

中国科学院遗传研究所

研究工作年報

《研究工作年報》編輯小組

1983

(第5年出版)

科学出版社

1984



71422

中国科学院遗传研究所

研究工作年报

(1983)



《研究工作年报》编辑小组

科学出版社

1984

C0129788



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)

**中国科学院遗传研究所
《研究工作年报 (1983)》**

《研究工作年报》编辑小组

*

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

*

1984 年 7 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1984 年 7 月第一次印刷 印张: 9 插: 1

印数: 0001—3,550 字数: 202,000

统一书号: 13031·2664

本社书号: 3666·13—10

定价: 1.50 元

《研究工作年报》编辑小组

胡 含 邵启全

(以下按姓氏笔划)

叶 晓	孙永华
孙怀祖	杜若甫
李显文	李继耕
陈 英	林章祺
周霞仙	梁 宏
梁正兰	童克忠
蒋耀青	

前 言

一九八三年,全所职工在原有的工作基础上,在分子遗传学、遗传工程、单倍体遗传学、体细胞遗传和人类与医学遗传学等领域,在不同的水平和层次上继续深入进行研究,并取得了进展和成果。在基础研究、应用基础研究方面取得了进展,在发展研究方面取得了成绩。

在分子遗传学和生物engineering研究方面,证明了不同生物的 RNA 聚合酶 B 的免疫特性不同;获得了抗炭疽保护性抗原的单克隆抗体和大量核糖体蛋白突变体;重组了拷贝数增加和转化能力提高的质粒 pK 209-8;证明了 pK 307 是一个有潜力的枯草杆菌克隆系统质粒;在大肠杆菌中克隆了 pTiS1 质粒的 *Hin* d III 片段和叶绿体 DNA 片段;把 Ti 质粒转化到大豆和甜菜中,诱导结瘤,并证明 T-DNA 已整合进受体染色体中。

在单倍体遗传学方面,除继续改善条件、高频率获得诱导植株外,还成功地培育了一些作物的植株;获得染色体工程的有用材料;对雄核发育进行了生化与亚显微结构的深入研究;探讨了在细胞水平上筛选抗病突变体的可能性,开展了品质育种的研究。

在人类和医学遗传领域,初步确定了 3p14 是热点;发现了一个脆性 X 综合症家庭;人类遗传进行了多种酶和蛋白的分布及多态性研究,用 HLA 基因频率计算了人群间的遗传距离。

此外还进行了 BrdU 抗性细胞姐妹染色体区别染色的研究,初步探讨其抗性机理。确证了血卟啉和激光处理对 HeLa 细胞的杀伤效应。

在应用遗传方面,进行了快速繁殖的研究;培育了优良玉米自交系;建立了淀粉的快速简易测定法。进一步完善多穗玉米的推广应用。

一九八三年,我所开展了广泛的国内外学术交流,共接待了近 70 位来访的外国科学家。交流形式有合作研究、办学习班、讲学和参观访问等。我所科研人员参加了“中国遗传学会第二届全国代表大会暨学术讨论会”等各种国内学术会议 84 人次,宣读或提供学术论文 57 篇。参加了“第十五届国际遗传学”大会等国际会议或训练班 36 人次,提供论文 22 篇。这些活动有助于我所研究工作的发展与提高。

胡 含 邵启全

1984 年 2 月

目 录

第一研究室

- RNA 聚合酶 B 的免疫特性.....刘连瑞、王恢鹏、黄崇喜 (1)
- L615 细胞抗 α -鹅膏蕈碱突变体的建立.....王恢鹏、冯 尚、刘连瑞 (2)
- 抗炭疽保护性抗原的单克隆抗体的产生及鉴定.....
- 尚芙蓉、郑永木、宁益华、宋海燕、于春海、尧素芳、黄华樑、庄汉澜 (3)
- 枯草杆菌 SD103 产生大量核糖体蛋白质基因突变 白应林、胡康荃、苗毓华 (4)
- 枯草杆菌 Ki-2-132 株与噬菌体有关特性的初步观察..... 汤懋斌、孙永华、李明凤 (5)
- 枯草杆菌克隆系统的一个新的载体 孙永华、汤懋斌 (6)
- 枯草杆菌重组质粒 pK209-8 特性的研究..... 范树田、杨 迪、孙永华、李明凤、汤懋斌 (7)
- pTZ22 质粒的改进..... 邹吉涛、李明凤、汤懋斌 (8)

