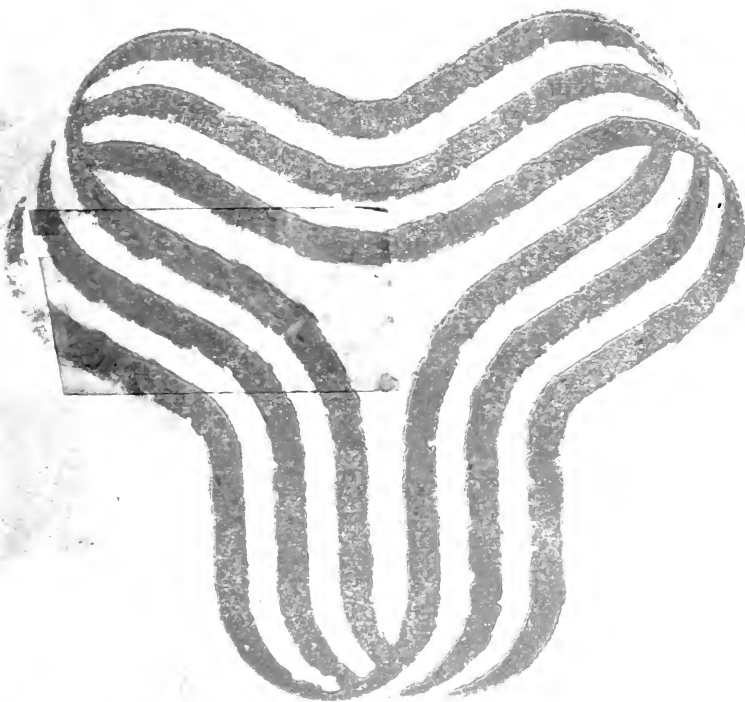


遗传学手册

主编孙勇如 副主编安锡培 赵功民

YI CHUAN XUE
SHOU CE



湖南科学技术出版社

生物工程文库

主 编：谈家桢

名誉编委：冯元桢

副 主 编：王祖农 郑国锷

李致勋 卢惠霖

编 委：郝 水 程玉华

钱新民 张维杰

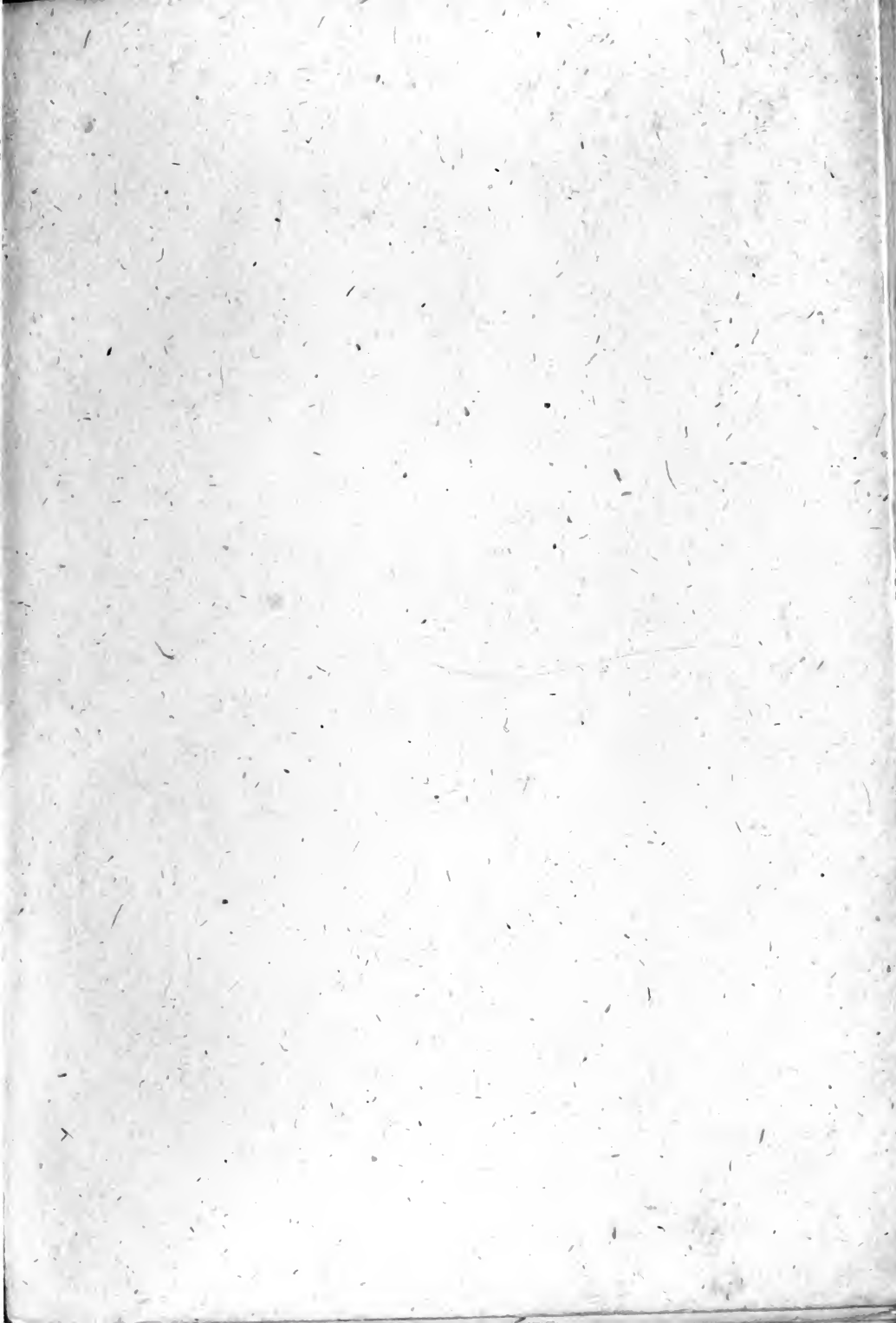
张志鸿 俞俊棠

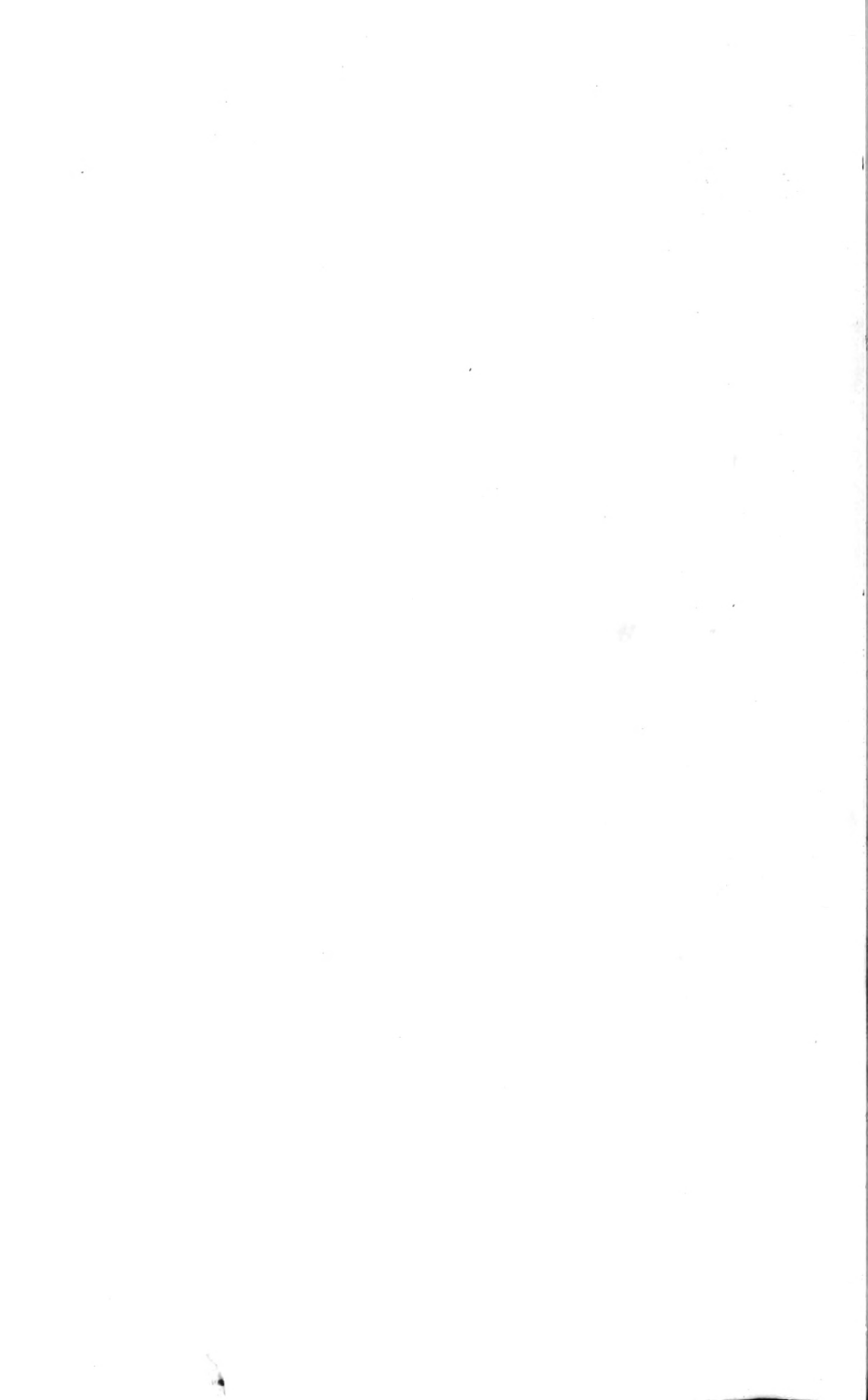
季道藩 陈仁彪

施履吉 钱迎倩

赵寿元 李向辉

庞天相 贺晓兴











遗传学手册

主 编 孙勇如
副主编 安锡培 赵功民
编 者 劳为德 赵世民 赵 炬 白琴华
王 玮 翁曼丽 贾敬鸾 魏 钧
白树慧 白应林



中科院植物所图书馆



S0014579

湖南科学技术出版社

25295

遗传学手册

孙勇如 主编

责任编辑：沙一飞

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1989年9月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：23.25 插页：4 字数：608,000

印数：1—4,500

ISBN 7—5357—0568—5

Q·15 定价：11.50元

地科89—27

前 言

遗传学手册是由中国遗传学会组织编写的。它的宗旨是阐明遗传学的基本原理，介绍遗传学研究的历史，反映当前遗传学研究的现状。同时，作为实用性手册，具体介绍了遗传学教学与研究中的技术与方法。

遗传学是一门涉及面广、内容丰富的学科。为了用尽可能少的文字阐明遗传学的基本原理与概念，我们突破遗传学教学的传统程序，抓住遗传学的核心问题，深入浅出地介绍了基因作用的机制与原理，从而阐明遗传规律最本质的概念，这些知识又反映了遗传学研究的最新成果。我们在手册中还归纳了基因定位的方法，这在国内外还属初次尝试。

我们在手册中将遗传学研究的重大进展以年表的形式介绍给读者。它反映了遗传学发展的历史，又反映了遗传学直至1987年的最新进展。我们希望读者能由此了解遗传学的发展过程，同时也了解遗传学发展的趋势。

为了适应广大教学单位的需要，我们参照了复旦大学、北京大学、北京师范大学及北京农业大学等高等院校的遗传学实验，汇集了30个教学实验。希望这些实验能适合不同水平的学生进行基础操作技术的训练，并通过这些实验，加深对遗传学基本原理的理解。

为反映当前遗传学研究中蓬勃发展的生物工程技术，我们编写了细胞工程与遗传工程技术，力求文字简练，操作具体，以作为从事该项研究的入门指导。同时也使读者全面了解当前遗传学研究所采用的技术及其发展趋势。对于从事某项专门研究的人员来说，了解旁系的研究方法与动态应是不无收益的。手册提供高等生物染色体数、遗传学主要期刊、实验用培养基及遗传工程常用质粒与菌株等附录，也是研究人员的有用资料。

为使手册既反映当前遗传学研究的最新水平，同时又符合各类研究与教学人员的实际需要，撰写者在参阅了大量文献资料的基础上进行精选和摘编，在此向原编作者表示感谢。尽管我们编写这本手册付出了很大的努力，但不足之处实为难免，衷心希望读者批评指正。

谈家桢教授为本手册写了序言，童克忠、蒋耀青与李向辉教授审阅了全文。在手册的编写出版过程中，得到了陈受宜、林章祺同志的大力协助，以及湖南科学技术出版社同志们的大力支持，我们仅在此一并表示衷心的感谢。

编者

1988年10月

序

读家模

遗传学是一门突飞猛进的学科，特别是近年来生物工程技术的兴起，使遗传学走向产业化道路。它作为一种生产力，将导致传统工业结构的调整与改革，在解决人类面临的难题中发挥着巨大的作用，成为推动新技术革命的动力。为了适应这种形势，中国遗传学会组织编写了《遗传学手册》。它介绍了遗传学的历史和现状，阐述了现代遗传学的基本理论，特别是汇集了遗传学实验及遗传学研究的实用资料。我认为，这是一本基本上反映了当前先进水平的实用性手册。我相信，它的出版将能使广大读者对遗传学这门学科，从基础知识到目前发展的现状有较全面的了解。同时也不失为从事遗传学研究工作者的一本较好的参考书。手册主编孙勇如同志是一位严谨的科学工作者，编写者大部分是多年从事科研教学工作的中青年同志，他们结合自己的工作经验，查阅了大量文献资料，编纂了这本近50万字的手册，它必将有力地促进遗传学知识的传播和研究工作的开展。因此，我高兴地向读者推荐这本手册。

目 录

第一章 遗传学简介 (1)

- 第一节 遗传学分科介绍 1
 - (一) 遗传学 1
 - (二) 细胞遗传学 2
 - (三) 体细胞遗传学 3
 - (四) 人类遗传学 3
 - (五) 毒理遗传学 4
 - (六) 肿瘤遗传学 5
 - (七) 辐射遗传学 6
 - (八) 免疫遗传学 7
 - (九) 微生物遗传学 8
 - (十) 分子遗传学 8
 - (十一) 发生遗传学 10
 - (十二) 行为遗传学 11
 - (十三) 数量遗传学 12
 - (十四) 群体遗传学 14
- 第二节 遗传学发展年表 15
- 第三节 遗传学大会与遗传学会 60

第二章 基因..... (72)

第一节 基因概念的演变 72

- (一) 生物性状的符号 72
- (二) 位于染色体上的遗传功能单位 75
- (三) 有功能的DNA片断 77
- (四) 顺反子是一个基因一条多肽 80
- (五) 操纵子是遗传信息传递和表达的统一体 82
- (六) 基因是实现一定遗传效应的核苷酸顺序 83

第二节 基因的表达与调控 87

(一) 原核生物基因的表达与调控 87

- 1. 原核生物转录起始的调节 88
- 2. 负调节系统: 乳糖操纵子 96
- 3. 色氨酸操纵子的阻遏作用 103
- 4. 正、负二元调节系统——阿拉伯糖操纵子 103
- 5. 正调节——分解代谢物阻遏 104
- 6. 半乳糖操纵子: 双启动区 106
- 7. 精氨酸调节子: 一种阻遏物有多个作用位点 108
- 8. 歧路转录 108
- 9. 调节蛋白本身的调控方式 108
- 10. λ 噬菌体的阻遏蛋白 110
- 11. 原核生物转录终止的调控 113
- 12. RNA聚合酶的修饰 120
- 13. 多顺反子操纵子中各基因相对性表达的调控 122

(二) 真核生物基因的表达与调控 124

- 1. 真核生物基因调控的信号 127
- 2. 真核生物RNA的合成与加工 132
- 3. mRNA代谢各级水平上的调节 154
- 4. 转录调控的机制 172
- 5. 染色质结构与转录调控 196
- 6. 化学修饰调控 200
- 7. 基因表达的RNA调控 203

第三节 基因定位 204

(一) 遗传重组值定位 205

1. 二点测交 206
2. 三点测交 206
3. 同功酶标记定位 207
4. 限制性内切酶片段长度多态性标记定位 207
5. 缺失重组定位 208
6. 利用卵巢畸胎瘤进行基因定位 209
7. 近端着丝粒染色体分析 210
8. 四分体分析 211

(二) 家系分析 214

1. 性连锁 214
2. 基因-染色体连锁 214
3. 基因-基因连锁 215
4. 杂种蛋白质的氨基酸顺序分析定位 215
5. 连锁不平衡的分析定位 216

(三) 非整倍体定位 216

1. 非整倍体分析定位法 216
2. 非整倍体剂量定位 222

(四) 细胞学定位 223

1. 缺陷定位 223
2. 病毒影响定位 224
3. 基因剂量定位 224

(五) 体细胞杂种定位 225

1. 同线性测验 225
2. 选择定位 226
3. 易位定位 226
4. 缺失定位 227
5. 蛋白质的分析定位 227
6. 点杂交定位 228
7. Southern blot定位 228
8. 利用放射性处理细胞来定位 228

- (六) 基因转移定位 229
1. 染色体介导的基因转移定位 229
 2. 载体介导的基因转移定位 229
 3. 细菌接合转移定位 230

- (七) 物理学定位 233
1. 变性定位 233
 2. 转录R-环定位 233
 3. 异源双链定位 234
 4. 限制性内切酶分析定位 234
 5. 插入失活定位 236
 6. 原位杂交定位 237

- (八) 基因图与基因符号 238
1. 大肠杆菌K₁₂的连锁图 插页
 2. 玉米的连锁图 插页
 3. 小鼠的连锁图 插页
 4. 西红柿的连锁图 插页
 5. 人的基因图 238
 6. 人的基因符号索引 241

第三章 遗传学教学实验..... (260)

1. 果蝇的培养与观察 260
2. 果蝇单因子杂交实验 262
3. 果蝇二对因子杂交实验 264
4. 果蝇的伴性遗传 265
5. 果蝇的三点测交 267
6. 果蝇的唾腺染色体 239
7. 粗糙链孢霉的分离和交换 270
8. 酵母菌的杂交实验 273
9. 大肠杆菌的杂交实验 276
10. 大肠杆菌的基因顺序分析 277
11. 物理因素诱发营养缺陷型菌株 280
12. 化学因素诱发营养缺陷型菌株 283
13. 枯草杆菌噬菌体普遍性转导 286

14. 大肠杆菌噬菌体局限性转导 290
15. 化学诱变剂的细菌检测法 (Ames法) 292
16. 枯草杆菌感受态细胞的转化 297
17. 大肠杆菌转化 300
18. 切片制作法 302
19. 孚尔根 (Feulgen) 染色法 304
20. 花粉母细胞的制片技术 306
21. 植物染色体组型分析 307
22. 物化因素对染色体的影响 310
23. 植物的有性杂交 312
24. 植物花药培养 314
25. 遗传力的估算 317
26. 人的外周血淋巴细胞培养及染色体标本制作 319
27. 骨髓细胞染色体制片技术 321
28. 人类X-染色质的标本制作与观察 322
29. 二倍体细胞株的培养及染色体制片技术 324
30. 人群中P.T.C味盲基因频率的分析 330

第四章 遗传学研究常用实验技术..... (333)

第一节 常用生化技术 333

(一) 离心技术 333

1. 原理 333
2. 几种离心技术 334
3. 应用实例 336

(二) 电泳技术 339

1. 原理 339
2. 几种常用的电泳技术 341
3. 电泳技术应用实例 343

(三) 层析技术 349

1. 原理 349
2. 层析的分类 350
3. 柱层析法的一般技术 354
4. 应用实例 355

LDH同功酶的亲和层析 355

(四) 放射性同位素技术 358

1. 原理 358
2. 放射性衰变的类型 359
3. 放射性衰变率 359
4. 放射性的单位 360
5. 使用放射性同位素的安全问题 360
6. 放射性的探测和测量 360
7. 放射性同位素在遗传研究中的应用 360
8. 放射性同位素的应用实例 361

第二节 微生物基本操作 364

(一) 纯种分离 364

1. 单菌分离 365
2. 生长与保存 365

(二) 噬菌体噬菌斑的纯化、 λ 噬菌体的制备 367

1. 噬菌斑的纯化 367
2. λ 噬菌体的大量制备 367

(三) 酵母的遗传操作 379

1. 酵母的分离与保藏 379
2. 酵母的生长和生活周期 380
3. 酵母的遗传分析 383
4. 酵母的遗传转化 385

第三节 免疫技术 369

(一) 免疫球蛋白制备 369

1. 抗原制备 369
2. 抗血清制备 371
3. 抗血清效价测定 372
4. 抗血清的纯度鉴定 374
5. 从抗血清中提取免疫球蛋白 374

(二) 微量淋巴细胞毒试验 377

(三) 植皮 378

第四节 电子显微镜技术 392

- (一) 电子显微镜 392
 - 1. 透射式电镜装置简介 392
 - 2. 电子显微镜中常用的长度单位 393
 - 3. 电子显微镜研究的技术方法 394
 - 4. 生物样品的超薄切片的制备 395
- (二) 生物材料的超薄切片技术 400
 - 1. 切片机 400
 - 2. 玻璃刀 400
 - 3. 样品块 400
 - 4. 样品块与刀刃的调整 401
 - 5. 制备优良切片的条件及切片中的问题 401
 - 6. 染色 402
- (三) 电子显微镜细胞化学技术 403
 - 1. 电镜细胞化学的几个步骤 404
 - 2. 酶的细胞化学 404
- (四) 扫描电子显微镜 408
 - 1. 扫描电镜的一般结构及原理 408
 - 2. 生物样品的制作方法 410
 - 3. 生物样品的断裂法 412
 - 4. 扫描电镜在生物学上的应用 414
- (五) 核酸分子的电镜技术 414
 - 1. 铺膜展开法 415
 - 2. 扩展法也叫扩散法 417
 - 3. 一步释放法也叫尿素释放法 418
- 第五节 染色体显带方法 418
 - (一) Q带 418
 - (二) G带 420
 - (三) C带 421
 - (四) R带 422
 - (五) Ag带 423
 - (六) BUdR-Giemsa显示姐妹染色体单体的方法 424

(七) 高分辨染色体标本制备 424

第五章 细胞工程技术..... (426)

第一节 植物体细胞遗传操作 426

(一) 原生质体培养与植株再生 426

1. 原生质体的游离 427
2. 原生质体培养 430
3. 植株再生 434
4. 原生质体培养的操作程序 (实例) 434

(二) 植物体细胞杂交 436

1. 原生质体融合技术 437
2. 杂种细胞的选择 439
3. 体细胞杂种的鉴定 444
4. 原生质体融合的操作程序 447

(三) 植物细胞转化 448

1. 致瘤农杆菌接种无菌苗或外植体而诱发肿瘤 449
2. 烟草叶盘感染农杆菌 450
3. 植物细胞与农杆菌共培养 452
4. PEG法转化植物原生质体 454
5. 植物原生质体的电激法转化 455

(四) 从培养细胞分离突变体 457

1. 诱变因素及诱变处理 458
2. 选择 461

(五) 利用组织培养生产有用物质 463

1. 筛选高产细胞系 464
2. 控制培养条件, 改进培养方法 465

第二节 动物体细胞遗传操作 468

(一) 完整细胞融合 468

1. 仙台病毒中介的细胞融合 468
2. 聚乙二醇中介的细胞融合 470

(二) 细胞质与细胞核融合 470

1. 细胞去核技术 470

2. 核质制备 471
 3. 细胞质与核质的融合 472
 - (三) 微细胞中介的基因转移 472
 - (四) 染色体中介的基因转移 474
 1. 在pH3条件下分离染色体 474
 2. 在pH7分离染色体 475
 3. 中期染色体的导入 475
 - (五) DNA中介的基因转移 477
 1. 载体DNA的分离 477
 2. 细胞DNA的制备 477
 3. 磷酸钙DNA沉淀和转移缓冲液的制备 478
 4. 受体细胞的制备和转移 478
 5. 选择系统 478
 - (六) 细胞或胚胎内微量注射外源物质 479
 1. 显微操作器 479
 2. 操作步骤 480
- 第三节 单克隆抗体技术 482
- (一) 单克隆抗体的产生与纯化 483
 1. 动物和细胞系的选择 483
 2. 免疫 485
 3. 培养液和细胞悬液的制备 486
 4. 融合程序 487
 5. 杂交瘤克隆化 489
 6. 杂交瘤细胞的冻存 489
 7. 杂交瘤的扩大培养 490
 8. 抗体的纯化 490
 9. 单克隆抗体的保存 492
 - (二) 抗体的测定 492
 1. 固相试验 493
 2. 液相系统 498
 3. 细胞试验 499
 4. 免疫细胞化学试验 501

| | |
|---------------------------|--------------|
| (三) 单克隆抗体的鉴定 | 501 |
| 1. 抗体类和亚类的测定 | 501 |
| 2. 对抗体所针对的抗原决定基进行分析 | 502 |
| (四) 单克隆抗体的应用 | 504 |
| 第六章 遗传工程 | (508) |
| 第一节 遗传工程的现状 | 508 |
| (一) 遗传工程及其特点 | 509 |
| (二) 遗传工程的施工程序 | 510 |
| 1. 目的基因的获得 | 510 |
| 2. 目的基因与载体的体外重组 | 511 |
| 3. 杂种重组DNA分子引入受体细胞并正确表达 | 512 |
| (三) 第二代遗传工程——蛋白质工程 | 515 |
| (四) 遗传工程的开发及其进展 | 516 |
| 1. 重组DNA活性蛋白质和多肽 | 516 |
| 2. 次级代谢产物 | 519 |
| 3. 基因元件 | 520 |
| 4. 改良和创建生物性状 | 520 |
| 第二节 遗传工程基本操作技术 | 523 |
| (一) 染色体DNA的制备 | 525 |
| 1. 分离细菌细胞DNA的一般方法 | 525 |
| 2. 分离枯草杆菌染色体DNA | 526 |
| 3. 分离大分子量大肠杆菌DNA | 527 |
| 4. 酵母DNA的分离 | 528 |
| 5. 分离真核细胞高分子量DNA | 528 |
| 6. 乙醇沉淀DNA | 529 |
| 7. 用冷冻干燥的植物材料制备DNA | 530 |
| 8. 用新鲜植物组织提取DNA | 531 |
| 9. 植物DNA的区带离心 | 531 |
| 10. 为 Southern 印迹法制备少量DNA | 532 |
| 11. 二苯胺法定量测定DNA | 533 |
| 12. 从新鲜叶片或愈伤组织中分离核DNA | 534 |
| 13. 叶绿体DNA的分离 | 535 |

- (二) RNA的制备 536
 - 1. 抽提果蝇成体总RNA 537
 - 2. 提取果蝇胚胎的多聚核糖体RNA 537
 - 3. 植物总RNA的制备 538
 - 4. 提纯PolyA-mRNA 539
- (三) 质粒DNA的分离 541
 - 1. 大量制备大肠杆菌质粒DNA 542
 - 2. 大量制备枯草杆菌质粒DNA 544
 - 3. Ti质粒DNA的制备 545
 - 4. 快速分离少量质粒DNA的方法 546
 - 5. 酵母质粒DNA的分离 548
 - 6. 从质粒DNA中去除RNA 549
- (四) 限制性内切酶和DNA连接酶的应用 549
 - 附: DNA的限制性内切酶消化和连接 554
- (五) DNA的凝胶电泳 555
 - 1. 大量筛选含质粒细菌的方法 558
 - 2. 限制性内切酶消化和DNA的凝胶电泳 561
 - 3. 从琼脂糖凝胶上回收DNA 562
 - 4. 制备性琼脂糖凝胶电泳 564
 - 5. Southern印迹转移 565
- (六) 质粒的转化 568
 - 1. 大肠杆菌的质粒转化 (I) 568
 - 2. 大肠杆菌的质粒转化 (II) 569
 - 3. 枯草杆菌的质粒转化 569
 - 4. 枯草杆菌原生质球的质粒转化 570
 - 5. 嗜热脂肪芽孢杆菌的质粒转化 571
 - 6. 致瘤农杆菌的转化 573
 - 7. 用碱性阳离子处理酵母细胞的转化 573
- (七) 特异DNA顺序的检测 574
 - 1. 杂交探针的制备—缺口平移 575
 - 2. DNA—DNA杂交 576
 - 3. 原位噬菌斑杂交 578

- (八) 质粒编码多肽的合成 579
1. 大细胞的基因表达系统操作 580
 2. 小细胞的基因表达系统操作 582
 3. 细菌离体蛋白质合成系统操作 583
- (九) 真核细胞离体翻译系统 590
1. 离体麦胚翻译系统 591
 2. 离体网织红细胞翻译系统 593
- (十) 蛋白质的凝胶电泳分析 595
1. SDS蛋白质抽提液的制备 596
 2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质 597
 3. 凝胶电泳分离蛋白质的银染色法 599
- (十一) 利用Cosmid载体建立基因文库 599
1. Sau3A酶部分消化细菌DNA 602
 2. 分离Sau3A部分消化的45kbDNA片段 603
 3. 应用溴化乙锭琼脂糖平皿测定DNA浓度 603
 4. Cosmid杂交分子的形成 603
 5. 包装混合液的制备和离体包装反应 604
 6. 侵染和重组体的选择 606

附录 (607)

一、主要的遗传学期刊目录 607

二、高等生物的染色体数 637

(一) 植物 637

1. 裸子植物 637
2. 被子植物 638

(二) 动物 642

1. 节肢动物 642
2. 脊索动物 642
3. 脊椎动物 642
4. 实验动物 643

三、常用缓冲液的配制 644

1. 甘氨酸-盐酸缓冲液 (0.05M) 644

2. 邻苯二甲酸-盐酸缓冲液 (0.05M) 645
3. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 645
4. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液 646
5. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (0.1M) 646
6. 乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.2M) 647
7. 磷酸盐缓冲液 647
8. 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 (0.05M) 648
9. 巴比妥钠-盐酸缓冲液 (18°C) 649
10. Tris-盐酸缓冲液 (0.05M, 25°C) 649
11. 硼酸-硼砂缓冲液 (0.2M硼酸根) 650
12. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (0.05M) 650
13. 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.05M硼酸根) 650
14. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (0.1M) 651

四、植物、动物及微生物的常用培养基 651

(一) 植物材料的常用培养基 651

1. 适用于组织培养的培养基 651
2. 适于花粉和花药培养的培养基 653
3. 适于胚培养的培养基 656
4. 适于细胞悬浮培养的培养基 658
5. 适于原生质体培养的培养基 663

(二) 微生物实验的常用培养基 668

(三) 动物组织培养常用培养基 675

五、酶 680

(一) 制备植物原生质体常用的酶 680

(二) 常用的限制性核酸内切酶 682

(三) 重组DNA实验所用的主要酶 685

六、遗传工程常用的菌株和质粒 686

(一) 大肠杆菌克隆系统 686

1. 常用的大肠杆菌菌株及性质 686
2. 载体系统 689

(二) 枯草杆菌克隆所用菌株和质粒 701

1. 克隆用的枯草杆菌菌株 701

2. 克隆用的质粒 701
 3. 克隆用的重组质粒 702
 4. 大肠杆菌和枯草杆菌中均能复制的穿梭载体 702
 5. pC194及pUB110的物理图谱 702
- (三) 酵母克隆系统 704
1. 酵母基因克隆常用的细菌和酵母株系 704
 2. 酵母基因克隆常用的载体 704
- (四) 植物遗传工程中常用的菌株及穿梭载体和Ti质粒的衍生载体 705
1. pGV3850系统 707
 2. SEV系统 708
 3. 双亲载体系统 710
- (五) 哺乳动物遗传工程的载体 710
1. pSV2载体 710
 2. pRSV载体 711
- 七、常用的同功酶检验法 712
- 八、其它有关的生化数据 718

第一章

遗传学简介

第一节 遗传学分科介绍

(一) 遗传学 (Genetics)

遗传学是研究生物遗传和变异的学科。它的研究范围包括遗传物质的本质、遗传物质的传递和遗传信息的实现三个方面。遗传物质的本质包括它的化学本质、它所包含的遗传信息、它的结构、组织和变化等。遗传物质的传递包括遗传物质的复制、染色体的行为、遗传规律和基因在群体中的数量变迁等。遗传信息的实现包括基因的原初功能、基因的相互作用、基因作用的调控以及个体发育中基因的作用机制等。

作为一门学科，遗传学的起源要追溯到奥地利学者孟德尔的豌豆杂交实验。他在1866年发表了论文《植物杂交试验》，揭示了后人称为孟德尔定律的遗传规律，奠定了遗传学的基础。他的工作到20世纪初才受到重视。1909年英国遗传学家贝特森发表了著作《孟德尔的遗传原理》，并提出了遗传学这一学科名称。从那时

起，遗传学的发展大致可以分为三个时期：细胞遗传学时期、微生物遗传学时期和分子遗传学时期。

细胞遗传学时期大致是1910~1940年。这一时期通过对遗传学规律和染色体行为的研究确立了遗传的染色体学说。1926年美国遗传学家摩尔根发表的《基因论》和1932年英国达灵顿发表的《细胞学的最新成就》是这一时期的代表著作。

微生物遗传学时期大致是1940~1960年。这一时期以微生物为材料，研究基因的原初作用、精细结构、化学本质、突变机制以及细菌的基因重组、基因调控等，大大发展了遗传学的基础理论，并使人们认识到遗传学的基本规律适用于一切生物。

分子遗传学时期是从1953年沃森和克里克提出DNA的双螺旋模型开始的。分子遗传学的基础研究工作都以微生物，特别是以大肠杆菌和它的噬菌体作为研究材料，在原核生物领域取得许多成就后，才逐渐在真核生物方面开展起来。在分子遗传学时代，另两个发展迅速的遗传学分支是人类遗传学和体细胞遗传学。自从进入了分子遗传学时期以来，在遗传学许多分支的研究中，都采用了分子遗传学手段，特别是重组DNA技术。因此，分子遗传学已成为遗传学领域的前沿学科。

(二) 细胞遗传学 (Cytogenetics)

细胞遗传学是遗传学与细胞学相结合的一个遗传学分支学科。研究对象主要是真核生物，特别是包括人类在内的高等动植物。早期的细胞遗传学着重研究分离、重组、连锁、交换等遗传现象的染色体基础，以及染色体畸变和倍性变化等染色体行为的遗传学效应。

细胞遗传学是遗传学中最先发展起来的学科，也是最基本的学科。从细胞遗传学衍生的分支学科主要有：1. 体细胞遗传学，主要研究体细胞，特别是离体培养的高等生物体细胞的遗传规律。2. 分子细胞遗传学，主要研究染色体的亚显微结构和基因活动的关系。3. 进化细胞遗传学，主要研究染色体结构和倍性

改变与物种形成之间的关系。4. 细胞器遗传学，主要研究细胞器如叶绿体、线粒体等的遗传结构。5. 医学细胞遗传学，是细胞遗传学的基础理论与临床医学紧密结合的边缘科学，研究染色体畸变与遗传病的关系等，对于遗传咨询和优生优育具有重要意义。

(三) 体细胞遗传学 (Somatic cell genetics)

体细胞遗传学以高等生物的体细胞为实验材料，采用细胞离体培养、细胞融合和遗传物质在细胞间转移等方法，研究真核细胞的基因结构功能及其表达规律等。

1956年哺乳动物的体细胞在离体培养条件下分裂，并增殖成为克隆。在植物中也发现了激动素，并从离体培养的组织诱发了器官分化，从而使体细胞遗传学的研究进入了新的阶段。以后在细胞融合、转化以及植物的原生质体技术等方面的研究工作都迅速地展开。由于这方面的工作对研究基因功能、调控以及核质关系等都具有重要意义，同时在医学与植物育种实践上也具有重大价值，因此这门分支学科受到了人们极大的重视。

植物离体细胞或原生质体再生完整植株的研究证实了植物细胞的全能性。这使植物体细胞遗传操作的研究迅速发展，包括植物细胞或原生质体的离体培养、细胞突变体筛选、植物体细胞杂交及遗传转化等。人们期望通过离体细胞的遗传操作，探索改良作物性状的新途径，成为当前蓬勃发展的生物技术研究中的重要组成部分，也是体细胞遗传学中最为活跃的一个领域。

(四) 人类遗传学 (Human genetics)

人类遗传学研究人类的形态、结构、生理、生化、免疫、行为等各种性状在遗传上的类别、人类群体的遗传规律以及人类遗传性疾病的发生机理、传递规律及预防等。着重于人类遗传性疾病的研究，亦称为医学遗传学 (medical genetics)。

1875年英国戈尔顿首倡双生儿法，用来研究遗传与环境的关系，成为人类遗传学研究的经典方法，奠定了人类遗传学的基础。

础。人类遗传学将果蝇与植物的遗传学研究所取得的基本规律加以运用，又不断地引进其他有关学科的技术与方法，紧密地与医疗保健事业的需要相结合，使这门学科得以迅速发展。

常用的方法有系谱分析法，从某一症状或性状入手，追溯先证者的直系与旁系亲属。这一般用于单基因遗传性状分析。数理统计则用于多基因性状的分析，例如体高、体重、血压和某些遗传病等。多基因性状在群体中呈正态分布，并易受环境的影响，所以常以遗传力来表示遗传因素和环境因素的相对效应。由染色体数目或结构异常而引起的染色体病则依靠细胞遗传学方法分析。染色体技术和人类性染色质的研究结果广泛应用于染色体病诊断和性别鉴定等。此外，层析、电泳、色谱分析、同位素示踪等生化技术及免疫学方法也在人类遗传学研究中广泛地应用。

(五) 毒理遗传学 (Toxicogenetics)

毒理遗传学又称为遗传毒理学(genetic toxicology)，是用遗传学方法研究环境因素对遗传物质的损害及其毒理效应。突变形、癌形成、致畸效应三者简称为毒理遗传的三致效应。研究三者关系，通过检测诱变作用来判断药物的致癌、致畸的可能性已成为毒理遗传学的重要课题。

