性基因内, 因此用 pBR322 作载体, 可直接应用插入失活的方法筛选重组体克隆。按照 $N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$ 的理论公式, 估计只要获得 30 个重组体克隆就足以包括叶绿体的全部基因组。在这样的文库中, 含任一基因的概率达 99%。鉴于 pBR322 质粒载容外源 DNA 片段的大小一般不超过 10kb, 实际上建立的文库容量应大于理论数 30。为了提高在连接反应中形成重组体分子的比例, 我们还根据 Dugaiczky 等人建立的方程 $[DNA] = \frac{51 \cdot \text{liter}}{(j/i)(MW)^{0.5}}$, 并通过试验确定了连接反应中 DNA 的最佳浓度, 从而提高了反应的产率。实验中我们采用常规的重组体 DNA 技术, 共获得 52 个阳性克隆(氨苄基青霉素抗性, 四环素敏感)。再用重组质粒快速的碱性制备法, 分别分离这些克隆的质粒 DNA, 并经 *SalI* 内切酶消化。电泳的结果表明, 在重组体克隆中插入的不同的 DNA 片段在长度上与菠菜叶绿体 DNA 的 *SalI* 片段是吻合的。分子杂交的试验也得到了肯定结果。

菠菜叶绿体基因组的两个 *SalI* 片段的克隆 及其初步研究

李小兵 胡乃璧 翟文学 朱荣焕 朱立煌 李 诺

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器,具有独立复制的遗传物质,大多数高等植物叶绿体 DNA 的长度均在 120—180kb 的范围内。在研究得最清楚的菠菜叶绿体 DNA 上已经定位了至少13个编码蛋白质多肽的基因,20 多个 tRNA 基因和 1 组反向重复的核糖体 RNA 基因。从理论上估计叶绿体基因组的编码容量应远远超过业已鉴定和证实的由叶绿体基因指令的多肽数目。有趣的是在叶绿体基因组的某些区段基因相当密集,而在另一些区段却尚未发现任何编码基因。对叶绿体 DNA 进行基因工程的必要前提是搞清叶绿体基因组的结构。为了实现这个目的,首先需要选择对叶绿体基因组中的一些有深入研究价值的片段进行克隆。在菠菜叶绿体 DNA 大的单拷贝区域中,有二个 *SalI* 片段分别体现了上述的二个特征,其中的一个 4.1kb *SalI* 的片段迄今未定位任何基因,另一个 5.2 的 *SalI* 片段编码二个完整的基因: 细胞色素 b/f 复合体的 b6 基因和亚单位 4 的基因,另外还编码 51kb 蛋白质的一部分。这二个片段相隔仅 0.7kb。因此克隆这二个片段对叶绿体 DNA 的基因工程有重要意义。

我们从本实验室建立的菠菜叶绿体 DNA 基因文库中,通过分子杂交的方法(见前文),鉴定出 pSS104 和 pSS247 二个克隆,前者含有 4.1kb 的 *SalI* 片段,后者含有 5.2kb 的 *SalI* 片段。这二个片段在 *E. coli* C600 受体菌株中长期传代的稳定性没有差别。已知高等植物叶绿体的基因与大肠杆菌的基因在启动子区域有很大的同源性,因此用大肠杆菌系统可以研究叶绿体基因的表达。但初步的实验未能证明 4.1kb 的 *SalI* 片段含有编码基因。