第二研究室

- 鸡的血型研究 IV. 从血型因子分布看我国几种白羽乌鸡的种群关系.....
- 程光潮、吴丽城、张 婷、郑小惠、段章雄 (9)
- 来航鸡京白 II 系近交试验(第三报)..... 崔道枋、段章雄、程光潮、郭 强、官桂芳、董绍棠 (10)
- BrdU 抗性细胞特性的研究 I. BrdU 抗性细胞的姐妹染色单体区别染色特征及其
- 抗性机制的初探..... 颜永杉、钱 进、刁霞辉 (11)
- 关于 5'-溴脱氧尿苷对中国仓鼠核仁形成区活性影响的研究... 颜永杉、钱 进、刁霞辉 (12)
- 对一例真性母马骡生育产驹的初步研究..... 柴瑞章、王培生、杨秀琴 (13)
- 虎头金鱼增生组织发生的研究 III. 细胞的培养..... 王春元、李延龄、金瑞霖 (14)
- 金鱼胚胎发育时期的扫描电镜观察..... 王春元、李延龄 (15)
- 金鱼头部增生组织中琥珀酸脱氢酶 (SDH) 定位的电镜细胞化学研究
- 王元玉、王春元、李延龄 (16)
- 金鱼葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳的研究..... 毕世华、王春元 (17)
- HeLa 细胞对血卟啉衍生物 (HPD)+激光的光敏反应..... 梁 宏、邓燕华、宋桂英 (18)
- 血卟啉衍生物 (HPD)+激光对雄鼠 (PTK₂) 细胞的杀伤效应.....
- 梁 宏、邓燕华、孙宝霞、宋桂英 (19)
- 氩激光显微照射雄鼠 (PTK₂) 有丝分裂细胞染色体
- 王兰凤、梁 宏、陆仲康、宋桂英、胡应和 (20)
- 激光微束照射诱发雄鼠 (PTK₂) 细胞染色体损伤及其细胞化学分析
- 胡应和、梁 宏、陆仲康、王兰凤、宋桂英、陈震古 (21)

第三研究室

- 小麦花粉来源的端体和等臂体植株..... 郝子英、景健康、胡 含 (22)
- 马铃薯-II 培养基诱导小黑麦花粉愈伤组织的效果..... 王兴智、胡 含 (23)
- 普通小麦和小偃麦中间型的几种同工酶和可溶性蛋白的比较研究.....

苗中和、黄大年、胡 含 (24)	
短期高温处理对小麦花药培养的影响	梁思信、胡 含 (25)
小麦-偃麦草属间杂种材料之间花粉植株诱导频率差异的研究	
庄家骏、贾 旭、陈国庆 (26)	
不同诱变方法在小麦-偃麦草属间杂种花药培养中的效应	贾 旭、庄家骏、陈国庆 (27)
离体培养下小孢子雄核发育启动机理的研究 I. 2-脱氧葡萄糖对水稻小孢子诱导频率的影响	曾君祉 (28)
离体培养下小孢子雄核发育启动机理的研究 II. 放线菌素 D 对小麦和水稻花药培养诱导频率的影响	曾君祉 (29)
小麦花药培养中花药密度效应的初步研究	黄 斌 (30)
花药培养中接种期前质体状态与白化现象的可能关系	黄 斌 (31)
小麦花药培养中愈伤组织和试管苗染色体调查方法的初步研究	
黄 斌、王兴智、曾君祉、冯国宏、梁思信 (32)	
抗烟草黑胫菌突变体的细胞水平选择	周嘉平、黄 河 (33)
激素不同水平和对比对水稻花粉植株形态发生的影响	陈 英、李淑媛、左秋仙 (34)
紫苜蓿叶肉原生质体再生植株的细胞学观察	吕德扬、陈 英 (35)
水稻抗镉突变体的筛选(初报)	李海民、陈 英 (36)
紫苜蓿叶肉原生质体胚状体形成的研究	吕德扬 (37)
中国半野生大豆 7S 贮藏蛋白的提取及其特性的研究	陈建南、李海民、刘纪华 (38)
Ti 质粒 pTiS1 在大肠杆菌中的克隆	魏荣瑄、李向辉、田绍成 (39)
根癌农杆菌的寄主范围研究	秦长乐 (40)
植物冠瘿瘤的生长激素自主能力	秦长乐 (42)
离体培养冠瘿瘤的分化	秦长乐 (43)
在长期继代培养中玉米花粉胚性细胞系染色体倍性变化	谷明光、张雪琴 (44)
二倍体多年生类玉米与玉米的杂种的 Giemsa C-带研究	谷明光、张雪琴 (45)
诱发玉米抗小斑病菌突变体的研究 II. 化学诱变剂和筛选因素对诱发玉米抗病突变体的作用	郭丽娟、陶自荣、黄梧芳、康绍兰、张 浩 (46)
三叶橡胶花粉植株的高频率诱导及移栽成活植株的表现	
陈正华、许绪恩、潘 勉、陈杞和、庞任声、戴梅莲、李文彬 (47)	
用细胞工程技术进行油菜品质育种 I. 油菜种苗组织培养物的脱分化与再分化	
陈正华、张丽华、李文彬、陈之征、张大卫 (48)	
用细胞工程技术进行油菜品质育种 II. 芸苔属几种作物的花药液体漂浮分步培养	
陈之征、姚渝光、李文彬、张丽华、张大卫、陈正华 (49)	
用细胞工程技术进行油菜品质育种 III. 芥菜的原生质体培养	
李文彬、陈之征、张大卫、陈正华 (50)	
用细胞工程技术进行油菜品质育种 IV. 大头菜组织培养中硫代葡萄糖甙的诱导	
陈之征、李文彬、张丽华、陈正华 (51)	
用细胞工程技术进行油菜品质育种 V. 油菜芥酸微量分析技术的建立	
张大卫、陈正华、李文彬、陈之征 (52)	

用细胞工程技术进行油菜品质育种 VI. 组织培养条件下芥酸的诱导与分析

..... 张大卫、陈正华、陈之征、李文彬 (53)

多年生宿根花卉的快速繁殖

..... 郑万珍、黄桥香、关月兰、何传启 (54)