由于绝大部分致癌物质具有诱变作用，人们现在都用细菌或离体培养细胞作为测试对象来代替动物试验。艾姆斯测验(回复突变法)以鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸缺陷型菌株为测试对象，如果菌株用某待测化学物质处理后能在没有组氨酸的培养基上形成菌落，说明发生了回复突变。根据菌落数目可估算该物质的诱变能力。这一检测系统还包括大鼠肝的微粒体酶系(Sg)，它能使一些前诱变剂转变为诱变剂，从而提高了检测的准确性。微核测试法以骨髓细胞或外周血淋巴细胞中微核(无着丝粒的染色体断片)出现的数目，作为染色体畸变的指标。姐妹染色单体互换(SCE)测试法，是在培养细胞中添加5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)，经过两个细胞分裂周期，用吉姆萨染料染色。这时两个染色单体之间

因Brdu的掺入程度不同而出现了色差，它们的互换也就显而易见。根据SCE率来检测环境诱变剂，是简速灵敏的方法。

其他还有DNA损伤修复的检测和离体培养细胞恶性转化试验等检测方法。

(六) 肿瘤遗传学 (Cancer genetics)

肿瘤遗传学研究癌的发生与遗传和环境间的关系，主要包括三方面内容：1, 恶性肿瘤易患性的遗传背景；2, 遗传物质的变化或遗传信息的异常表达与恶性肿瘤发生的关系；3, 以遗传学的方法分析环境中的致癌因素。常用的研究方法有系谱调查、双生儿法、流行病学调查、细胞遗传学方法、免疫学方法等。

人类恶性肿瘤中只有少数几种是按单基因方式遗传的，如神经母细胞瘤与Wilm瘤等，但在人类3000多种单基因的遗传性疾病中，240多种为遗传性癌前疾病，有不同程度的发癌倾向，如家族性结肠息肉病、基底细胞痣综合征、多发性内分泌腺肿瘤综合症等。常见的恶性瘤是多基因的遗传因素与环境因素共同作用的结果，如乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫颈癌等，患者的一级亲属的发病率显著高于群体的发病率。此外，先天性的染色体异常与恶性肿瘤的发生也密切相关，如先天愚型（唐氏综合征）患者易患白血病。

关于肿瘤发生的遗传机理，目前有多种假说。染色体不平衡假说，认为染色体异常是癌变的原初变化，各种因素造成细胞的不对称分裂而使子细胞内遗传物质的分布不平衡，从而影响基因的正常功能，这是肿瘤发生的原因。有些结构异常的染色体可以作为某种肿瘤的特征性染色体，如慢性粒细胞白血病的ph1染色体等，被称为标记染色体。两次突变假说认为肿瘤可分为两种类型：一类是非遗传型肿瘤，这是由于体细胞连续发生两次突变而形成的；另一类为遗传型肿瘤，第一次突变发生在患者亲代的生殖细胞中，而后一次则发生在患者的体细胞中。第一次突变是肿瘤的始动过程，第二次则是促进过程。转化基因假说认为，正常

细胞转化为恶性细胞是由转化基因(Tr)与其调节基因 i^+Tr 所控制的。当 i^+Tr 基因突变为 i^0Tr 基因时,在纯合体 i^0Tr/i^0Tr 中,Tr基因消除阻遏而被激活,致使细胞发生恶性转化。癌基因假说认为在所有的细胞中都包含着致癌病毒的全部遗传信息,其中与致癌有关的信息称为癌基因。正常细胞中与病毒癌基因同源的DNA顺序被称为原癌基因或细胞癌基因,以区别于病毒中的癌基因。分子杂交方法证明同一种癌基因在不同类别的生物中极为相似,酶切图谱也说明同一种肿瘤的癌基因的种族差异不大。原癌基因活化可能有两种方式:1,通过DNA的重排而提高原癌基因的转录活性。2,原癌基因中编码顺序的局部变化,从而转录出异常的产物。这两种情况都会导致细胞癌变。

(七) 辐射遗传学 (Radiation genetics)

辐射遗传学主要以高等动植物为研究对象,研究辐射的遗传效应。辐射包括电离辐射和非电离辐射,电离辐射包括X、 γ 射线等电磁辐射和 β 、中子、质子、 α 等粒子辐射;非电离辐射主要是紫外线。

从细胞水平来说,电离辐射的遗传效应主要是引起染色体畸变;畸变类型有末端缺失、微小体、具着丝粒和不具着丝粒的环、臂间倒位、相互易位、双着丝粒体或多着丝粒体、单位断裂、单体互换等。辐射也可引起染色体数目的改变而出现非整倍体。染色体畸变已被作为一种灵敏的生物剂量法普遍用于职业性照射、医疗照射、军事照射等方面。

在分子水平上,电离辐射的遗传效应是引起基因突变。研究方法主要有显性、隐性致死突变法,特定位点突变法等。

电离辐射导致遗传效应的过程为:①使各种分子电离激发($10^{-8} \sim 10^{-15}$ 秒);②这些分子产生许多活泼的自由原子或自由基($10^{-12} \sim 1$ 秒);③它们互相反应并和周围大分子发生反应($10^{-1} \sim 10^{-2}$ 秒);④细胞器的结构组分变化,包括染色体畸变和基因突变(几秒钟至若干年)。

紫外线是广泛应用的非电离辐射，它能使DNA分子结构发生多种变化，如氢键和链的断裂，胞嘧啶的水合作用，以及胸腺嘧啶二聚体的形成等。胸腺嘧啶二聚体的形成可以发生在两链之间，也可发生在同链相邻的胸腺嘧啶之间。双链间的二聚体使双链的解开受阻，从而使复制过程或修复过程发生差错。同链上的二聚体也会导致突变。辐射遗传学的研究对突变育种及辐射危害的防护都是非常有用的。

(八) 免疫遗传学 (Immunogenetics)

免疫遗传学主要研究免疫系统的结构和功能，包括抗原遗传、抗体遗传和免疫应答遗传三个方面。

红细胞血型抗原是一类糖蛋白，其抗原的特异性由糖蛋白的糖基结构决定。血型基因产物是一些专一性的糖基转移酶，分别催化血型抗原前体特定部位的糖基化反应，从而形成相应的特异性抗原。人体的主要组织相容性复合体称为人白细胞抗原，即HLA，决定HLA的复合位点在第6号染色体的短臂上。

抗体分子是由两条轻链和两条重链组成的免疫球蛋白。根据氨基酸顺序的变异程度，每条链都可分为可变区(V)和恒定区(C)。基因分析表明，决定轻链的染色体上，有L、V、J、C四类基因片段，L为引导片段，C为恒定片段，各有一种，V为可变片段，有150种，J为连接片段，共有5种。决定重链的染色体上有L、V、D、J、C五类基因片段，分别有1种、80种、50种、6种及8种。在淋巴细胞分化过程中，这些基因片段经过重排、连接后才被转录。这种重排和组合，可产生180亿种免疫球蛋白分子，说明了抗体的多样性。

免疫应答基因(Ir)控制着个体对抗原发生免疫应答的程度。实验表明高应答反应是显性，低应答反应是隐性。

免疫遗传学是输血、器官移植、新生儿溶血症和亲子鉴定等现代医学临床实践的重要理论基础，对于阐明免疫系统的演化、人种差异和生物进化也有重要意义。

(九) 微生物遗传学 (Microbial genetics)

微生物遗传学是以病毒、细菌、小型真菌以及单细胞动植物等为研究对象的遗传学分支学科。

微生物由于个体小,生长周期短、繁殖迅速等优点,是遗传学研究的良好材料。在40~50年代取得了巨大的进展,主要包括,(1)用射线处理链孢霉,得到了多种营养缺陷型。这对于研究基因的原初功能、基因结构和基因突变具有重大的意义,提出了一个基因一种酶的假设。(2)在大肠杆菌中,以营养缺陷型为选择标记,发现了细菌的基因重组现象,说明生物界遗传规律的普遍性,并使大肠杆菌和它的噬菌体成为分子遗传学研究的主要对象。(3)发现转化因子就是DNA,从而逐渐认识到DNA的重要意义。(4)实验证明抗药性的出现可以发生在细菌接触药物以前,表明抗药性是基因突变的结果,这一实验使人们对于生物变异规律的普遍性加深了认识。(5)噬菌体的遗传学研究证明了DNA是遗传物质,三联体是遗传密码的基本单位,并阐明了基因是不容分割的功能单位,而不是突变和重组的单位,发现了基因突变的热点,又揭示了基因的重叠现象。

微生物遗传学的迅速发展与其研究方法有密切的联系。最突出的是突变型的筛选和选择性培养方法的应用。用选择性培养方法,可以检出距离十分接近的两个突变位点之间的重组,能在短时间内测定大量的这类突变型,并从根本上改变了对于基因的认识。

微生物遗传学的发展推进了人们对遗传规律的认识,同时也推动了生产的发展,对于氨基酸和核苷酸的发酵生产、医疗卫生事业以及重组DNA技术也都作出了重要的贡献。

(十) 分子遗传学 (Molecular genetics)

分子遗传学是在分子水平上研究遗传与变异的机制,主要研究基因的本质(包括基因的化学性质、结构和组织)、基因的功能

及基因的变化等问题。

一般认为,1953年沃森和克里克提出DNA分子结构的双螺旋模型是分子遗传学的起点,它是在微生物遗传学的基础上发展起来的。早期工作应提及1955年车泽用基因重组分析方法对大肠杆菌的T4噬菌体中基因精细结构的研究,其精细程度达到DNA链上相隔仅三个核苷酸的水平,沟通了分子遗传学和经典遗传学的概念。1964年美英科学家分别证实了,基因的核苷酸顺序和它所编码的蛋白质分子的氨基酸顺序之间存在着排列上的线性对应关系,从而充分证实了一个基因一种酶的假说。此后,真核生物分子遗传学研究才逐渐开展起来。

真核生物除了与原核生物相同的特点以外,还有一些自身的特点,如普遍存在着不编码肽链的重复顺序。在真核生物及其病毒的基因组中还发现了大量的断裂基因。真核生物的染色体外遗传物质与原核生物也有很大差别。转座因子是一种可以转移位置的遗传因子,真核生物的转座因子与原核生物的转座子同样都是目前分子遗传学研究的重要课题。

在分子遗传学的发展过程中,一系列重要的研究方法与技术的开发起了重要的作用,这些技术方法还极大地影响了其他分支学科的进程。

用遗传学方法可以得到一系列突变型,如不能合成某种氨基酸、不能进行DNA复制、不能进行细胞分裂、不能完成某发育过程、不能表现某种趋化行为等。进而可对它们进行遗传学分析,应用互补测验和基因定位等手段,了解这些突变型代表几个基因,各基因在染色体上的位置。

如果两个突变分别位于两个同源的染色体上,称为反式构型,位于同一染色体上则称为顺式构型。如果两个突变不在一个基因座位上,由于基因的互补作用,细胞的表型正常;如果两个突变在同一个基因座位上,反式构型的细胞则表现为突变型。通过比较顺式和反式构型的细胞表型,从而判断两个突变是否属于同一基因座位的测验称为顺反位置效应测验,简称顺反测验或互补测

验。在反式构型中不能互补的各个突变型，在染色体上所占的一个区域称为一个顺反子。顺反子是一个必须保持完整才具有正常生理功能的遗传物质最小单位，因而是基因的同义词。

抽提、分离、纯化和测定等生物化学方法都是分子遗传学中的常用方法。特别有用的技术是顺序分析、分子杂交和重组DNA技术。由于核酸、蛋白质结构单元的排列顺序决定着它们的生物学活性，因而常需要了解它们的顺序。由于DNA分子的两条单链之间，以及DNA与其转录产生的mRNA之间，具有互补结构，可以形成杂种分子。测定杂种分子形成的方法就是分子杂交方法，可用它来测定两种生物的DNA总的相似程度，以及某一mRNA分子从DNA的哪一部分转录等。重组DNA技术则是通过限制酶和连接酶等的作用，把目的基因与载体相连接，并引进细菌细胞，通过载体的复制和细菌的繁殖便可得到这一基因DNA的大量纯制品。如果这一基因得以在细菌中表达，还可获得这一基因所编码的蛋白质。这一方法还有助于研究特定基因的结构和功能。

分子遗传学研究的方法，特别是重组DNA技术，已经成为许多遗传学分支学科的重要研究方法。分子遗传学也已经渗入到许多生物学分支学科中。以分子遗传学为基础的遗传工程则正在发展成为一个新兴的工业生产领域。

(十一) 发生遗传学 (Developmental genetics)

发生遗传学研究基因如何控制发育，分析基因和性状发育之间的关系。

19世纪末德国魏斯曼最早提出发育是受细胞核控制的。后来美国的威尔森和摩尔根分别强调了基因在发育中的作用。1940年英国沃丁顿首先提出应从基因与细胞质环境的相互作用来理解胚胎学中的反应能力、诱导和决定等基本概念。70年代初马克特与乌尔施普龙合著的《发生遗传学》总结了前人的研究，初创了这门学科的体系。

黑腹果蝇、小鼠、海胆及线虫是发生遗传学研究的常用材料。

果蝇有许多影响发育的突变型，而且唾腺巨大染色体上疏松区的消长反映了不同发育时期的基因活动情况。小鼠也有许多遗传背景清楚的纯系和致死突变型，但它们都难以得到足量的样品可供生化分析。海胆则便于取得足量的同一发育阶段的材料，但可供研究的突变型较少。线虫繁殖迅速，细胞数少而恒定，胚胎发育属镶嵌型，每一器官的来源有确定的细胞谱系可循，而且有许多突变型。此外，细菌形成芽孢的过程、噬菌体的自动装配过程也作为发育模型应用于发生遗传学的研究。

动物发育是从受精开始，通过受精卵核质之间、分裂球之间以及胚胎不同部位之间的相互作用，使基因按一定时空顺序表达，从而控制细胞和器官原基的逐步决定和分化。动物的发育类型不同，基因控制发育的具体方式也可能不同。果蝇属于镶嵌卵类型，细胞的发育命运决定得早，发育过程是一系列由大到小的发育区愈分愈细的过程，其中每一步都可能受一个或一组选择基因的控制。两栖类属于调整卵类型，发育中细胞的命运决定得晚，细胞迁移和相互作用在发育中起重要的作用。

发现了一类在胚胎发育中控制某些酶出现的时间和位置的基因，称为时序基因。例如编码黑腹果蝇淀粉酶的结构基因附近有一个map基因，它的三个等位基因控制着淀粉酶在中肠出现的时间和地位。小鼠编码 β -葡萄糖酸苷酶的结构基因也与它的时序基因Gut紧密连锁。

在小鼠的第17号染色体上发现了T基因复合体，包括六个互补群。除显性突变T以外，还包括一系列隐性致死或半致死突变t，它们各自对早期发育的某一阶段起作用。如 t^{12} 使胚停留在桑椹期，而 t^9 使中胚层细胞内迁受阻，造成中轴器官发育异常。

发生遗传学的研究对于了解畸胎、肿瘤等发生的机制，以及对于遗传病的治疗、动物遗传工程的应用等都具有重要的意义。

(十二) 行为遗传学 (Behavioral genetics)

行为遗传学研究控制生物行为的基因及其作用机制。行为

是受基因控制的复杂的生物学过程。深入了解生物行为的遗传机制，将提高人类利用动物资源的能力，推动仿生学的发展，同时也为防治行为异常的遗传病提供理论依据。

60年代后期，一些科学家通过诱变处理得到了许多影响行为的突变型，行为遗传学逐渐发展成为一门独立的学科。

大肠杆菌对某些化合物的趋向或趋避行为，包括识别、信号输入和鞭毛运动三个环节。每一环节与一系列基因有关，已经测定这些基因的位置。草履虫对障碍物的回避行为也受若干个基因的控制。线虫中也已经发现与趋化性有关的十多个基因。

果蝇的行为比较复杂，已经获得影响趋光性、趋化性、趋地性、摄食、飞翔、求偶和交配、记忆等多种行为的突变型。已经发现蜜蜂将死在巢穴中的幼虫和蛹丢到远处的特殊行为，是受两个隐性基因支配的。小鼠的一种华尔兹舞蹈突变型是由单基因隐性突变造成的。

人类也有一些由于单个基因发生突变而造成的行为异常，例如自毁容貌综合症和严重的苯丙酮尿症，表现为智能低下，行动困难。人的晕车、晕船、梦游、便秘、夜尿、磨牙等行为在一卵双生儿中有很高的一致性，智力方面的调查也都说明了遗传因素的重要性。

(十三) 数量遗传学 (Quantitative genetics)

数量遗传学是运用数理统计和数学分析的方法研究生物数量性状遗传的规律。

早在1909年瑞典的尼尔松-埃勒提出多基因学说，认为同一数量性状由若干对基因控制，各个基因对于性状的效应都很微小，而且大致相等，称为微效基因。微效基因的作用一般是累加性的，等位基因之间没有明显的显隐性关系。50年代以来随着概率论、线性代数、多元统计和随机过程的应用，使数量遗传学有了很大的发展。

群体某一数量性状的遗传变异在数量遗传学中用遗传型方差

(V_G) 来表示,它是累加方差 (V_A)、显性方差 (V_D) 和上位性方差 (V_I) 之和,而测量到的表型变异的表型方差 (V_p) 等于遗传型方差 (V_G) 与环境方差 (V_E) 之和,用公式表示为:

$$V_p = V_G + V_E = V_A + V_D + V_I + V_E$$

由于纯系亲本或杂种一代的遗传性一致,即 $V_G = 0$, 所以可用它们的方差来表示环境方差。根据上式,我们可以由表型方差和环境方差求得遗传型方差。

为判断某种性状变异可能传递给后代的程度,数量遗传学中用遗传力来表示。如奶牛出生体重的遗传力是49%,说明出生体重在很大程度上是由遗传因素决定的。广义遗传力 (h^2B) 以遗传型方差占表型方差的比值来表示,即 $h^2B = \frac{V_G}{V_p}$ 。由于遗传方差中

只有累加方差 V_A 是上下代可以固定遗传的变异量,所以育种上常用狭义遗传力,以累加方差占表型方差的比值来表示,即

$$h^2N = \frac{V_A}{V_p}$$

为估算群体或个体某一性状的稳定性,确定某表型值应该测量的次数,数量遗传学中用重复力的概念,指某性状的表型值在不同生产周期之间可能重复的程度。如牛奶乳脂率的重复力为80%,表明重复力较高,测量少数几次就能大致确定该乳牛今后的乳脂率水平。

在育种工作中,常根据性状的相关性进行间接选择,这就需要反映基因型之间相关程度的遗传相关的概念。遗传相关指同一个体两个性状的基因型中,累加效应之间的相关,它等于两性状的遗传协方差与各性状遗传标准差乘积之比。由于去除了环境影响,它比表型相关可靠。如家鸡的卵重与体重的遗传相关达50%,而卵重变异的遗传力(60%)显著大于体重(31%),所以按卵重性状来间接选育大种鸡,效果较好。

为确定选择效果,预测某性状在选择情况下的绝对进度及其它性状的相应进展,数量遗传学运用遗传进度的概念。遗传进度

是杂种后代某一数量性状的平均数，在一定选择强度下比原来群体平均数提高的数值。它是遗传力 h^2 与选择差 i 的函数，即

$$\Delta G = ih^2。$$

选择指数是对多个数量性状进行综合选择时的指标。它等于各性状表型值与指数系数乘积的代数和。

由于经济性状绝大多数是数量性状，所以数量遗传学的研究对于育种实践具有重要的指导作用。近年来基因型与环境的相互作用也成了数量遗传学的重要研究课题。

(十四) 群体遗传学 (Population genetics)

群体遗传学研究群体的遗传结构及其变化规律。它应用数学和统计学方法研究群体中基因频率和基因型频率以及影响这些频率的因素，并由此来探讨生物的进化过程。

群体遗传学起源于英国哈迪与德国温伯格1908年提出的平衡定律。如果一个随机交配的无限大群体，在没有突变、迁移或任何形式的自然选择的情况下，群体中各基因型的比率从一代到另一代将保持不变，这就是哈迪-温伯格定律。

群体遗传学的重要研究指标，是考查各种遗传方式使群体达到平衡的速度，以及由此所达到的平衡的稳定性。只有在这种平衡被打破时才发生演变；打破平衡的因素有突变、选择、迁移和漂变。

突变对基因频率的影响力不大，但突变是生物群体中遗传性变异的根本来源，加上自然选择和随机漂移等因素的作用，从而导致生物的进化。

为考虑自然选择对群体遗传组成的影响，必须了解适合度的概念。它是指生物生存并把它们的基因传给后代的相对能力。适合度受环境的影响，某一基因的适合度，还受该基因以外的基因的状态即遗传背景的影响。生物群体中，由于有害基因的存在而使群体适合度下降的现象称为遗传负荷。在影响群体的基因频率和基因型频率的因素中，特别重要的是突变和自然选择的关系，

其平衡频率都是受突变率及选择系数控制的。突变率的增高或选择系数的减小都导致有害基因平衡频率的提高。

迁移也是影响基因频率的一个因素。在自然界中，全体均一的生物种是不多的，常因分布范围和生活环境的变化而产生种内分化。如果遗传组成不同的群体之间发生个体迁移的话，基因频率就受到影响。

当群体不大时，由某一代基因库中抽样形成下一代个体的配子时所发生的误差，严重地影响群体的基因频率，这就是基因频率的随机漂移。与上面提到的突变、自然选择和迁移不同，它导致基因频率无方向性的变化。另外，非随机的交配方式，包括选型交配和近亲交配，都能导致基因型频率的变化。近交增加纯合率，血缘越近则纯合率增加越快，而杂交则正好相反。但这种非随机交配方式不影响基因频率。

群体遗传学不同于进化遗传学，进化遗传学研究物种内变异转化为物种间变异的过程，即物种的形成和绝灭。而群体遗传学研究不同世代中遗传结构的演变，它仅仅涉及品系间、品种间和亚种间的变迁，并据以培育各种新的生物品系和品种。

(孙勇如)

第二节 遗传学发展年表

1590 Z. and H. Janssen将两个凸透镜组合在筒内，首次生产出复合显微镜。

1651 W. Harvey提出了全部生物（包括人在内）都起源于卵子的概念。

1657 R. de Graaf在人的卵巢中发现了卵泡，但错误地把它们看作是卵子。

1665 R. Hooke 发表“Micrographia”，首次描述了细胞。

1668 F. Redi驳斥了蛆是自然发生的学说。

- 1677 A. Van Leeuwenhoek 观察了人和其它哺乳动物的精子。
- 1694 J.R. Camerarius 初次进行授粉实验，报道了显花植物中性的存在。
- 1735 C.V. Linné 出版了《自然的体系》第一版，在他的生涯中，该分类学著作共完成了16版。该书的第10版，成为动物界现代科学命名的出发点。与他的《Species Plantarum》一书在植物界齐名。他倡导的二名法至今还在应用。他坚持种不变的观点及客观分类的主张，从而提出了研究种起源的方法论。
- 1761-1767 J.G. Kölreuter 进行了烟草属的种间杂交，发现杂种的外表形质在量上介于双亲之间，正反交没有差异。他认为双亲对于子代特性的影响是均等的。
- 1769 L. Spallanzani 证明如果将器皿密封，并在沸水中处理30分钟以上，就可防止微生物在培养基中“自发发生”。1780年，他用两栖类作人工授精实验，证明卵与精液的接触是受精与发育所必需的。
- 1798 T.R. Malthus 匿名发表了人口论“An Essay on the Principle of Population”，启示了达尔文在1838年提出的生存竞争与适者生存的概念。
- Edward Jenner 首次报道接种牛痘病毒来防止天花，从而建立了主动免疫的原理，开创了免疫学。
- 1809 J.B. de Monet Lamarck 提出，通过适应性状的不断强化及完善，物种可以逐渐变为新种，而这些获得性状能被传递给后代。
- 1820 C.F. Nasse 记述了人的血友病是伴性遗传。
- 1822-1824 T.A. Knight, J. Goss 与 A. Seton 分别用豌豆进行杂交，观察到了子一代的优势及各遗传特征在子二代中的分离。但没有继续研究它们的后代，也没有测定遗传特性的分离比例。
- 1825 F.V. Raspail 进行了淀粉的碘反应实验，成为组织化学的基础。

1827 K.E.von Baer 首次准确地描述了人卵。

1830 G.B.Amici 展示了花粉管伸向花柱底部，直达胚珠。

1831 R.Brown 记述了细胞中的细胞核。

—— 12月27日英国Beagle号军舰从普利茅斯港出发，开始绕地球航行。22岁的博物学家达尔文乘船随行。1833年9月15日到达Galapagos 诸岛。达尔文花了5个星期考察了动植物。岛上极丰富的近缘种，使达尔文想到岛上有些种是从大陆迁居而来，这些种后来发展成各式各样的姐妹种，专门适应于各种新的环境条件。

1838 蛋白质一词首次在化学论文中出现，作者是G.J.Mulder。但这个词是J.J.Berzelius 首次提出的。

1838-1839 M.J.Schleiden和T.Schwann 建立了细胞学说，这是生物学界唯一可与进化论相比的伟大法则。Schleiden 在核内发现了核仁。

1841 A.Kölliker 证实精子就是从精巢里的细胞转变来的性细胞。

1845 J.Dzierzon 报道了雄蜂是从未受精的卵孵化而来的，而工蜂与蜂王是从受精卵孵化来的。

1855 R.Virchow 提出了新细胞是从原有的细胞分裂产生的原理。

1856 Gregor Mendel, 奥地利Brünn市Augustinian 修道院的修道士，开始用豌豆进行育种实验。

1859 达尔文发表物种起源。

1860 T.A.E.Klebs 介绍了石蜡包埋法。

1861 L.Pasteur 反驳微生物自然发生学说。

1865 Gregor Mendel 于2月8日和3月8日、在Brünn 自然科学研究协会的每月例会上报告并解释了他的豌豆遗传研究。

1866 G.Mendel 发表了“植物杂交试验”。但未引起重视。

—— F.Miescher 分离出核蛋白。

1869 F.Galton 发表“天资遗传”，强调了智力的遗传基础，首

- 次对双胞胎的智能特性进行比较。
- 1870 W. His 发明切片机。
- 1873 A. Schneider 首次记述有丝分裂。
- 1875 O. Hertwig 从海胆繁殖的研究得出结论，动植物的受精在于雌雄双亲所提供的两个细胞核的物理结合。
- E. Strasburger 记述了种籽植物的细胞分裂。
- F. Galton 引人注目地用双胞胎的研究来阐明遗传与环境对于行为的相对重要性。
- 1876 O. Bütschli 记述原生动物核的二形性。
- 1877 H. Fol 报道了海星精子穿入卵子的观察，可以看到精子的完整核转移到卵内，成为雄性原核。
- E. Abbe 开始发表显微镜光学原理的重要资料。
- 1878 W. Kuhne 创造“酶”一词。
- 1879 W. Flemming 研究了蝾螈尾鳍上皮的有丝分裂。他指出核的分裂包括染色体的纵裂及由此产生的姐妹染色单体迁移到未来的子核中。他也创造了“染色质”一词。
- 1881 E. G. Balbiani 在摇蚊幼虫唾腺细胞中发现“交叉条纹状细线”，但他没有认识到这是多线染色体。
- R. Koch 发明了至今还用的纯菌分离培养法。
- 1882 W. Flemming 发现灯刷染色体，提出“有丝分裂”一词。
- 1883 E. van Beneden 研究了多种蛔虫的减数分裂，其染色体数为 $2n = 4$ 。他报道了蛔虫配子的染色体数为体细胞的一半，而体细胞的染色体数在受精时恢复。他还记述了哺乳动物的受精过程。
- W. Roux 提出核内的染色体是遗传因子的载体。
- 1887 A. Weismann 推测所有有性生物都必然发生染色体的周期性减数。
- 1888 T. Boveri 记述了中心粒。
- W. Waldeyer 提出“染色体”一词。
- 1889 F. Galton 将群体的数量性状测定法引入遗传学。

1890 R. Altmann 报道了细胞内存在着“细胞质生活粒”，并推断它们作为细胞内的共存者，是“基本的生物体”，执行着它们的寄主所必不可少的过程。C. Benda(1898)称这些细胞器为“线粒体”。

—— E. von Behring 证明已被免疫过的动物的血清里含有一种因子，能专门杀死用作免疫的生物体。这些因子现在叫做抗体。

1892 T. Boveri 记述了蛔虫成熟分裂中染色体的配对。

—— A. Kossel 发现RNA。

—— A. Weismann 主张种质是独立于生殖细胞其它部分的特殊物质，遗传变异是由种质的变化产生的。否定拉马克的获得性遗传学说。

1895 W. C. Roentgen 发现X射线。

1896 E. B. Wilson 发表了“发育与遗传中的细胞”(The Cell in Development and Heredity)。这篇有影响的论文，精辟地归纳了Schleiden和Schwann提出细胞学说半个世纪以来的细胞学资料。

1897 E. Buchner 展示用无细胞酵母提取物进行酒精发酵。

1898 C. Benda 发现线粒体。

—— T. Boveri 记述了蛔虫染色质的减少，

1899 M. W. Beijerinck 证明烟草镶嵌病起因于一种自体繁殖因子。这些因子能通过细菌滤纸，光学显微镜看不到，在细菌培养基上也不能生长。他提出这种病毒是自体繁殖的生命亚细胞形式，是迄今未知的一种生物体类型。

1900 H. de Vries, C. Correns和E. Tschermak各自重新发现了孟德尔的论文。de Vries和Correns用几种植物作了与孟德尔早期研究相类似的育种实验，并分别对他们的结果作出了相似的解释。因此当他们看到孟德尔的论文时，就立即确认了它的重大意义。W. Bateson也在伦敦皇家学会上强调了孟德尔贡献的重要性。

—— K. Pearson 确立了 χ^2 检定法。

- K. Lansteiner 发现了人的血液凝集反应。
- P. Ehrlich 推测抗原与抗体相结合是由于它们结构上的互补性。
- 1901 H. de Vries 用“突变”一词来解释月见草突然的、激烈的、自发的变化。
- T. H. Montgomery 研究了几种米翅目的精子发生,他断定减数分裂时母本染色体只与父本的染色体配对。
- K. Landsteiner 提出人类可分成三种血型: A、B 和 C, C 型后来改称为 O 型。
- E. von Behring 由于抗血清疗法的研究而获得诺贝尔奖金。
- 1902 C. E. McClung 注意到各种昆虫都产生数量相等的两类精子,一类精子含有“副染色体”,而另一类没有。他提出这种额外染色体是性的决定因素,并声称性别是受精时决定的,不只昆虫是这样,其他生物,包括人类在内可能也不例外。
- T. Boveri 研究了单倍体、二倍体及非整倍体海胆胚的发育,发现生物必需有完整的染色体组才能正常发育。从而推断各染色体都载有不同的遗传要素。
- W. S. Sutton 发展了染色体学说,提出基因对的独立分配起源于减数分裂时染色体行为的假设。因为二价体中同源物的分离方向不受其他二价体的影响,所以它们所含的基因也是独立分配的。
- F. Hofmeister 和 E. Fischer 提出所有蛋白质是氨基酸常规地通过肽键缩合而形成的。
- 1902-1909 W. Bateson 采用了“遗传学”、“等位基因”“纯合体”、“杂合体”、“ F_1 ”、“ F_2 ”及“上位基因”等名词。
- 1903 W. Waldeyer 称有丝分裂时染色体上由纺锤丝附着着的部位为着丝点。
- 1904 A. F. Blakeslee 在真菌中发现了异核融合。
- 1905 L. Cuénot 发现将携带黄毛基因的小鼠互相交配时,后代

总是以2:1的比例产生黄毛鼠和野色鼠。因此推断黄毛鼠是杂合体。W.E.Castle和C.C.Little于1910年证明黄色纯合体死在子宫内。因此,野鼠色系列中的这一显性等位基因(A^y)是第一个被证明的纯合致死基因。

1906 W.Batson和R.C.Punnett 以香豌豆为材料,报道了连锁的首例。

1907 R.G.Harrison 用血淋巴液培养蛙的中枢神经片段,观察到了神经纤维的派生。他由此而发明了组织培养。

1908 G.H.Hardy和W.Weinberg 通过各自独立的研究,将群体遗传学的哈迪-温伯格定律公式化。

1909 G.H.Shull 倡导用自交系生产商品化玉米种。该杂交玉米方案导致价值十亿美元的粮食增产。

—— A.E.Garrod 发表“先天性代谢异常”,这是人类(或其他任何物种)生化遗传学的最早研究。

—— F.A.Janssens 指出非姐妹染色单体之间的交换产生交叉。

—— C.C.Little 创始了一种育种法,首次培育出鼠的近亲繁殖系(现在被称为DBA)。

—— W.Johannsen 从事豆科植物自交系的种籽大小的遗传研究,认识到将有机体的表现与它的基因构成进行区分是必要的。为此他提出了“基因型”、“表型”及“基因”这些新词汇。

—— C.Correns和E.Bauer 研究花斑植物中叶绿体缺失的遗传,发现在某些情况下,不能形成正常叶绿体的特性是非孟德尔方式遗传的。

—— H.Nilsson Ehle 用多因子假设来解释小麦种皮颜色的数量遗传。

1910 T.H.Morgan 发现了白眼果蝇,由此又发现了性连锁。开始了果蝇遗传学。

—— W.Weinberg 发展了一种方法,用小家族资料所得的各种确定值,来修正人类谱系孟德尔分离的期待值。

—— P.Rous 将鸡肉瘤的无细胞滤液注射到受体鸡中,诱发了新

的肉瘤。

1911 T.H.Morgan 提出果蝇的白眼、黄体和小翅基因都连锁在X染色体上。

—— W.R.B.Robertson 指出一种直翅目昆虫的等臂染色体可能与另一个种的两个近端着丝点染色体一致，并推断等臂染色体可能是进化过程中，由近端着丝点染色体融合产生的。为纪念他，这种整臂融合被称为罗勃逊氏易位。

1912 A.Wegener 提出大陆漂移的概念。

—— F.Rambousek 认为蝇蛆唾腺细胞中“交叉条纹状细线”就是染色体。

—— T.H.Morgan 证实雄性黑腹果蝇不发生交换。他还首次发现性连锁致死。

1913 Y.Tanaka 报道雌性家蚕不发生交换。该种的异配性别是雌性。

—— W.H.Bragg和W.L.Bragg 证实对X射线衍射图进行分析可以确定晶体的三元原子结构。

—— A.H.Sturtevant 提供了果蝇连锁概念的实验基础，并制作了第一张基因图。

1914 C.B.Bridges 在果蝇的减数分裂中发现不分离现象。

—— C.C.Little 假设移植瘤的接受或拒绝有其遗传基础。

1915 F.W.Twort 分离出第一个滤过性细菌病毒。

—— R.B.Goldschmidt 用“间性体”一词来描述舞毒蛾的一些亚种间杂交所产生的性畸形。

—— J.B.S.Haldane, A.D.Sprunt和N.M.Haldane 记述了脊椎动物(鼠)连锁的首例。

1916 H.J.Muller 在果蝇中发现交叉干扰。

1917 F.d'Herelle提出术语“噬菌体”，开发了病毒滴定度检验法。

—— O.Renner 展示月见草属的各个种都是复合杂合体。

—— O.Winge 强调了多倍体在被子植物进化过程中的重要作用。

- C.B.Bridges 在果蝇首次发现了染色体缺失。
- 1918 H.Spemann 证实胚的生命部分可以刺激它部分的形态建成，并导致它的形态分化（胚胎诱导）。从而他发现并命名了“组织原”。
- H.J.Muller 在果蝇中发现平衡致死现象。
- 1919 T.H.Morgan 强调黑腹果蝇的连锁群数目与单倍染色体数相等。
- C.B.Bridges 发现了果蝇的染色体复制。
- 1920 A.F.Blakeslee, J.Belling和M.E.Farnham 在曼陀罗中发现了三体。
- H.Kniep 记述并正确地解释了*Schizophyllum commune*及相关的担子菌纲中的不亲和系统。
- 1921 F.G.Banting和C.H.Best分离出胰岛素并研究其生理特性。
- R.B.Goldschmidt 发表了工业黑化型的初次遗传分析并论述其进化含义。
- C.B.Bridges 在果蝇中报道了第一例单体（第四染色体为单数）。
- 1922 L.V.Morgan 发现果蝇的并连X染色体。
- R.E.Cleland 记述了月见草减数分裂中的染色体环。
- A.F.Blakeslee, J.Belling, M.E.Farnham及A.D.Bergner 发现了单倍体曼陀罗。
- 1923 C.B.Bridges 观察到了果蝇的染色体易位。
- R.Feulgen和H.Rossenbeck 记述了当今DNA定位最有效的细胞化学方法。
- O.Winge在植物（小麦）中最早发现了单体。
- T.Svedberg 制作了第一台超速离心机。
- A.E.Boycott和C.Diver 记述了控制蜗牛壳螺旋方向的“延迟的”孟德尔遗传。
- A.H.Sturtevant 提出蜗牛壳螺旋方向是由母体基因型控制的卵质特性所决定的。

- J.K.Santos用*Elodea*, H.Kihara和T.Ono用*Rumex*, O.Winge用*Humulus* 分别证实, 某些雌雄异株植物是XX-XY的性决定型。
- 1925 C.B.Bridges 完成了他对三倍体果蝇的非整倍体后代的细胞学分析, 确定性染色体与常染色体之间的关系控制着性的表现型。
- E.M.East和A.J.Mangelsdorf 首次满意地解释了显花植物的自花不孕现象。
- A.H.Sturtevant 分析果蝇的棒眼现象, 发现了位置效应。
- F.Bernstein 提出ABO血型是由一组等位基因决定的。
- T.H.Goodspeed和R.E.Clausen 创造了一个烟草双二倍体。
- 1926 E.G.Anderson 证实果蝇X染色体的着丝点在黄体位点的对侧端。
- S.S.Chetverikov 介绍了野生果蝇群体的遗传分析。
- J.B.Sumner 分离第一个结晶酶, 并证明它(脲酶)是一种蛋白质。
- A.H.Sturtevant 最先在果蝇中发现倒位。
- R.E.Clausen和T.H.Goodspeed记述了植物(烟草属)中第一例单体分析。
- 1927 K.M.Bauer报道将皮肤从一个单卵双生儿移植到另一个身上时, 没有遭到排斥。
- J.Belling提出减数分裂时非同源染色体间的交换导致环状染色体。
- J.B.S.Haldane 推测在各种啮齿动物与食肉动物中控制皮毛颜色的一些基因在进化上可能是同源的。
- J.Belling 介绍用乙酸洋红技术压片的染色体。
- B.O.Dodge 介绍红色链孢霉的遗传研究。
- H.J.Muller 报道用X射线人工诱发果蝇突变。
- 1928 L.J.Stadler报道玉米的人工诱变, 证实剂量与频率呈直线关系。