第四研究室

带有菠菜叶绿体 DNA 片段的重组质粒的体外构建

..... 李继耕、舒群芳、孔繁瑞 (55)

大麦叶绿体突变体类囊体膜蛋白质的分析

..... 李继耕、李玉湘、耿玉轩 (56)

小麦亚族叶绿体类囊体膜多肽及其类型的研究

..... 何世屏、李继耕 (57)

菠菜、甜菜叶绿体 70S 核糖体蛋白质的分离

..... 李家洋、李继耕 (58)

叶绿体膜中糖蛋白的分析

..... 李家洋、李继耕 (59)

玉米组织中同工酶和蛋白质特异谱带的研究 I. 过氧化物酶、细胞色素氧化酶的特

异谱带及其调控位点

..... 曾孟潜、杨太兴 (60)

玉米不同雄性不育细胞质的遗传研究

..... 曾孟潜、杨太兴、魏建昆、崔汝镜 (61)

玉米优良自交系埃 1278C、埃 1278C-2、VC²-1 和海 7-1 等的选育及其利用

..... 曾孟潜、魏建昆 (62)

四川糯玉米过氧化物酶同工酶分析

..... 杨太兴、曾孟潜、赖世坚 (63)

非配子融合转移基因的方法在小麦上的应用

..... 刘根齐、张孔溢 (64)

大豆种子 mRNA 的分离及体外翻译蛋白质

..... 张孔溢、黄菲 (65)

微核与染色体畸变的相关性

..... 沈光平、周社被 (66)

粳稻恢复系 C₃₇ 与几种雄性不育系杂交后代的研究

..... 王培田、许莉萍、王联清 (67)

亚麻显性雄性不育系的调查研究

..... 王培田、许莉萍、王联清 (68)

高温对小麦叶绿体核糖体和叶绿体蛋白质生物合成的影响

..... 刘祚昌、苏德荫 (69)

从棉花未传粉子房诱导出苗

..... 祝仲纯、安庆坤 (70)

离体培养桔梗未传粉子房获得植株

..... 祝仲纯、乔跃民 (71)

矮牵牛再生植株的诱导

..... 祝仲纯、吴海珊 (72)

我国几个地方野生稻种的观察

..... 杨天宝、李璿 (73)

西藏野小麦及几种栽培小麦核型结构的初步观察

..... 李敬仪、李璿 (74)

青藏高原野大麦新类群

..... 李璿 (75)

青藏高原野生小麦的新类群

..... 李璿 (77)

第五研究室

致瘤农杆菌对大豆属致瘤及基因转移

..... 邵启全、蒋兴邨、王连铸、尹光初 (79)

甜菜畸胎瘤的诱导及其基因转移

..... 蒋兴邨、邵启全、王宇清、罗翠娥 (80)

通过未授粉子房培养获得四倍体枸杞

..... 牛德水、李金国、李安生、周泽其、蒋兴邨、陈永强、邵启全、秦金山、王莉、王大桢 (81)

枸杞细胞系的建立及单细胞培养再生植株

..... 牛德水、李金国、李安生、周泽其、蒋兴邨、陈永强、邵启全、秦金山、王莉、王大桢 (82)

中国大麦雄性不育的选育及其研究

..... 周泽其、邵启全、周德成、刘宜宾、蒋兴邨、李安生、牛德水、李金国、陈永强 (83)

大麦雌雄同穗异花突变体的选育

..... 周泽其、邵启全、蒋兴邨、周德成、李安生、牛德水、李金国、陈永强 (84)

齿瓣延胡索胚状体无性系的初步建立.....

- ...李安生、杜令阁、常维春、侯艳华、陈泽光、杨振棠、邵启全、蒋兴邨、牛德水、李金国、周泽其、陈永强 (85)
- 菜豆属的种间杂交..... 林建兴、张性坦、赵存、柏慧霞 (86)
- 山羊草细胞质对普通小麦抽穗期的影响..... 张炎、吴郁文、张翠兰、汪永祥、肖洪佑 (87)
- 具有节节麦细胞质的普通小麦抗锈性..... 吴郁文、张炎、张翠兰、汪永祥 (88)
- D型细胞质与小麦种间杂交..... 张炎、张翠兰、吴郁文、汪永祥、肖洪佑 (89)
- 异细胞质小麦可溶性蛋白电泳图谱分析..... 张翠兰、吴郁文、张炎 (90)
- 异细胞质小麦的酯酶同工酶..... 吴郁文、张翠兰、张炎 (91)
- 小麦种间正反交与杂种种子生活力..... 张翠兰、张炎、吴郁文 (92)
- 偏凸山羊草×小麦杂种胚乳培养..... 张帆 (93)
- 植物细胞赋活剂 Atonik 对小麦杂种胚形成的影响..... 魏秀玲、曹化林 (94)
- 普通小麦基因互作对提高与球茎大麦可交配性的效应..... 李大玮、胡启德 (95)
- 植物激素对促进棉花种间杂种胚乳发育效果的超微结构观察..... 邱仲锦、吴莲英 (96)
- 陆地棉×非洲异常棉杂种的观察..... 钟文南、姜茹琴、梁正兰 (97)
- 陆地棉×澳洲野生棉杂种的观察..... 姜茹琴、钟文南、梁正兰 (98)
- 陆地棉×比克氏棉 BC₁ 的观察..... 梁正兰、姜茹琴、钟文南 (99)

第六研究室

- 青饲多穗玉米穗穗红 32 在北京地区大田制种的适宜播期.....
-叶晓、覃作干、王绪田、周文娟、郭德树、杜力 (100)
- 甘薯高淀粉性状的简易测定方法研究..... 以凡、王文质、林自安、杜述荣 (101)
- 马铃薯花粉发育时期与花蕾形态相关性的观察..... 王文质、林自安、杜述荣、以凡 (102)
- 马铃薯淀粉率几种测定方法的比较..... 王文质、杜述荣、林自安、以凡 (103)
- 向日葵小孢子及胚囊发育的细胞学观察..... 杜允、潘湘民、夏新界、陈梅生 (104)
- 小麦未成熟种子的组织培养和形态发生的细胞学观察..... 潘湘民、杜允、夏新界 (105)

第七研究室

- 人类染色体热点 I. 在三个不同群体中的热点 3p14.....
-周宪庭、许碧珍、朱章菱、肖桂芳、李宁、沙人 (106)
- 白血病儿童化疗前后的染色体脆裂性..... 肖白、周宪庭、汪安琦 (107)
- 一个脆性 X 综合征家庭..... 许碧珍、沙人、肖桂芳、周宪庭 (108)
- 壮族、朝鲜族和维吾尔族中成人乳糖酶多态性研究..... 王永发、金锋、杜若甫 (109)
- 我国几个民族的毛发根鞘细胞葡萄糖磷酸变位酶表型及分布..... 陈良忠、顾永彬 (110)
- 维吾尔族四种血清蛋白多态性的初步分析..... 牛克毅、陈良忠、杜若甫 (111)
- 新疆维吾尔族七个红细胞酶多态性的初步研究..... 赵红、陈良忠、杜若甫 (112)
- 新疆维吾尔族红细胞血型系统的分布..... 袁义达、乌云、艾绍董、金锋、杜若甫 (113)
- 赫哲族群体遗传学初步研究..... 陈良忠、杜若甫 (114)
- 北京、重庆汉族人身高变化的初步研究..... 徐玖瑾、杜若甫 (115)
- 用 HLA 基因频率计算人群间的遗传距离..... 赵桐茂、张工梁、袁义达、杜若甫 (116)

技术室

- 几种植物根尖细胞腺苷环化酶活性的细胞化学定位比较..... 贾敬鸾、黄季芳 (117)

国际间学者协作研究简报

- 黄瓜根和子叶原生质体培养再生根和苗的研究..... 吕德扬、E. C. Cocking (118)
- 一些培养因素对单倍体油菜叶肉原生质体细胞培养胚胎发生过程的影响.....
.....李良材、H. W. Kohlenbach (119)
- 营养缺陷培养基中的染色体畸变..... 周宪庭、J. R. Reidy、陈达能 (120)
- 在缺失叶酸的基本培养基中自发及诱发的染色体畸变.....
.....周宪庭、J. R. Reidy、陈达能 (121)
- 中国北方三个民族中成人乳糖酶表型的分布.....
.....王永发、颜永杉、徐玖瑾、杜若甫、S. D. Flatz, W. Kühnau, G. Flatz (122)
- 蒙古族、朝鲜族和壮族某些血清蛋白和红细胞酶的多态性 徐玖瑾、崔梅影、
李实喆、陈良忠、杜若甫、H. W. Goedde, H-G.Benkmann, G. Kriese, P. Bogdanski (123)
- 已发表的论文及著述..... (124)

国际国内学术交流

- 国内学术活动..... (129)
- 国际性学术活动..... (134)
- 外国专家来我所做的学术报告..... (136)

RNA 聚合酶 B 的免疫特性

刘连瑞 王恢鹏 黄崇喜

以前的报道认为真核生物 RNA 聚合酶 B 是有同源性的。为了证明这个结论是否正确,我们分别从家蚕、中华蟾蜍、鸡、小鼠以及玉米、大豆等不同的材料分离纯化了 RNA 聚合酶 B,对这些不同来源的 B 酶进行了免疫学测定。

以 615 小鼠 RNA 聚合酶 B 为抗原,对鸡进行免疫,得到抗 615 小鼠 B 酶的抗血清。用这种抗血清为 RNA 聚合酶 B 的转录活性抑制剂,以小牛胸腺 DNA 为转录模板,分别用不同种类的 RNA 聚合酶 B 进行体外转录实验。观察各种 RNA 聚合酶 B 在不同用量的抗 615 小鼠 B 酶抗血清反应活性受到抑制的情况。结果表明,615 小鼠 RNA 聚合酶 B 的活性随着抗血清用量的增加而逐渐降低,抗血清对之抑制作用很明显。而抗 615 小鼠 RNA 聚合酶 B 的抗血清对鸡、蟾蜍、蚕、玉米和大豆的 RNA 聚合酶 B 的作用,在抗血清用量为 1—5 μ l 的范围内,对这些种类的 B 酶不但没有抑制作用,反而在某种程度上有激活作用;只有抗血清用量增加到 5 μ l 以上到 20 μ l 的范围时,这些 RNA 聚合酶 B 的活性才受到明显的抑制作用。