- F. Griffith 发现肺炎球菌属的模式转化。成为 Avery, Macleod 和 McCarthy (1944) 工作的基础。
- L. F. Randolph 识别了植物细胞的正常染色体与超数染色体。称正常染色体为“A染色体”，超数染色体为“B染色体”。
- E. Heitz 引入“异染色质”一词。
- 1929 A. Fleming 发现青霉素。
- C. D. Darlington 首次提出，交叉使同源染色体在减数分裂中期 I 保持在一起，从而使它们能在后期 I 分到两极。
- R. C. Tryon 对大鼠的迷宫学习能力成功地进行了连续选择。
- 1930 R. E. Cleland 和 A. F. Blakeslee 证明月见草属中基因组的特殊传递模式，是由平衡致死与相互易位的复合体系所造成的。
- R. A. Fisher 发表“自然选择的遗传学原理”(The Genetical Theory of Natural Selection)。
- K. Landsteiner 的免疫学研究获诺贝尔奖。
- 1931 C. Stern 提供了交叉的细胞学证据。
- H. B. Creighton 和 B. McClintock 也得到同样结果。
- S. Wright 发表《孟德尔式种群的进化》(Evolution in Mendelian Populations)。该书与 Fisher 的著作，以及 J. B. S. Haldane 于 1930 到 1932 年在“自然与人工选择的数学原理”总标题下发表的一系列论文一起，构成了群体遗传学的数学基础。
- C. D. Darlington 报告交叉可以移到二价体的末端而染色体不断裂。现在已经知道这种“移端”过程只在某些种内存在。
- B. McClintock 用玉米证明，如果一个染色体片段相对倒置的话，该倒位的个别杂合子在粗线期逆向配对。
- 1932 M. Knoll 和 E. Ruska 记述了现代电子显微镜的原型。
- 1933 T. S. Painter 介绍了果蝇唾腺染色体的细胞遗传学研究。
- H. Hashimoto 解决了家蚕性决定的染色体控制问题。
- A. W. K. Tiselius 发明了将带电分子分离开的电泳装置。
- B. McClintock 证实了玉米中臂内倒位杂合体的倒位环中，

- 单一交换产生了无着丝粒和双着丝粒的染色单体。
- T.H.Morgan 由于发展了基因理论而获得诺贝尔奖金。
- 1934 M.Schlesinger 报道某些噬菌体是由DNA与蛋白质组成的。
- P.L'Héritier和G.Teissier 用实验证明了有害的基因从饲养箱饲养多代的果蝇群体中消失。
- A.Fölling 发现了遗传代谢失调的苯酮尿症能导致智力障碍。
- H.Bauer 认为蝇蛆唾腺细胞的巨大染色体是多线染色体。
- B.Mcclintock 提出玉米的核仁组织者会因为易位而分裂开，每个裂片都能组织独立的核仁。
- 1935 J.B.S.Haldane 首次计算了人的基因自发突变频率。
- F.Zernicke 记述了相差显微镜的原理。
- G.W.Beadle, B.Ephrussi, A.Kuhn和A.Butenandt 完成了果蝇和*Ephestia* 眼睛色素合成的生化遗传研究。
- W.M.Stanley 成功地分离并结晶出烟草镶嵌病毒。
- C.B.Bridges 发表黑腹果蝇唾腺的染色体图。
- H.Spemann 因胚胎诱导研究而获得诺贝尔奖金。
- 1936 J.Schultz 报告了果蝇基因的镶嵌表现与它对异染色质的相对位置有关。
- J.Caspersson 用细胞分光光度测定法研究了细胞的定量化学组成。
- J.J.Bittner 报道小鼠乳房癌是由母乳传递的病毒样因子引起的。
- A.H.Sturtevant和T.Dobzhansky首次报道将倒位用于构建染色体的系统树。
- C.Stern 发现果蝇体细胞的染色体交换。
- R.Scott-Moncrieff 综述了植物的色素遗传。这项研究的大部分工作是John Innes 园艺学院的英国学者做的，早期成员的工作确定了导致类黄酮与类胡萝卜素化学变化的基因置换。
- 1937 T.Dobzhansky 发表“遗传学及种的起源”。

- A.F.Blakeslle和A.G.Avery 报道用秋水仙素诱发多倍体。
- T.M.Sonneborn 在草履虫属发现接合型。
- F.C.Bawden和N.W.Pirie报道烟草镶嵌病毒中虽然主要是蛋白质，但也含有少量的RNA(约5%)。
- P.A.Gorer 在实验鼠中发现第一个组织相容性抗原。
- H.Karström 指出某些细菌酶的合成是由于培养基中加入了它们的作用物而受到激发的。他称其为“适应酶”，以便与不受培养基成分的影响而总能形成的“组成酶”相区别。
- 1938 B.Mcclintock 记述了裂合桥周期。
- T.M.Sonneborn 发现草履虫的杀伤因子。
- M.M.Rhoades 记述玉米的增变基因。
- H.Slizynska 对黑腹果蝇唾腺X染色体上，缺刻“翅”基因的几个重复缺失作了细胞学分析，确定了有关基因(w, N)条带的位置。
- 1939 E.L.Ellis和M.Delbrück 研究大肠杆菌噬菌体的生长，这标志着现代噬菌体研究的开始。他们设计了“一步生长”实验，证实了在噬菌体吸附到细菌上之后的“潜伏期”间，噬菌体在细菌内复制，最终其后代被“突发性”释放。
- P.Levine和R.E.Stetson发现了由于胎儿带有父亲的一个新血型抗原而导致的母体免疫。后人验明该抗原就是引起胎儿溶血症的人类Rh血型。
- A.W.K.Tiselius和E.A.Kabat 证实抗体属于 γ 类血清球蛋白。
- 1940 W.Earle从C3H 小鼠建立稳定的L细胞株。
- K.Landsteiner和A.S.Wiener 发现Rh因子。
- 1941 G.W.Beadle和E.L.Tatum 发表红色链孢霉生化遗传的经典研究，提出一个基因与一个酶的学说。
- J.Brachet和T.Caspersson 分别得出结论，RNA 位于核仁和细胞质里，细胞的RNA含量直接与它的蛋白质合成能力有关。

- A.J.P. Martin和R. L.M. Synge 开发了分配色谱技术,并用以测定蛋白质水解物中的氨基酸。
- A.H. Coons, H.J. Creech和R.N. Jones开发了免疫荧光技术,证实特异细胞上存在有抗体反应位点。
- 1942 R. Schoenheimer 发表“生物体组分的动态”(The Dynamic State of Body Constituents),记述了同位素标记化合物在代谢研究中的应用。他提出了有机化合物在细胞内“周转”(turnover)及“代谢库”的概念。
- L.J. Stadler和F.M. Uber 证明紫外光诱发玉米花粉突变的效果与核酸的吸收光谱一致。
- G.D. Snell 开始培育高度纯化的小鼠近交系,并将其用于研究与移植排斥相关的基因。
- 1943 美国田纳西州奥克里季城的x-10反应堆开始生产放射性同位素。
- A. Claude 分离并命名了微粒体,指出它含有细胞RNA的大部分。
- S.E. Luria和M. Delbrück 明确地证实细菌经历的自发突变,开创了细菌遗传学的研究领域。
- 1944 O.T. Avery, C.M. Macleod和M. McCarty叙述了肺炎球菌的转化原理。近乎纯DNA转化的事实表明遗传物质是DNA而不是蛋白质。
- T. Dobzhansky阐述了果蝇*Drosophila pseudoobscura*和*D. persimilis* 第三染色体基因排列的系统发生。
- E.L. Tatum, D. Bonner和G.W. Beadle用脉孢菌属*Neurospora crassa* 的突变株研究了色氨酸合成的中间代谢。
- 1945 R.R. Hunniphrey 证实urodeles的异配性别是雌性。
- E.B. Lewis发现果蝇的顺反位置效应。
- R.D. Owen 报道二卵双生牛常常终生保持混合的红血球,这是胎儿绒毛膜血管吻合的结果。这种嵌合现象是免疫耐受性的首例。

- 1946 谈家桢以亚洲异色瓢虫为实验材料,提出了镶嵌显性理论。
- A. Claude 在差速离心的基础上建立了组织分级分离技术及其生化鉴定的方法。
 - M. Delbrück和W. T. Bailey; 以及A. D. Hershey 分别证实菌体的遗传重组。
 - J. Lederberg和E. L. Tatum 证实细菌的遗传重组。
 - C. Auerbach和J. M. Robson 报道芥子气诱发了果蝇突变。
 - J. A. Rapoport 证实了甲醛对果蝇的诱变效应。
 - J. Oudin 发展了凝胶扩散, 抗原-抗体沉淀法, 称为Oudin 法。
 - H. J. Muller, J. B. Sumner 及 W. M. Stanley 分别由于他们对辐射遗传学的贡献, 结晶酶的工作及病毒纯化与其化学特性的研究, 获得了诺贝尔奖金。
- 1948 A. Boivin, R. Vendrely 和 C. Vendrely 证实生物体的各种细胞中, 单套染色体的DNA量是一定的。
- H. K. Mitchell 和 J. Lein 发现红色链孢霉的一些突变体缺乏色氨酸合成酶, 为一个基因一个酶的学说提供了第一个直接的证据。
 - P. A. Gorer, S. Lyman 和 G. D. Snell 发现了小鼠中主要的组织相容性位点。它在第17染色体上, 被称为H₂。
 - O. Ouchterlony 开发了抗原-抗体的双向扩散沉淀试验, 被称为 Ouchterlony 试验。
 - G. D. Snell 引入“组织相容性基因”一词, 并阐明了移植时是否被排斥的规律。
- 1949 B. Ephrussi, H. Hottinger 和 A. M. Chimenes 发现酵母小群落胞质突变。
- M. M. Green和K. C. Green证实果蝇的“菱形”(lozenge)位点可分为三个亚位点。
 - A. Kerner 发现酵母菌中潜伏的紫外线伤害被可见光激活的光致复活作用。

- J. V. Neel 用遗传学证据证明，镰刀形红细胞贫血病，是以简单的孟德尔方式遗传的常染色体隐性性状。
- L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer 和 I. C. Wells 证明 H^S 基因产生异常的血红蛋白，从而引入分子病受遗传控制的概念。
- M. L. Barr 和 E. G. Bertram 证明雄猫和雌猫在神经细胞性染色质的形态上存在着差异。
- 1950 B. McClintock 发现玉米Ac系和Ds系转位因子。
- E. Chargaff 为核酸结构的研究奠定了基础。他证实DNA中腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)的数量总是相等的；同样，鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)的数量也总是相等的。这些发现后来给Watson与Crick以启示，DNA是由两条多核苷酸链组成，它们以A与T及G与C之间的氢键相结合。
- A. Lwoff 和 A. Gutman 研究巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium*) 的溶源株，证实每个细菌都隐藏着非感染型病毒。它使细菌能在没有外源噬菌体参与的情况下产生新的噬菌体。他们称这非感染期病毒为“原噬菌体”(Prophage)。Lwoff 与 L. Siminovitch, N. Kjeldgaard 共同证明，原噬菌体可以被紫外线诱发产生感染性病毒。
- E. Lederberg 在大肠杆菌发现第一个病毒游离基因“lambda”。
- H. Latta 和 J. F. Hartmann 介绍用玻璃刀作超薄切片。
- G. L. Stebbins 出版“植物的变异与进化”。
- 1951 G. Gey 建立人的海拉 (HeLa) 细胞株。
- J. Mohr 首次证实人常染色体基因 Lewis 与 Lutheran 间的连锁。
- C. Stormont, R. D. Owen 与 M. R. Irwin 记述了牛的复等位基因B与C血型系的血清交叉反应。
- Y. Chiba 用细胞化学方法证明叶绿体中存在着DNA。
- N. H. Horowitz 和 U. Leupold 培育了大量的 *E. coli* 和

- N. crassa* 的温度敏感突变群体，以确定它们执行必要机能的基因的百分比。所得的值分别为23%和46%。
- 1952 徐道觉首次提出人的染色体数是46。
- G. E. Palade 首次发表线粒体的高分辨率的电子显微照片。
- R. Dulbecco 运用细菌病毒学技术研究动物病毒。他统计了西方马脑脊髓炎病毒在鸡胚单细胞层上的噬菌斑。
- D. Mazia 和 K. Dan 分离出海胆的有丝分裂器，并开始研究其生化特性。
- N. D. Zinder 和 J. Lederberg 记述了沙门氏菌(*Salmonelle*) 的转导。
- R. Briggs 和 T. J. King 将囊胚细胞的活性核移植到去核的蛙卵里。事后观察到移植的细胞核经历了染色体变化。
- W. Beermann 观察了多线染色体膨松形成的时期与组织专一性，指出它们是不同的基因活性的表型反映。
- F. Sanger 及其同事阐明了蛋白质激素——胰岛素的全部氨基酸序列，证明它含有两条以二硫键相结合的多肽链。
- A. D. Hershey 和 M. Chase 证明噬菌体的 DNA 进入寄主，而大部分蛋白质留在外面。
- D. M. Brown 和 A. Todd 证明DNA与RNA是3'-5'键连接的聚核苷酸。
- G. Pontecorvo 和 J. A. Roper 记述了曲霉 *Aspergillus nidulans* 的体细胞重组。与果蝇不同，重组核形成能繁殖的纯系供进一步的分析。
- 1953 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 提出了DNA的模式，认为DNA是由靠嘌呤与嘧啶之间的氢键相结合的两条互相缠绕的螺旋链所组成的。
- C. C. Lindegren 发现酵母菌的基因转换。
- A. Howard 和 S. R. Pele 用放射自显影技术证明，真核细胞的细胞分裂周期，包括不合成DNA的合成前期(G_1)，核

内DNA含量加倍的DNA合成期(S)，合成后期(G_2)，然后有丝分裂。

—— W. Hayes 在细菌重组中发现极化行为。他分离出大肠杆菌的高频重组的H系菌株(Hfr H)，证明有些基因容易从Hfr株转移到F⁻株，而另一些基因不行。

—— R. E. Billingham, L. Brent 和 P. B. Medawar 证明用实验方法可产生免疫耐受性。

—— Porter-Blum 和 Sjöstrand 使超薄切片机成为商业产品。

—— J. B. Finean, F. S. Sjöstrand 和 E. Steimann 首次发表了叶缘体切片的电子显微镜照片。

—— K. R. Porter 发现并命名了内质网(endoplasmic reticulum)，验明它就是胞质嗜碱性的源泉。

—— G. D. Snell 发现小鼠主要的组织相容性复合体(H-2)是由复合位点组成的。

1954 A. J. Dalton 和 M. D. Felix 首次详细地记述了高尔基复合体的超微结构。

—— J. Dausset 观察到一些接受多次输血的病人会产生抗体，抗别人的白细胞抗原，而不抗自己的白细胞抗原。这些抗体确定了最早的HLA抗原，并导致人组织相容性体系的解说。

—— N. K. Jerne 提出抗原的作用是在抗原显露之前选择性地刺激那些合成相应抗体的细胞。

—— E. S. Barghoorn 和 S. A. Tyler 在沉积岩中发现20亿年前的丝状与球状微生物化石。这个发现证明在极长的元古代就存在着生命。

—— A. C. Allison 证明镰刀形红细胞基因杂合的个体在疟疾区具有优势。

1955 M. B. Hoagland 得到了不含细胞的生物制品，可合成蛋白质。

—— S. Benzer 研究了大肠杆菌T4噬菌体rII部位的细微结构，杜撰了“顺反子”(cistron)、“重组子”(recon)和“突变子”

(muton) 等术语。

—— N. K. Jerne 提出抗体形成的选择学说，主张所有的抗体都是遗传决定的。这一基本概念后来被所有的克隆选择学说所接受。

—— H. Fraenkel-Conrat 和 R. C. Williams 将来源不同的核酸和蛋白质重组成烟草镶嵌病毒“杂种”。

—— O. Smithies 用淀粉凝胶电泳鉴定血浆蛋白质的多型性。

—— R. H. Pritchard 研究曲霉“需要腺嘌呤”突变体的等位基因系列的线性排列。他证实了 Pontecorvo 的结论，假如突变体基因在不同的亚位点上，那么同一基因的不同等位基因之间可以发生交换。

—— C. de Duve 与四位同事记述了含有水解酶的细胞内小泡，称其为溶酶体 (lysosome)。

—— P. Grabar 和 C. A. Williams 发明用免疫电泳技术来分析复杂的抗原分子混合物。

1956 H. B. Kettlewell 研究蛾 *Peppered Moth* 的工业黑化现象。他证明在蛾的栖息地，与不显目的蛾相比较，显目的蛾被鸟吃掉的更多。

—— F. Jacob 和 E. L. Wollman 用实验方法阻碍大肠杆菌的接合过程，并表明供体菌的一段DNA插入受体菌。

—— S. Ochoa 和 A. Kornberg 领导的小组成功地用离体酶法合成RNA与DNA。

—— J. H. Tjio 和 A. Levan 证明人的二倍体染色体数是46。

—— C. O. Miller 和他的同事分离出促进植物细胞分裂的物质——激动素，并确定了它的化学结构。

—— T. T. Puck, S. J. Cieciura 和 P. I. Marcus 成功地将人体细胞离体培养成克隆。

—— G. E. Palade 和 P. Siekevitz 分离出核糖体。

—— M. J. Moses 和 D. Fawcett 各自观察了精母细胞的联合会丝复合物。

— A. Gierer, G. Schramm 和 H. Fraenkel-Conrat 各自用实验说明, 一个化学纯的核酸——烟草镶嵌病毒的 RNA 具有感染性, 也有遗传能力。

1957 S. A. Berson 和 R. S. Yalow 首次用放射免疫测定法, 检测出接受外源胰岛素的病人所产生的胰岛素抗体。

— J. H. Taylor, P. S. Woods 和 W. L. Hughes 最早用有高分辨能力的放射自显影技术中³H标记的胸腺嘧啶脱氧核苷, 来验证蚕豆染色体复制期间标记物的半保留分配。

— V. M. Ingram 报告正常血红蛋白与镰刀形红细胞血红蛋白的差异, 在于单个氨基酸的代换。

— A. Todd 因核苷与核苷酸结构的研究而获得诺贝尔奖金。

1958 F. Jacob 和 E. L. Wollman 证明大肠杆菌的单个连锁群是环状的, 指出不同高频重组菌株 (*Hfr*) 的不同连锁群是由使环开裂的插入因子作用在环状连锁群的不同位点所致。

— F. H. C. Crick 提出蛋白质合成期间氨基酸被一个含有核苷酸的衔接分子带到模板上, 衔接体正是适合 RNA 模板上的那部分。因此, Crick 预言了转移 RNA (tRNA) 的发现。

— P. C. Zamecnik 与其同事阐明了氨基酸-tRNA 复合体的特性。

— H. G. Callan 和 H. G. MacGregor 证明两栖动物灯刷染色体的染色单体, 是靠 DNA 而不是靠蛋白质保持其直线的完整性。

— M. Okamoto; R. Riley 和 V. Chapman 分别在小麦中发现控制部分同源染色体配对的基因。

— J. R. Raper 与其同事搞清了 *Schizophyllum commune* A 和 B 不亲和因子的双位点复等位基因的结构。

— F. C. Steward, M. O. Mapes 和 K. Mears 成功地将野生胡萝卜 (*Daucus carota*) 根的次生韧皮部的单个二倍体细胞, 培养成性成熟的植株。他们认为多细胞机体的每个细胞都有形成完整有机体所需要的全部成分。

- M. Meselson 和 F. W. Stahl 用密度梯度平衡离心技术证明, 大肠杆菌在DNA复制期间, 密度标记呈半保留分布。
- G. W. Beadle, E. L. Tatum 和 J. Lederberg 因为对遗传学的贡献而获得诺贝尔奖。
- F. Sanger 因为对蛋白质化学的贡献而获得诺贝尔奖。
- 1959 J. Lejeune, M. Gautier 和 R. Turpin 证明唐氏先天愚症是由一个端着丝粒小染色体的三体性引起的, 是一种染色体畸变。
- C. E. Ford, K. W. Jones, P. E. Polani, J. C. de Almeida 和 J. H. Briggs 发现女性唐氏先天愚症是XO型。
- P. A. Jacobs 和 J. A. Strong 发现男性 Klinefelter 氏综合征(精细管发育不全)是XXY型。
- S. J. Singer 将铁蛋白与免疫球蛋白结合而形成带标记抗体, 易于在电镜下识别。
- R. L. Sinsheimer 证实大肠杆菌的噬菌体phiX174含有单链DNA分子。
- F. M. Burnet 提出抗原只刺激合成其互补的抗体的那些细胞繁殖, 从而完善了 Jerne 氏抗体形成的选择学说。
- G. M. Edelman 将免疫球蛋白G分解为重链和轻链。
- A. Lima-de-Faria 用放射自显影技术证明异染色质的复制在常染色质之后。
- M. Chèvremont, S. Chèvremont-Comhaire 和 E. Baeckeland 用放射自显影与福尔根染色相结合的方法证实了线粒体里的DNA。
- K. McQuillen, R. B. Roberts 和 R. J. Britten 用大肠杆菌为材料证明核糖体是蛋白质合成的场所。
- E. Freese 提出DNA中单一碱基对的变化可以引起突变。他杜撰了新词“转换”(transition), 指嘌呤或嘧啶被同型碱基置换; “颠换”(transversion), 指嘌呤或嘧啶被异型碱基置换。

- C. Pelling 发现多线染色体在含有³H尿苷的营养液中培养之后，它的膨松区被选择性地标记。
- R. H. Whittaker 建议将生物分成五大界：细菌、真核微生物、动物、植物及真菌。
- S. Ochoa 和 A. Kornberg 因为离体合成核酸的研究而获得诺贝尔奖金。
- 1960 P. Nowell 发现了植物凝血素 (phytohemagglutinin)，它用在人白细胞培养中激发有丝分裂。
- H. E. Huxley 和 G. L. Zubay 为亚细胞粒子的电子显微镜技术发展了负染色操作法。
- P. Siekevitz 和 G. E. Palade 记述了分泌蛋白在邻接膜的核糖体上合成。
- P. Doty, J. Marmur, J. Eigner 和 C. Schildkraut 证明 DNA 分子的互补链可以被分离和重新结合。
- G. Barski, S. Sorieul 和 F. Cornefert 报告首次成功地进行了哺乳动物细胞的离体杂交。
- U. Clever 和 P. Karlson 将蜕皮激素注入摇蚊 (*Chironomus*) 幼虫，人工诱发了多线染色体特异的膨松模式。
- P. B. Medawar 和 F. M. Burnet 因为免疫耐受性的研究而获得诺贝尔奖金。
- 1961 F. Jacob 和 J. Monod 认为核糖体不含有负责氨基酸顺序装配的模板。他们提出，每个 DNA 顺反子引起寿命有限的 RNA 分子的合成，在这 RNA 的核苷酸序列中，包含着氨基酸序列的信息。随后这个分子与核糖体会合，给核糖体以合成某一蛋白质的能力。这种信使 RNA (mRNA) 以后为 S. Brenner, F. Jacob 和 M. Meselson 以及 F. Gros, W. Gilbert, H. Hiatt, C. G. Kurland 和 J. D. Watson 所证实。
- M. F. Lyon 和 L. B. Russell 分别提出证据表明，哺乳动物的部分胚胎细胞及其后代中，一对 X 染色体中有一条不活化，而另一部分细胞则另一条 X 染色体不活化，因而雌性哺乳

动物是X染色体的嵌合体。

- V. M. Ingram 提出学说认为，四类已知的血红蛋白链是由一个原始的肌红蛋白状血红素蛋白通过基因的重复与移位进化而成的。
- B. D. Hall 和 S. Spiegelmann 用实验证实，一条单链 DNA 与一条 RNA 可以形成杂种分子，它们的碱基序列是互补的。该技术为分离信使 RNA 及阐明其特性开辟了道路。
- S. B. Weiss 和 T. Nakamoto 分离了 RNA 聚合酶。
- G. von Ehrenstein 和 F. Lipmann 将兔网织红细胞的信使 RNA 和核糖体，与大肠杆菌的氨基酸-转移 RNA 复合物相结合。这个无细胞体系合成了与兔血红蛋白相同的蛋白质，因而他们断言遗传密码是通用的。
- F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner 和 R. J. Watts-Tobin 提出遗传的语言由三体密码组成。
- F. Jacob 和 J. Monod 提出操纵子 (operon) 的概念。
- W. Beermann 证明摇蚊多线染色体上的一个膨松位点是孟德尔方式遗传的。
- M. W. Nirenberg 和 J. H. Matthaei 发展了大肠杆菌的无细胞体系，当给予模板 RNA 制剂时，氨基酸就结合成蛋白质。他们证明，用人造的多核苷酸——多聚尿苷酸，指令合成了类似聚苯丙氨酸的蛋白质。
- M. Meselson 和 J. J. Weigle 用 λ 噬菌体证实，重组包括染色体的断裂和复合，而不包括复制。
- H. Dintzis 阐明血红蛋白的合成方向是从氨基端到羧基端。
- H. Moor, K. Muhlenhaller, H. Waldner 和 A. Frey-Wyssling 发展了第一个冰冻断裂法，可用以观察常规切片法所不能看到的超微结构。
- U. Z. Littauer 证明核糖体只包含两种高分子量的 RNA，细菌核糖体 RNA 的沉降值为 16S 和 23S，动物的是 18S 和 28S。

- C. Tokunaga 证实黑腹果蝇的 *engrailed* 基因引起发育预型 (developmental prepattern) 的转变。
- J. P. Waller 和 J. I. Harris 发现细菌核糖体含有大量不同的蛋白质。
- 1962 H. Ris 和 W. Plaut 用电子显微镜技术证明叶绿体中含有 DNA。
- E. Zuckerkandl 和 L. Pauling 计算出真核生物进化期间, 不同的血红蛋白链从它们的共同祖先衍生出的大致时间。
- F. M. Ritossa 发现果蝇 *D. buskii* 的唾腺染色体在热休克时的膨松反应。
- J. F. A. P. Miller 和 R. A. Good等; N. L. Warner等阐明了T与B淋巴细胞间的区别。
- R. R. Porter 用酶裂解免疫球蛋白分子。他证实每个分子含有两个连接抗原的部分 (Fab) 和一个不连接抗原的可结晶部分 (Fc)。并证明重链与轻链的比例是1:1, 提出了四链模式。
- D. A. Rodgers 和 G. E. McClearn 发现小鼠品系间对酒精选择的差异。
- U. Henning 和 C. Yanofsky 证明三联体 (密码) 内的交换可引起氨基酸置换。
- J. B. Gurdon 报道将肠细胞核注入去核的蛙卵中, 可发育成正常可育的蛙。该实验证明体细胞核与生殖细胞核在性质上是相同的。
- A. Gierer; J. R. Warner, A. Rich 和 C. E. Hall; T. Staehelin 和 H. Noll 三个实验室各自发现了多核糖体 (Polyribosome)。
- W. Fiers, 和 R. L. Shinsheimer 报道噬菌体 ϕ X174 是闭环的环状, 这对后来发现种种的环状DNA是重要的。
- A. M. Campbell 提出与真核生物联会的环状或杆状染色体间的变化相似, 游离基因 (episome) 可通过交换而并入寄主的染色体。

- J. D. Watson, F. H. C. Crick 和 M. H. F. Wilkins 因他们对DNA结构的研究而获得诺贝尔奖金。
- M. F. Perutz 和 J. C. Kendrew 因他们对血红蛋白和肌红蛋白结构的研究而获得诺贝尔奖金。
- 1963 B. B. Levine, A. Ojida 和 B. Benacerraf 首次发表论述豚鼠基因免疫反应的文章。
- R. Rosset 和 R. Monier 发现5SRNA。
- T. Okamoto 和 M. Takanami 证实 mRNA 结合到核糖体的小亚单位上。
- H. Noll, T. Staehelin 和 F. O. Wettstein 用实验证实蛋白质合成的转录机制 (tape mechanism)。
- J. G. Gall 证明灯刷染色单体含有单一的DNA双螺旋。
- B. J. McCarthy 和 E. T. Bolton 用他们的DNA-琼脂技术测定各生物种间的遗传亲缘关系。
- E. Hadorn 证实了培养的果蝇成虫盘的异型分化。
- J. Monod 和 S. Brenner 发表复制子(replicon)的模型。
- R. Sager 和 M. R. Ishida 从衣藻 (*Chlamydomonas*) 分离出叶绿体DNA。
- R. H. Epstein 和 R. S. Edgar 等采用T4噬菌体的条件致死突变来研究必需基因的机能。
- J. Cairns 用放射自显影技术证明大肠杆菌的基因带是环状的, 并证明在半保留复制期间一个Y状的复制叉从出发点开始, 产生两个环状的子基因带。
- E. Margoliash 测定了很多种生物的细胞色素C的氨基酸序列, 为这一特异的基因产物制作了第一个系统树。
- L. B. Russell 证明当小鼠体细胞含有易位常染色体片断的X染色体失活后, 紧靠断裂点的常染色体基因也失活。亦即, X染色体失活能扩散到附着的常染色体片断上。
- E. Mayr 发表“动物种与进化”。该书综合了有关物种形成机制的现代概念, 对于这一领域的科学工作者有深远的影响。

1964 R. B. Setlow 和 W. L. Carrier; R. P. Boyce 和 P. Howard-Flanders 分别论述了细菌切补修复 (excisionrepair) 的机制。

—— A. S. Sarabhai, A. O. W. Stretton, S. Brenner 和 A. Bolle 根据包裹大肠杆菌T4病毒头的蛋白质, 确证了基因与蛋白质产物的线性对应关系 (colinearity)。

—— C. Yanofsky, B. C. Carlton, J. R. Guest, D. R. Helinski 和 U. Henning 就大肠杆菌的色氨酸合成酶确证了基因与蛋白质产物的线性对应关系。

—— M. S. Fox 和 M. K. Allen 证明肺炎双球菌的转化, 与单链供体DNA片断并入受体DNA有关。

—— E. T. Mertz, L. S. Bates 和 O. E. Nelson 证明“opaque-2”突变改变了成熟胚乳的氨基酸成分, 显著改良了玉米种籽的营养品质。

—— J. G. Gorman, V. J. Freda 和 W. Pollack 证明在第一个Rh阳性的婴孩分娩之后立即给与Rh抗体, 可以防止Rh阴性的母亲的致敏作用。

—— D. J. L. Luck 和 E. Reich 从 *Neurospora* 分离线粒体DNA。以后 (1966) 还证明这种DNA是按典型的半保留机制复制的。

—— G. Marbaix 和 A. Burny 从小鼠网织红细胞分离出9S RNA, 认为它可能是mRNA。

—— R. Holliday 提出一个模型, 来解释同源染色体DNA分子间的交换期间必然会发生的一系列断裂愈合事件。

—— L. W. Littlefield 发展了一种方法, 利用培养在HAT培养基上的HGPRT⁻和TK⁻成纤维细胞选择体细胞杂种。

—— D. D. Brown 和 J. B. Gurdon 证明核仁组成中心纯合缺失的爪蟾蝌蚪不合成18S和28S rRNA。

—— W. D. Hamilton 提出社会行为的遗传理论。

—— W. Gilbert 发现新生的蛋白质像tRNA一样, 连接在核糖

- 体的大亚单位上。
- 1965 D. D. Sabatini, Y. Tashiro 和 G. E. Palade 证明核糖体的大亚单位连接在内质网膜上。
- L. Hayflick 发现人的双倍体细胞组织培养时的离体寿命大约是50个加倍周期。
- R. W. Holley 与其同事测定了酵母丙氨酸转移RNA的全部序列。
- N. Hilschmann 和 L. Craig 报道免疫球蛋白分子是由氨基酸成分不变的羧基端部分, 和变化的氨基端部分所组成。该发现提出了一个问题, 基因是如何编码氨基酸成分变化的那部分蛋白质的。
- P. Karlson, H. Hoffmeister, H. Hummel, P. Hocks和G. Spitteller 测定了蜕皮素完整的结构构型。
- S. Spiegelman, I. Haruna, I. B. Holland, G. Beaudreau 和 D.R. Mills 用纯化的Q β 复制酶, 成功地离体合成一个自体繁殖的感染性RNA (大肠杆菌噬菌体Q β 的RNA)。
- S. Brenner, A.O.W. Stretton 和 S. Kaplan 推断 UAG 和 UAA 是标志多肽合成终止的密码子。
- F.M. Ritossa 和 S. Spiegelman 证明产生果蝇核糖体RNA的多重顺反子, 存在于每个X和Y染色体的核仁组织中心区。
- H. Harris 和 J.F. Watkins 用仙台病毒使人与小鼠的体细胞融合, 产生人工种间异核体。
- A.J. Clark 和 A. D. Margulies 报道有重组缺陷的许多大肠杆菌突变体对紫外线照射也异常敏感。该发现表明 DNA 的修复和重组是由同样的酶体系起作用。
- F. Sanger, G.G. Brownlee 和 B. C. Barrell 阐述了一种方法能从部分水解的RNA制品得到低聚核苷酸的指纹图谱。
- R. Rothman 证实 λ 噬菌体在大肠杆菌染色体上有一个特异的接触位点。
- W.J. Dreyer 和 J.C. Bennett 提出抗体的轻链是由两条不

同的DNA序列编码的，一条为可变区编码，另一条为不变区编码。他们指出不变区只有一个，而可变区则包含几百个不同的微基因(minigene)。

—— F.Jacob, J.Monod 和 A.Lwoff 因他们对微生物遗传学所作的贡献而获得诺贝尔奖金。

1966 B.Weiss 和 C.C.Richardson 分离到DNA连接酶。

—— M.M.K.Nass 报道线粒体DNA是一个环状双链分子。

—— F.H.C.Crick 提出变位假说来解释遗传密码中所见到的简并的一般模式。

—— J. Adams 和 M. Cappecchi 证明N-甲酰甲硫氨酰 tRNA 是核糖体上多肽链合成的起始点。

—— W.Gilbert 和 B.Müller-Hill 证明大肠杆菌乳糖的阻遏物是一种蛋白质。

—— M. Ptashne 证明 λ 噬菌体的阻遏物是一种蛋白质，它直接与 λ DNA 分子相结合。

—— H.Röller, K.H.Dahm, C.C.Sweely 和 B.M.Trost 确定了 *Hyalophora cecropia* 保幼激素的结构式。

—— M.Waring 和 R. J. Britten 证实脊椎动物DNA含有重复核苷酸序列。

—— E.F.J.Van Bruggen 等, J.H.Sinclair 和 B.J. Stevens 分别证实动物线粒体DNA是周长约5微米的环状分子。

—— R.S.Edgar 和 W. B. Wood 分析了T4噬菌体装配过程的遗传控制程序。

—— V.A. McKusick 发表“人的孟德尔遗传”，附录列举了大约1500种人类的遗传性异常。

—— E. Terzaghi, Y. Okada, G. Streisinger, J. Emrich, M. Inouye 和 A. Tsugita 进一步证实T4噬菌体溶菌酶的遗传密码是通过从某一定点开始顺序地读三联碱基而翻译过来的。

—— H.Wallace 和 M.L.Birnstiel 证明滑爪蟾无核仁的缺失体消除了99%以上的rDNA。

- R.C.Lewontin 和 J. L. Hubby 用电泳法概括研究了果蝇 *D. pseudoobscura* 自然群体中基因控制的蛋白质变异。他们证实，按个体基因组平均，杂合状态占全部位点的8%到15%。
- H.Harris 用同样的技术证实人群中存在着广泛的酶多态性。
- P.Rous 因他对致癌病毒的研究而获得诺贝尔奖金。
- 1967 S.Spiegelman, D. R. Mills 和 R.L. Peterson 报道一系列转移实验的结果，实验中他们选择体外复制最快的那些Q β 噬菌体分子。随着这细胞外进化实验的进行，它的复制速度增快，分子也变得更小。经过第74次转移，复制的RNA分子只是原来长度的20%，这是已知的最小的自体复制的分子。
- H. G. Khorana 和其同事用带有已知的2-或3-重复核苷酸序列的多核苷酸来解读遗传密码。
- K.Taylor, Z.Hradecna 和 W.Szybalski 证明 DNA 的两条链都可以发生mRNA。
- B. Mintz 用嵌合体小鼠证明提供小鼠毛皮颜色的黑素细胞起源于34个胚胎发生早期已被确定的细胞。
- J. B. Gurdon 将体细胞核移植到不同发育阶段的蛙卵里。移植核的RNA和DNA的合成特性变成宿主细胞核的类型。
- L.Goldstein 和 D. M. Prescott 进行变形虫的核移植。实验表明有一种特异的蛋白质从细胞质进入细胞核，并可能控制了该细胞核的核酸代谢。
- C.B.Jacobson 和 R. H. Barter 报道用羊膜穿刺作宫内诊断及控制遗传缺失。
- M. Goulian, A. Kornberg 和 R. L. Sinsheimer 成功地离体合成了有生物学活性的DNA。他们为大肠杆菌DNA聚合酶提供的模板来自phiX174的单链DNA。
- M. L. Birnstiel 报道从滑爪蟾(*Xenopus laevis*) 分离出纯rDNA。
- T. O. Diener 和 W. B. Raymer 证明土豆纺锤块茎病是由一种病毒引起的。