为了进一步证明各种来源的 RNA 聚合酶 B 在结构组成上有所不同,我们做了聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果表明,各种来源不同的 RNA 聚合酶 B 的亚基不完全对应。最明显的是家蚕在吐丝期之前 RNA 聚合酶 B 只有两条亚基,一为大亚基,一为小亚基。玉米和大豆的 RNA 聚合酶 B 两条大亚基含量相对少,容易降解,存放之后大亚基容易失去。

应用免疫扩散技术研究了 RNA 聚合酶 B 的同源性。结果表明,抗 615 小鼠 RNA 聚合酶 B 的抗血清与 615 小鼠、白血病 615 小鼠,以及大鼠 RNA 聚合酶 B 可以形成免疫沉淀线;而与鸡、蟾蜍、家蚕、玉米和大豆的 RNA 聚合酶 B 不能形成免疫沉淀线。同样抗蟾蜍 RNA 聚合酶 B 的抗血清只能与蟾蜍的酶形成免疫沉淀线,而与其它种类的 B 酶不形成沉淀线。用抗野生大豆 RNA 聚合酶 B 的抗血清,能与野生大豆和栽培大豆 RNA 聚合酶形成免疫沉淀线,而不能与其他乃至玉米的 RNA 聚合酶 B 形成沉淀线。

根据上述实验结果,我们认为不同来源的 RNA 聚合酶在结构组成和免疫同源性方面是不一致的。小鼠和大鼠等哺乳动物的 RNA 聚合酶 B 有免疫同源性。野生大豆与栽培大豆的 RNA 聚合酶 B 有免疫同源性。而哺乳动物与鸟类、两栖类、昆虫,以及植物的 RNA 聚合酶没有同源性;双子叶植物的大豆和单子叶植物的玉米 RNA 聚合酶 B 也没有免疫同源性。RNA 聚合酶 B 可能是功能相同的一类酶,它们在不同物种中的结构相同和不同的性质有待深入研究。

L615 细胞抗 α -鹅膏蕈碱突变体的建立

王恢鹏 冯 尚 刘连瑞

α -鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶 B 有特异性抑制作用, 是鉴定 RNA 聚合酶 B 的重要指标之一。我们先前的工作曾对 L615 细胞的 RNA 聚合酶 B 进行了提取、鉴定及免疫学特性比较研究。为研究 RNA 聚合酶 B 的组成亚单位在转录中的作用, 就必须获得具有 RNA 聚合酶 B 突变的细胞。我们选择抗 α -鹅膏蕈碱 L615 细胞突变体分两个步骤进行。

1. 由悬浮生长的细胞选择贴壁生长的突变细胞 由于 L615 细胞是悬浮培养的细胞, 在选择抗性突变体时不易于挑选突变体, 因而采用琼脂平板培养法挑选在琼脂平板上形成的集落, 获得贴壁生长的突变 L615 细胞。国外琼脂平板培养细胞多采用特纯琼脂 (special noble agar), 我们用普通细菌培养琼脂亦得到满意的结果。具体作法为: (1) 琼脂在 4℃ 多次用双蒸水泡洗, 配制 1% 琼脂溶液, 高压灭菌, 冷却至 45—50℃。(2) 与 40—50℃ 预热的同量 2 倍浓度的 RPMI1640 培养液 (内含 10% 小牛血清) 混合。(3) 在 60mm 平皿中倒入 5ml 琼脂培养液。(4) 制备 L615 细胞悬液, 每皿加入 0.2ml 细胞悬液 (10,000 个细胞/ml)。(5) 平皿放入 CO₂ 培养箱培养 15 天, 挑选出能在琼脂上生长的集落。一共做了 15 批实验, 得到 50 多个集落, 从中挑选出 1 个贴壁生长良好的 L615 细胞系 (传代时需用 0.25% 胰酶消化)。这对治疗肿瘤药物的筛选是很有用的实验材料。

2. 抗 α -鹅膏蕈碱突变体的选择 贴壁生长的 L615 突变细胞对 α -鹅膏蕈碱的毒害作用很敏感, 在 0.3 μ g/ml 时细胞全部死亡, 用 400 μ g/ml EMS 对贴壁生长的 L615 细胞进行诱变处理, 培养 16 小时, 倾去诱变液, 换上新鲜培养液, 继续培养至细胞长成会合层, 然后用 0.25% 胰酶消化, 在 60mm 平皿内加入 1ml 细胞悬液 (3×10^5 细胞/ml)、2ml 培养液。加入 α -鹅膏蕈碱使最终浓度为 0.3 μ g/ml, 置于 CO₂ 培养箱培养 10 天, 挑选单克隆, 将每一单克隆消化, 并分别接种于 25ml 培养小瓶中, 加培养液 3ml (内含 α -鹅膏蕈碱 0.6 μ g/ml), 连续传代, 培养达数月之久, 最后获得了抗 α -鹅膏蕈碱的突变体, 能在含有 2 μ g/ml α -鹅膏蕈碱的培养液中增殖生长。此突变体细胞冷藏于液氮中一年, 复苏后抗性不变。

对抗 α -鹅膏蕈碱突变体进行了染色体组型分析, 计数 100 个中期分裂相良好的细胞, 85% 细胞 $2n = 40$, 并且具有两个亚中间着丝点的大标记染色体。对抗性突变与染色体组型变化的关系、抗 α -鹅膏蕈碱的基因定位, 以及突变体 RNA 聚合酶 B 的组成分析, 将待下一步进行。

抗炭疽保护性抗原的单克隆抗体的产生及鉴定

尚芙蓉 郑永木¹⁾ 宁益华 宋海燕 于春海¹⁾ 尧素芳 黄华樑 庄汉澜¹⁾

炭疽保护性抗原是炭疽毒素组分之一,可制成疫苗来预防炭疽病,但其含量低,因此分离纯化还存在一定困难。如能获得抗炭疽保护性抗原的单克隆抗体,将为定量测定、纯化抗原,进而为提高抗炭疽疫苗的效力提供更好的条件。

炭疽保护性抗原是从炭疽杆菌外毒素中提取的一种糖蛋白,血凝滴度为 $2048^*Hu/ml$,纯度含蛋白量 $11mg/ml$ 。此蛋白是一种弱免疫原。

将抗原与弗氏完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠。第2、3次免疫是经小鼠尾静脉注射纯抗原 $0.5ml$,3天后取脾,制备脾细胞(3.5×10^6),与小鼠骨髓瘤细胞系 NS-1 (7.4×10^7) 在 50%PEG (MW = 1,000) 作用下进行融合。用 ^{125}I 放射免疫法筛选上清液,经过4次再克隆,挑选4株单克隆杂交细胞 C11、C17、C38、C39。

选 C17 杂交细胞,从它 20 代冰冻细胞复苏后,又传 30 多代,用间接血凝法测其培养上清液,滴度为 $1:128-256$,接种 BALB/c 小鼠所产生腹水的滴度为 $1:4, 926-6,344$ 。用炭疽抗原免疫小鼠的血清滴度为 $1:16-32$ 。

作细胞的核型分析,看到小鼠骨髓瘤 NS-1 细胞染色体数是 65,正常 BALB/c 小鼠脾细胞染色体数为 40,而杂交的细胞 C17 染色体数为 $80-100$ 。可见后者是融合而获得的杂交细胞。

从 C17 细胞无血清培养的上清液或其腹水经 Protein A-Sepharose CL 4B 层析,用 pH8.0 的磷酸缓冲液洗脱,洗脱峰作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,只出现 1 条带,证明是同一种细胞所分泌的抗体。

经 Protein A-Sepharose CL 4B 分离提纯的抗体,用不同 pH 值的 0.1M 磷酸缓冲液洗脱,并对各洗脱峰进行抗体效价测定。只有 pH8.0 的洗脱峰呈阳性,其余各峰为阴性。将 pH8.0 峰的洗脱液与兔抗鼠 IgG₁、抗 IgG_{2a}、抗 IgG_{2b}、抗 IgG₃ 和抗 IgM 的血清作双扩散,只与抗 IgM 的血清反应,出现明显的沉淀线,说明 C17 分泌的抗体亚型为 IgM。将此抗体作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与各种分子量的标准蛋白质比较,表明重链的分子量为 72,000,轻链为 25,000,与正常 IgM 的亚基分子量 195,000 相同。

将所得的单克隆抗体偶联到 CNBr-Sepharose 4B 上,以提纯抗原。观察到 C17 分泌的抗体能与抗原中分子量为 19,000d 的组分特异组合。将所结合的抗原与未经处理的抗原比较,证明应用所得的单克隆抗体能纯化特定的抗原组分。

1) 军事医学科学院微生物流行病学研究所。

枯草杆菌 SD103 产生大量核糖体蛋白质基因突变

白应林 胡康荃 苗毓华

为定位枯草杆菌核糖体蛋白质基因,了解翻译基因操纵子的组织结构和功能调节,需要分离大量的突变体,然而分离这些突变体是一项费时费事的繁重任务。本文设计了一种比较简便而有效的方法,可以获得大量核糖体蛋白质突变。

B. subtilis 168 不能自发地产生依赖链霉素突变,首先用 EMS 诱变 *B. s.* 168, 分离出 1 株依赖链霉素突变体 SD103, 它生长稍慢但正常形成孢子,当链霉素浓度低于 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 时停止生长。依赖抗菌素性状十分稳定,回复突变率为 $<2.9 \times 10^{-10}$, 因此有可能用诱变方法分离它的回复突变体,而不致因自发回复突变率高而造成混乱的本底。为从 SD103 株获得大量核糖体蛋白质突变,在方法设计上有以下两个考虑: (1) NTG 的主要作用位置是在 DNA 的复制点,为了使细胞处于不同的复制点上,需要用不同生长时期的细胞群体进行诱变。由于 SD103 在不同链霉素浓度中生长速度不同,可以控制 SD103 的生长。将 SD103 培养在含有 30、50、70、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素培养液中分别培养不同的时间,收集细胞进行诱变处理。(2) 由于核糖体是细胞内一种不可缺少的亚细胞结构,它的某些成分的改变和缺失可能是致死性的,因此获得核糖体结构改变的最好方式是筛选条件致死突变体。为此在诱变后,选择双重标志,即选择依赖链霉素回复突变的同时,筛选温度敏感突变,分离出 106 株独立的突变体,它们的生长速度、形态和孢子生成率有多种异质性。