- M. C. Weiss 和 H. Green 发展了HAT选择程序,并对胸苷激酶基因定位。这是第一次用体细胞遗传学方法定位人的基因。
- G. Wald因他对视觉生化的研究而获得生理学诺贝尔奖金。此工作对遗传色盲的生理解作出重要贡献。
- 1968 R. T. Okazaki与四位同事报道新合成的DNA含有许多断片。这表明短链DNA是间断地复制,然后拼接在一起的。
- J. Morgan, D. P. McKenzie和X. Le Pinchon提出了板块构造的概念来解释大陆漂移。
- J. G. Gall, D. D. Brown和I. B. Dawid分别报道两栖动物卵子发生时核糖体DNA基因的特异合成。
- M. Kimura提出分子进化的中性基因学说。
- H. O. Smith, K. W. Wilcox和T. J. Kelley分离出第一个特异的限制性核酸内切酶*HindII*,并阐明其特性。
- D. Y. Thomas和D. Wikie证实了酵母线粒体基因的重组。
- R. P. Donahue, W. B. Bias, J. H. Renwick和V. A. McKusick确定Duffy血型在人第一染色体上的位置。这是在特定的常染色体上最早的基因定位。
- J. A. Huberman和A. D. Riggs证实哺乳动物染色体含有连续排列的独立复制单位,每个长约30微米。
- E. H. Davidson, M. Crippa和A. E. Mirsky证明滑爪蟾卵子发生时60%以上标记的RNA是在灯刷阶段合成的,并在卵母细胞成熟的后几个月里贮藏起来。这种RNA推测是用在胚胎发生早期的长命mRNA。
- O. Hess和G. Meyer广泛研究了各种果蝇Y染色体的结构变异,证明Y染色体含有对精子发生的各个阶段进行控制的基因。
- S. A. Henderson和R. G. Edwards证实小鼠每个卵母细胞的交叉数随母体年龄的增加而减少,单价体数则随年龄而增加。如果人的情况与此相同的话,可以预料非整倍体的后代数会随母亲年龄的增加而增加(这已被证实)。

- J. E. Cleaver证明着色性干皮症患者的DNA修复复制是不完全的。
- R. W. Holley, H. G. Khorana和M. W. Nirenberg由於阐明遗传密码及其在蛋白质合成中的机能而获得诺贝尔医学生理学奖。
- 1969 J. Abelson, L. Barnett, S. Brenner, M. Geftter, A. Landy, R. Russell和J. D. Smith确定了突变体酪氨酸tRNA的核苷酸序列, 证明无意义突变抑制机构的存在。
- J. G. Gall和M. L. Pardue, H. John, M. L. Birnstiel和K. W. Jones发展原位杂交技术来作特定核苷酸序列的细胞学定位。
- B. C. Westmoreland, W. Szybalski和H. Ris开发电镜技术作 λ 噬菌体基因的物理图谱。他们将亲本一方的I-染色分体与另一方有缺失、插入、置换或倒位的 γ -染色分体退火, 给所得的异源双链DNA分子照相。
- R. Burgess, A. A. Travers, J. J. Dunn和E. K. Bautz分离并鉴定了RNA聚合酶的转录起始因子(σ 因子)。
- O. L. Miller和B. R. Beatty发表电镜照片, 显示RNA分子转录过程中两栖动物的基因。
- J. R. Beckwith等报道分离出了大肠杆菌纯粹的乳糖操纵子DNA。
- G. M. Edelman等最早发表人 γ -G₁免疫球蛋白的完整氨基酸序列。
- Y. Hotta, S. Benzer, W. L. Pak和J. Grossfield各人独立地诱发了果蝇的神经突变体并阐明其生理学特性。
- C. Boon和F. Ruddle显示了在含有人和鼠染色体的杂种体细胞系中, 特定的染色体丢失与特定的表型性状丢失相关。通过此途径可确定某些人染色体上特定基因的位点。
- R. E. Lockard和J. B. Lingrel纯化了从小鼠网织红细胞多核糖体得到的9S RNA部分, 证明它指令小鼠血红蛋白 β 链的合

- 成。从而证实了Marbaix和Burny(1964)的观点。
- A. Ammermann报道纤毛虫*Stylonychia mytilus*的大核原基经历核内有丝分裂的DNA复制,形成多线染色体。随后它们的大部分被毁坏,90%以上的大核DNA降解并被排到培养基里。
- R. I. Huebner和G. I. Todaro提出致癌基因学说。
- H. A. Lubs描述了人X染色体上的一个脆性位点,证实它存在于男性精神呆滞症患者。后来证实这个位点(Xq27)是同X-连锁的精神呆滞的总体结构相联系的。
- M. Delbrück, S. E. Luria和A. D. Hershey因他们对病毒遗传学的贡献而获得诺贝尔奖金。
- 1970 B. M. Alberts和L. Frey分离T4噬菌体基因32的蛋白质产物,证明这种蛋白质协调地连接在单链DNA上。他们认为这种32蛋白质的机能是启动DNA分子解链,使复制能够开始。
- H. G. Khorana等报道酵母丙氨酸tRNA基因的全合成。
- J. Yourno, T. Kohno和J. R. Roth成功地将两种细菌酶融合为一个蛋白质分子,它兼备两种酶的功能。这种酶的融合是利用一对移码突变,将沙门氏菌组氨酸操纵子中*hisC*和*hisD*基因结合起来而得到成功的。
- D. Baltimore和H. M. Temin报告在两种致癌的RNA病毒(劳舍尔氏小鼠白血病和劳氏家禽肉瘤)中存在着依赖RNA的DNA多聚酶。
- M. L. Pardue和J. G. Gall证实中心粒周围的异染色质含有丰富的重复DNA。
- D. E. Wimber和D. M. Steffensen将黑腹果蝇的5SRNA顺反子定位在第2染色体的右臂上。
- T. Caspersson, L. Zech和C. Johansson将喹吖因染料用于染色体细胞学,证实人染色体上特异的荧光带谱。
- R. Sager和Z. Ramanis发表第一个非孟德尔基因的遗传图。这八个基因的基因组存在于衣滴虫叶绿体的染色体上。

- R.T.Johnson和P.N.Rao将有丝分裂活性细胞与间期细胞进行体外融合引起染色体过早的浓缩。
- 1971 M.L.O'Riordan, J.A.Robinson, K.E.Buckton和H.J. Evans报告人的22对常染色体在盐酸喹啉因(quinacrine hydrochloride)染色之后,全部可以用视觉鉴别。他们证明Philadelphia染色体是中间缺失的第22染色体。
- Y.Hotta和H.Stern阐明百合减数分裂前期合成的DNA的特性。偶线期的合成是前面的合成期未能复制的小片断DNA的延迟复制。粗线期合成的DNA具有修复合成的特性。
- S.H.Howell和Stern证实小孢子中内切核酸酶在粗线期的早期达到最高水平,一般认为交叉发生在这个时期。
- B.Dudock, C.Di Peri, K.Scileppi和R.Reszelbach提供证据证明苯丙氨酰tRNA合成酶的识别部位,邻接於二氢尿嘧啶核苷环。
- C.R.Merril, M.R.Geier和J.C.Petricciani将带有半乳糖操纵子转导的 λ 噬菌体,感染半乳糖血症患者的培养成纤维细胞。这些细胞制造了失去的转移酶,并在培养中比未被感染的半乳糖血症细胞更长命。
- R.J.Konopka和S.Benzer报道诱发的果蝇時計突变体(clock mutant)的恢复。
- D.T.Suzuki, T.Grigliatti和R. Williamson分离果蝇温度敏感的瘫痪突变体。
- J.E.Manning和O.C.Richards在裸藻叶绿体的溶解产物中,发现环状的叶绿体DNA分子。
- C.Kung诱发并分离了草履虫(*Paramecium aurelia*)的行为突变体,证明许多突变体的质膜有电生理的缺陷。
- K.Dana和D.Nathans用限制性核酸内切酶将猿猴病毒40切成一系列片断,然后推断其物理的顺序。
- 1972 P.Lobban和D.Kaiser发展了连接任何两个DNA分子的一般方法,用末端转移酶在两段DNA末端各接上互补的碱基同聚

物尾巴。

- A.F.Zakharov和N.A.Egolina发展了BUDR标记技术产生深浅不一的染色体。
- G.H.Pigott和N.G.Carr显示蓝细菌(*cyanobacterium*)的核糖体RNA与裸藻(*Euglena gracilis*)叶绿体DNA的杂交。这种遗传的同源性为“叶绿体是内源共生的蓝细菌后代”的学说提供了强有力的证据。
- S.J.Singer和G.L.Nicholson提出细胞膜构造的流动镶嵌模型。
- B.Benacerraf和H.O.McDevitt证明小鼠的Ir基因连接在H2复合体上。
- Y.Suzuki和D.D.Brown分离鉴定了家蚕丝纤蛋白的mRNA。Y.Suzuki, L.P.Gage和D.D.Brown阐明了丝纤蛋白基因的特性。
- N.Eldredge和S.J.Gould提出标点平衡模型(punctuated equilibrium model)来解释主要的进化变异的速度。
- R.Silber, V.G.Malathi和J.Hurwitz发现RNA连接酶。
- D.A.Jackson, R.H.Symons和P.Berg将SV40病毒的DNA拼接到大肠杆菌 λ 病毒的DNA上。因而是他们首次将两种不同生物的DNA进行体外连接。
- J.Mend'ewicz, J.L. Fleiss和R.R.Fieve证实躁狂抑郁性精神病是通过X染色体短臂上的一个显性基因遗传的。
- G.J.Bargman, B.Mackler和T.H.Shepard报告兔胎仔性软骨异常营养症的生化原因是酸化磷酸化系统的遗传缺失。
- M.L.Pardue, E.Weinberg, L.H.Kedes和M.L.Birnstiel报道黑腹果蝇的组蛋白基因在第二染色体上。
- P.S.Carlson, H.H.Smith和R.D.Dearing用拟有性方法得到植物种间杂种。
- J.Hedgpeth, H.M.Goodman和H.W.Boyer通过特异的核酸内切酶识别的方法验明了 λ 大肠杆菌噬菌体DNA的核苷酸序列。

—— G.M.Edelman和R.R.Porter因他们对抗体化学结构的研究而获得诺贝尔医学生理学奖。

1973 D.R.Mills, F.R.Kramer和S.Spiegelman发表一个复制型RNA分子的218个核苷酸序列。该分子是MDV-1, 是Q β 噬菌体的RNA经实验选拔, 因而是被迫经历了“细胞外进化”而缩短长度的变异分子(见本年表1967年第一条)。

—— S.H.Kim, G.J.Quigley, F.L.Suddath, A.McPherson, D.Sneden, J.J.Kim, J.Weinzierl和A.Rich提出酵母苯丙氨酸tRNA的三维结构。

—— R.Kavenoff和B.H.Zimm用新发展的粘弹性的方法, 测定由各种果蝇的细胞分离出来的DNA分子的分子量。他们得出结论, 染色体含有一个DNA的长分子, 在中心粒区没有中断。

—— P.Debergh和C.Nitsch成功地从小孢子直接培养成单倍体蕃茄植株。

—— W.G.Hunt和R.K.Selander用凝胶电泳跟踪界面, 分析了两个家鼠亚种间的杂交区。

—— P.J.Ford和E.M.Southern证明滑爪蟾的各种5S RNA基因, 在卵母细胞而不是在体细胞转录。

—— W.Fiers, W.M.Jou, G.Haegerman和M.Ysebaert最早为编码蛋白质(雄性专一噬菌体MS2的外壳蛋白)的基因排序。

—— B.E.Roberts和B.M.Patterson报道用小麦胚芽无细胞体系, 供给mRNA作体外翻译实验。

—— A.Garcia-Bellido, P.Ripoll和G.Morata报道果蝇翅盘发育的区域化。

—— S.N.Cohen, A.C.Y.Chang, H.W.Boyer和R.B.Helling将不同质粒的限制性内切片断在体外连接, 构建了第一个有生物学机能的杂交细菌质粒。

1974 J.Shine和L.Dalgarno证明大肠杆菌16SrRNA的3'端含有一段核苷酸链, 它与各种大肠杆菌噬菌体mRNA的核糖体连接部位互补。他们提出16S rRNA的这个区域可能是在蛋白质合

成(在mRNA上)的终止和起始中起碱基配对的作用。

—— I.Zaenen, N.van Larebeke, H.Teuchy, M.van Montagu 和 J.Schell在冠瘿瘤细菌中发现致瘤质粒。

—— K.M.Murray和N.E.Murray用限制性核酸内切酶的识别位点对 λ 噬菌体进行操作,使它的染色体可用作外源DNA内切片段的受体部位。 λ 噬菌体因而成为一个无性繁殖的载体。

—— A.Tissieres, H.K.Mitchell和U.M.Tracy发现热休克导致果蝇合成六种新的蛋白质。合成它们的组织没有多线染色体。

—— B.Dujon, P.P.Slonimski和L.Weill提出酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)线粒体基因组的重组与分离模型。根据这个模型,线粒体DNA以多重拷贝的形式存在于受精卵细胞中。它们随机配对,在任何配对周期中,亲本一方的片段可以与另一方线粒体DNA的片段交换,产生重组体单位。

—— R.D.Kornberg提出染色质是一种重复结构,每个结构单位包含DNA分子的200个碱基对与四种组蛋白(H₂A, H₂B, H₃和H₄)中的两种。后来称这种结构单位为核小体,被M.Noll分离出来。A.L.Olins和D.E.Olins发表了红细胞核染色质束的最早的电镜照片,显示了核小体。

—— B.Ames发展了快速的筛选试验法,检测诱变的及可能致癌的化合物。

—— S.Brenner记述线虫*Caenorhabditis elegans*突变的诱发、分离及制图的方法。

—— A.Claude, C.de Duve和G.Palade因为对细胞生物学所作出的贡献而获得诺贝尔奖金。

1975 G.Köhler和C.Milstein用小鼠细胞做实验。证明体细胞杂交可用来产生连续的“杂种瘤”细胞系,生产单克隆抗体。

—— 全世界的分子生物学家汇集在加利福尼亚州Asilomar,编写一部有历史意义的章程以指导重组DNA实验。

—— NIH重组DNA委员会出版了准则,旨在消除或尽力减少重组DNA研究的危险性。

- M.Grunstein和D.S.Hogness发展了菌落杂交方法，来分离含有特定DNA片段或基因的克隆DNA。
- D.Pribnow测定了噬菌体T7的两个独立启动子的核苷酸序列，将其与别的启动子序列进行比较，以建立启动子结构与机能的模型。
- E.M.Southern记述了将DNA片段从琼脂糖凝胶转移到硝化纤维素滤膜上的方法。滤膜再与放射性RNA杂交，杂种分子用放射自显影检测。
- W.D.Benton和R.W.Davis记述一种快速而直接的方法，来筛选重组 λ gt噬菌体的噬菌斑。即，将噬菌体DNA转移到硝化纤维素滤膜上，用互补的标记核酸杂交，来鉴别特定的DNA序列。
- F.Sanger和A.R.Coulson发展了第一个快速的测定法测定注入DNA聚合酶而合成的DNA的序列。第二个广泛应用的方法是由A.M.Maxam和W.Gilbert在1977年报道的。
- G.Morata和P.A.Lawrence证实果蝇“缺刻”(engrailed)突变允许后翅区的细胞与前翅区的细胞相混。因此它的正常等位基因的功能，是规定发育翅姐妹区之间的边界条件。
- B.Minty和K.Illmensee将小鼠恶性的畸胎瘤XY双倍体细胞，注入小鼠胚胎细胞中，然后移植到母体中养育。某些子一代雄鼠的体细胞及生殖细胞中出现瘤细胞。当这些雄鼠交配后，某些子二代鼠含有畸胎瘤的标记基因。实验证明畸胎瘤的细胞核保留了发育的全能性，即使几百代以后，它们还有恶性肿瘤的机能。
- S.L.Mckenzie, S.Henikoff和M.Meselson分离热休克蛋白质的mRNA,并证明它们与果蝇多线染色体特定的膨松位点杂交。
- L.H.Wang, P.H.Duesberg, K.Beemon和P.K.Vogt确定了致癌活性片段在劳氏肉瘤病毒RNA基因组中的位置。
- R.Dulbecco, H.Temin和D.Baltimore因他们对致癌病毒的

研究而获得诺贝尔奖金。

1976 H.R.B.Pelham和R.J.Jackson用兔网状细胞溶胞产物,建立一个简便有效的依赖mRNA的体外翻译系统。

—— R.V.Dippell证明草履虫的动体含有RNA而不是DNA,伴随动体复制的是RNA合成而不是合成DNA。

—— N.Hozumi和S.Tonegawa证实编码免疫球蛋白链的可变区与稳定区的DNA片段在鼠胚的染色体上是远离的,而在小鼠浆细胞瘤的染色体上是邻接的。他们断定B淋巴细胞分化期间,体细胞的重组使不变区与可变区的基因片段靠到一起。

—— W.Y.Chooi证明抗大鼠核糖体蛋白的铁蛋白标记抗体,结合在“米勒树”(从果蝇滋卵细胞分离出来的)延伸纤维的端球上。这观察证明米勒树是核糖体RNA的转录单位,并证明至少部分核糖体蛋白质在其转录完成之前是连接在核糖体RNA的前体分子上。

—— B.G.Burrell, G.M.Air和C.A.Hutchinson报道噬菌体 ϕ X174含有重叠基因。

—— 美国国家健康协会发表正规的准则来管理包括重组DNA在内的研究工作。

—— 建立第一个遗传工程公司,命名为“Genentech”。

—— A.Efstratiadis, F.C.Kafatos, A.Maxam和T.Maniatis首次离体酶促产生真核的基因片段。他们合成的双线DNA分子含有编码兔血红蛋白 α 和 β 链的序列。

—— J.T.Finch和A.Klug提出,破裂染色质的电镜图片中所看到的直径为300 Å的丝状体是由DNA核小体丝折叠而成的螺线管。

1977 A.Knoll和E.S.Barghoorn在34亿年前的岩石中发现经历细胞分裂的微体化石。该发现将地球上生命的年龄推回到太古代的早期。

—— C.Jacq, J.R.Miller和G.G.Brownlee记述了滑爪蟾卵母细胞的5S DNA群中存在着“拟基因”(“pseudogene”)。

- J.C.Alwine, D.J.Kemp, 和G.R.Stark制备了重氮苄氧甲基纸(diazobenzyloxymethyl paper),并记述了将电泳分离的RNA带从琼脂糖凝胶转移到DBM纸上的方法。然后与放射活性的DNA探针杂交,进行放射自显影来检测特异的RNA带。因为这个方法与Southern(1975)的方法相反,是将RNA转移到固体上,而不是转移DNA,所以被称为“northern”印迹法。
- F.Sanger与8位同事报道噬菌体*phi*X174的DNA基因组的全部核苷酸序列。
- M.Leffak, R.Grainger和H.Weintraub证明DNA复制期间原来的组蛋白八体(octamer)保持完整,而新的八体完全由复制期间合成的蛋白质所组成。
- W.Gilbert诱导细菌合成有用的非细菌蛋白质(胰岛素和干扰素)。
- R.W.Old, H.G.Callan和K.W.Gross利用标记的海胆组蛋白克隆基因,通过原位杂交来检测蝶螈卵母细胞灯刷染色体上正在转录的组蛋白mRNA。
- D.S.Hogness, D.M.Glover和R.L.White报道黑腹果蝇的一些28S核糖体RNA基因中存在插入的片段。于是内含子(intron)被用来指编码蛋白质的基因,即兔 β 球蛋白基因(A.Jeffreys和R.A.Flavell)和鸡卵清蛋白基因(R.Breathnach, J.L.Mandel和P.Chambon)。
- J.F.Pardon与五个同事利用中子反差配比技术(neutron contrast matching technique)证明核小体中,与组蛋白八体连接的DNA片段是在颗粒的外面。
- J.Sulston和H.R.Horvitz完成*Caenorhabditis elegans*胚胎后期的细胞谱系。
- R.S.Yalow因为发展放射免疫测定法(RIA)而获得诺贝尔奖金。

1978 R.M.Schwartz和M.O.Dayhoff比较了原核生物、真核生物、线粒体和叶绿体的各种进化类群中各种蛋白质和核酸的序列资

料。他们用电子计算机算出的进化树验明了原始真核生物进化到与线粒体和叶绿体共生生物的时间，大约分别为20亿年和10亿年前。

—— W.Gilbert杜撰“内含子”(intron)和“外显子”(exons)两词。

—— 世界第一个“试管婴儿”在英国诞生，这是体外受精后将胚胎移入母体子宫的结果。

—— T.Maniatis, R.C.Hardison, E.Lacy, J. Lauer, C.O'Connell, D.Quon, G.K.Sim和A.Efstratiadis发展了基因分离的程序，包括构建克隆的真核DNA库，用特异的核酸探针杂交从库里拣出独特的序列。

—— D.J.Finnegan, G.M.Rubin, M.W.Young和D.S.Hogness对果蝇分散的重复DNA作了详细的分析。他们的发现是了解真核生物突变可能性、转位、转化、杂种不育和还原病毒的新的起点。

—— V.B.Reddy与八位同事发表猿猴病毒40的全部核苷酸序列，并将该序列与已知的病毒基因和mRNA联系起来。

—— Y.W.Kan和A.M. Dozy证实内切片段长度的多态性可用作镰状细胞贫血症产前诊断的标记。

—— W.Arber, H.O.Smith和D. Nathans因他们发展了用核酸内切酶技术研究遗传体系的结构而获得诺贝尔奖金。

1979 J. G.Sutcliffe测定了克隆的载体质粒pBR322全部的4,362个核苷酸顺序。

—— J.C.Arise, R.A. Lansman和R. O. Shade成功地利用限制性核酸内切酶测定自然群体中线粒体DNA的序列。

—— B.G.Barrell, A.T.Bankier和J.Drouin报道人线粒体的遗传密码有一些特有的不通用的特征。

—— E.F.Fritsch, R.M.Lawn和T. Maniatis用DNA重组技术确定人珠蛋白基因的染色体排列结构。

—— A.Wang, A.Rich和他们的同事发现Z形的DNA。

1980 L.Glisson和H.S. Kaplan制造了第一个人的杂种瘤，它们在

实验室培养中生产纯抗体。

- 美国联邦最高法院裁定，遗传修饰的微生物可获得专利。
电气总公司 (General Electric company) 获得了一项专利，是一种能消耗油膜的遗传工程微生物。
- J. W. Gordon, G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa 和 F. H. Ruddle 得到了转移基因的小鼠 (transgenic)。
- A. R. Templeton 用“建立者”原则提出物种形成的新理论。
- M. R. Capecchi 记述了用玻璃微细管将 DNA 直接注入细胞的方法，使哺乳动物的培养细胞高效率转化。
- G. D. Snell, J. Dausset 和 B. Bénacerraf 因他们对免疫遗传学的贡献而获得诺贝尔医学生理学奖。
- P. Berg, W. Gilbert 和 F. Sanger 因他们对 DNA 的实验操作所作出的贡献而获得诺贝尔化学奖。
- 1981 P. C. Parker, H. E. Varmus 和 J. M. Bishop 证实劳氏肉瘤病毒的致癌特性是由于一个受 *v-src* 基因编码的蛋白质。各种脊椎动物的细胞都含有一个同源的基因，*c-src* 基因。这两个基因的区别在于 *v-src* 有连续的编码序列，而 *c-src* 有 7 个外显子被 6 个内含子分割开。
- L. Margulis 出版《细胞进化中的共生现象》(Symbiosis in Cell Evolution)。她在书中概述了她的理论根据，认为像线粒体、叶绿体与动物体那样的细胞器是由现代真核生物祖先的内共生体——原核生物进化而来的。
- R. Lande 基于多基因性状的性选择，提出新的物种形成模式，重新引起人们对性选择的兴趣。
- T. E. Wagner 首次在哺乳动物种间成功地转移有功能的遗传物质，兔血的一种蛋白质在小鼠中形成。
- J. D. Kemp 和 T. H. Hall 通过根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的质粒将豆类主要贮藏蛋白 (菜豆蛋白) 的基因转移到向日葵里，创造了“太阳豆”。
- M. D. Edge 装配 514 对核苷酸而合成了干扰素基因，这是至

今拼合最长的基因。

- S. Anderson, B.G. Barrell, F.Sanger等完成人线粒体基因组的全部核苷酸序列和遗传结构的分析。
- M.E.Harper和G.F.Saunders证明用改良的原位杂交技术，可在人有丝分裂的染色体上作单拷贝基因图。
- J. Banerji, S. Rusconi和S.Schaffner证明当 β -珠蛋白基因与某种SV40的核苷酸序列连接时，转录增强了几百倍。他们称这种序列为强化因子序列。
- M.Chalfie和J. Sulston在*Caenorhabditis elegans*的触觉迟钝突变体中鉴别出5个基因，它们影响一套特定的6个感觉神经元。
- T.R.Cech, A.J.Zaug和P.J.Grabowski报道某些内含子具有ribozyme的功能。(注：ribozyme是一个RNA片断，它本身具有断裂及形成共价键的能力)。
- K.E.Steinbeck, L.McIntosh, L. Bogorad和C.J. Arntzen证实野田古 (*Amaranthus hybridus*)对三氮杂苯除莠剂的抗性是受一个叶绿体基因控制的，该基因编码一个多肽，它与除莠剂结合。野田古的突变体改变了基因产物，不能与三氮杂苯结合。
- 1982 Eli Lilly跨国公司首次销售重组DNA技术制造出的药物
- 人的胰岛素，商品名是“Humulin”。
- G. Scott与其同事证实重组DNA技术生产的干扰素阻遏了感冒病毒。
- E.P.Reddy, R.K.Reynolds, E.Santos和M.Barbacid报道人膀胱癌细胞中的致癌基因被激活的遗传变异是基于该基因单个碱基的置换，结果致癌基因编码蛋白的第12氨基酸——赖氨酸被缬氨酸所取代。
- P.M.Bingham, M.G.Kidwell和G.M.Rubin证明P品系果蝇的每个P转位因子基因组含有30~50个拷贝。这是杂种不育的原因。后来A.C. Spradling和Rubin证实，将克隆的P因子显微注射到果蝇胚胎中，它就整合到种系的染色体上。因而P因子可

以用作载体，将有意义的DNA片段带入果蝇的种质里。

—— J.G.Sutcliffe, R.J.Milner, F. E. Bloom和R.A.Lerner报道分离了ID序列，这是唯一在神经组织中表达的基因。

—— A.Klug由于发展了晶体的电子显微镜，并阐明了核酸复合物的构造而获得诺贝尔奖金。

1983 E.A.Miele, D.R.Mills和F.R. Kramer成功地构建第一个重组RNA分子，包括将一个合成的十腺苷酸通过小细菌病毒复制酶的作用，插入到该病毒RNA基因组的变异体中。

—— S. Altman, N.Pace和他们的同事发现一个被叫做核糖核酸酶P的细菌酶，此酶的活性只取决于它的RNA组分。这是第一例有这种特性的RNA分子

—— H. J. Jacobs和6位同事报告在海胆卵中存在“混杂”DNA (promiscuous DNA)。(注：混杂DNA指的是在细胞器之间或由细胞器到细胞核转移的DNA片断，可能是由于几百万年以前发生了转位的结果)。

—— R.Doolittle和六位同事证明负责猿猴肉瘤病毒致癌活性的基因，起源于一个编码生长因子(正常由血小板合成)的基因。

—— I. S. Greenwald, P. W. Sternberg 和H. R. Horvitz 证明 *Caenorhabditis* 的 *lin-12* 突变体是作为一个发育的控制基因起作用的。

—— B.McClintock因为发现转位遗传因子而获得诺贝尔奖金。

1984 A. F. Willams等, Yasuke等及S. M. Hedric等各自独立地通过T-细胞受体基因的分析发现，在对组织移植、感染源及肿瘤的体内应答中起重要作用的一种特殊蛋白质与抗体极其相似。

—— B.Robert等证明抗生素的遗传工程植株能将获得的性状传递给后代。

—— 哈佛医学院Philip领导的小组将致癌基因的遗传“开关”置入小鼠，能控制小鼠肿瘤发生的时间与部位。

—— William McGinnis等从昆虫、其它分节的无脊椎动物及脊

椎动物中鉴别出了一个同源异形序列 (homeotic sequence) 的基因片段。认为包含该片段的基因, 在胚胎发育过程中起主导作用。

—— C.Robert, Gallo领导的小组与Luc Motagnier领导的小组同时发现, 获得性免疫缺损综合症(AIDS) 的病因是一种引起罕见的白血病的逆转录病毒的变异体。

—— N. K.Jerne, G.Köhler和C.Milstein因为对免疫学的贡献, 获得诺贝尔医学奖。

1985 Thomas Südhof等人对低密度脂蛋白 (LDL) 受体基因的分析提供了强有力的证据证明, 基因是通过一系列不同的原始基因镶嵌整入拷贝而进化的。

—— S.Horowitz等人发现一些单细胞动物的基因密码与通用的遗传密码不同。

—— B. Erickson等用蛋白质工程技术改造已知的酶, 构建了一个新的酶分子。E.Paoletti等利用遗传工程重新构建天花疫苗, 为抵抗其它疾病提供免疫性。

—— 美国M. Brown和J. Goldstein由于对胆固醇代谢及有关疾病的研究作出了卓越的贡献而获得诺贝尔医学奖。

1986 A.G.Amit等人用X-射线结晶学方法首次获得抗原-抗体复合物结构的详细三维图象, 支持了传统的“锁钥”理论。

—— A.J. Mason等用基因疗法使生殖激素基因缺失的小鼠恢复了生育能力。

—— A. Penn 等将动物粥样硬化组织的基因转移到一个细胞系中, 使该细胞系象癌细胞那样生长。把这种细胞注入小鼠, 小鼠便产生肿瘤, 说明上述动脉粥样硬化的遗传物质与正常细胞生长和分裂的控制有关。

—— C.Cohen与Levi-Montalcini因有关生长因子的研究工作而获得诺贝尔奖金。

1987 遗传改变的细菌被首次批准在美国的加利福尼亚进行室外实验。此细菌是由美国高级遗传公司 (AGS) 的科学家研制成

的遗传工程抗霜菌。

—— R. Charles 及他领导的小组完成了普通大肠杆菌基因组的示意图。

—— Heler Doms-Keller 等人测定了分布在46条染色体上的400多个遗传标记间的相对位置,从而绘制了第一张人的基因组的连续图谱。

—— J.P.Simons 等人报道,他们利用基因转移技术,已成功地繁殖了携带羊 β -乳球蛋白的小鼠。这些小鼠的乳汁中充满了羊 β -乳球蛋白。

—— S.C.Woo小组及R. Garver Jr等人分别成功地对培养的小鼠肝细胞和肺细胞进行了基因转移。它使将来利用基因转移来代替某些器官和组织的移植成为可能。

—— T.D.Pallela及W. N. Kelley领导的小组利用疱疹病毒作载体,将基因直接转移到猫的中枢神经系统。

—— C.Readhead与B. Popko等将编码神经鞘蛋白的正常基因,注入患先天性痉挛症的小鼠的受精卵中,使该受精卵发育成正常小鼠。

—— N. Grimsley和T. Hohn等首次利用土壤农杆菌Ti系统将病毒DNA转移到玉米中。

—— 美国麻省理工学院的日本分子生物学家利根川进由于解释了少量的免疫细胞基因何以产生如此多样的抗体而获得诺贝尔奖金。

(孙勇如)

第三节 遗传学大会与遗传学会

(一) 历届国际遗传学大会简介

国际遗传学大会从1899年开始至今已召开了16次。第一次大会是1899年7月11日—12日在英国伦敦召开的。第二次大会于1902年9月30日—10月2日在美国纽约召开。这两次大会都是以“植物杂交工作国际会议”的名义召开的。直到1906年7月30日—8月3日在英国伦敦召开的第三次大会仍然称为“杂交与植物育种国际会议”。但大会主席、英国的W·Bateson在发表演说中提出：“我们大家所致力研究的新科学还没有一个正式的名称，我建议称它为‘Genetics’”。因此大会闭幕后就名正言顺的称为“第三届国际遗传学大会”了。这次会议录题为“第三届国际遗传学会议报告书”。以后每隔五年，当国际形势允许时，就召开一次国际会议。1911年9月18—23日在法国巴黎召开了第四届大会。会议主席是Ivcs·Delage。这以后由于爆发了第一次世界大战，第五届大会直到1927年9月11—17日才得以在德国柏林召开。会议主席是Erwin·Barer。1932年8月24—31日在美国纽约召开第六届大会，主席是著名的遗传学家T.H.Morgan。他在大会发表演说时提出，要注意寻找对发展遗传学更为有利的材料。大家知道，作为遗传学理论研究的著名材料那时已有：豌豆、玉米、果蝇。而一种新的研究材料正在第五届大会上展览，这就是美国C.C.Lindegren用以进行工作的红色链孢霉。红色链孢霉与生化遗传在遗传学发展史上所占地位之所以不容忽视，是因为这一研究促使我们更深入地了解基因的功能以及基因与酶合成的关系。当然，在当时的条件下，由于缺乏新的方法技术，使遗传学研究受到限制，但遗传学的发展和突破却在孕育之中。第七届大会于1939年8月23—30日在苏格兰爱丁堡召

开。大会主席是F.A.Crew。由于第二次世界大战的影响，相隔九年以后，1948年7月7日—14日才在瑞典斯德哥尔摩召开了第八届大会，大会主席是H.J.Muller。谈家桢教授出席了大会，这是第一次有中国学者参加的国际遗传学大会。

1953年8月24—31日在意大利Bellagro召开第九届大会。大会主席是R.B.Goldschmjidt。就在这一年J.D.Watson和F.H.C.Crick发现了脱氧核糖核酸的双螺旋结构，揭开了遗传学历史的新篇章。DNA作为基因的载体逐渐为遗传学家所公认。从那时起，遗传学中的许多基本概念得到不断的发展、补充和更新，其速度之快，为其它学科所罕见。

第十届大会于1958年8月20—27日在加拿大蒙特利尔召开，与历届大会不同的是：以往大会的组织者均为东道国遗传学会或有关的学术团体，但第十届大会却由美国遗传学会和北美的十一个生物研究机构联合组织。这从一个侧面反映出50年代初开始的遗传学革命所引起的广泛重视。这个革命方兴未艾，不断取得新的成果。1958年以后对遗传学发展作出重要贡献的有：J.H.Taylor证明了脱氧核糖核酸分子复制的机理。P.C.Zamecnik等研究了氨酰基tRNA的性质。1961年F.Jacob和J.Monad阐明了乳糖操纵子的调节机制，随后又发现了信息RNA(mRNA)。M.W.Nivenberg等找出了mRNA所携带的密码。G.Von Ehvenstein和F.Lipmann证明了遗传密码的普遍性。1962年F.H.C.Crick指出了核酸中的碱基顺序是以三联体的方式决定着蛋白质中氨基酸的顺序的，遗传学的研究逐渐进入全盛时期。

1963年9月2—10日在荷兰海牙召开第十一届国际遗传学大会，大会主席是E.Hadom。会议录由英国Pergamon出版社以《今日遗传学》为书名分三卷出版。这也是一个显著变化，因为直到第九届大会，会议的论文集均以有关杂志的增刊形式出版的。这说明遗传学日益为人们所重视，遗传学的研究队伍也逐步壮大。从1953年至1963年这十年中，分子遗传学得到迅猛的发展，其中的两项主要成就为：遗传密码及遗传信息转移规律的阐明。

第十二届大会于1968年8月19—28日在日本东京召开。大会主席是H.Kihara。在这一段时间内，分子遗传学的研究逐步深入。诸如核酸的分子构型，脱氧核糖核酸的复制基因的直线排列以及蛋白质在细胞内的合成都有所突破。1973年8月20—29日在美国柏克莱召开第十三届大会，大会主席是Curt.Stern。这一时期较重要的贡献有：H.M.Temin发现在某些致癌的动物病毒中，遗传信息流是“逆向”的——从核糖核酸到脱氧核糖核酸。这一发现对研究人类癌症具有重要意义。另外，D.A.Jackson和R.H.Symons及P.Barg发现了切割脱氧核糖核酸分子的生化方法。接着，H.Boyer和S.Copen用酶把基因拼接到质粒载体上，创建了重组DNA技术。

1978年8月21—30日在苏联莫斯科召开第十四届大会。大会主席是B.ЦИЦИН。这次大会的会议录分三卷出版。书名分别为：1.遗传学与人类福利；2.遗传过程的分子学基础；3.普通遗传学问题。这次大会是继1977年11月遗传工程取得第一项成果以后召开的，至1980年通过此技术已获得九个基因的产物。遗传工程的研究蓬勃发展。遗传学进入了一个新的历史时期。

1983年12月12—21日在印度新德里召开第十五届大会。大会主席是M.S.Swaminathan。谈家桢教授为大会副主席。中国遗传学会代表团第一次出席了大会，并向大会提交42篇论文，展出了16篇墙报。这一时期，遗传学工作者在分子生物学和细胞生物学的理论基础上，综合采用了基因重组、杂交瘤、固定化酶和动植物细胞大规模组织培养等技术，建立起一个现代化生物工程的体系。中国的植物组织培养技术已跻身于世界先进行列。生物工程的兴起，标志着现代遗传学已发展到人们可以定向控制遗传性状的新阶段。它和微电子、新材料一起被称为世界新技术革命的三大支柱。

第十六届大会于1988年8月20—27日在加拿大多伦多召开。大会主席由R.H.Haynes担任。谈家桢教授为大会名誉副主席。中国学者近60人出席了盛会。

目前，遗传学已渗入到科学和社会的众多领域，成为一种促

使自然科学和社会科学结合的力量，在解决当代科学和实践的各种尖端课题中发挥着巨大的作用。国际遗传学大会作为世界遗传学家学术交流的场所，为推动遗传学的发展作出了贡献。

(二) 中国遗传学会

中国遗传学的发展经历了曲折的过程。建国初期，由于教条地学习苏联，使我国的遗传学工作受到巨大的损失。1956年党提出百花齐放、百家争鸣方针以后，召开了著名的“青岛会议”。这次会议推动了我国遗传学的发展，是我国遗传学发展历史上的一次重大转折点。但是青岛会议以后不久，接连不断的政治运动及文化大革命又使遗传学险遭灭顶之灾。

文革以后，专家们开始酝酿成立中国的遗传学学术组织。1978年3月31日，李汝祺、童第周、谈家桢、祖德明等19位科学家在北京集会，他们一致倡议成立中国遗传学会。推选李汝祺、祖德明、谈家桢、鲍文奎、李竞雄、吴旻、钟志雄、胡含、邵启全、许运天、吴鹤龄、叶晓等同志组成中国遗传学会筹备组。

1978年10月7日，来自全国各地的230名遗传学工作者在南京聚会，庆祝中国遗传学会成立。我国著名的遗传学家、教育家李汝祺教授在开幕词中号召我国遗传学工作者在新的历史时期，加强团结，共同担负起发展我国遗传学的重任。这次大会共收到论文200余篇，经过审查有153篇收集在遗传学报论文摘要专辑中。这些论文课题广阔，涉及到动物、植物、微生物与人类，包括医学以及分子遗传学和遗传工程等各个领域。植物遗传和育种方面，较为突出的例子如从花粉培养中培育出单倍体的纯品种小麦，从杂交中创造出高产的异源多倍体的新品种。动物育种、数量遗传的研究和胚胎移植的工作填补了我国空白。人类和医学遗传学的研究在我国处于起步阶段，在分子病、辐射遗传学和遗传病的研究方面均有了进展。

这次大会认真贯彻了“双百方针”，结束了国内所谓米丘林、摩尔根两个学派老死不相往来的局面，在实践是检验真理的唯一

标准的原則下，共同携手为发展中国的遗传学竭尽全力。大会经民主协商选出由70位理事组成的第一届理事会。理事会选举李汝祺为理事长，谈家桢、祖德明、金光祖、钟志雄、胡含、卢惠霖、沈善炯、奚元龄、方宗熙为副理事长。邵启全为秘书长，吴旻、吴鹤龄、李致勋为副秘书长。並决定建立中国遗传学会办公室，安锡培为秘书。

中国遗传学会成立以后，在1979年召开了两次重要会议。1979年10月6日~12日在成都召开了“作物遗传学术报告会”，出席会议的有来自全国139个单位的224位代表。从会议收到的131篇论文看出我国在育种、杂种优势和组织培养方面广泛开展了遗传研究。在作物抗毒性、早熟性和光合效能的遗传、棉花腺体遗传、细菌固氮性的遗传、不同作物多途径地利用杂种优势，诱发孤雌生殖以及一些作物远缘杂交的研究，均取得了一些进展，数量遗传学的研究也得到了一定重视。染色体分带技术、同工酶分析等新技术开始应用于遗传资源和遗传育种的研究。代表们认为，今后要加强作物遗传资源的研究，与育种目标有关的各种性状、特性的遗传规律的研究，以提高育种的主动性和效率。并建议组织一部分力量，应用常规技术，开展细胞遗传工程研究，进一步为育种技术的不断创新打下坚实的基础。这次会议的直接效益是组织了全国的植物遗传研究队伍，为解决国内植物遗传研究课题重复，培养后继人材，编写适用教材等方面提出了具体意见，并在有关部门的支持下逐步加以实施，推动了植物遗传学的研究和教学工作。

1979年11月25日~12月1日在长沙召开的人类和医学遗传学论文报告会有340人出席，收到论文400余篇。这是建国以来召开的第一次大型专题会议。这次会议突破了禁区，在卢惠霖教授的支持与鼓励下，吴旻教授提出在我国一定要重视计划生育工作，要开始并抓紧优生学的研究，他还提出了具体实施措施。这个建议引起了轰动，光明日报、新华社作了报道，在全国引起反响。这以后蓬勃展开的优生优育工作和大规模的遗传性疾病调查不能

不说是这次会议的巨大收获。例如：染色体分带技术已普遍推广，带型的清晰度有很大改进，从而推动了染色体病研究的深入，提高了诊断的正确程度。血红蛋白分子病的研究方面发现了一些新的血红蛋白异常，作了肽链的一级结构分析。另外，绒毛细胞培养和多基因病的调查，也有了良好的开端。临床遗传学研究也发现了国内外未见报道的罕见病例。这一切标志着我国人类和医学遗传学正进入一个大规模地普及和取得更大成果的新阶段。

1980年1月4日~7日在北京召开了中国遗传学会科普工作会议。这次会议指出了普及遗传学的重要性和迫切性。与会代表认为，遗传学基本知识的普及是为了解答人民关心的有关问题，如科学种田、近亲结婚，遗传病防治等，是为了澄清遗传学基本问题长期存在的混乱思想。会议决定为解决师资水平低下及遗传学教材中存在的问题，在1980年和1981年分别举办中学生物教师遗传学学习班和开办大专院校生物学中青年教师高级训练班。

1980年9月14日~18日，中国遗传学会在北戴河召开“微生物遗传学和分子遗传学论文报告会”。这次会议组织了8位专家介绍了国外分子遗传学和基因工程的研究进展和国内初步工作结果。会议收到的108篇论文涉及到微生物遗传和分子遗传学的基础理论和方法以及应用遗传学方法解决工农业生产和医疗实践问题等内容。

中国遗传学会“动物遗传学术讨论会”于1980年12月15日~20日在昆明召开。通过会议交流和讨论使大家看到，我国的动物遗传学教研工作虽然比较落后，但仍有一定的基础，增强了我们的信心。我们已在一些工作中结合生产实践取得了可喜的成绩。例如利用激素处理XY基因型雄鱼的方法，使其得到的后代全是雄鱼。由于雄鱼生长快，体重大，可以较快地提供市场需要，在生产上有重要的实践意义。另外在低等脊椎动物的细胞培养及染色体组型的分析方面以及数量遗传、哺乳类动物和实验动物等遗传研究方面也奠定了基础。

中国遗传学会于1981年5月28日~6月3日在杭州召开了“全国

遗传学教学讨论会”。这次会议上，综合大学、师范院校、医学院校、农林院校以及部分中学教师交流了经验，针对当前遗传学教学提出了大量的意见和建议。其中在医学院校设立遗传教研组（室）的建议得到卫生部、解放军后勤部的采纳和支持。我国相继在一些医学院校、军医大学配备了师资，设立了遗传学教研组（室）。

通过以上一系列学术会议和工作会议的召开，不仅全面推动了我国遗传学的发展，而且也为建立健全学会组织作了必要的准备。至1981年，中国遗传学会成立了以奚元龄教授为主任的植物遗传委员会，以卢惠霖教授为主任的人类和医学遗传委员会，以方宗熙教授为主任的科普委员会，以李汝祺教授为主任的动物遗传委员会，以盛祖嘉教授为主任的微生物和分子遗传委员会，以季道藩教授为主任的教育委员会。内蒙、上海、广东、湖南、江苏、海南等24个地方遗传学会也相继成立，拥有会员近4000名。各专业委员会和各地遗传学会的设立，促进了学术交流和科教卫生事业的发展，取得了较好的社会效益。

在国际交流方面，中国遗传学会与美国、英国、法国、意大利、日本等同行进行了学术探讨，交换了刊物。1980年7月，经国务院批准，中国遗传学会正式加入国际遗传学联合会，成为第32个会员国。

中国遗传学会健全和巩固了组织建设后，各专业委员会积极活动，在各个领域取得了可喜的成绩。人类和医学遗传委员会所属8个协作组在全国各地开展了工作。血红蛋白协作组在海南岛进行了近3万人的血红蛋白病的调查，掌握了大量的第一手材料，相继发现了新的血红蛋白病。在产前诊断和染色体协作组的推动下，几个大城市初步开展了遗传咨询门诊。植物遗传委员会在1982年4月召开了“植物体细胞遗传和染色体工程讨论会”。这次会议显示了我国植物遗传研究工作在短短几年内取得了巨大成果。花粉育种与常规育种和其它方法结合起来，为应用于生产开辟了美好的前景。在染色体工程研究中，蓝粒单体小麦的工作为

小麦基因定位等遗传研究提供了可靠手段，推动了小麦染色体工程的研究和进展，花培小麦新品种也获得了好评。这两项工作都获得国家重大成果奖。这说明我国的植物遗传研究工作已经形成了自己的特点。这次会议组成了染色体工程协作组和体细胞遗传协作组，以进一步深入研究。

中国遗传学会第二次代表大会暨学术讨论会于1983年1月5日~11日在福州市召开。这次大会共收到论文近千篇，在11个分组会上共宣读了238篇论文。这些论文表明了1978—1982年遗传学各领域的进展。其中人类及医学遗传学发展较快。如血红蛋白分子病的研究和普查工作，包括胎儿血红蛋白的分型和定量，地中海贫血家系调查，16个省（市、区）异常血红蛋白研究，170个家系异常血红蛋白的化学结构分析等。血红蛋白病调查协作组在全国抽样调查了几十万人，十多个民族。据调查资料，全国异常血红蛋白的发生率为0.29%。其它还有人鼠杂种细胞的形成和鉴定，云南省彝族400例皮纹正常值研究，中国11个少数民族的肤纹学研究，乙型肝炎患者外周血淋巴细胞中rRNA基因活性的研究，人体鼻咽癌上皮转CNE—2的细胞遗传学研究，口服避孕药妇女、正常妇女、孕妇姐妹染色单体交换频率的研究，性畸型的细胞遗传学研究，河北省畸形儿抽样调查报告以及1167例遗传咨询门诊病人的染色体分析等工作都反映了人类和医学遗传学在基础工作和实验技术工作方面做了大量扎实的工作，加上社会的支持和重视，使这个学科取得了显著的进展。

植物遗传学方面进展较快的仍在花药培养工作，茶叶、三叶橡胶、柑桔等经济作物的花药培养取得了较大成绩。据不完全统计，已有16个单位先后选育出20多个小麦新品种（品系）。北京市农科院选育的“京花一号”1981年平均产量为705斤，比对照农大139增产16.9%。一些单位在未授粉子房培养方面获得成功。单倍体育种与常规育种等方法相结合，为植物遗传学面向生产开辟了美好的前景。我国在领先的杂交水稻研究方面，这两年开展了杂交水稻细胞质效应及遗传问题的研究，取得了进展。此外，植物试管

无性杂交方法获得了几种嫁接组合的无性杂种。天津地区滨海盐碱地结合育种工作，发展了粳稻半矮秆性状遗传和应用的研究，选育出早熟的半矮秆品系4152，在污水地区亩产900—1000斤。在烟草、油菜叶绿体DNA的电镜观察中发现有小型环圈结构，称之为“花盘状结构”。从得到的叶绿体DNA电镜图象可以清晰地看到这种结构。这种结构可能同叶绿体DNA重组有关。这届大会有关数量遗传学的内容明显增多，其中有作物数量遗传电子计算机程序、数量遗传应用在水稻育种上的初步研究以及作物农艺性状遗传参数的测定及其在育种上的应用等。

国内的分子及微生物遗传的研究日趋活跃。在乙型肝炎病毒基因工程的研究、固氮基因的遗传互补和它的结构分析、重氮苯氧甲基纤维素的制备方法和应用、真核生物DNA重复序列的分析研究工作方面，都取得了一定的成绩。

动物遗传学研究工作在国内是薄弱环节，近年来在生产应用方面做出了一定成绩。新疆21型白猪的染色体畸变的研究，发现染色体畸变的检出率因年龄而异。在动物数量遗传、行为遗传、群体遗传、家蚕遗传以及动物染色体组型、同工酶谱和激光显微照射后对微核仁形成的研究等方面，也做了许多工作。

这届大会上由鲍文奎教授、吴旻教授、李载平教授分别作了题为“植物育种中的遗传学问题”、“遗传学与医学实践”，“基因工程”的专题报告。谈家桢教授作了“关于遗传学在我国社会主义现代化建设中的地位和作用”的长篇发言，阐述了遗传学和农业、工业、医药卫生、生态学以及哲学、社会科学、政治经济学的密切关系。加拿大华裔科学家黄兆泉博士在大会上作了“血红蛋白的产前诊断”的学术报告。

这届大会是在党的十二大以后召开的，会议的基调为“振兴经济必须依靠科学技术的进步，科技工作必须面向经济建设”，这也是以后几年学会工作的重点。

中国遗传学会第二次代表大会选举产生了第二届理事会。理事会由59位同志组成，理事长为谈家桢、副理事长为胡含、吴旻、

李载平、秘书长邵启全，副秘书长为吴鹤龄、李致勋、李璞。各专业委员会进行了调整，鲍文奎教授任植物遗传委员会主任，刘祖洞教授任人类和医学遗传委员会主任，吴仲贤教授任动物遗传委员会主任。盛祖嘉、方宗熙、季道藩教授分别继续担任分子和微生物遗传委员会、普及委员会、教育委员会主任。第二次代表大会后成立环境诱变剂委员会，谈家桢教授兼任委员会主任。

第二次代表大会以后，学会工作重点围绕面向经济建设。例如为贯彻计划生育这项基本国策，1983年学会召开“计划生育中的遗传学问题讨论会”，对我国制定优生法提出了具体意见，并希望有关部门重视遗传咨询工作。这次会议的资料表明，我国遗传病的发病情况是严重的，因此在全国范围内组织大规模的普查是必要的。光明日报为此次会议发了内参，不久以后国家计划生育委员会拨出专款用于三项项目的调查。1984年我会召开“全国花卉遗传学讨论会”。代表们建议把花卉生产纳入国民经济计划，并统筹解决花卉良种化及研究、生产、贸易等事宜，应该特别重视球根与花卉种子的研究、生产和供销等问题。

第二次代表大会以后，加强了国际交流。1983年春，中国遗传学会和上海科协在上海举办了致癌、致畸、致突变讲习班，应邀讲学的有11个国家的33位学者，200多位国内学者参加了讲习班。通过交流，可以看到我国在这些新兴领域内的工作已初具规模并达到或接近世界水平。1983年冬，中国遗传学会代表团出席了在印度新德里召开的第15届国际遗传学大会。这是我国加入国际遗传学联合会以后首次参加的国际大型会议，我国代表团向大会提交论文42篇，展出墙报16篇。参加国际会议扩大了我国影响，加强了交流和合作。1984年10月在北京召开了国际作物遗传操作学术讨论会。

遗传学经历了80多年的发展，成长为一个重要的领域。如果把它比喻成一棵根深叶茂的大树，那么孟德尔法则便是具有顽强生命力的种子，1984年1月6日，是孟德尔逝世一百周年，中国遗传学会在全国各地举行了隆重的纪念活动，并出版了孟德尔逝世

一百周年纪念文集。

1987年5月6日~10日中国遗传学会在合肥市召开第三次全国代表大会暨学术讨论会。全国各地代表近700人出席了大会。香港中文大学和美国Waltar研究所的专家也应邀参加大会并做了专题报告。这次大会检阅了自1983年以来遗传学各领域内的研究进展。

我国微生物与分子遗传学研究、遗传工程与基础研究方面都取得了较快进展。癌基因的研究和分子遗传线粒体研究有了良好的开端，致病菌遗传工程疫苗的研究正向纵深发展。值得提到的是乙型肝炎及仔猪腹泻疫苗的工作即将应用于生产，为我国遗传工程开创了先例。另外，已经开展的高温细菌的遗传学研究及酵母遗传工程体系的研究都是意义重大的项目。在基础理论研究方面，也已发现了核糖体蛋白质对不同的mRNA有选择性，得到了具有开创性的结果。

动物遗传学的研究，近几年不论在研究人员的数量上及研究的水平上都有了较大的发展与提高。染色体研究技术有了新突破。值得提到的是联会复合体的工作已成为研究染色体结构变异的有力手段，光学和电子显微镜相结合提高了分辨能力。鱼类染色体高分辨G带的研究也取得了显著进展，对鱼类遗传的深入研究具有重要意义。动物遗传工程的研究已取得了进展，行为遗传学研究也有了新的开端。

植物遗传学分10个专题进行了学术交流与讨论，反映了近几年来我国植物遗传学研究的进展。①实验研究技术取得了新的突破。G带高分辨技术的应用与改进，使成本降低、方法简化，并显著提高了效果。动物遗传的联会复合体研究技术已经应用于植物遗传研究。②与生产密切联系的生物技术蓬勃发展。水稻与豆科作物原生质体再生的研究已处于世界先进行列。花药培养、体细胞筛选等研究都取得了可喜的成果。小麦兰单体的研究是染色体工程研究的一项突破性进展，并已经作了21个基因定位。③应用研究取得了显著成果。光敏核不育及广亲和系的研究使杂交

育种工作进入了新的阶段，它将对农业生产作出重要贡献，另外，各类作物抗病性的遗传研究也正向纵深发展。④植物分子遗传学的研究受到普遍重视。

因 基

医学遗传学进行了十三个项目的学术交流，其中新技术的发展讨论会引起了代表的极大兴趣，人精子细胞染色体的显示以及减数分裂染色体行为的观察，促进了男性不育及其各种因素遗传效应的研究。产前诊断近年来发展迅速，早孕绒毛的检查国内已普遍开展，一个新的突破是采用胎儿标本进行胎儿质量的预测研究，为产前诊断开辟了新的途径。我国已发现的180种染色体异常在国际上尚未见到报道。高分辨显带技术已广泛应用，并且在产前诊断羊水细胞标本中能稳定地显示。这些研究在一些单位已达到世界先进水平。在基因诊断方面，国内有五个单位采用了DNA限制性酶谱技术点突变，限制性片断连锁分析，寡核苷酸探针等技术。在出生前诊断出 α 、 β 地中海贫血，血友病，苯丙酮尿症等几种发病率较高的遗传病。缩短了同世界先进国家的差距。基因定位也有了进展，不少实验室具备了一定的技术力量，为定位新的基因提供了条件。

中国遗传学会与所属地方遗传学会经过了广泛及较长时间的酝酿和讨论，选出了59位同志组成的第三届理事会。

谈家桢教授当选为理事长；吴旻、李载平、胡含为副理事长；李振声当选为秘书长，副秘书长为吴鹤龄、李璞、赵寿元、陈伟程。

中国遗传学会在推动我国遗传学发展，加强国际间的联络和合作方面发挥了一定的作用，在全体会员的努力下，中国遗传学会正逐步建设成一个活跃的学术团体。

(安锡培)

第二章

基 因

第一节 基因概念的演变

遗传学作为一门实验性学科,在研究方法上,自始至终着眼于对基因——遗传物质的结构和功能的研究。在不同历史时期,基因的概念赋予不同的内容。可以这样说,一部遗传学发展史,渗透和贯穿着人们对基因认识的不断深化过程,基因概念在科学实践中不断得到充实和完善。

(一) 生物性状的符号

格利戈·孟德尔被认为是近代遗传学的奠基人。孟德尔从1856年开始,连续七年以豌豆做实验材料,进行一系列的杂交试验,孜孜以求地探索生物遗传的规律。

孟德尔把两个可区分相对性状的植株,通过杂交授粉,产生第一代(F_1)杂种。他发现在每一组中杂种的性状表现,都完全象或几乎完全象两个亲本中的一个。孟德尔把在杂交时保持不变或几乎不变地传给后代的那些性状称为显性;而在杂种中隐而不现,

或潜伏起来的性状称为隐性。当 F_1 自花授精产生第二代(F_2)时,孟德尔发现原先隐而不见的隐性性状得到了表现,统计显性植株与隐性植株的比率,得到3:1的比数。

为了证明这个试验的结果,孟德尔提出这样一个假设:在每一个植株中,每一个相对性状都受两个相同的“基因”(孟德尔当时称为“遗传因子”)控制,显性遗传因子使之表现为显性性状,隐性遗传因子使之表现为隐性性状。例如红花与白花这一对相对性状植株杂交,亲代为纯系的红花植株,它的基因型为CC;亲代为纯系的白花植株,它的基因型为cc,在杂交过程中,CC提供一个C配子,cc提供一个c配子,受精时雌雄生殖细胞结合为合子,基因型为Cc,因C对c是显性,所以产生杂种第一代(F_1)的表现型为全红花。当 F_1 自花授粉,即 $Cc \times Cc$ 时,雌雄各有两种配子,一种是C,一种是c,两种配子之比是1:1。受精时产生四种不同的组合,即四种不同的基因型为CC, Cc, cC, cc。同样C对c是显性,在表现型上CC与Cc、cC的基因型植株都表现为红花,而cc植株表现为白花,所以在子二代(F_2)植株中,表现红花与白花之比为3:1。

孟德尔再进行回交试验,试验结果又与预期的假设相符,从而验证了他的假设的正确性。在此基础上,孟德尔建立了遗传学第一定律,即“分离规律”:一对基因在异质接合状态下并不相互影响,相互沾染,而在配子形成时,完全按照原样分离到不同的配子中去。在一般情况下,配子分离是1:1,子二代共同基因型分离为1:2:1,表现型分离为3:1。分离出来的隐性同质接合和原来隐性亲本在表现型上是完全一样的,隐性基因并不因为曾与显性基因处于同一个体内而发生沾染或影响,仍保持它的性质。

孟德尔在进行了一对相对性状杂交试验后,又通过杂交把几对相对性状结合在一个杂种体上,观察性状传递规律。他认为,无论多么复杂的多对性状植株杂交,对于每一对相对性状来说,它们同样服从于分离规律。孟德尔在多对相对性状植株杂交试验基础上推论出遗传学的又一规律,即“独立分配规律”,又称自由

组合规律。这个规律表明，当两对或多对基因处于异质接合状态时，它们对配子中的分离是彼此独立互不牵连的。同样，孟德尔用回交试验来验证这个假设的可靠性，结果证明理论分析与试验结果符合，从而证实了这个规律的正确性。

孟德尔揭示的遗传规律表明，生物的每一个性状，可以用遗传因子的基本单元来分析。从亲本到子代，是由颗粒性遗传因子负责传递的。颗粒性遗传因子存在于细胞，是成双存在于体细胞里，而在性细胞里是成单存在的。杂交时，颗粒性因子保持独立性，它们之间不相融合，在杂种产生配子时，不同的遗传因子仍然保持相对的独立性，互不感染地各自分配在不同的配子里，完整地传给下一代。这就是孟德尔用颗粒性遗传因子对生物遗传现象所作的解释。

1865年2月2日和3月8日，孟德尔在布隆由自然科学研究学会召开的讨论会上宣谈了他的《植物杂交试验》论文，遗憾的是孟德尔这篇具有划时代意义的论文，在以后35年里正象他本人一样，很少有人问津。直到1900年，荷兰的休戈·德弗里斯、德国的卡尔·柯仑斯和奥地利和丘歇马克三位植物学家根据他们各自独立的植物杂交试验，在几个星期里接踵发表的研究论文中，确认他们在进行各自的试验之前是完全不知道孟德尔的工作，而只是在论文发表前，在查阅以前有关文献时才发现自己论文的结果竟与孟德尔论文的中心思想不谋而合。三位科学家的研究工作恰恰证实了孟德尔所发现的遗传规律的正确性。由此，孟德尔的经典性工作才得到科学界的承认。

孟德尔提出的“遗传因子”，后被丹麦遗传学家约翰逊在1909年提出的“基因”一词代替。早期的基因与“遗传因子”的概念，在实质上是一致的，它只是一种逻辑推理的产物，作为一种遗传性状的符号并没有任何物质内容。随着遗传学的研究进一步深入，基因的概念不断地改变其内容与形式，进一步推动遗传学的发展。

(二) 位于染色体上的遗传功能单位

托马斯·亨特·摩尔根是二十世纪最著名的生物学家之一。他是一位优秀的博物学家。他的研究兴趣极为广泛，在实验胚胎学、进化论、细胞学、遗传学等领域进行大量的研究工作。

摩尔根从1909年开始，与他的学生一起用果蝇作为实验材料，在前人研究的基础上根据大量的实验结果，证明位于同一条染色体上的某些性状的基因，“连锁”在一起不易分开的连锁和交换现象，并进而阐明它的规律和本质，提出了遗传学的另一重要规律——连锁交换规律。它连同孟德尔的遗传因子分离规律和自由组合规律，一起成为经典遗传学的三大规律。同时，结合当时细胞学上已经阐明的有丝分裂和减数分裂的详细过程，发现染色体在细胞分裂时的特殊行为，即在减数分裂和受精时的染色体行为与基因行为存在着一种平行现象，从而证明染色体是基因的物质载体，基因在染色体上作直线排列，建立了遗传的染色体学说，成为今天的遗传学从经典遗传学中继承下来的最重要的遗产。1933年，为表彰他在遗传学上的杰出贡献，被授予此年度的生理学和医学方面的诺贝尔奖金。

1910年，摩尔根在进行大量的果蝇近亲杂交试验中，在许多野生型红眼果蝇中，偶然发现了一只白眼雄蝇，它与红色野生型果蝇有着细小然而明晰的不同。他用那只白眼雄蝇和一只没有交配过的红眼雌蝇杂交，九天后，发现所有后代都是红眼果蝇。再进行子一代自交产生子二代，这一代果蝇检查发现，呈现三种表现型，即红眼雌蝇、红眼雄蝇和白眼雄蝇。摩尔根注意到，在红眼和白眼的分配比率上，它们基本上符合孟德尔分配定律所表明的3:1关系，红眼对白眼占有显性地位。这说明红眼和白眼是由孟德尔式的遗传因子决定的。

如果按照孟德尔式遗传的设想，雄蝇中的四分之一和雌蝇中的四分之一应表现出隐性性状。可是，在摩尔根的观察结果中，雄蝇中半数是红眼睛，半数是白眼睛；在雌蝇中却没有一只是白

眼睛的，即雌蝇全部是正常的红眼睛。这种现象在其后的交配中说明为什么白眼睛果蝇基本上为雄的理由。摩尔根是这样说明的：将白眼睛雄蝇同正常雌蝇交配时，子代中半数为白眼睛，并且都是雄的。白眼睛因子（不久用基因术语称呼之）明确地与其它的孟德尔遗传的隐性因子不同，归根到底受性别的影响。即认为眼色基因(R)和性别决定因子(X)是结合在一起的。也就是说(R)与(X)连锁在一起。当这些连锁在一起的基因在同一条染色体上，减数分裂时作为一个整体而遗传给后代。摩尔根把这种遗传方式称为伴性遗传。不久，搞清了基因组成群，基因群也称为“连锁群”，它的数目刚好等于染色体的对数，同一群内的基因一起遗传，由此推论基因是染色体的一部分。依据摩尔根首创的连锁学说，连锁遗传是由于连锁基因位于同一染色体上的结果。如果染色体在遗传过程中保持原来状态，位于同一染色体上的两个基因应该在所有情况下保持在一起，也就是说，应该是完全连锁。进一步研究认为，在同一连锁群中的基因，并非永远“抱紧”在一起，通常的连锁只是部分的，连锁基因有时会分开，连锁程度或强度有赖于染色体上连锁基因间的距离。通过细胞学观察，发现在第一次减数分裂前期中，在同源染色体配对期，两条染色体单体之间会发生交叉现象，这标志着两个相对连锁群的基因之间，随着染色体的交叉而发生基因有秩序的交流，使基因重新组合，从而增加了遗传的变异性。同时研究表明，在同一染色体上的连锁基因之间发生的交换，基因距离着丝点愈远，基因和着丝点之间的交换机会就愈大，也就是说，交换率愈大，它们的分离机会也就愈多；距离着丝点最近的基因，获得最小交换率。根据重组频率可以衡量两个基因之间的相对距离，进而推算出紧靠着的基因之间的图距，综合大量统计资料就可能绘制成染色体遗传图。

染色法遗传图或染色体连锁图是证明基因在染色体上直线排列学说的基础。因为染色体遗传图表明，每个物种的许多基因，形成与染色体数相等的连锁群，每群成为一个直线系统，在这直线系统上用基因之间的交换百分数来表示它们之间的相对距离，

这就有力地证明了基因在染色体上的相对位置，并依一定的顺序作直线排列。

摩尔根在果蝇遗传研究的基础上发展了前人的染色体遗传理论，创立了新的遗传理论，即基因理论。他主张遗传是由遗传物质——基因起作用；基因在染色体上作直线排列以及在遗传传递中，基因表现分离规律、自由组合规律及孟德尔式遗传例外的“连锁”及作为连锁例外的交换规律。同时，他证明了性别决定是受染色体支配的；发现了重复、缺失、易位、倒位、三体、三倍性及并连X染色体等；发现了位置效应、基因的多效、复等位基因、受多数基因影响的单一性状等。这个理论几十年来成为遗传学研究的理论基础，并在实践中不断得到充实、修正和发展，成为现代生物学的基本理论之一。

1926年，摩尔根发表了《基因论》，这是摩尔根和他的助手在1910年到1916年期间的研究工作的总结。基因论揭示了基因与性状之间种种联系和规律。限于当时的科学水平和认识能力，还不可能对基因赋予实体的内容。但是，摩尔根科学地预见了基因将是一个化学实体。他说：“我们仍然很难放弃这个可爱的假设，基因之所以稳定，是因为它代表着一个有机的化学实体。”这个预见被日后的研究所证实。可以说基因论的创立标志着经典遗传学发展到了细胞遗传学阶段，并在这个基础上展现了现代生化遗传学和分子遗传学的前景。

（三）有功能的DNA片断

自摩尔根以后，一些科学家为证实基因并不是形式上的符号而是一个实体，做了大量的工作。科尔夫、海兹和鲍尔等人证实了巨染色体（多线染色体）与生殖细胞染色体之间的对应关系，并提出巨染色体上的横纹就是基因的假设。在此基础上，贾德等在一个具有15条横纹的X染色体上识别出16个基因，又在约33—50条横纹的第4号染色体上识别出43个基因。这样，一个基因—横纹的假说便得到了证实，从而把形式上的基因推向实体。

1928年，英国科学家格里菲斯用肺炎双球菌对小家鼠的感染

做了实验。这个实验表明，高温杀死的有致病力的S品系细菌，具有改变无致病力的R品系，使它成为有致病力细菌的效应。这种改变遗传性状的现象称为细菌转化。这个实验的意义在于它为确定遗传物质的化学性质的研究开辟了道路。

1944年，美国三位化学家艾弗里、麦克劳德和麦卡锡为了弄清楚这种引起遗传性状改变的转化因子的化学本质，通过化学方法，把这种提取物进一步纯化以后，一样一样分离，结果证明转化因子不是蛋白质，也不是各种有机物质和无机物质，而是脱氧核糖核酸(DNA)。这个实验的重要意义在于第一次有效地证明了DNA是遗传物质，冲击了当时所流行的蛋白质是遗传物质的观点。这个实验在当时并没有引起人们的足够重视，因为在这之前，虽然已有不少科学家怀疑DNA在遗传过程中可能具有一定的功能，但是还没有一个人曾考虑过DNA可能是遗传信息的载体。

直到1953年，沃森和克里克提出了DNA分子结构的双螺旋模型，雄辩地证明了基因就是DNA分子，基因的传递和表达同生物体内的生化代谢过程密切相关。

按照沃森、克里克阐述的DNA分子结构，它是由两条脱氧核糖核苷酸链所组成，这两条链呈右旋，反走向，环绕同一个轴盘绕，形成一个双螺旋结构。这两条链的两边由脱氧核糖和磷酸间隔地连接起来，每一级的阶梯是由每一边内侧的碱基通过氢键相连。每个阶梯之间相距 3.4\AA ，每10个阶梯绕轴一周，长度为 34\AA 。

DNA分子的四种碱基组合是由一定规律的，在空间上四种碱基配对，一个嘌呤必与一个嘧啶配成一对。而且腺嘌呤(A)总是和胸腺嘧啶(T)配对；鸟嘌呤(G)必与胞嘧啶(C)配对。因而两条链是互补的，只要确定一条链的碱基顺序，根据互补配对原则，另一条链的碱基顺序也就确定下来。

在完善DNA分子结构基础上，沃森和克里克进一步深入研究，明确了DNA在活体内的复制方式。1957年由克里克最早提出遗传信息在细胞内的生物大分子间的转移的基本法则——中心法

则。继而在1961年，克里克又提出了三联遗传密码。这样，DNA分子不仅具有独特的双螺旋结构，而且还有主要的生物学功能，从而把结构与功能有机地统一起来。

①复制

DNA分子能精确地复制自己，通过亲代DNA分子复制子代DNA分子。复制的结果形成完全与原先一样的DNA分子。这样使得DNA所贮藏的遗传信息准确地一代一代传递下去。

②指导蛋白质合成

研究表明，基因是DNA的一个片断，它是遗传信息的载体。在子代发育中，亲代DNA分子中的遗传信息转录为RNA，RNA在核糖体上通过翻译，把核酸和核苷酸顺序解读为蛋白质和氨基酸顺序，从而合成蛋白质，使得亲代的各种遗传性状在子代中得到表达。这就是沃森和克里克用来表明遗传信息流向的“中心法则”。中心法则合理地阐明了核酸和蛋白质两类大分子的联系和分工：核酸的功能在于贮存和转移遗传信息，指导和控制蛋白质合成；蛋白质的主要功能是进行新陈代谢以及作为细胞结构的组成部分。

③遗传密码

克里克等人在大肠杆菌体T₄中用遗传学方法证明在蛋白质合成中，组成蛋白质中氨基酸顺序和每个氨基酸在蛋白质分子中的排列顺序是由密码子所决定。一个密码子是由相邻的、连续的核苷酸所构成。这种由三个连续的核苷酸组成的密码称为三联体遗传密码。由于DNA或RNA都分别含有四种碱基，每三种碱基组成一个密码子，这样密码子共有 $4^3 = 64$ 种，这就足够由它决定蛋白质的20种氨基酸。1966年，对组成蛋白质的20种氨基酸的遗传密码字典已全部阐明，证明了遗传密码在生物界里是普遍适用的。DNA双螺旋模型的建立，表明生物遗传性状的表现是通过核酸和蛋白质之间的复杂关系而实现的。DNA分子所以有千差万别，就在于四种组成DNA的核苷酸顺序有千变万化；蛋白质所以有千变万化，就在于组成蛋白质的氨基酸排列有千变万化。与此

同时，基因表达的全部过程都在严格的调节与控制之下，这就使生物系统中各种生命活动有条不紊地进行。同时，DNA双螺旋模型的建立，标志着遗传学由经典遗传学发展到分子遗传学的新阶段，在此以后，人们对基因本质的认识取得了前所未有的进展。

(四) 顺反子是一个基因一条多肽

早期的遗传学理论，把基因看作是位于染色体上的念珠状颗粒，它们之间由非遗传的物质连接在一起。基因之间会发生交换。总之，把基因看作是决定遗传性状差别的功能单位，同时也是重组和突变的三位一体的最小单位。

到了二十年代，发现果蝇的染色体断裂后再重新组合，会使生物体出现新的性状，染色体断裂位置不同造成的性状也不同。根据这种“位置效应”，有人认为决定遗传性状的不是单个基因，而是一段染色体。这样对“三位一体”的基因概念提出了挑战。四十年代，又发现“拟等位基因”，说明基因是可分的，不是决定性状的最小单位。五十年代，DNA双螺旋结构的建立，对基因的结构和功能的本质了解达到了一个新的水平。

1957年，本泽尔以T4噬菌体为材料，在DNA分子结构水平上，分析研究基因内部的精细结构，提出了顺反子学说。

分子遗传学研究表明，特定噬菌体可感染特定的寄主细菌（寄主细胞），有的会使裂解，能产生裂解作用的物质是由噬菌体DNA分子上一定区域的核苷酸序列控制的。如果这段区域的核苷酸序列发生突变，就可能影响这种物质的产生，即使寄主细菌感染了这种噬菌体，也不会裂解。

本泽尔使用一类通称为rII突变型的T4噬菌体为材料进行研究。T4噬菌体可引起大肠杆菌迅速裂解，裂解大肠杆菌的物质，是在T4DNA的rII区。这个区有1000多个突变型，它们裂解大肠杆菌后形成的噬菌斑的大小、形态各不相同，裂解的细菌品系和条件也不一样。按照基因是突变和重组的基本单位的概念，可用杂交方法来测量这些突变型是否为等位基因。实验结果表明，YII

区的突变型可分别归入rII区上前后相连的A、B两个亚区里。此两亚区本身的突变似保持等位性，彼此间则经常出现一定频率的重组后代。这样rII区好象包含A、B两个基因。可是，如果重组试验的规模扩大，却发现两个亚区本身突变之间，也有重组发生，只是频率较低。因此，也很难说A或B是一个基因。本泽尔根据这些资料，形成了基因结构的顺反子学说，提出了顺反子、突变子和重组子三个概念。

顺反子是功能单位。一个顺反子就是一段核苷酸顺序，它编码一种完全的多肽链。如rII区的A、B亚区是两个顺反子，两个功能单位，分别产生两种物质。细胞里同时出现这两种物质时，才能裂解细菌。当A亚区里有两个地方发生突变(a、b)，如果是顺式($\frac{ab}{++}$)仍能引起细菌裂解；如果是反式($\frac{a+}{+b}$)A亚区就不

能产生其物质，因而不能裂解细菌。这说明a和b虽是突变的单位，本身却不是一个基因。能产生一定物质的顺反子相当于一个基因。一个顺反子可以包含一系列突变单位——突变子。突变子是构成基因的DNA片断中一个或几个核苷酸。核苷酸的改变，将使密码发生改变；生物性状也随之发生改变。由于基因里各个突变子之间都有一定距离，所以彼此间能发生重组，重组频率随相隔距离而改变。重组子代表一个空间单位，它有起点和终点；它可以是几个密码子的重组，也可以是一个核苷酸的互换。根据本泽尔的计算，在功能DNA中的最小交换单位约为1—3对核苷酸，这同理论上的最低值一个核苷酸对极为相似。所以顺反子中的最小交换单位(重组子)和最小的突变单位(突变子)都应是DNA分子中的一对核苷酸。只有在这种情况下，交换子才等于突变子。

顺反子学说打破了“三位一体”的基因概念，把基因具体化为DNA分子上的一段顺序。它负责传递遗传信息，是决定一条多肽链的完整的功能单位；但它又是可分的，它内部的核苷酸组成或排列，可以独自发生突变或重组。而且基因同基因之间还有相互作用，排列的位置不同，会产生不同的效应。在分子遗传学文

献中，顺反子和基因这两个术语是相互通用的。一般说来，一个顺反子即一个基因，大约含有一千对以上的核苷酸，是由一群突变单位和重组单位组成的线性总和。

(五) 操纵子是遗传信息传递和表达的统一体

分子遗传学的深入研究，使得人们对细胞核内部的结构与功能有了更充分的认识，并由此揭示了一系列普遍现象和规律，其中最为重要的是遗传信息的转移规律及基因的控制与表达。在这些规律支配下，生命有机体在分子水平上的各种分子有规律、有秩序地进行着工作，表现出各种生命活动的和谐性。同时，使基因概念又进一步获得新的内容。

1961年，法国遗传学家雅克和莫诺基本上阐明了原核类基因表达的调节控制机制——大肠杆菌乳糖操纵子模型。

基因依其功能可分为调节基因、操纵基因和结构基因三大类。通过这些基因的密切协作，细胞才能表现出和谐的功能。细胞的功能是由细胞中各种蛋白质来表现的。结构基因负责合成这些蛋白质，而调节基因和操纵基因则是负责控制结构基因的动向，操纵各种蛋白质合成的质和量。