提取 106 株突变体的 70S 核糖体蛋白质,并进行双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,观察核糖体蛋白质的电泳改变。表 1 列出了改变核糖体蛋白质的突变体,结果表明 30% 以上的突变体 (36/106) 带有核糖体蛋白质的改变。我们相信利用上述诱变和选择方法,只要分析更多数量的突变体,就可以得到更多种核糖体蛋白质的基因突变。因此这是一种获得多种核糖体突变的有效途径。

表 1 改变核糖体蛋白质的突变体

核糖体蛋白质	突 变 体	核糖体蛋白质	突 变 体
S3	SDN51,104	L6	SDN63,82
S4	SDN4,34,48,64,103	L13	SDN19
S5	SDN23,42,58,65,67,69,77,92	L14	SDN73
S8	SDN15	L16	SDN57,87,100
S9	SDN28,51	L17	SDN59
S13	SDN61	L20	SDN98
S18	SDN96	L22	SDN3,45
S19	SDN36	L23	SDN95
L1	SDN19	L27	SDN6
L4	SDN52		

枯草杆菌 Ki-2-132 株与噬菌体有关 特性的初步观察

汤懋竑 孙永华 李明凤

枯草杆菌 Ki-2-132 系我组获得的可作为克隆和表达外源基因的受体菌株,具有对质粒稳定性好、转化频率高和转化方法简单等特点。枯草杆菌噬菌体 $\phi 105$ 已被用来研究当作运载工具的可能性。研究 Ki-2-132 株有关噬菌体的特性对研究该菌株的限制 (r) 和修饰 (m) 特性具有重要意义。本文报道 Ki-2-132 株与 $\phi 105$ 等噬菌体有关特性的初步结果。

将 $\phi 105$ 噬菌体分别感染枯草杆菌 209 株、2165 株 (168 株的突变体)、63501 株和 Ki-2-132 株。在 Ki-2-132 中只能少数噬菌斑,其它菌株较易获得噬菌斑。从各株挑出噬菌斑,悬浮于液体培养基中,细菌漏斗抽滤,分别编号为 $\phi 105(209)$ 、 $\phi 105(2165)$ 、 $\phi 105(63501)$ 和 $\phi 105(Ki-2-132)$ 。然后再分别以原液、10,000 倍稀释液感染 Ki-2-132、2165、209 和 63501 株。结果列于表 1。从表 1 看出,原液和 10,000 倍稀释液均不能感染 Ki-2-132 株,除 Ki-2-132 株外,2165、209、63501 株的感染最高数都是从该株繁殖的

表 1 噬菌体感染不同菌株的结果

测定菌株	噬 菌 体	不同稀释噬菌体产生的 噬菌斑数		为最大感染数的%
		原 液	10,000	
Ki-2-132	$\phi 105(209)$	0	0	0
Ki-2-132	$\phi 105(63501)$	0	0	0
Ki-2-132	$\phi 105(Ki-2-132)$	0	0	0
Ki-2-132	$\phi 105(2165)$	1	0	$<10^{-8}$
2165	$\phi 105(209)$	多	14	3.4
2165	$\phi 105(63501)$	多	20	35.7
2165	$\phi 105(Ki-2-132)$	多	120	31.7
2165	$\phi 105(2165)$	多	多	100
209	$\phi 105(209)$	—	408	100
209	$\phi 105(63501)$	—	27	48.2
209	$\phi 105(Ki-2-132)$	—	378	100
209	$\phi 105(2165)$	—	0	0
63501	$\phi 105(209)$	—	0	0
63501	$\phi 105(63501)$	—	56	100
63501	$\phi 105(Ki-2-132)$	—	0	0

噬菌体感染而得到的,这是由于 r^+m^+ 的缘故。Ki-2-132 是唯一的例外,而且不能被自身繁殖的 $\phi 105$ 噬菌体感染。这说明 Ki-2-132 对 $\phi 105$ 可能是抵抗的或免疫的。用紫外线和丝裂霉素分别诱导 Ki-2-132,均未发现释放噬菌体,所以 Ki-2-132 是抗 $\phi 105$ 噬菌体的一个菌株。它可产生敏感的突变体。这种敏感的突变体产生的噬菌体不能感染未突变的 Ki-2-132 细胞。从微生物所余茂效赠送的枯草杆菌噬菌体中,也观察到 1-1、2.20、1421、A13-14 和 A13-10 不能感染 Ki-2-132。

枯草杆菌克隆系统的一个新的载体

孙永华 汤懋兹

自从 Erhlich 发现金黄色葡萄球菌质粒能转入枯草杆菌,并能在其中复制和表达以来,枯草杆菌已成为分子克隆化研究的重要受体之一。枯草杆菌克隆化研究所用的主要载体,有从金黄色葡萄球菌和芽孢杆菌中分离的各种抗药性质粒。在这些质粒中,抗卡那霉素质粒 pUB110,由于拷贝数较多,在枯草杆菌中很稳定,有较多的限制性内切酶单切点,应用最为广泛。

我们从金黄色葡萄球菌 307 株分离的质粒中,有一个抗卡那霉素质粒 pK307,其分子量为 2.8Md,与 pUB110 相近。限制性内切酶切点及物理图谱的研究,证明它是与 pUB110 不同的另一个抗卡那霉素质粒。