在乳糖操纵子上有三个结构基因，分别携带一种酶的遗传信息。三个结构基因前面有一个操纵基因，上面留有同阻遏物结合的位置，当阻遏物附着时，结构基因失去活性，不能合成三种酶。在操纵基因前面有一个启动基因，当操纵基因上没有阻遏物时，同启动基因结合的RNA聚合酶向操纵基因和结构基因移动，于是合成出三种酶。启动基因以外还有一个调节基因，它为阻遏物编码，调节结构基因的活性。操纵基因同一个或几个结构基因联合起来，在结构上与机能上形成一个协同活动的整体，称为一个操纵子。调节基因通过产生阻遏物来调节操纵基因，从而控制结构基因的功能。这样，这些基因形成了一整套调节控制机构。正因为生命有机体中有着一套相互制约的统一整体的基因调控机制，才使生命系统在功能上是有序的和开放的。这一点也是生命系统

与非生命系统的根本性区别。

操纵子模型大大丰富了基因概念。基因是可分的，不仅在结构上，它是由许多可以单独发生突变、重组的核苷酸所组成；而且在功能上也是有差别的，既有指定某种蛋白质的结构基因；又有同环境因素相协同、调控遗传信息转化为具体性状的调节基因；还有并不决定蛋白质而在功能上却又必不可少的操纵基因和启动基因。基因不仅是传递遗传信息的独立单位，而是各个基因间又形成了相互制约的统一整体，每一基因是这个整体中的一个组成部分。同时，有些基因可以有某种产物，有些基因却没有产物。由此可见，人们对基因的认识又达到了一个新的高度和深度。

(六) 基因是实现一定遗传效应的核苷酸顺序

近十多年来，随着分子生物学和分子遗传学的实验手段愈加丰富，诸如发展了DNA纯系增殖技术和快速准确的核苷酸序列分析法，以及分子杂交等实验技术，使人们对基因在结构和功能上的认识又深了一层，发现了“跳跃基因”、“断裂基因”、“重叠基因”、“重复基因”及“假基因”等新现象。

1. 跳跃基因

一般认为，基因除非发生突变，破坏其稳定状态，否则不会改变基因的功能，也不会随意地插入其它染色体上。1956年，麦克林托克在研究玉米籽粒的色素斑点时，首先提出了有一个可在染色体上移动的“控制因子”，一个控制因子整合到一个基因位点上，可产生一种新的突变型。如果把控制因子准确地切除下来，基因位点的表型也恢复正常。这些可移动的DNA片断，叫做跳跃基因。

七十年代初，在研究大肠杆菌乳糖操纵子和半乳糖操纵子时，发现由于操纵子里插入了一段DNA顺序，出现了一组不常见的突变种，这一插入因子（IS）就是一类跳跃基因。现在已弄清楚至少有五种DNA插入因子，即IS₁、IS₂、IS₃、IS₄和IS₅。这些插入因子都很短，一般只有700—1400个核苷酸对，即相当于1—2

个基因。IS插入因子不仅破坏了它插入位置上的基因功能，而且也使处在IS转录方向“下游”的其它基因的活性降低。它们可到处移动，几乎能插入大肠杆菌染色体组的任何位置。插入的方向不同，产生不同的效应。它可作为基因活性的一个简单“开关”。IS引起的突变可以自发回变，频率为 10^{-7} ，这可能是IS被切下的结果。同时由于切割不精确，会在插入位置附近造成缺失。不同的缺失有其特定频率。例如IS₁引起的缺失，都是从IS₁一端开始，扩展到染色体其它领域。

转座子也是一种跳跃基因。它是由几个基因组成的一段DNA，两端各有一段相同的核苷酸顺序，顺序的排列或是按同一方向，或取相反方向。转座子可从一个位置转座到另一个位置。在高等生物中也有跳跃基因。

跳跃基因的发现，人们进一步认识到基因不是稳定、静止的实体，它是一段DNA顺序，在结构上有明确的界限，在功能上是一个单独的遗传单位，它可以通过自身的运动调节基因的活性。因此说，基因是可动的。

2. 断裂基因

以细菌等原核生物为材料的研究表明，基因的遗传密码子是连续不断地排列在一起，形成一条没有间隔的完整的基因实体。也就是说，基因表达从DNA的起始信号开始，沿着DNA分子转录，直至转录成mRNA直接翻译成蛋白质分子。编码构成生物体的蛋白质和酶蛋白的结构基因是一段独立的而其内部又是连续的DNA片段。mRNA同由它反转录成的互补DNA(cDNA)杂交实验，进一步对真核基因结构分析发现，它们的核苷酸序列中间有不转录成mRNA的间隔区。

1978年，吉尔伯特认为基因是一个嵌合体，它包含两个区段，一是在mRNA中丢失的片段称内含子；一是将表达的片段称外显子，表达顺序分别处在内含子之间。泉本发现鸡的卵清蛋白基因DNA片段被分成15个小片段，其中8个(L, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)能转录转译，称之为外显子；7个(A, B, C, D, E, F, G)

能转录但不能翻译，称之为内含子，因能表达的外显子被不能表达的内含子一一隔开，故有断裂基因之称。

不连续的断裂基因的表达程序是，外显子和内含子在细胞核内一并转录成前体mRNA，然后加帽接尾后，切除用不着的间隔区DNA的转录物，所有的外显子转录物按照顺序连接成成熟的mRNA，转移到细胞质，再翻译成相应的多肽链。

现已陆续报导真核细胞转录 mRNA 的结构基因，确实有 mRNA 中未包含的“间隔区”顺序。例如果蝇的 rDNA 中，28SrDNA 和 18SrDNA 是反复出现的，除了在 28S 和 18S 基因之间有间隔区外，28S 基因本身也分成两部分，中间插入了功能不明的 5400 个核苷酸。结构基因中插有间隔顺序是普遍的，它的功能还不清楚。

基因的不连续现象的发现，说明功能上相关的各个基因，不一定紧密连锁成操纵子形式，它们不但可分散在不同染色体或同一染色体的不同位置上，而且同一基因还可分成几个部分，

3. 重叠基因

研究者在一些噬菌体和动物病毒中发现，不同基因的核苷酸序列有时是可以共同的，即它们的核苷酸序列彼此重叠，这样的基因称为重叠基因。

1977 年，桑格等人在测定 $\phi x174$ 噬菌体 DNA 的核苷酸序列时发现，同一部分的 DNA 能编码两种不同的蛋白质。发现基因重叠有两种情况。一是一个基因的密码子完全包含在另一个基因里，如 B 基因在 A 基因里，E 基因在 D 基因里，但它们的密码子的码组不同。另一种情况是两个基因只有一个核苷酸重迭。如 D 基因的终止密码子的第三个核苷酸，是 J 基因起译密码子的第一个核苷酸。在 G4 病毒的单链环状 DNA 中，还发现一段 DNA 参与三个基因的组成，出现三层重迭基因。G4 噬菌体的单链环状 DNA 共有十个基因。其中编码 K 蛋白的 K 基因的核苷酸序列有两个位置重叠着三个基因。头一个位置是同 A 基因和 B 基因的序列重叠，重叠部分的五个核苷酸是 TGATG，它们分别为三个基因 (K、A、B)

的编码。另一个重叠位置是同编码蛋白质A和C的基因重叠，重叠部分是四个核苷酸ATGA。

重叠基因现象在病毒中已确信无疑，近来在细菌和果蝇中，也已发现有基因重叠的现象。基因重叠现象的发现，修正了传统地认为各个基因的核苷酸链是彼此分立的观念。进一步推想，如果重叠基因是生物界的普遍现象，生物体是这样合理而又经济地利用自己的DNA，那末，迄今为止对基因功能和结构上所作出的结论，将要重新给予估价。

4. 重复基因

高等生物中，给核糖体组成成分18SrRNA和28SrRNA编码的基因，位于核仁组织表区内。蛙的每一个核仁组织表区里，这两种基因各有450个。5SrRNA基因，共有24000份拷贝，分布于整个染色体组里。18SrRNA基因和28SrRNA基因，果蝇中有100份拷贝，烟草中有750份拷贝。

5. 假基因

研究者对哺乳动物珠蛋白基因丛的核苷酸序列分析发现，除正常功能基因之外，还有一些基因的核苷酸序列同相应的正常基因相比约有75—80%部分是同源的，但由于许多突变而阻碍了自身的表达，这一类功能失活的基因称为假基因。

1977年，杰奎等人对非洲爪蛙5S基因系统研究中，首先提出假基因的概念。已经分析过的假基因，如兔 β 假基因(β_2)、L α 假基因($\psi\alpha_1$)、小鼠 β 假基因及小鼠c假因等，由于在这些假基因中存在着小的核苷酸缺失或插入，结果导致翻译结构的改变（即移码突变），使它们没有一个能编码具有功能的珠蛋白多肽链。另一种情况，如在兔 $\psi\beta_2$ 、小鼠 βH_3 和 $\psi\alpha_1$ 等假基因中，都有一个或几个间隔子—表达子的接点是异常的。因此，即使这些假基因都被转录，也不可能产生正常的mRNA。在哺乳动物珠蛋白基因中，其胚胎基因和成体基因之间都有一个假基因，究竟这个假基因对胚胎和成体发育有何功能，正待进一步的研究。

从孟德尔提出遗传因子假设以来，一百余年时间里，人们对

基因的认识是遵循着由表及里、由浅入深、由简单到复杂、由片面到全面的发展过程的。分子遗传学的研究表明，基因是一个化学实体，是具有遗传效应的DNA分子中的一些的核苷酸顺序。基因是遗传信息传递、表达、性状分化发育的依据。一切环境因子都通过基因来影响生物的遗传性。基因是可分的，也是可移动的遗传因子，它不是固定不变在染色体上的静止结构，基因本身在结构和功能上也存在着差异。随着遗传学研究的深入，基因的概念也必定赋有新的内容，人们也将更准确、全面地揭示生物遗传和变异的规律。

(赵功民)

第二节 基因的表达与调控

(一) 原核生物基因的表达与调控

原核生物与真核生物的差别也表现在基因表达的调控方面。就细菌来说，基因表达的调控主要使这些单细胞得以适应环境的变化，从而使它们的主要机能——生长与分裂——达到最佳状态。原生动物的有些基因也可对环境变化产生直接应答性反应。但在真核生物中，基因调控最富特征和最深远的作用和效果则是胚胎发育和组织分化上遗传程序的调节。

原核生物的转录和转译表现出明显的偶联性与共线性(图2-1)。在mRNA尚未完成它的转录之前就开始了蛋白质合成，核蛋白体及其它蛋白质合成机构的成分在mRNA形成期间就附着其上。大家知道，DNA转录成RNA是以5'→3'方向进行，核蛋白体mRNA转译也遵循同样的方向。因此，细菌细胞中，mRNA

分子在转译前不发生化学修饰。转录与转译偶联在一起。在原核生物某些类型的基因调节中，转录机构与转译机构的相互作用是很重要的。

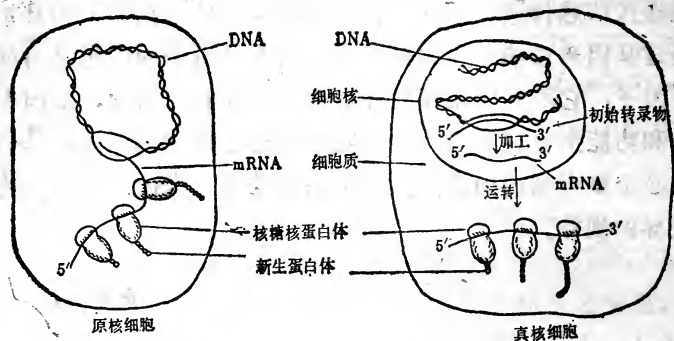


图2-1 原核细胞和真核细胞具有功能的mRNA的形成差别很大。原核生物中，RNA转录物直接作为mRNA被使用，转译在转录未完成前就已开始，即两种过程是耦联的。真核细胞的初始转录物必须在细胞核内经过修饰才成为mRNA。转译要在mRNA形成后并运转到细胞质中才开始

一旦mRNA上形成了第一个核蛋白体结合位点，核蛋白体即附着在正在转录的mRNA分子上并开始了转译过程。原核基因表达调控的临界点即为转录的起始。但是，一个基因的编码序列尚未被完全转录之前，也会发生转录受控制的终止；有时，转录可终止在两个基因之间。因此，转录终止与转录起始同样重要。这种受控制的终止反应使细菌避免产生不必要的mRNA。

细胞内特定mRNA的浓度不仅取决于它的合成速率，也取决于它的降解速率，也即mRNA的代谢稳定性。一般说来，细菌的mRNA的寿命比细胞增代的时间短。随着特定mRNA形成的停止，特定蛋白质的合成也停止了。细菌中仅有一些mRNA的寿命较长，即使这样，也只有增代时间的一半。

综上所述，构成原核生物基因调控的控制要素有三个，即转录起始，转录终止和mRNA的迅速更新。

1. 原核生物转录起始的调节

(1) 原核生物转录的起始需要RNA聚合酶对序列的识别

细菌中DNA的一切转录都由单一种RNA聚合酶来催化。这个酶的全酶含有5条肽链：两条 α 链(分子量36,512)；一条 β 链(分子量150,619)；一条 β' 链(分子量155,162)；及一条 σ 链(分子量70,236)。 β 链和 β' 链各含有一个催化活性所必需的锌离子。酶反应需要所有四种核苷三磷酸和一种二价金属离子(体内需要 Mg^{2+} ，离体条件下需要 Mg^{2+} 或 Mn^{2+})。分离纯化后的酶制剂是一种全酶和核心酶的混合物。所谓核心酶，即 σ 链(一般称为 σ 因子)已丢失。核心酶是酶的催化成分，它一般具有结合DNA的能力，如果DNA有缺口，它可以从缺口开始合成RNA，但不能催化专一性的起始。 σ 因子加成到核心酶后，则重建成具有全部活性的全酶，从而降低了与非专一性DNA序列的亲合力，大大增加与特异的识别序列的亲合力。换句话说，RNA聚合酶能跟双链DNA的任何区域结合。大肠杆菌染色体上具有约 4×10^6 个非专一性结合位点，RNA聚合酶与这些位点结合的结合常数是 $2 \times 10^{11} M^{-1}$ ；这种结合仍然使

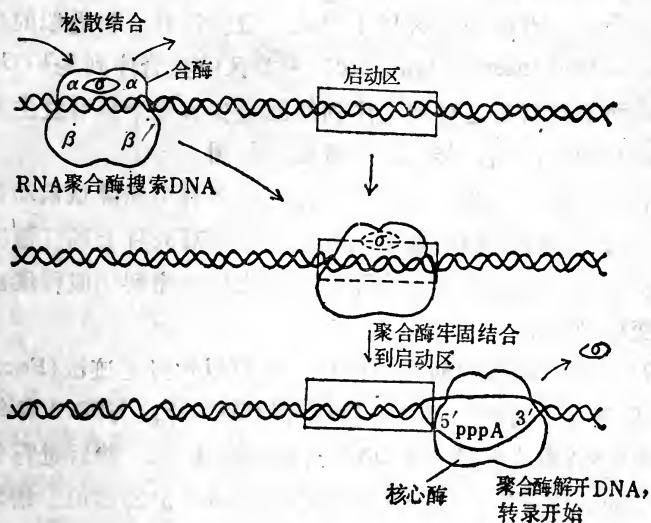


图2-2 大肠杆菌的RNA聚合酶通过与DNA松散地结合而沿着DNA链移动，最后定位在启动区，并牢固结合之，RNA于是开始合成。

DNA保持双链封闭状态。松散地结合——偶而脱开——再一次结合，RNA聚合酶如此反复地在DNA上进行搜索(图2-2)。借助于辅多肽即 σ 因子，RNA聚合酶识别出专一性的DNA序列，并与这些序列紧密结合，结合常数可增加至 10^{12} 至 $10^{14}M^{-1}$ ，引起双链DNA解链，使之处于开放状态，由此开始合成mRNA。这种专一性DNA序列就是启动区*。

大肠杆菌的RNA聚合酶可以保护启动区免受核酸酶的破坏。其所保护的片段长度因核酸酶和水解条件不同而有所差别，但显然该酶是非对称地结合在转录起始位点的一侧，即覆盖基因的5'侧翼的约50个核苷酸及延伸至基因内20个核苷酸的部分。在此保护区的5'端一侧中，围绕在第-10和第-35核苷酸处，有两个片段是高度保守的序列，即为全酶结合的启动区。-10区的序列一般称为Pribnow框(Pribnow box)。并非所有启动区的Pribnow框都具有完全相同的序列，但都有相似于TATAAT的序列，而且所有细菌启动区的Pribnow框的最后一个残基皆为胸腺嘧啶核苷酸，其余的核苷酸有60%以上对应一致。这样一种近似的序列称为契合序列(consensus sequence)。-35区的契合序列是TTGACA。任何启动子都只是这种契合序列的固定少数几个核苷酸发生变化。

(2) 契合序列对转录起着重要的作用

启动区发生突变，既有可能提高，又有可能降低启动区的转录作用，因而有所谓升、降突变株之分。经对98种大肠杆菌突变株的分析表明，一般的规律是降突变株的契合序列相似程度减少，升突变株则增加。

RNA聚合酶与启动区的结合位点可以通过足迹法(Footprinting)来研究。将纯化的含有启动区的DNA片段与RNA聚合酶混合，使RNA聚合酶结合到DNA的某些碱基上，然后进行如序列分析中的化学修饰，以破坏那些不受该酶保护的部位。结果经凝

*启动区一词出自英文promotor或Promoter，以前一般译为启动子，译名无可非议，但为了使“子”称让给较复杂的结构如操纵子等，用启动区称谓可更好区别它的结构与功能的层次。有的人译作启动基因，则似欠妥，原因不说也可自明。

胶电泳后，在序列“阶梯”上，受聚合酶掩蔽的碱基就会留下某些空隙(图2-3)。由于这种方法，可以检测到蛋白质在DNA链上的“落脚”点，故得名“足迹法”。实验结果表明，结合位点大多数是在非编码链上，集中在-35和-10的契合序列中。在-16区域也有结合点。但是结合点并非总是那些高度保守的碱基。因此，DNA的空间结构及氢键型式对于序列识别也是很重要的。而且改变启动区活性(增加或减少)的DNA，其受聚合酶保护的位点也有变化。这些结果均说明，启动区与聚合酶之间的专一性结合对

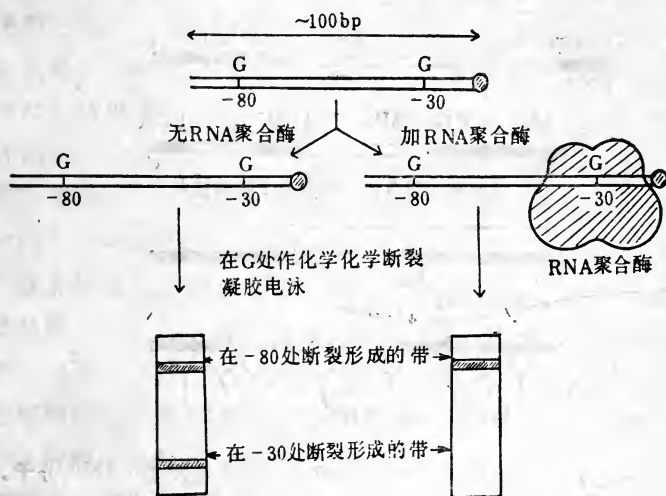


图2-3 足迹法图解。显示如何测定DNA与蛋白质的相互作用位点。纯化的DNA片段经在一条链的5'端标记后，再使之与某种蛋白质(如RNA聚合酶)相互作用。由于蛋白质结合的部位在某种条件下不被化学修饰的影响，凝胶电泳后则显示那些部位的碱基受到保护。

于一个具有活性的复合物的形式是很重要的。

RNA聚合酶与DNA的接触看来是非对称的。也就是说，如果把双螺旋作为一个圆柱体而俯视之，则接触位点一般落在其中的一个180°断面上。RNA聚合酶结合时，螺旋扭转，从Pribnow框中心打开2—3个碱基对直至转录起点(图2-2)。

(3) 操纵子的一组基因维持着结构与调控的协调

细菌在利用各种物质以适应其新陈代谢的需要时，具有很大的伸缩性，而这种伸缩性又往往与它们的“不需要则不生产”的节俭原则互为一体，以适应环境的变化和调控其基因表达。细菌的这种适应能力是通过将某些在功能上有关的蛋白的基因，诸如某一代谢途径中有关酶系的基因连锁成丛，进行协调的表达。这就是所谓操纵子(operon)(图2-4)。操纵子一般是在单个启动区的控制之下(但并非绝对如此)，由此去转录操纵子中的各个基因成为单一的mRNA；操纵子的各个基因都体现在该mRNA中，而

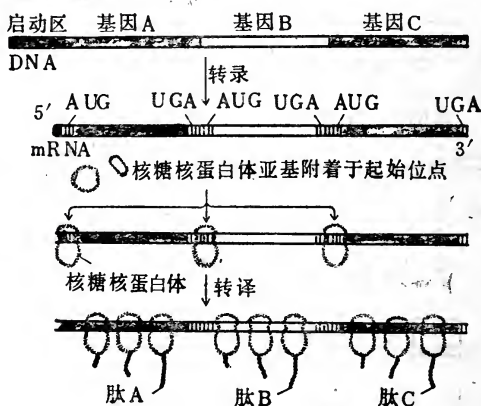


图2-4 细菌的操纵子转录形成单一的多顺反子mRNA分子。该mRNA的每一段都有其自己的核糖核蛋白体结合位点、起始密码(AUG)和终止密码(如UGA)。30S和50S亚基附着在mRNA的各起始位点，即转译出该分子所编码的各个肽链。

mRNA的各个部份则独立转译。因为一般这种mRNA编码不止一条多肽链，因而称为多顺反子mRNA (polycistronic mRNA)(图2-4)。

在一个特定的操纵子中，所有基因都同等地被转录，换句话说，它们或者皆转录，或者皆不转录。为了行使某一代谢功能，往往需要若干种酶，这些酶通常被编码在同一个操纵子内。当其中有一个酶生成，操纵子中的其它酶也都一起合成了。但是，如上所述，由于多顺反子mRNA中的各编码部份是独立转译的(也

就是说有多个转译起点和终点), 因此, mRNA的某些部份可能转译得快些, 另一些部份可能慢些。转译速度很大程度上受mRNA的起始位点附近的序列的二级结构(如发卡结构)所控制。

在细菌的生命周期中, 并非所有潜在的启动区都在时刻使用。选择哪一个启动区(并因此而哪一个操纵子)主要由细菌生长环境的营养成分所决定。例如, 某些糖类转换成葡萄糖(易于代谢的碳源)时, 需要特定的一组酶。将半乳糖转换成葡萄糖需要的一组酶; 乳糖转换成葡萄糖时则是另外一组酶; 而转换阿拉伯糖的是第三组酶。编码不同种酶的基因丛集在不同的操纵子内, 它们分别是乳糖操纵子(*lac operon*), 半乳糖操纵子(*gal operon*)和阿拉伯糖操纵子(*ara operon*)。细菌从环境中摄取某种糖进行新陈代谢时, 只使用相应的启动区, 生产相应的酶。酶的合成是由它们的底物(此处为糖)来诱发的, 这种特定的应答称为酶诱导(*enzyme induction*)。

营养缺乏也能诱导酶的合成。许多细菌均能合成生长所必需的氨基酸。但只在它们需要某种氨基酸时, 生成该氨基酸所需的酶才会出现。例如假定需要细菌合成色氨酸, 则将它们培养在不含色氨酸的培养基中, 这时细菌以最高速度合成色氨酸生产所必需的五种酶, 以致这些酶达到最大浓度。另一方面, 如果培养基中含有足够量的色氨酸, 则细胞从培养基中摄取其所需的量, 而不去制造为催化合成这种氨基酸所需的酶, 原有的酶则在生长过程中稀释。这时色氨酸的生成处于受抑制状态。这种新的酶分子合成受代谢物抑制与反馈抑制是两回事, 反馈抑制是代谢途径的终产物抑制原有酶分子的作用。

(4) 调节蛋白控制RNA聚合酶与细菌DNA中启动区的接触

细菌内的蛋白质及编码这些蛋白质的基因可以分为两大类。绝大多数蛋白质都不参予转录的调节, 这类蛋白质包括各种酶系、膜蛋白及核蛋白体组分。编码这类蛋白的基因称为结构基因。有些结构基因的RNA合成速率是受调节和控制的。但有许多结构基因连续不断地, 或多或少地以某些速率转录。这种非调节的基因

表现出一种定制型(constitutive)功能。

另一类重要蛋白质是调节蛋白。它们的作用是帮助细胞去感受环境，并通过与DNA的结合来调节结构基因的转录速率。编码调节蛋白的基因称为调节基因(regulatory gene)。

调节蛋白有两种类型，根据它们是提高RNA聚合酶与启动区结合的效率还是根本上阻碍这两者之间的结合来区分，前者称为活化物或活化蛋白，后者称为阻遏物或阻遏蛋白。在启动区旁或附近，往往分别存在着与阻遏蛋白或活化蛋白结合的位点。阻遏物的结合位点就是操纵序列或称操纵区(operator)*。操纵序列总是靠近启动区序列并且往往互相重叠(两者共用一些同样的核苷酸)。

有些小分子可以与阻遏蛋白结合起来，从而影响阻遏物与操纵序列的结合亲和力。这种小分子称为效应物(effector)。有两种效果绝然不同的效应物。一种是诱导物(inducer)。另一种是协阻遏物(corepressor)。诱导物与阻遏蛋白结合，则降低阻遏蛋白与DNA结合的亲和力，从而使阻遏蛋白改变其形状，从DNA链上脱离下来，让位于RNA聚合酶，使转录得以进行。例如，乳糖操纵子中的阻遏蛋白，如果环境中没有乳糖，或者体内没有代谢产物，就一直与乳糖操纵子上的操纵区结合着；直到有了乳糖或其代谢产物(作为诱导物)与阻遏蛋白结合，从而使阻遏蛋白构象发生变化，降低它与操纵区的亲和力，从操纵区上脱离下来，使乳糖代谢所需酶的基因得以转录。协阻遏物的作用相反。它可与那些缺乏协阻遏物则不具功能的阻遏蛋白结合，从而提高阻遏物与操纵区的亲和力。例如，色氨酸可以跟色氨酸操纵子的阻遏蛋白结合。该阻遏蛋白只有跟色氨酸结合以后才可以与操纵区紧紧地结合，抑制生成色氨酸所需酶系的基因的转录。因此，色氨酸起着协阻遏物的作用，终止生成色氨酸所需酶的合成(图2-5)。

活化蛋白是一类与阻遏蛋白作用相反的调节蛋白。它们在DNA上的结合位点称为活化蛋白位点(图2-6)。有些活化蛋白也

*操纵序列或操纵区严格地说并非基因，因此称之为操纵基因似欠妥。

有其相应的效应物。研究得最详细的是阿拉伯糖操纵子上的活化蛋白，即Arac蛋白。我们将在后面加以描述。

有些操纵子只有阻遏蛋白，有些操纵子则只有活化蛋白，但许多操纵子则两者兼备。对于这种受双重调节的基因，只有在某种诱导物导致阻遏蛋白失效而又有活化蛋白结合到DNA上时，转录mRNA才可能达到最大速率。

目前对细菌及噬菌体的调节蛋白结合DNA的物理机制的研

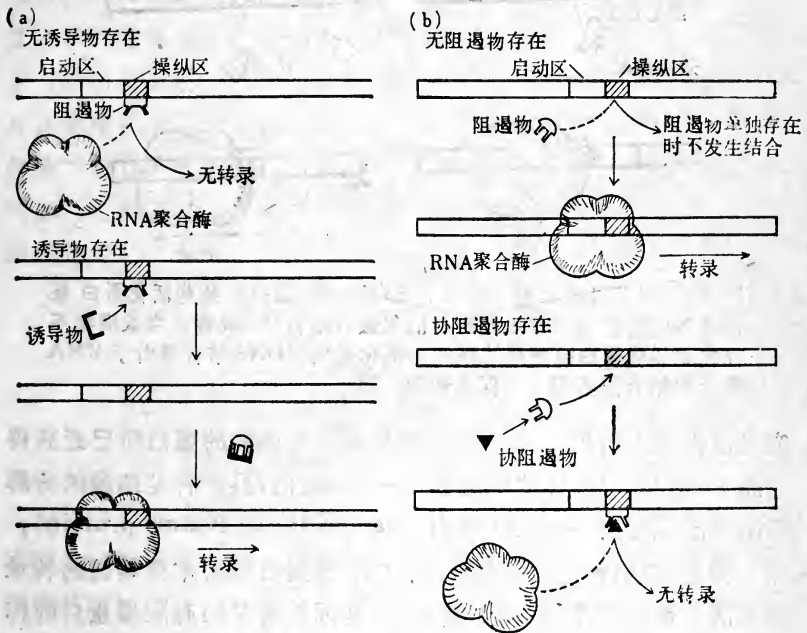


图2-5 两种效应物—诱导物与协阻遏物一作用示意图。(a) 有些阻遏物在自然状态下结合到DNA上，因此，无诱导物存在时，该蛋白与操纵区相结合，从而阻碍RNA聚合酶进入启动区，mRNA合成成为不可能。而有诱导物存在时，诱导物则与阻遏蛋白结合，使其形状发生变化，阻遏蛋白即从DNA分子上脱离下来，RNA聚合酶即可进入启动区。(b) 另一类阻遏蛋白只在协阻遏物存在时才起作用。这种情况下，阻遏蛋白不能单独与操纵区结合，因而无法停止RNA的合成。当协阻遏物与阻遏蛋白结合后，这种复合物与操纵区紧紧结合，而使RNA无法合成。

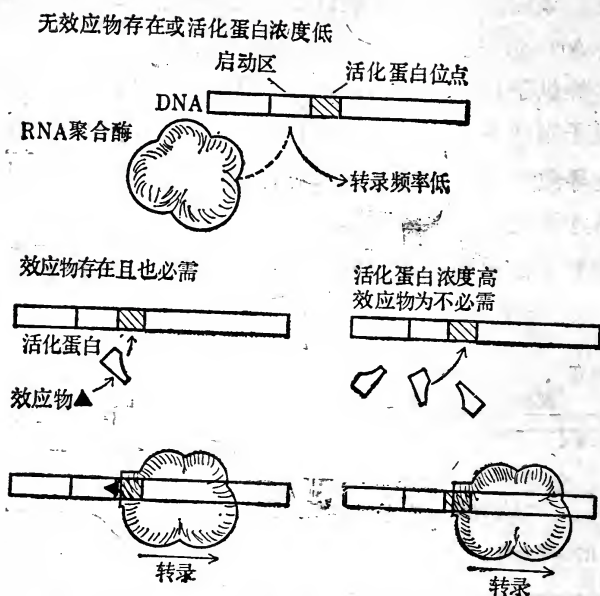


图2-6 调节可能依赖于正调节蛋白即活化蛋白；某些活化蛋白还需要效应物。当某种效应物与活化蛋白结合时（或者，当效应物不存在而活化蛋白浓度足够高时），活化蛋白与DNA结合吸引了RNA聚合酶结合到基因上而促进转录

究已取得很大进展。迄今有三种具有调节功能的蛋白质已经获得结晶：一种是 λ 噬菌体的阻遏物——Cro蛋白；另一种是细菌的分解代谢物活化蛋白——CAP蛋白（catabolite activator protein），再一种是 λ 噬菌体的cI阻遏蛋白。cI阻遏蛋白对它本身基因的转录起着活化蛋白的作用，而对其它 λ 的基因的转录则有阻遏蛋白的作用。这三种蛋白质的三维结构具有惊人的相似性，它们都是以二体的形式与DNA结合；单体都有三个 α -螺旋区。根据DNA与这些蛋白质结构建立的模型表明，这些蛋白质的每一单体中的一个 α -螺旋与DNA结构中的大沟吻合得相当好，比如，Cro蛋白与DNA结合的空间吻合模型，说明Cro蛋白的二体与DNA双螺旋的两个相邻大沟结合的严密程度

2. 负调节系统：乳糖操纵子 (*lac operon*)

大肠杆菌乳糖操纵子是细菌的操纵子受阻遏蛋白负调节的一个经典例子。它给人们揭示了细菌通过什么样的机制在正常情况下不生产乳糖代谢所需的酶系，但当环境摄取不到葡萄糖而代之以乳糖时，依然具有合成这些酶的能力。这种机制的认识过程代表了人们对基因调控知识的历史发展。

细菌结构基因上发生突变，就会改变酶的活力；而调节基因上发生突变就会改变细菌对环境变化的应答能力。为要了解正常细菌的基因调控，对细菌中突变的调节基因的鉴别是不可缺的。接合、转导和转化的方法使在大肠杆菌中进行基因转移得以工程化，从而能够考察结构基因和调节基因突变的效应。

从历史上说，细菌基因调控的最重要研究都集中在大肠杆菌及其乳糖代谢途径方面。乳糖是哺乳类奶汁中的一种双糖。大肠杆菌如果在有乳糖的环境中生长，细胞中有三种蛋白质会急剧增加，它们是： β -半乳糖苷酶， β -半乳糖苷渗透酶和乙酰转移酶(图2-7)。

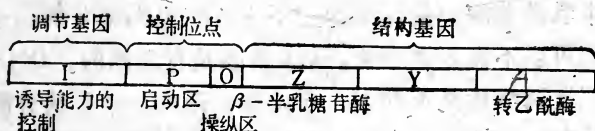


图2-7 大肠杆菌负责乳糖代谢的有关基因。

其中 β -半乳糖苷酶的作用是催化乳糖分解成葡萄糖和半乳糖；渗透酶是细胞内膜上的一种蛋白质，它可以增加乳糖的摄入量，乙酰转移酶的作用尚未了解。所有这三种酶的基因都是乳糖操纵子结构的一部分，在染色体上的排列顺序是：Z基因，编码 β -半乳糖苷酶；Y基因，编码渗透酶；A基因，编码乙酰转移酶。乳糖或乳糖的某种代谢物对操纵子的转录起诱导作用，乳糖操纵子转录起始的负调节（即由阻遏蛋白质控制）是经典遗传学和生物化学研究的基础上提出的。

正常细菌乳糖操纵子的特征可以写成 $Z^+Y^+A^+$ ，这表示该细菌可以正常产生具有活性的这三种蛋白。其中任一基因上有突变都

可导致相应蛋白质失活，或根本不合成。例如， $Z^-Y^+A^+$ 突变株，对乳糖存在时的反应是合成渗透酶和乙酰转移酶，但 β -半乳糖苷酶则没有活性。有些突变株这三种酶的结构基因都正常，但对这三种基因不具正常调节能力，即为调节基因突变株。它们当中有许多是在没有诱导物存在时也能合成这三种酶，而相反，正常细菌只有在乳糖存在时才诱导合成这种酶。这样的突变株就是定制突变株 (constitutive mutant)。引起 β -半乳糖定制式合成的突变有些是发生在起调节作用的基因 (即I基因) 上 (图2-7)。因此正常的，可诱导的细菌可以用 I^+ 表示，定制突变株则用 I^- 表示。

50年代末期，法国巴斯德研究所的Francis Jacob和Jacques Monod在进行接合试验时首先注意到I基因的属性。以正常菌 (I^+Z^+) 作供体，突变菌 (I^-Z^-) 作受体进行接合，结果受体菌会包含有两套基因，即变成部份合子 (merozygotes)。其遗传构造可用 I^+Z^+/I^-Z^- (供体/受体) 表示。

接合开始前，供体细胞由于培养基中无诱导物 (乳糖) 而不合成 β -半乳糖苷酶；受体细胞也不生成 β -半乳糖苷酶，这是由于虽然它们可以不需要诱导物，但Z基因是有缺陷的。DNA转移后不久，不管诱导物是否存在，开始都会形成 β -半乳糖苷酶；但若无诱导物存在，酶合成约2小时后，即复停止。因为I基因和Z基因转移后，供体细胞一旦死去，合成 β -半乳糖苷酶的受体细胞也当即停止其合成。

Jacob和Monod在解释这种事实时是这样认为的：即在没有诱导物时，供体细胞 I^+ 基因有一种产物妨碍 Z^+ 基因的表达。因此，当 Z^+ 基因由供体进入到受体细胞时，由于受体细胞内的环境缺乏该 I^+ 基因产物， Z^+ 基因则不受约束地指令 β -半乳糖苷酶的合成。但 I^+ 也同样供给了受体细胞，在没有诱导物的那段时刻， I^+ 基因产物也在受体细胞内累积， Z^+ 基因活动再一次受到抑制。由此，他们提出了起着阻遏作用的是基因产物 (I^+ 基因产物) 的概念。

阻遏蛋白的作用在用乳糖操纵子的各基因作的另一些实验中得到了充分的阐明。可以将乳糖操纵子和I基因上的突变作各种组

合，插入质粒中，然后引入到具有一个乳糖操纵子和一个I基因的大肠杆菌中，构成一种所谓部分二倍体的细胞。在这些细胞中，阻遏物要表现其功能必须结合在DNA的特定位置上，而且这种位置必须与受控的Z基因相邻近。

表1给出了这种实验的结果，说明了含有不同组合的突变的

表1 不同品系的大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶含量

| 菌株 | 酶 含 量 | | 结 论 |
|------------------------------|-------|-------|----------------------------------|
| | 诱导 | 不诱导 | |
| $O^+I^-Z^+$ | 最大 | 最大 | 定制式酶合成 |
| $O^+I^-Z^+/O^+I^+Z^-$ | 最大 | 低 | 可扩散的跨域作用阻遏蛋白 I^+ 相对于 I^- 为显性 |
| $O^C I^+(或I^-)Z^+$ | 最大 | 接近最大 | 操纵区为定制式，显性；阻遏蛋白不能起作用 |
| $O^C I^+(或I^-)Z^+/O^+I^+Z^+$ | 最大 | 最大的一半 | O^C 显性，同域作用* |
| $O^C I^+(或I^-)Z^+/O^+I^+Z^-$ | 最大的一半 | 最大的一半 | O^C 显性，同域作用 |

* 跨域作用意味着在另一“染色体”上起作用；同域作用意指在同一染色体上起作用；突变总是同域起作用的，它必定是发生在受影响基因的附近。

Lac基因的各种菌株的酶活。首先在 I^-Z^+/I^+Z^- 的细胞中， β -半乳糖苷酶合成依然需要诱导物。这表明阻遏物基因位于另一染色体上。 O 序列（即操纵区或操纵序列）突变的发现表明，阻遏蛋白作用在与Z基因很靠近的位点上， O 序列上的突变引起邻近的 Z^+ 基因活化，即使没有诱导物存在。这种突变以 O^C 表明，意思是操纵区定制化（operator constitutive）。当具有一个活化 Z^+ 基因的 O^C 突变株用来产生一种部分二倍体（ $O^C I^-Z^+/O^+I^+Z^+$ ）时，这时，细胞依然是部份定制化。因此，即使有I基因产物形成， O^C 仍继续引起邻近 Z^+ 表达。

由此，我们可以区分导致 β -半乳糖苷酶定制化合成的两种类型的突变，即I基因上的突变和操纵区上的突变。操纵区中的突变是同域起作用的（cis-active）〔注〕。也就是说，只对同一染色体上

的Z基因发生影响。但I基因中的突变则是跨域起作用的 (trans-active)^{〔注〕} 意味着既可能对同一染色体上的Z基因也可能对另一染色体上的Z基因发生影响。由此可以得出结论, Z基因附近的某一位点上受到一种可扩散产物 (I基因产物) 的作用。对I基因产物的温敏突变的研究表明, 其产物是一种蛋白质, 因为蛋白质对热比核酸更敏感。I基因上会发生可抑制突变 (也就是说, 突变可被抑制基因tRNA来校正)。这为阻遏物是蛋白质的看法提供了强有力的证据。

基于这些事实, Jacob和Monod在1961年提出了操纵子学说。乳糖操纵子的基本特征目前已得到很好的了解, 归纳起来有:

(i) 编码三种酶的结构基因在DNA上相互毗邻并使用同一个启动区, 转录成一种多顺反子mRNA。

(ii) DNA上的I区域为调节基因, 使用单一的启动区转录, 产生ImRNA。ImRNA转译成分子量为38,000的多肽。阻遏蛋白是由这种多肽组成的四聚体。在无诱导物时, 阻遏蛋白结合在操纵区上, 阻止结构基因的转录 (图2-8a)。上面提到的I基因突变导致突变阻遏蛋白的形成。突变阻遏蛋白不能与操纵区结合, 也就不能阻止转录。操纵区上的突变也会得出相似的定制化突变株。

(iii) 有乳糖存在时, 诱导物 (乳糖) 与阻遏蛋白相互形成一种复合物。这种复合物使阻遏蛋白丧失了与操纵区结合的能力, 结构基因得以进行转录 (图2-8b)。天然的诱导物并非乳糖, 而是由乳糖通过转糖苷作用形成的异乳糖 (allolactose)。实验室中用的是一种不可代谢的诱导物——异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)

〔注〕 英文的cis-acting和trans-acting等词, 目前见于中文书刊中常被译为“顺式作用”和“反式作用”等。这种译法, 沿用化学结构上顺式、反式的概念; 意蕴颇为含糊。作者不揣冒昧, 妄译为“同域作用”和“跨域作用”等, 以抛砖于各届同行和专家。实际上cis和trans有纵向和横向之意。cis-acting是纵向作用或纵向效应; trans-acting是横向作用或横向效应。此地译作“同域”者, 含有在结构上共线性的意思, “跨域”则相反。而且跨域作用因子是 (往往) 由位于别的染色体编码的蛋白质。同域作用序列则是DNA结构成分本身。

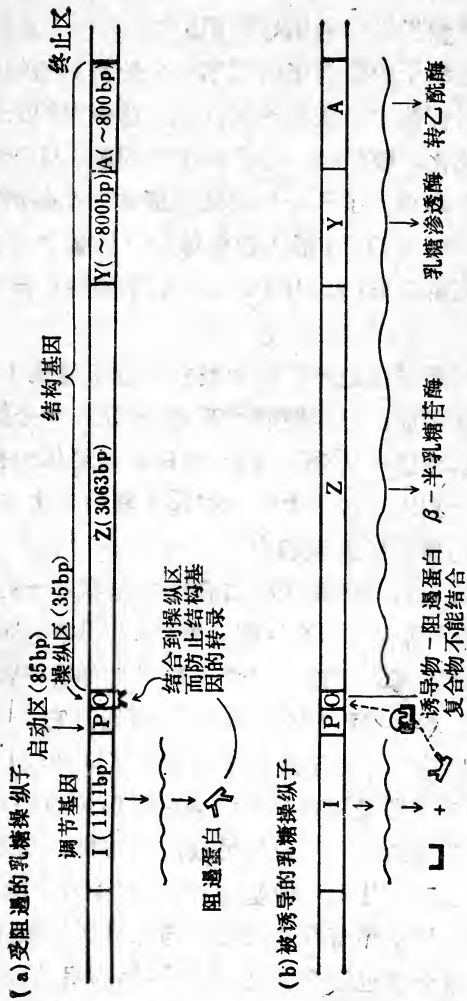


图 2-8 乳糖 (lac) 操纵子处于受阻状态和被诱导状态的示意图。

可以达到极理想的诱导效果。

(iv) 该启动区的3'部分在原核启动区中或多或少地具有典型性；而其5'部分，在分解代谢物阻遏中起作用，这是又一种调控机制：当乳糖和葡萄糖均可作为底物被利用时，则通过这种机制去抑制乳糖操纵子的诱导作用。

乳糖操纵子的阻遏蛋白是第一个分离到的细菌阻遏蛋白。在野生型大肠杆菌中，该阻遏蛋白只占总蛋白的0.001%左右，将它加以分离纯化，曾经是一个极棘手的问题。Gibert和Miiller-Hill用遗传学方法得到了一个启动区突变株，产量增加了近10倍；然后他们把突变的DNA插入噬菌体中，该蛋白的合成上千倍地增加。利用该阻遏蛋白与IPTG具有的亲和性，纯化工作迎刃而解了。

这一阻遏蛋白是一种酸性蛋白，分子量是150,000，由四个相同的亚基组成；已经搞清了亚基全部的360个氨基酸序列。每一个亚基与一个诱导物分子结合，但只有四聚体与操纵基因结合。当诱导物结合到阻遏蛋白上时，引起了其构象上的一种变构变化，降低了其与操纵区的亲和力。

该阻遏蛋白与操纵区的结合比之与非专一的DNA的亲和力大 4×10^6 倍，前一种结合的解离常数 $k_d \sim 10^{-13}M$ 。基于这一点，阻遏蛋白与操纵基因所形成的复合物则有可能停留在硝酸纤维素滤膜上，而不形成这种复合物的DNA会通过它，从而使得含操纵区的片段得以纯化。由于这种结合防止了DNase I的水解，然后分离出的DNA片段即是阻遏蛋白结合时所保护的序列。然后用序列分析方法，则得到前面所说的足迹法的结果。阻遏蛋白结合所保护的操纵区包含有廿七个碱基对，其中有十六个碱基对是迴文结构。这也表明，这些核苷酸在阻遏物与操纵区的相互作用中是很重要的。RNA聚合酶也结合在这一区域，因为启动区与操纵区有重叠。这种重叠说明了为什么阻遏蛋白与操纵区结合就妨碍了RNA聚合酶在启动区上的结合，因而阻止 β -半乳糖苷酶mRNA合成的起始。

3. 色氨酸操纵子 (*trp* Operon) 的阻遏作用

大肠杆菌具有合成为蛋白质合成所必需的各种氨基酸的能力。但在许多情况下，只有外源缺乏某种氨基酸时才去合成为生成该氨基酸所需的酶。色氨酸操纵子这一系统就是很好的例子。它由五个结构基因组成，编码合成色氨酸所需的三种酶的五个多肽键。该操纵子也是由单一个启动区控制，转录成一种多顺反子 mRNA，并且也受到与其操纵区结合的阻遏蛋白的控制(图2-9)。但是它们的调节基因远离操纵子的其余部分。它们所编码形成的阻遏蛋白是没有活性的，若无色氨酸存在，不能结合到操纵区上，但若有色氨酸存在，色氨酸即与之结合并使其激活阻遏蛋白。这时阻遏蛋白即可与操纵区结合并阻止转录。在这里，色氨酸是一种协阻遏物。在乳糖操纵子中是乳糖降低阻遏物与操纵区的亲和力；而色氨酸则大大增加色氨酸操纵子的阻遏蛋白与其操纵区的亲和力。但是，这两种操纵子都属于负调节，因为具有活性的阻遏蛋白都是阻止转录。色氨酸操纵子的转录中止也是一种调控办法，我们后面将谈到。

4. 正、负二元调节系统——阿拉伯糖操纵子 (*ara* operon)

大肠杆菌以阿拉伯糖作其能源时，它们就合成三种酶来将阿拉伯糖转换成木糖5磷酸。这三种酶(一种异构酶，一种激酶，一种表异构酶)分别是三个基因(B, A和D)的产物，同属于单个操纵子——阿拉伯糖操纵子(图2-10)。造酶来利用糖，这一点与

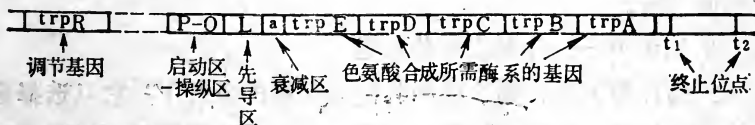


图2-9 色氨酸操纵子示意图

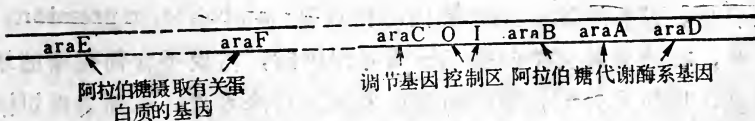


图2-10 阿拉伯糖调节子示意图

乳糖操纵子是共同的。但它们的调节“线路”却迥然不同。

在研究阿拉伯糖时发现大肠杆菌的一种突变株，其三个酶的结构基因都正常，但不能利用阿拉伯糖。这种突变株是调节基因（即ara C基因）上的突变。ara C产物也与乳糖操纵子的阻遏蛋白一样，是一种调节蛋白，但作用不一样。在没有阿拉伯糖的条件下，Ara C蛋白与操纵区结合则抑制mRNA的生成，因此对阿拉伯糖代谢酶的结构基因行使的是负调节。但在阿拉伯糖存在的条件下，Ara C蛋白则对这些结构基因行使正调节，即与启动区结合成一个单位，促进有效的转录。当AraC与阿拉伯糖结合后，蛋白构象发生变化，亦即异位变化，从而不与操纵区结合，而与启动区结合。这一点与乳糖操纵子阻遏蛋白相反，因为后者在乳糖存在时，与启动区脱离接触。

在没有阿拉伯糖的条件下，AraC蛋白对阿拉伯糖操纵子也行使负调节的功能。但在这时，AraC的作用部位并非紧挨转录起始点的上游，而是作用在上游约距28碱基对的地方的另一操纵区上，造成DNA弯曲，结果，阻遏蛋白同时与两个操纵区结合，阻止B，A，D mRNA的转录，这一例子说明，参与调节的DNA位点，并非都是紧邻在转录起始点。

值得指出的是，参与阿拉伯糖代谢的除了上述三个酶结构基因外，还包括另外两个为阿拉伯糖摄取的蛋白编码的基因，这两个基因远离操纵子，但受到同样的调节。这种散在的控制单位，称为调节子。

5. 正调节——分解代谢物阻遏

大肠杆菌生长在葡萄糖和乳糖均存在的条件下，它只选择葡萄糖进行代谢。所需的酶不能诱导合成代谢其它糖（如乳糖）。显然，葡萄糖或其分解产物妨碍了其它种类糖代谢所需酶的mRNA的合成。这种现象就是分解代谢物阻遏（catabolite repression）。因此，在研究其它糖的操纵子诱导作用时，需要不含葡萄糖的培养基，以防止分解代谢物阻遏的发生。后来发现，在葡萄糖饥饿时，大肠杆菌合成的环腺苷酸（cAMP）明显增加。cAMP量的增加

是代谢胁迫时的一种“警戒”信号，也与基因调控有关。将大肠杆菌培养在同时含有葡萄糖和乳糖的培养基中，并加入 cAMP，

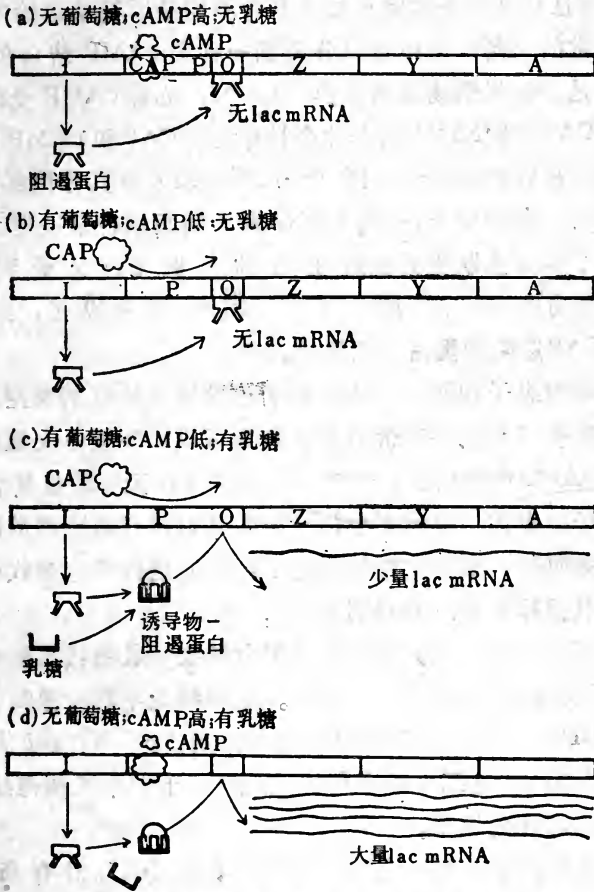


图2-11 乳糖操纵子受到两种蛋白质 (LacI 阻遏蛋白和 cAMP-结合蛋白, CAP) 的控制。(a), (b) 不管有无葡萄糖存在, 无乳糖则无 Lac mRNA 形成, 因为操纵区被阻遏蛋白结合。(c) 乳糖的存在可以除去阻遏蛋白, 但当 cAMP 含量低时, CAP 蛋白不跟启动区结合, 只合成最低限度的 mRNA。(d) 当有乳糖而无葡萄糖时, lac 操纵子转录最旺盛, 这是因为乳糖可驱去阻遏蛋白, 而无葡萄糖则 cAMP 含量增加。cAMP 与 CAP 结合形成复合物, 结合到启动区而促进转录。

这时 β -半乳糖苷酶的诱导并不像无cAMP时那样受到抑制。阿拉伯糖代谢酶的诱导也有同样的结果。显然cAMP在克服分解代谢物阻遏中起着直接的作用。事实上,现在知道,cAMP不仅在原核生物中,而且在真核生物中也参与各种不同基因转录起始的调节。

从正常的大肠杆菌中可以分离到一种与cAMP结合的蛋白质,这就是分解代谢物激活蛋白(CAP),亦称cAMP受体蛋白(CRP)。CAP只跟cAMP结合才会被激活。CAP和cAMP形成一种复合物,在乳糖操纵子5'区(-72至-52)有其作用部位。它与这一作用位点的结合,有助于RNA聚合酶起始转录过程。因此,乳糖操纵子事实上既受到阻遏蛋白的负调节,又受到CAP-cAMP复合物的正调节(图2-11)。而阿拉伯糖操纵子,则受到Ara C和CAP这两种蛋白的双重正调节。

像乳糖操纵子和阿拉伯糖操纵子这种转录的复杂调控,对大肠杆菌的生存显然是很有价值的。如果可以从环境中大量获得葡萄糖,则cAMP量就很少;这时不激活CAP,无需动员其它糖代谢的操纵子的表达,也就不会诱导产生其它糖代谢所需的酶;在缺乏葡萄糖而可利用其它糖的情况下,才能进行其它糖代谢。

6. 半乳糖操纵子: 双启动区

生长在含有半乳糖条件下的细菌会导致半乳糖代谢酶系的增加,把半乳糖转换成葡萄糖1-磷酸。这些酶是半乳糖激酶、磷酸转移酶和UDP半乳糖4-表异构酶。它们分别由*gal K*, *gal T*和*gal E*三个基因编码。这三个基因所构成的操纵子即半乳糖操纵子,受到两个启动区的调节。

在大肠杆菌中,两个启动区在操纵子的5'端互相有所重叠(图2-12中的P1, P2)。P1受CAP-cAMP复合物的正调节,这时P2则受抑制。P1和P2两个启动区都受到*gal*阻遏物的负调节。但在CAP和cAMP含量少的情况下,P2也可使基因得以转录,也就是说,它是一个负责这些酶的定制型转录的位点。因此,葡萄糖的存在虽然也抑制诱导生成半乳糖代谢所需的各种酶,但非诱导生成的酶总是在一个基本的水平上。相反,P1则是一个调节型的

启动区，它需要cAMP和CAP的参与，以便RNA聚合酶的结合而进行转录。显然P1与RNA聚合酶的亲和力要比P2的大得多。因而在cAMP量高而利用P1时，RNA链起始的速率亦较大，产生的mRNA也更多。

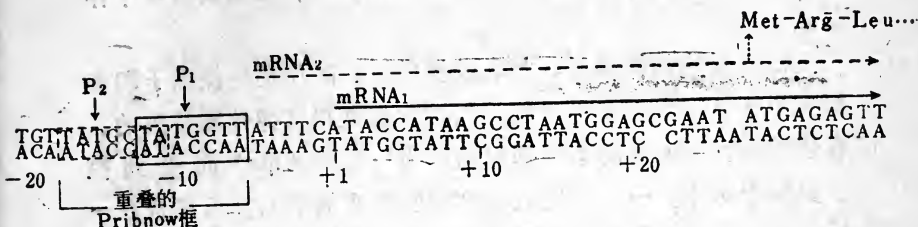


图2-12 半乳糖操纵子具有两个转录起始位点，各自有其本身的RNA聚合酶的结合位（P₁和P₂）。P₂是定制型活动状态（甚至有葡萄糖存在的时候），因此它不需要CAP或cAMP。另一个结合位点P₁则需要半乳糖，CAP和高含量的cAMP（无葡萄糖时启用）。

但在streptomyces lividans 这种链霉菌中，半乳糖操纵子的两个启动子各自位于不同部位。其中的一个(P1)是在操纵子的5'端，而另一个(P2)与操纵子的第一个基因的3'端有所重叠，在第一和第二基因的交界处。而且，这两个启动区在转录起始点上游的序列彼此之间没有明显的同源性。因此，它们可能是由不同的RNA聚合酶全酶有区别地加以识别。启动区这种机构上的变化，也使基因的布局发生了改变。大肠杆菌中，这三个基因的顺序是gal E→gal T→gal K；而在这种链霉菌中，基因的顺序则是gal T→gal E→gal K。启动区P1负责全部三个酶基因转录成单个多顺反子mRNA的转录，是调节型的，即其起始的转录受到半乳糖所诱导。P2只负责gal E和gal K这两个基因的多顺反子mRNA的转录，在无半乳糖的非诱导条件下，维持其转录的基本水平。因此P2为定制型启动区。

从比较可以看出，不管大肠杆菌或是前面提及的链霉菌，其定制型启动区都是在gal E基因的上游。这种布局可能与半乳糖的利用有重要的关系。这两种细菌的UDP-半乳糖-4-表异构酶都是定制型表达，因为其定制型启动区都紧挨在gal E的上游。在大肠

杆菌中，不管其碳源是否为半乳糖，细胞壁的生物合成总是需要UDP半乳糖4-表异构酶。在链霉菌中，存在着一个内部的定制型启动区P₂，可能也是为了满足类似的需要。

7. 精氨酸调节子 (arginine regulon): 一种阻遏物有多个作用位点

上面所描述的操纵子，如乳糖操纵子，阿拉伯糖操纵子和半乳糖操纵子，在细菌的转录起始调控中都是很富弹性和精致的。所有这些糖代谢所需酶系的基因均作为一个转录单位而受到控制。真核细胞中，一个特定代谢途径所牵涉的基因并不集合在一个操纵子内。大肠杆菌精氨酸生物合成所需酶系的基因是研究真核生物转录调控的一个珍贵的模型。这些基因分散在大肠杆菌染色体的许多位点上，互不毗邻。当精氨酸来源丰富时，所有这些基因的转录都受单一种阻遏蛋白分子所阻遏。这种散在的、调节协调的基因群即称为精氨酸调节子。

8. 歧路转录

大肠杆菌的生物素操纵子 (biotin operon) 含 5 个结构基因 (A, B, F, C 和 D)，编码生物素合成所需的各种酶；在 A 和 B 基因间有一个区域包含着操纵区和启动区。基因 A 从其中的一个启动区向左转录，而其余四个基因则由另外一个启动区向右转录。位于这两个启动区之间的操纵区看来具有单个结合位点去结合阻遏蛋白-生物素复合物，对整个操纵子行使负调节。操纵区的序列部份地为迴文式对称，与两个启动区均有重叠。在精氨酸调节子中也发现这种二元启动区。这种系统可能是不同基因有不同表达速率的基础。

9. 调节蛋白本身的调控方式

调节蛋白本身的表达是如何调控的呢？在大肠杆菌中发现了两种不同的情形：①调节蛋白为定制型合成②调节蛋白通过一种所谓自生调节机制控制其本身的合成。

(1) 有些调节蛋白持续地合成

乳糖操纵子的阻遏蛋白是 *lac I* 基因的产物。这个基因不是定

位在乳糖操纵子中，而是在一个邻近的区域，它有自己的启动区，并总是有RNA聚合酶结合着。阻遏蛋白的mRNA在这一独立转录单位上合成是不受调节的，而总是以一定的速率进行转录。看来，有可能许多负调节的阻遏蛋白都定制地少量地合成。

(2) 有些调节蛋白控制自身的合成——自生调节

组氨酸利用操纵子 (*hut* operon) 的阻遏蛋白的合成是调节蛋白自生调节的一个例证。编码阻遏蛋白的基因是该操纵子三个基因当中的一个，可看成是自生调节。此外，还有 λ 噬菌体中的阻遏蛋白(见后)和前面提到的Ara C蛋白也是由单个基因编码，使用自己的启动区和操纵区(也即，它们是只合成一种蛋白的操纵子)，各自控制本身mRNA的合成。我们在这里先讨论*hut*操纵子的调控。后面再另辟章节讨论 λ 噬菌体的调控系统。因为实际上，各种调控机制在 λ 噬菌体中都得到体现，它是转录调节的一个综合系统。

(3) *hut*操纵子

[*Klebsiella aerogenes*]、鼠沙门氏菌与大肠杆菌的亲缘关系很近。它们能够把组氨酸降解为氨、谷氨酸和甲酰胺。这些降解产物均为可利用的碳源与氮源。因此，组氨酸可以作为这些细胞培养基的唯一能源。降解组氨酸需要两组酶，称为*hut*酶，即组氨酸利用酶。*hut*酶分别由两个操纵子编码，每个操纵子有其自己的操纵区和启动区。在无组氨酸的条件下，这两个*hut*操纵子的转录受到单一种阻遏蛋白的阻碍，也就是说两个操纵子的操纵区都被同一种阻遏蛋白分子所结合。以组氨酸作为诱导物，它则与阻遏蛋白结合。阻遏蛋白被组氨酸结合后，就再不能与操纵区结合，从而不能起始转录过程。

*hut*阻遏蛋白本身则由操纵子三个基因当中的一个编码，因此*hut*阻遏蛋白的合成也在组氨酸(诱导物)的控制下合成。当组氨酸耗尽时则累积游离的阻遏蛋白，从而减少更多的阻遏蛋白的合成。所以阻遏蛋白的合成是由阻遏蛋白本身所控制。

需要指出的是，*hut*操纵子不仅对组氨酸的存在有反应，而且

它也像 *lac*, *ara* 和 *gal* 操纵子一样, 对葡萄糖很敏感, 因为在离体转录系统中 *hut* mRNA 合成也需要有 cAMP 和 CAP 的参与。

10. λ 噬菌体的阻遏蛋白

前面描述过的关于原核生物的转录调控机制, 包括转录起始的正、负调节, 自生调节以及后面讨论的转录终止的调节, 都可以在 λ 噬菌体中得到体现。 λ 噬菌体全部 DNA 约为 50kb, 包含有 50 个以上不同的基因。其中包括调节噬菌体 DNA 本身转录的特异性蛋白的编码基因。

λ 噬菌体表现出两种不同的生活方式, 或两种不同的生命历程。一种是裂解周期, 即噬菌体中的各种基因得以表达, 产生许多噬菌体子代, 最后使细菌细胞裂解, 而将这些噬菌体释放出来。另一种方式是维持其溶源状态。这时 λ DNA 整合到宿主基因组中并与之一道复制而代代相传下去, 不形成噬菌体去裂解细胞。但在某些情况下(如紫外光照射), 则导致结束溶源状态进入裂解状态, 产生出上百个新的噬菌体, 将宿主杀死。溶源状态的确立和维持如何处于一种精巧的平衡呢?

(1) 溶源状态的维持 噬菌体感染宿主后, 维持溶源状态取决于一个主要的转录调控蛋白——阻遏蛋白。这一阻遏蛋白是 *cI* 基因的产物。具有活性的阻遏蛋白是二个同样的多肽形成的两聚体; 每一多肽的分子量为 27,000。

阻遏蛋白抑制噬菌体裂解周期发生的机制可以简单归纳如下(图2-13):

① 噬菌体 DNA 有两个操纵区即 O_L 和 O_R , 它们皆分别可以区分出三个同属于同一契合序列的、由 17 对碱基组成的阻遏蛋白结合位点即 O_{L1} , O_{L2} , O_{L3} 和 O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} (图2-13)。每一结合位点都会与两聚体阻遏蛋白的 N 端区结合。

② 结合位点 O_{L1} 和 O_{R1} 与阻遏蛋白的亲合力最大。它们分别与 P_L 和 P_R 两个启动区在结构上有所重叠。阻遏蛋白因此优先与这两个位点结合而使这两个启动区的转录受到抑制, 从而阻碍了噬菌体进入裂解周期所需蛋白质的合成。

③阻遏蛋白在 O_{L1} 和 $O_{R\beta}$ 的结合进一步刺激阻遏蛋白在 O_{L2} 和 O_{R2} 上的结合。当阻遏蛋白占据 O_{R1} 和 O_{R2} 时，又引发RNA聚合酶 P_M 启动区的结合，使编码阻遏蛋白的 ci 基因得以转录。因此，这个阻遏蛋白对 P_R 和 P_L 行使的是负调节，而对 P_{RM} 启动区及其本身的合成则行使的是自生的正调节。

④ O_{L3} 和 O_{R3} 这两个结合位点对阻遏物的亲和力比较低，一般情况下则空着不用。但一旦阻遏蛋白大量累积， O_{R3} 被占据， P_{RM} 也会被堵塞，于是阻遏蛋白合成也就停止。在这里，阻遏蛋白对本身的合成又行使着一种自生的负调节。

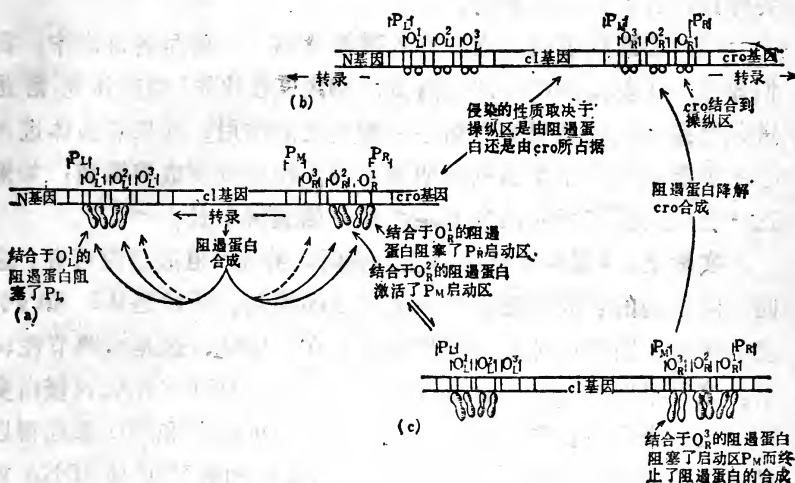


图2-13 λ 噬菌体阻遏蛋白的作用方式。(a)溶原；(b)进入裂解周期；(c)阻遏蛋白合成的自生控制。

(2) 溶源状态向裂解状态的转变 溶源状态的原噬菌体保留着转变到裂解生长的能力。在实验室条件下，可以通过一定的方法（如紫外光照射或化学诱变剂）损伤宿主DNA，使原噬菌体转变到裂解生长周期。这种物理的或化学的刺激会导致所谓SOS功

能的一系列反应，其中包括激活RecA蛋白（正常功能是参与遗传重组）的蛋白酶活性。RecA蛋白的这种激活是由受损伤所产生的单链DNA结合到RecA蛋白上引起的。被激活的RecA蛋白将 λ cI阻遏蛋白分解而使之失活，因此解除了 P_R 操纵基因的受阻遏状态（去阻遏）。 P_R 操纵基因的去阻遏要先于 P_L ，因为后者与阻遏蛋白的亲合力较高。 P_R 的去阻遏会导致Cro蛋白的生成。Cro蛋白也是一种两聚体，与阻遏蛋白相似，但它与 O_{R1} 、 O_{R2} 和 O_{R3} 的亲合力与阻遏蛋白的正好相反，即在Cro蛋白浓度较低时，优先与 O_{R3} 结合，阻塞 P_{RM} 启动区，随着浓度的不断增加，Cro蛋白逐渐占据 O_{R2} 和 O_{R1} ，从而抑制cI的转录。这是所有为进入裂解周期所需要的各种蛋白合成的必备条件。

(3) 溶源状态的确立和进入裂解状态 从前面的讨论中，我们知道，cI基因的产物即阻遏蛋白的浓度在决定 λ 噬菌体究竟是进入溶源状态还是裂解周期中起着关键的作用。如果噬菌体进入宿主细胞后合成了足够的cI阻遏蛋白，细胞则变成溶源菌；如果这一合成受到破坏或供应不足，即开始裂解生长。

实际上， λ 噬菌体感染宿主细胞时，并无cI阻遏蛋白可言。这时，阻遏物的合成则受到另一组基因的控制。开始是从 P_L 和 P_R 引发的转录；因为这时无cI阻遏蛋白存在，因此，这是非调节性转录。这种早期转录的产物是N蛋白和Cro蛋白的mRNA。N蛋白实际上是一个反终止蛋白（后详），它的出现可使cII和cIII基因得以转录。首先需要指出的是cIII下游的各基因的转录可使 λ DNA得以整合到宿主DNA中；而cII下游各基因的转录则引起 λ DNA复制并产生噬菌体颗粒。但cII和cIII产物即这两种蛋白又产生一种综合效应从而导致使用 P_E 启动区来进行合成cI阻遏蛋白。由 P_E 启动区的转录是定制型转录，它所产生的mRNA比由 P_M 所产生的可能更有效地转译成阻遏蛋白。此外，cIII基因产物还会减少cII基因的活动。所有这些反应综合平衡的结果是导致cII基因活动的增加而使在感染后数分钟cI阻遏蛋白骤然增加。cI阻遏物的不断供应则又剥夺了对 P_L 和 P_R 的使用权，从而停止了由它们引起的转录

作用。相反，如果由 P_L 和 P_R 而起的转录得以继续下去，则 Cro 蛋白，N 蛋白连同 cII 和 cIII 蛋白一道，又会阻断 cI 阻遏蛋白的合成，结果就会进入裂解生长状态。

11. 原核生物转录终止的调控

原核生物 DNA 的转录起始毋庸置疑地处于基因调控首当其冲的位置，在细胞对环境的适应中，起着重要的作用。转录控制的另一个层面可能是 RNA 合成的受控终止(或不终止)的形式展开的。下面是终止或不终止三种可能的情况(图2-14)：

① 如果转录过程过早终止于 RNA 聚合酶到达操纵子的每一基因之前，这可能构成否决 mRNA 生成的次级调节。

② 终止作用受控地发生在操纵子的各基因之间，则会导致一种“极性效应”，即靠近启动区的 DNA 比远离它的 DNA 有更多的转录。

③ 如果 RNA 聚合酶持续不断地从一个操纵子行进到下一个操纵子(即“通读”)，那么，就下一个操纵子的起始而言，则可能是一种有控制的“越位”(图2-14)

与转录起始相比，对转录终止分子机制的认识还远远不够。但上述三种情况，每一种都可能在原核生物基因表达调控中起着某种作用。

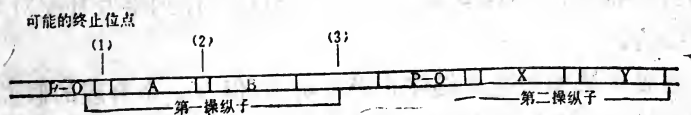


图2-14 细菌可以将转录停止在三种不同部位：(1) 在一个操纵子的结构基因之前，(2) 在操纵子的基因之间，产生某种极性效应，(3) 在一个操纵子的末端。如果在第三种部位不停止，RNA 聚合酶可能串读到下一个操纵子。

转录终止可能有两种类型，一种是因子依赖型，另一种非因

子依赖型。

(1) 因子依赖型终止 需要某种蛋白的存在。第一个认识的这种转录终止因子是所谓 ρ 因子。它是在对 λ DNA 的离体转录研究中从大肠杆菌中发现的。在离体条件下，将大肠杆菌 RNA 聚合酶与 λ DNA 混合，RNA 则从 P_L 和 P_R 启动区向左右两个方向开始转录，所产生的转录物竟长达几千碱基，在感染早期阶段，细胞内不会合成这样长的 RNA。

若将不曾感染过的细胞提取物加入上述的无细胞转录系统中，可形成两个不同的产物，一个含约 500 核苷酸，另一个约 1000 核苷酸。它们分别是从小 P_L 和 P_R 启动区延伸到特异的终止位点所形成的。从细胞提取物中纯化到的一种蛋白质与这种正确的链终止有关。已经知道这种称为 ρ 因子的蛋白质在 λ DNA 和大肠杆菌 DNA 中的一些作用区域，但这些区域的序列之间没有明显的相似性。 ρ 基因的突变会引起 RNA 聚合酶从一个操纵子到下一个操纵子的通读，说明它在 RNA 链终止中起着重要的作用。尚不清楚其精确机制。

(2) 非因子依赖型终止 在细胞内或在离体条件下都可发生。例如，*trp* mRNA 的合成在超出 mRNA 最后一个编码区的 36 个碱基处停止。该位点连续出现 4 个 U 残基，在它之前是一个所谓“发卡型”结构。对 30 个以上这种非因子依赖位点进行比较，它们的共同特征是：GC 含量高，U 成串出现，序列半互补配对而成发卡结构。

这种区域如何造成链终止尚不明确，但有一个合理的假说。这一假说认为，当生长着的 mRNA 链已经合成到半互补区，它们的碱基彼此配对，引起聚合酶行进停止。RNA 聚合酶后面的 DNA 这时自行复性，迫使聚合酶从模板上脱落并释放出 mRNA。

(3) 衰减作用 γ 色氨酸操纵子的次级调控 关于色氨酸操纵子的转录起始调节前面已作了介绍。但大肠杆菌色氨酸操纵子的表达的变化摆动达 600 倍。这种表达上的差异不能完全用阻遏蛋白—辅助物—操纵基因之间的相互作用来解释。阻遏作用

可以使转录减少70倍，而受控制的转录终止即所谓衰减作用，可使转录减少8—10倍，两者的综合影响，逐使其有600倍的变化。

人们发现有一些大肠杆菌突变株，色氨酸合成酶的合成比正常的要大。其中有的突变株能生成正常的阻遏蛋白，其操纵基因也属正常但色氨酸合成酶比正常的要高，且在缺乏色氨酸时，转录速率也较高。于是人们将这种突变株的色氨酸操纵子的序列与野生型（正常）的进行比较，发现在突变株中，启动区—操纵区后面和第一个结构基因之前有50对碱基缺失。正是这一短序列的缺失造成了色氨酸合成酶mRNA合成的非转录调节（定制型转录）。在分析野生型和突变株大肠杆菌中色氨酸操纵子的mRNA的开头部份及靠近启动区的DNA时，发现了细菌转录的一种新的调节机制。原来，在色氨酸操纵子的第一个结构基因的蛋白质合成起始位点(AUG)上游，还转录有一段含162核苷酸的mRNA，称为先导序列。在色氨酸含量丰富时，野生型细胞也转录少量的先导mRNA；在色氨酸匮乏时，转录的则是包括先导序列在内的操纵子全部编码序列。当色氨酸来源丰富时，终止作用的控制发生在全长度mRNA的第140个核苷酸上。即使在全长度的mRNA大量转录时，先导序列的分子也比全长度的mRNA来得多。这种情况说明，先导序列含有一个衰减区，对其后面一定距离的转录行使“否决权”。当色氨酸匮乏时，只有25—50%的RNA聚合酶得以越过衰减区；而在色氨酸丰富时，也出现一些转录，但转录物全部是短的。

因此，当色氨酸供应充足时，该操纵子不仅受控于阻遏物对操纵基因的作用，也受控于离起始位点140个核苷酸处的RNA合成所引起的衰减效应。越过衰减区的RNA聚合酶的分子的数目精确地取决于培养基中色氨酸的浓度。这可以用一个“微调钮”来作比喻。通过这种微调，将色氨酸合成酶的生成量和色氨酸的需要量平衡了起来。在上面提到的突变株中，缺失了衰减区，因此不管是什么条件都有更多的全长度mRNA的合成。