在酶切试验中,所用的限制性内切酶、酶切液成份及浓度(终浓度)如下: *Acc* I、*Bam* HI、*Bgl* I、*Bgl* II、*Eco* RI、*Sma* I、*Xba* I、*Hae* III、*Alu* I、*Hpa* II、*Hind* III 和

Sal I: 50mM Tris (pH7.4)、50mM KCl、10mM $MgCl_2$ 、10mM DTT。

Hpa I: 10mM Tris (pH7.4)、10mM $MgSO_4$ 、1mM DTT。

Pst I: 10mM Tris (pH7.4)、50mM NaCl、10mM $MgCl_2$ 、1mM DTT。

内切酶反应总体积约为 30 微升,其中酶切液(10 倍浓度)3 微升,酶 2—5 微升。37℃ 保温 1—2 小时。结果用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。*Hind* III 消化的 λ DNA 作为分子量标准。

实验结果表明, *Acc* I、*Bam* HI、*Bgl* I、*Bgl* II、*Eco* RI、*Hpa* I、*Pst* I、*Sma* I 和 *Xba* I 在 pK307 上有单切点; *Hae* III、*Alu* I 和 *Hpa* II 为多切点; *Hind* III 和 *Sal* I 无切点。与 pUB110 酶切点相比较,可以看出: (1) *Bam* HI、*Bgl* II、*Eco* RI 和 *Xba* I 在 2 个质粒上均有单切点; (2) *Ava* I、*Cau* II、*Pvu* II 和 *Tha* I 在 pUB110 上有单切点,在 pK307 上没测定; (3) *Acc* I、*Hpa* I、*Bgl* I、*Pst* I 和 *Sma* I 在 pK307 有单切点,而在 pUB110 上无切点。

根据酶切结果,我们作出了 pK307 的 *Eco* RI、*Bam* HI、*Bgl* II、*Pst* I 和 *Xba* I 等几个限制性内切酶的物理图。

由于 pK307 质粒拷贝数较多,在枯草杆菌中很稳定,并且具有 *Eco* RI 等 9 个限制性内切酶单切点,所以它有可能作为枯草杆菌克隆系统中一个有潜力的新载体。

枯草杆菌重组质粒 pK209-8 特性的研究

范树田 杨迪¹⁾ 孙永华 李明凤 汤懋竑

纯化的 pUB110 质粒 DNA 和枯草杆菌 209 染色体 DNA, 分别经限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切割, 再经 T4DNA 连接酶随机连接。连接物转化枯草杆菌 Ki-2-132-5, 在含有卡那霉素 (10 μ g/ml) 的固体肉汤培养基上获得转化体。受体对照和给体 DNA 对照在卡那霉素 (10 μ g/ml) 培养基上均无菌落生长。对所获得的转化体进行电泳鉴定, 其中一质粒定名为 pK209-8。该质粒能稳定存在于枯草杆菌中。我们对质粒 pK209-8 的特性进行了研究, 结果如下。

1. 用酸酚法提取 pK209-8 DNA 和 pUB110 DNA, 分别经限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 消化, 经琼脂糖凝胶电泳, 用 *Hind*III 消化的 λ DNA 作分子量标准, 测得 pK209-8 的分子量为 4.5×10^6 道尔顿。

2. 用 ³H 标记染色体 DNA 和质粒 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳分离二种 DNA, 进行液闪计数, 计算质粒的拷贝数, 测得 pK209-8 质粒拷贝数为 101 ± 10 , pUB110 质粒拷贝数为 53 ± 2.7 , pK209-8 质粒的拷贝数约为多拷贝数质粒 pUB110 的二倍。

3. 纯化的质粒 pK209-8 DNA 和 pUB110 DNA 转化枯草杆菌 Ki-2-132-5、枯草杆菌 422 和枯草杆菌 168, 均获得了抗卡那霉素 (10 μ g/ml) 的枯草杆菌转化体, 质粒 pK209-8 对枯草杆菌 Ki-2-132-5、422 和 168 的转化效率和转化频率均为质粒 pUB110 的 10 倍, 结果列于表 1。

表 1 质粒 DNA 的转化活性

受体菌株	质粒 DNA (μ g/ml)		转化体数/ml	转化频率	转化效率
<i>B. s.</i> Ki-2-132-5	pUB110	6.2	27,360	2.2×10^{-4}	4.3×10^3
	pK209-8	6.2	292,080	2.3×10^{-3}	4.7×10^4
<i>B. s.</i> 168	pUB110	6.2	1,940	2.0×10^{-5}	3.1×10^2
	pK209-8	6.2	18,080	2.0×10^{-4}	3.4×10^3
<i>B. s.</i> 422	pUB110	6.2	1,120	3.9×10^{-5}	1.8×10^2
	pK209-8	6.2	11,120	3.8×10^{-4}	1.8×10^3

质粒 pK209-8 的拷贝数增加和对枯草杆菌转化效率提高的原因尚不清楚。质粒拷贝数的增加可能是插入枯草杆菌 209 染色体片段引起质粒复制活性的增加, 也可能是由于质粒 pUB110 复制起点发生了变化。转化效率的提高可能是由于插入枯草杆菌 209 的染色体片段, 增加了与受体菌的同源部分所致。搞清楚这些问题。尚需深入研究。

1) 北京师范大学。