这种衰减作用显然与mRNA先导序列的分子内相互作用有关。色氨酸操纵子的全部序列已经搞清，先导序列可以广泛地进行分子内的碱基配对。如图(2-15)中1区可以和2区进行碱基配对；而3区和4区也可以配对形成非因子依赖的终止位点(见前)，即GC含量高、发卡结构和U成串出现。但是先导序列也有另外的碱基配对方式，即2区与3区配对，形成一种防止形成典型的终止位点的结构。这即预示着先导序列的转录可能采用两种构型当中的一种进行：一种情况是，转录在先导序列末端终止；另一种情况则允许转录整个操纵子的mRNA。这是一个广泛被接受的模型。

根据这一模型可以看出，选择哪一种构型进行转录将取决于色氨酸的浓度。因为在先导序列转录物的1区中含有两个连续的UGG码组，这在大肠杆菌基因组内是很为罕见的一种码组。人们注意到，当色氨酸供应充足，载荷后的色氨酸tRNA将会与UGG码组发生作用而不致延误核蛋白体的转译进程。先导序列将迅速被转译，而且核蛋白体将紧紧地尾随在RNA聚合酶后面，使转录有多快，转译也有多快。这样当1区转译完后，2区也处于转译过程而不容2区与3区进行配对。这种情况下，3区和4区的碱基配对就没有任何障碍，因而使转录停止。因此，如果色氨酸含量充足，将只有先导序列的162个核苷酸得以转录；而色氨酸短缺则是另外的一种情况。因为色氨酸tRNA无荷可载(或只有少量载荷的色氨酸tRNA)，核蛋白体的行进放慢，使它停止在双连的色氨酸码组上，而远远落后于RNA聚合酶，并腾出时间让2区与3区进行配对。次后的情形是3区与4区不能配对而形成衰减结构，将RNA聚合酶放行越过先导区进入结构基因。

显然，这个模型赖以根据的是原核生物中转录和转译之间的耦联关系。它也依据着核蛋白体停止位点与2区和3区之间的空间关系。已经积累了许多例证支持这一模型。例如，先导序列碱基的改变或缺失突变可以改变彼此的碱基配对能力；先导序列对核糖核酸酶敏感等等，都与先导序列内有碱基配对的预测是相吻合的。其它种属细菌中，色氨酸操纵子先导序列也保留着相毗邻的色氨

酸码组。但是最重要的证据可能是来自对其它氨基酸合成的操纵子的研究。例如,组氨酸操纵子的先导序列具有6个紧挨在一起的组氨酸码组;亮氨酸操纵子的先导序列有4个串联着的亮氨酸码组;而苯丙氨酸操纵子的先导序列中,有一段9个码组的序列中竟有7个码组是苯丙氨酸的。受苏氨酸和异亮氨酸调节的苏氨酸操纵子的先导序列中一段13个码组的序列中竟包括8个苏氨酸码组和4个异亮氨酸码组。同样受亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸调节的异亮氨酸操纵子中,其先导序列的一段17个码组的序列分别也包含着4个亮氨酸码组,5个异亮氨酸码组和6个缬氨酸码组。所有这些操纵子都保有如像色氨酸操纵子先导序列中的那种次级结构。

(4) 反终止作用因子 (antitermination factor) 如果不考虑核蛋白体防止先导序列3区和4区的RNA-RNA配对结构的形成,那末衰减作用则是由DNA序列本身所决定的,或多或少带有一些自发的色彩。相反,反终止作用是由蛋白质调节的。在 λ 噬菌体的裂解周期中,病毒的许多基因顺次表达,这个过程的初级调节发生在转录终止的层次,是由反衰减蛋白行使的调节。

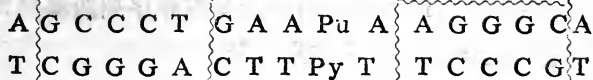
前面已经提到, λ 噬菌体乍一感染细胞,宿主的RNA聚合酶就从 P_R 和 P_L 这两个启动区往相反两个方向去转录*cro*和*N*这两个基因。*cro*编码的蛋白是抑制阻遏蛋白的作用;*N*蛋白则是一种终止蛋白。它们都属极早期基因。*N*蛋白的出现,使得下一组基因(晚早期基因)得以接着表达。

(5) 转录作用的反终止蛋白 当 λ 噬菌体或其它噬菌体进行裂解感染后,病毒基因便按照裂解的级联过程开始依次表达。这一过程的基本控制发生在转录终止上,这时转录终止受反终止蛋白抑制。

λ 噬菌体一旦感染一个细胞,*cro*和*N*基因便由寄主RNA聚合酶以相对方向从启动区 P_R 和 P_L 转录,这两个基因即所谓早早期基因。他们编码反阻遏蛋白*cro*和反终止蛋白*N*蛋白。*N*蛋白能使裂解周期继续下去,即允许下一组基因即晚早期基因得以表达。具

体细节如下：首先，N蛋白的存在，使RNA聚合酶得以通过分别位于N和Cro基因3'端依赖于 ρ 的终止区。 $(t_L$ 和 $t_R)$ 进行转录晚早期基因，它们包括cII和cIII蛋白，加上两种涉及病毒基因组复制的蛋白，一系列重组功能的蛋白以及另一个反终止蛋白，Q因子。蛋白Q启动噬菌体最后的一段基因：所谓晚期基因，它们编码病毒的头、尾蛋白，这两个蛋白造成宿主细胞裂解。晚期基因的转录使用的是独立的启动区即 P'_R 。RNA聚合酶一般情况下也使用这个启动区定制性地合成RNA，但却在邻近的依赖 ρ 的终止区 t'_R 处终止，释放出6S RNA的194个核苷酸RNA。Q蛋白阻止在 t'_R 处的终止作用，允许RNA聚合酶通过它直至晚期基因的转录。

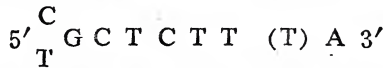
N蛋白参与中期早基因的反终止作用是研究得最广泛的反终止系统。N基因编码一个分子量为12000的蛋白，它对 λ 基因是高度专一的反终止蛋白。相似的噬菌体也有相应的蛋白，但它们之间是不可互换的。这种专一性说明了该蛋白识别 λ DNA上独特的位点，这些位点已通过使功能丧失的突变作用得到鉴别。它们就是所谓N蛋白利用位点(nutL和nutR)，即在 λ DNA链左侧 P_L 和 t_L 之间和链右侧 P_R 和 t'_R 之间的17个bp的序列，两者之间有16个bp是相同的，其中含有5bp反向对称：



这一序列的功能也已得到证明：将含nutR的片段置于非 λ 启动区和终止信号之间进行克隆。这时，转录可不受阻碍地进行。N与nut一道可使转录通过任何依赖于 ρ 的终止区。

用其它大肠杆菌突变体可以说明，至少有五个宿主蛋白即所谓N利用物基因(nus)参与反终止作用即nusA至E。其中nusD编码 ρ 蛋白，nusC编码RNA聚合酶的 β 亚基，说明N蛋白和聚合酶的这一部份相互作用。nusA，nusB和nusE作用的重要性也已得到证明，因为在离体转录反终止系统中，都需要这三个蛋白质，但是它们作用的模式尚不清楚。nusA基因编码一个分子量为69000与N

蛋白结合的蛋白质。它也能与释放出 σ 因子之后的RNA聚合酶核心酶等分子量地结合，但不是取代 σ 因子。对于RNA聚合酶全酶的亲和力要低得多，但是最近证明，它特异性地与 ρ 结合。这个蛋白质的DNA结合位点即所谓A框的契合序列是：



但最近的结果却有些矛盾，即证明该蛋白更多地与该 λ mRNA结合而不是与DNA结合。

另一个反终止蛋白即Q蛋白，分子量为23000，看来依赖于较少的宿主蛋白质。在离体系统中，它与RNA聚合酶及 nus 可以读过 t'_R 终止区。 nus 蛋白是唯一的附加蛋白因子，在 $nusA$ 存在下，Q蛋白与RNA聚合酶结合，引起它通读 λ 晚期基因操纵子中早期的一个终止位置。

E. coli rRNA基因也有反终止作用，前面说过，转录和转译的去偶联造成了衰减作用而使得转录过早终止，新生的转录物可以折叠成二级结构诱导终止作用。显然，非转译操纵子例如编码rRNA的操纵子，必定不包含早期终止作用位点，另一方面必定含有一些其它的反终止作用机制。事实证明，将终止信号引入rDNA是不起作用的。rDNA的启动区与先导序列能够修饰RNA聚合酶，使它可通读转录终止作用信号。

12. RNA聚合酶的修饰

前面说过，RNA聚合酶核心酶与DNA结合是非专一性的，只有在 σ 因子参与时才专一性地与启动区结合而起始转录，换言之，原核生物转录起始的特异性是由 σ 因子与RNA聚合酶核心酶的结合所决定的。不同种类启动区是由一系列启动区特异的 σ 因子所识别。枯草杆菌有一系列的 σ 因子与其RNA聚合酶结合。其中的一个与大肠杆菌 σ 因子相当，称为 σ^{55} ，原定其分子量为55000。该酶的序列已搞清，含371个氨基酸，准确的分子量为43000，因此改称为 σ^{43} 。它和*E. coli*的 σ 因子同源，同样识别启动区的序列从-10到-35区。

除了 σ^{43} 以外, 枯草杆菌的营养细胞起码含有三个 σ 因子, 同样根据分子量称为 σ^{28} , σ^{32} , σ^{37} 。它们中的一些在细菌从对数生长期转到静止期后其含量升高。 σ^{29} 还可在孢子形成时出现, 以应答营养枯竭。这些因子都能改变RNA聚合酶对启动区识别的特异性而指令不同基因的表达(表2)。

σ 因子看来在细菌生长的静止期起着某种作用。在晚对数期 σ^{37} 的酶含量增加, 在离体条件下, 指导着在静止期才表达的基因的转录。另一个在生长期和早静止期都表达的基因含有 σ^{43} 和 σ^{37} 识别的启动区, 说明了该基因的表达在细菌快速生长时由 σ^{43} RNA聚合酶调控, 而当细菌准备孢子形成时, 则由 σ^{37} RNA聚合酶调控。同样在开始孢子形成时, 激活的 $spoVG$ 基因也有二个启动区, 各含 σ^{37} 和 σ^{32} 的识别序列。 $spoVG$ 调控很复杂, 还不知道这种双重启动区如何起作用。含 σ^{28} 的RNA聚合酶也是营养细胞的稀有成份, 它在孢子形成的一个小时内突然消失, 因此看来, 它对于少数基因的转录作用是特异的。 σ^{28} 可能参与从营养生长到孢子形成这一转变过程。相反, σ^{29} 是孢子形成所特异的RNA聚合酶成分, 可能是在孢子形成早期活动的基因所使用的专一性转录因子。

表2 枯草杆菌的 σ 因子

| σ 因子 | 来源及使用 | 启动区序列 | |
|----------------------------|--------|-------------|-------------|
| | | -35区 | -10区 |
| $\sigma^{43}(\sigma^{55})$ | 生长细胞 | TTGACA | TATAAT |
| σ^{28} | 生长细胞 | CTAAA | CCGATAT |
| σ^{32} | 生长细胞 | AAATC | TA-TG-TT-TA |
| σ^{37} | 生长细胞 | AG--TT--A | GG-ATT-TTT |
| σ^{29} | 孢子形成细胞 | TT-AAA | CATATT |
| σ^{9p28} | 受感染细胞 | T-AGGAGA--A | TTT-TTT |
| $\sigma^{9p33-34}$ | 受感染细胞 | CGTTAGA | GATATT |

枯草杆菌噬菌体 $Spo1$ 本身的繁殖则利用构型可变的细菌RNA

聚合酶进行控制。它的三个基因：基因28、33和34，编码 σ 多肽。这类 σ 多肽利用宿主细胞聚合酶去改变对启动区的识别作用。正如在 λ 噬菌体中所看到的那样，病毒基因可分成三个转录区：一个在感染的早期表达，第二个在裂解周期的中期转录，第三则在裂解晚期转录。病毒早期基因的启动区被带有 σ^{43} 多肽的宿主聚合酶识别。早期基因之一的基因28所编码的类 σ 蛋白，分子量26000，可导致宿主RNA聚合酶去识别并开始中期基因的转录。另外中期基因即基因33和34所编码的类 σ 蛋白(σ^{EP33} 和 σ^{EP34})则指导宿主聚合酶转录晚期基因。

RNA聚合酶全酶有多种型式控制特异基因表达的例子不胜枚举。不久前还认为*E. coli*整个基因组的转录起始的特异性是由 σ 因子所控制。然而，现在知道对热激蛋白调节子起调节作用的*htpR*基因产物是一种类 σ 蛋白。同样，形态复杂的丝状链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中也至少有两种独特的含不同 σ 因子的RNA聚合酶全酶。它们识别不同的启动区，也许还参与细菌复杂的分化。根瘤菌的固氮基因之一的*ntrA*基因产物也是 σ 因子。

对*E. coli*的 σ^{70} 因子，枯草杆菌中的 σ^{43} 因子，*E. coli*热激类 σ 蛋白HtpR和枯草杆菌诱导孢子形成的蛋白SpolIG（也许与 σ^{29} 相同）进行比较后发现，所有这四种蛋白内部都具有一个高度保守区域。 σ 因子可能通过它而结合到RNA聚合酶上。这四个蛋白的C端区都呈现出与前面所说的阻遏蛋白和活化蛋白中 α 螺旋- β 褶片- α 螺旋的那种构象。而这正是识别有关靶基因启动区的蛋白质中DNA结合区的特征。

13. 多顺反子操纵子中各基因相对性表达的调控

原核生物中，功能相关的一些基因往往有机地组织成为多顺反子的操纵子。这种基因布局使得这些基因的诱导和阻遏很容易协调一致；但却使其中各个基因的相对性表达造成了困难。由于操纵子中各个基因都是由同一个启动区负责转录，因此相对性表达必定伴随着转录终止于操纵子中间，或者各个基因转译成蛋白质时效率上的不同，两者必居其一。转译效率上的差别可能有两

种原因：一是各 mRNA 的核蛋白体结合位点强度的差异，二是 mRNA 降解速度的不同。

最近3—4年间，mRNA稳定性的差别在决定基因表达上的重要性已经越来越看得清楚了。不同的mRNA具有不同的衰变速率。在许多情况下，特定mRNA的半衰期是随着环境的变化而变化，而这种变化在某种方式上是与mRNA的稳定性在基因表达调控中的作用是相一致的。但是，决定RNA稳定性的因素及其在调控基因的表达中的精确作用还是极不明了。

在大肠杆菌中，存在着两种与mRNA降解有关的酶，即核糖核酸酶II (RNaseII) 和多核苷酸磷酸化酶。这两个酶都是3'→5'外切核糖核酸酶。大肠杆菌中尚未鉴别出5'→3'外切活性的核糖核酸酶。因此，对这些3'→5'外切酶具有阻碍作用的序列结构(例如mRNA中稳定的二级结构——茎环结构或称发卡式结构)有可能专一性地使mRNA上游得以稳定。

其它因子也可以影响mRNA的衰变。例如，核蛋白体的有无及转译速率等都可改变mRNA的稳定性，这可能是由于核糖体可以防止mRNA被核糖核酸酶水解的缘故。内切酶的专一性切割可以暴露出新的3'端而引起3'→5'外切酶的进一步水解。最好的例子是λ噬菌体的整合酶(integrase)mRNA被核糖核酸酶III (RNase III)的切割。前面说过，在λ感染早期，N蛋白的出现可引起反终止作用。实际上，这时从P_L开始的转录一直向左进行，通过int基因(整合酶基因)，并且遇到int基因的终止区(T_i)也不终止。这一通读的转录物在3'端非转译区形成一个很大的发卡式结构，被RNaseIII识别和切割。经此切割后，这个转录物被宿主的外切核酸酶迅速水解。只有到感染晚期，整合酶基因才由另一个启动区转录而终止于T_i，形成具有功能的mRNA。这一mRNA所形成的发卡式结构较小，不被RNaseIII切割，从而增加了该mRNA的稳定性。在大肠杆菌的lac操纵子和gal操纵子中，多顺反子mRNA内部也有内切酶的特异性位点。它们对mRNA的衰变也具有起始的作用，从而影响它们的转译。

那末，在一个多顺反子操纵子中不同基因的mRNA片段的稳定性的差别是否可以决定基因的相对性表达呢？在许多操纵子中，各个基因的mRNA片段已经发现有稳定性的差异。在许多场合下，mRNA的不同片段的稳定性与其所产生的各蛋白质相对量之间也具有明显的相关性。这说明一个操纵子各mRNA片段稳定性差异可以调控基因的相对性表达。

前面所说的发卡型结构导致了mRNA对内切核酸酶的敏感性。相反的情况也存在。在大肠杆菌和沙门氏菌中，发现了一种高度保守的反向重复序列（简称REP）对mRNA的稳定性起着重要的决定作用。在大肠杆菌染色体中，这种REP估计含有500至1000拷贝，它们和mRNA一道被转录；或者出现在转录物的3'端的非转录序列中，或是在基因间的区域。它们有着形成发卡式结构的潜在可能。它们的存在可以增加mRNA上游部分的半衰期，而对下游部分则无甚影响。由此看来，它们可以防止3'→5'外切酶的降解作用。因此，REP序列在一个多顺反子操纵子的基因间出现，可以专一性地使上游mRNA稳定而得以积累。例如大肠杆菌malEFG操纵子的malE和malF基因之间存在两个REP序列。malE基因所编码的蛋白在细胞外周存在，一般比与膜结合的malF和malG蛋白含量多20—40倍。如果这两个REP序列在染色体上缺失，不仅造成上游的malERNA不稳定，而且使malE蛋白的合成减少9倍。REP以及其它能使上游mRNA稳定性增加的序列的广泛存在，说明这种基因调控机制可能是相当普遍的。

（二）真核生物基因的表达与调控

真核生物基因调控的分子基础是当今生物学研究最活跃的领域。纵观经典遗传学的整个发展史，其宗旨正是期望揭示基因如何参与导致动植物发育的一系列控制程序。分子生物学，尤其是基因工程的兴起使对基因调控的认识无论在深度和广度上都取得了很大的进展。当然尚有许多问题或难题有待解决。这一部分，我们想要重温一下所取得的进展和检讨一些未解决的问题。

真核基因调控的研究范围

基因调控是牵制和确保不同细胞各种蛋白质合成在速率上的差别的一套复杂的相互作用。这种有差别的基因表达是在分子水平上的不同层次调节mRNA形成和利用的结果。蛋白质合成的不同主要源于转录的不同。换句话说，基因表达的调节很大一部分是在转录水平上。当然，真核生物基因调控的因素中还可能包括：细胞核内RNA转录物有差别的加工、细胞质中mRNA不同的稳定性以及mRNA有差别地转译成蛋白质。此外，影响基因表达的还有染色体局部的放大或重排。

我们现在对基因调控的分子细节的认识以及对调节线路的逻辑看法大多来源于对原核生物的研究。与真核生物相比，原核生物基因表达的调控要简单得多。它们在有限的生命周期中，所要完成的功能也有限。细菌面对着直接的营养环境和自然环境，调节着各种酶的机构，通过转录调控，基因可逆地关闭或打开，以便更好地生长和繁殖。也难怪，这就是它们的生活目的！

有些真核细胞，比如酵母细胞，看来也主要是为了生长而花费许多基因去调节对环境的适应。高等动植物的一些器官（比如肝脏）中的一些基因也可逆地对外部刺激进行反应。但是外界影响对它们来说是比较间接的，许多细胞所经受的是一种严格控制的环境。因此在多细胞生物中，负责对外部环境变化进行反应是少数的基因。它们的基因调控最大的特征和最主要的方面是实现某个受控的发育途径，以使在正确的时间里在正确的细胞中激活正确的基因。大多数情况下，这种发育程序在某一细胞中是不可逆和不可重复的，许多分化了的细胞（例如皮肤细胞，红细胞，眼球的晶状体细胞，抗体生成细胞等等）沿着一条道走下去，直至死亡且不生后嗣。显然，导致分化的基因调控的一定程式是服从于整体的需要，而与由环境刺激的基因调控不同，后者是保证每个细胞生长和增殖之所必需。

因此，高等生物基因表达的调控往往有着严格的不可倒转的时序性，或者说时间特异性。这种时间特异性表达往往又在某种

形式上从空间特异性反映出来。肝脏组织所表达的一些基因，在脑组织中可能一生一世不会使用一次，反之亦然。从微观角度说，核中以染色质形式存在的DNA所结合的蛋白质与基因表达密切相关，细胞核内RNA的合成与转运，细胞质中的RNA加工与转译等，这些空间上的差异，甚至于转录结构之一的各个增强区的使用，既有时序性，又有组织特异性的特征。而基因调控在发育分化上的时序性常常寓于空间特异性（组织或细胞特异性）之中，或者更简单地说，时间差寓于空间差之中。我们一开始就引入差别转录、差别表达或差别加工等词语，并不是在修辞上的故弄玄虚。

原核生物基因调控各级水平的机制是由于调节基因的发现及对其突变的分析研究才得以阐明的。通过转导、接合以及最新的DNA重组技术将突变的调节基因重排、重组等，这些手段对了解调节基因的突变如何影响基因活动的分子细节有着重要的贡献。有的调节性突变只在同域内起作用（act in cis），也即这种突变必须与受调节的基因很靠近；这种突变是影响参与RNA合成调控的关键序列。另一些调节性突变是跨域起作用（act in trans）即突变不一定靠近受调节的基因。跨域作用的调节成分（trans-acting regulatory element）是独立编码调节蛋白的基因，而调节蛋白可以在细胞间扩散，作用在敏感的基因上。前面我们提到过的lac阻遏蛋白和 λ 阻遏蛋白就是很好的例子。目前尚无证据表明真核生物具有类似原核生物的操纵子，由若干基因组织在一起，通过紧邻的调节基因调控而转录成一个多顺反子mRNA。影响真核生物基因表达的同域作用序列往往远离其调节的基因（如增强区）。真核生物转录也受到跨域作用因子的影响；虽然如何起作用的机制知之甚少，但有越来越多的证据说明，跨域作用因子在激活基因时总伴随着染色质构象的改变、染色质所结合的蛋白质的变化、染色质的DNA酶敏感度增加等等。细胞核本身就是原核生物所不可能具有的特点，何况染色质高度复杂的结构是真核基因活动的重要场所，更是几乎处于裸露状态的原核遗传物质所规定

的各种机制难以比拟的。

为了要了解真核生物中控制mRNA的浓度及其利用的分子机制，有三个基本问题必须贯串于基因调控研究过程的始终(图2-16)，即：

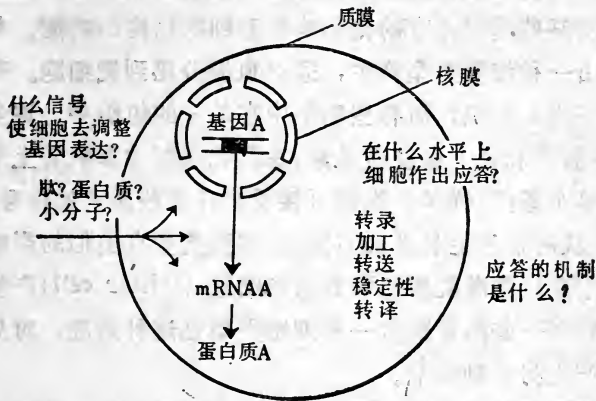


图2-16 研究基因调控的三个问题

① 特定基因的表达是由什么信号触发的？

② 从DNA转录直至mRNA被用来合成蛋白质的整个连锁反应过程中，对特定基因行使的调控发生在哪一级水平，亦即哪一(些)步骤上？

③ 各级基因调控的分子机制是什么？也就是说，哪一种分子或细胞结构参与基因调控？它们如何行使其影响？

对这些问题目前尚难以作出完整的问答，但最近的研究已经勾画出一些基本规律。在后面的章节中我们试图沿着寻找这些问题答案的线索去综述一些研究资料。

1. 真核生物基因调控的信号

这里所说的基因调控信号，指的是触发基因表达的一些物质。这些基因表达的触发剂，在原核生物中，诱导物就是我们所熟悉的例子。真核生物中，基因调控信号除了细胞外的诱导物之外，大量的和主要的是机体内产生的一些引起基因表达的物质，它们

本身也就是机体生长、发育和分化期间的产物。弄清它们作用机制的研究对阐明真核基因调控机制可能起着重要的作用(表3)。

(1) 激素——小分子的或多肽的——均可触发基因的表达

在动物中,激素是已知的最大的一类基因信号物,它们对成年机体和生物发育期间的细胞都具有深远的影响。有一些激素的作用是控制某些基因,有的则影响酶和细胞结构的功能。每一种激素都是由一种细胞类型产生,通过血流分泌到靶细胞。有些靶细胞分散在许多组织,而有些则集中在单一的组织中。许多激素(如甲状腺激素和肾上腺皮质激素)在其靶组织中影响着上百个基因而不是单个基因。许多细胞都可接受来自这些激素的信号。蛋白质激素(如胰岛素和生长激素)对许多细胞类型有类似的影响。相反,冲乳激素只刺激乳房组织的腺泡细胞(acinar cell)产生乳蛋白质。另外有一些激素则对一种细胞类型是这种效应,对另一细胞类型则产生另一种影响。

除了循环系统中熟知的蛋白质和固醇类激素外,脊椎动物中还有许多蛋白质,它们由一种细胞分泌,而对另一种细胞具有强烈的影响。神经生长因子和表皮生长因子就是这方面的例子。尚有许多其它的蛋白质因子具有类似的对细胞起着刺激和阻滞生长的效应。

还有一些蛋白质因子有更特殊的功能。干扰素就是一例。干扰素是一蛋白质家族,包括20至25种低分子量蛋白质,可以使细胞能防止各种病毒的生长。干扰素处理过的细胞会产生出一些新合成的蛋白质,显然这是研究基因激活的很好模型。

已知可作为信号分子的激素和生长因子可分为两种类型:(1)可以进入细胞而引起效应的小分子,如类固醇和甲状腺激素;(2)与细胞表面特异的受体结合的多肽或蛋白质,它们大多在未进入细胞之前即发生作用。当然,在生物学中一件东西可以使用两个以上的机制来达到同一目的是屡见不鲜的。因此毫不奇怪,有些蛋白质看来是与细胞表面结合,后来则转运到细胞内部,而它们或它们的裂解产物即成为触发基因活动的信号因子。

表3

真核生物中某些基因激活信号

| 类别 | 举例 | 靶位 |
|-----------|-------------------|---------------------------------------|
| 激素: | | |
| 蛋白质 | 生长激素 | 多种细胞 |
| | 泌乳激素 | 乳房组织的分泌细胞 |
| 类固醇 | 雌激素 | 肝、脑、生殖器官 |
| | 睾酮 | 肌肉、骨骼、皮肤 生殖器官 |
| 循环或分泌的蛋白质 | 神经生长因子 | 轴突(分化中的神经细胞) |
| | 表皮生长因子 | 多种表面组织(皮肤、眼睛等) 以及所有类型的培养细胞 |
| | 白介素(淋巴介素) | 白细胞 |
| | 造血素元 | 红细胞前体 |
| | 干扰素 | 大多数表皮细胞、白细胞 |
| | PDGFs(血小板来源的生长因子) | 多种类型的成纤维细胞 |
| 环境 | | |
| 营养信号: | | |
| | 低等真核生物 | 负责合成活动(氨基酸、核酸组分)的基因和水解作用的基因(磷酸酶、糖分解酶) |
| | 动物细胞 | 饥饿时糖元分解酶 某些负责合成的基因(产物过量有阻遏作用) |
| | 热刺激 | 特定蛋白质(诱导的)基因广泛存在于动、植物中 |
| | 有毒物质 | |
| | 药物, 致癌物 | 肝中的细胞色素 P-450 蛋白, |
| | 重金属 | 肝、肾等组织中及单细胞真核生物中的金属结合蛋白 |
| | 坏血或发炎的产物 | 白细胞 |

(2) 细胞之间的接触也起着基因调控信号的作用

大多数激素和一些生长因子要达到靶细胞需先释放到循环系统中。另一些基因激活信号则需要细胞之间的直接接触。例如，大部分特化细胞的胚胎决定期间，不同类型的细胞必须有所接触，这些相互接触的细胞分别来自不同的原基细胞层，如间质(mesenchymal)细胞(来自中胚层)与内胚层或外胚层细胞间的相互接触。细胞之间接触所传递的信息的性质尚不清楚，但表面信号可能是以细胞表面蛋白之间的接触为媒介导致基因的调控。

相互作用也可能是更为间接地进行，即一种类型的细胞生成某种细胞外介质，而这种介质与另一类型细胞接触而成为后者的信号物。无论是直接接触或间接接触，都意味着细胞外的信息向细胞内的传递。

毋庸讳言，真核细胞基因调控信号的鉴别是远远不够。已经发现的可能仅仅是具有强烈效应的信号。而对已经鉴别的信号来说，它们跟靶细胞相互作用后如何起到调控基因的作用仍然需要花大气力去研究。

(3) 环境和营养信号

上面提到的真核生物基因调控信号——激素、生长因子、细胞之间的接触等等——跟原核生物所碰到并发生应答的环境信号是绝然不同的。低等真核生物如酵母、霉菌也对营养环境信号发生反应，并且其糖代谢、无机盐的利用和氨基酸生物合成的代谢途径也有可诱导的相应酶系。但酵母细胞饥饿时所诱导的生物合成酶系与原核生物饥饿时所诱导的程度并不相同。例如，酵母细胞在色氨酸、组氨酸、异亮氨酸和缬氨酸饥饿时，这些氨基酸的合成酶的水平只有比正常水平高2—10倍。同是这种情况，大肠杆菌则会高出上百倍。

高等真核生物虽然也有一些基因负责对营养胁迫进行应答，但也只是很有限，许多基因则对营养要求毫无反应。哺乳动物的培养细胞对不同营养条件的应答是很不一致的。例如，大多数哺乳动物培养细胞可以合成嘌呤和嘧啶，无需在培养基中加入这些

碱基。但是如果加入腺嘌呤，经过几代之后，则细胞中DNA和RNA中的腺嘌呤和鸟嘌呤100%来自培养基中的腺嘌呤。而如果加入尿嘧啶作为嘧啶的来源，则只有50%的尿苷和胞苷是来自培养基。显然，腺嘌呤或其衍生物成为一种信号，导致嘌呤合成途径中的至少某种酶的抑制。而相反，嘧啶合成则继续以一种比较不受抑制的方式进行。丝氨酸和甘氨酸的生物合成也有同样情况：即使培养基中有这些氨基酸存在，细胞依然合成它们。因此，哺乳动物细胞并不总是抑制不必需的酶的合成。

这些细胞也不总是对代谢需要作出反应，尽管它们具有必要的基因。例如，肝细胞含有苯丙氨酸羟化酶（这种酶将苯丙氨酸转换成酪氨酸）。但培养的细胞（包括肝细胞）即使在酪氨酸饥饿时也不能把苯丙氨酸转换成酪氨酸。因此，营养条件并非一定是哺乳动物细胞的信号，像细菌和酵母那样，调整它们的生物合成机构合成其需要的养分和抑制不需要的养分的生成。

动物个体对于营养的变动也可通过蛋白质合成来作出反应。例如，如果一个大白鼠用低糖饲料喂养，则其肝脏内合成葡萄糖的酶（将氨基酸转换成葡萄糖）就会急剧增加；而如果再喂以正常含量的葡萄糖，则这些酶也跟着减少。肝脏内为满足代谢需要的许多应答性反应都是通过影响特定mRNA合成和稳定性的激素来调节的。

肝脏通过从胃经门静脉而来的血液所得到的供应不仅有养分而且也有有毒物质。肝细胞对许多有害物质有去毒作用，它们能产生一些特殊的蛋白质来代谢这些有害物质。例如，镉或其它金属的存在可以使肝脏金属结合蛋白(metallothionin)增加。金属结合蛋白有两种，它们都是分子量小的蛋白质（每一种都是由61个氨基酸残基组成，其中包括20个半胱氨酸残基），能跟重金属离子结合而对其毒性有防护作用。在肝细胞膜中，有一组称为细胞色素P450的酶有时会增加上百倍，以帮助机体清除一些有毒物质如：苯巴比妥，可待因和吗啡，以及致癌药物等。P450酶是一个很大的家族，分别由不同的基因编码，分别对不同的有毒物质作出反应。

动物中大多数细胞如果遇到异常物则不仅代谢上不能适应，而且若营养环境变化很大则会受到损伤。例如，正常情况下，输送到大脑的主要是葡萄糖，脑细胞利用它作为能源。人类有一种遗传病叫半乳糖血症。这种病人的脑细胞遇到半乳糖即会受损伤而不能利用它。奶汁中主要的糖是乳糖。婴儿的小肠与肝脏可以把乳糖分解成葡萄糖和半乳糖。患有半乳糖血症的婴儿不能代谢半乳糖，致使血液后半乳糖浓度增加，接着造成严重的脑损伤。

上述的例子说明，在应答环境信号时，培养细胞和动物个体内的细胞中有一些基因是可被调控的，但并不是所有组织的所有细胞对这些信号有同等的反应性。

总而言之，导致细菌基因表达变化的许多简单的环境信号也引起单细胞真核生物基因表达的变化。但是，多细胞生物一般来说对这类信号并不作出反应。这也许是由于整个机体内维持着稳定的正常环境。即使哺乳动物对环境变化的应答偶尔也是通过基因调控的方式，但像氨基酸饥饿和糖供给的改变等一般并不导致基因调控的变化以适应新的情况。

引起基因有差别表达的大多数信号一般是使细胞去完成特殊的任务。许多细胞通过它们分别完成的特殊任务，将导致器官和整个机体的形成。这些信号包括激素、生长因子。尚待发现作为信号的还有许多其它的分子，这当中包括两种细胞类型相互作用表面的特定分子。

2. 真核生物RNA的合成与加工

原核生物细胞中，各种RNA(包括核蛋白体RNA、转移RNA和信使RNA)的合成都是由单一的RNA聚合酶所催化。这个酶作用的控制决定着合成哪一种RNA，因而也决定着合成哪一种蛋白质，因为mRNA的转译是紧跟在其转录起始后不久即开始。真核生物基因的表达跟原核生物的有显著差别(图2—17)。

首先，大多数真核生物DNA都处于跟组蛋白捆束在一起的形式形成高度有序的染色质结构。DNA与组蛋白的结合使它较不容易甚至很难进行转录。一般认为，染色质构造的变化是真核基因

转录之所必需。这与原核生物DNA容易进入转录状态形成强烈的对照。在细菌中，DNA不与蛋白质结合成一种严密的形式，特定基因转录的起始与停止是瞬间可就的事。在单细胞真核生物中，许多基因转录的起始与停止也可能采取同样迅速的反应，但多细胞生物的基因调控一般对外界刺激不具备快速反应的性质。

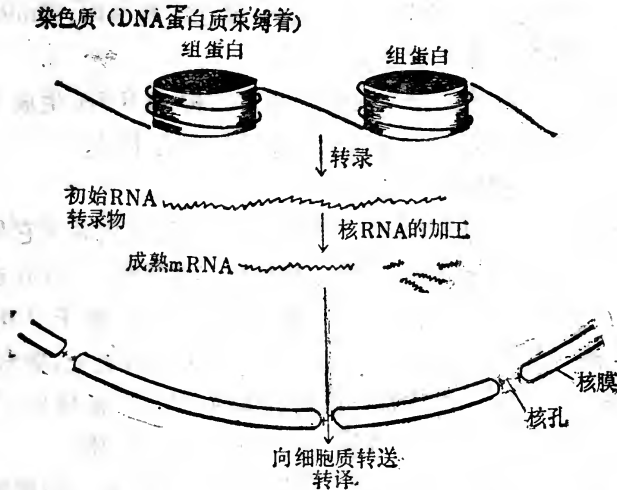


图2-17 真核生物mRNA的生成有四个方面不同于原核生物；(1) 被转录的DNA绕在一个组蛋白的核心上。(2) 转录时选择三种RNA聚合酶中的一种。(3) 初始转录物都不是rRNA、tRNA或mRNA的一种完成的形式，它必须在细胞核内加工成其最后的形式。(4) 只有向细胞质转送后，mRNA才得以被转译。

其次，真核生物中，某一基因乍一转录时，大多数情况下，不管它是rRNA、tRNA或mRNA，其初始转录物都是不具功能的形式，而是在细胞核内先形成一种前体RNA分子，并在那里受到一些化学修饰，然后才作为某种rRNA、tRNA或mRNA分子进入到细胞质中。(实际上，细菌的rRNA和tRNA也是由前体RNA分子所形成) 真核mRNA形成时的修饰通常包括拼接。由于编码一种蛋白质的基因序列往往是各异其处，因此，mRNA的形成必需将各部分的转录物连接在一道并删除其间插序列。

第三，真核RNA合成是分别由三种不同的RNA聚合酶来执行

的。RNA聚合酶I在核仁中负责四种rRNA中的三种(28S, 5.8S和18SrRNA)前体的形成。mRNA的前体分子的合成则由RNA聚合酶II担任。而RNA聚合酶III负责一些小分子RNA(tRNA及5S rRNA)或其前体的合成。

第四,真核生物的转录与转译不像原核生物中的那样偶联在一道进行。真核生物中mRNA合成的位置在细胞核内,而mRNA转译成蛋白质则在细胞质中进行。

真核生物与原核生物之间在染色体结构和RNA生成上的这些基本差别表明它们的基因表达调控机制也有不同。

(1) 真核生物的RNA聚合酶

前面提到的三种RNA聚合酶均是在细胞核内完成它们的转录作用,聚合酶I在核仁内,另外两种酶在核质部分。所有这三种酶都以-DNA模板来合成RNA,并需要某种二价离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})。离体条件下,用 Mn^{2+} 时,聚合酶II活力更大,聚合酶III也有这种趋势。但一般认为,在活机体内, Mn^{2+} 浓度低,因此,在具体条件下,利用 Mn^{2+} 可能改变了酶的结合性质。

这三种酶对 α -鹅膏蕈碱(一种真菌所产的毒素)的敏感性也不一样。换句话说,这三种酶可根据它们对 α -鹅膏蕈碱的敏感性而加与区别:聚合酶I极不敏感,聚合酶II最为敏感而聚合酶III居中;RNA聚合酶II在 α -鹅膏蕈碱为 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 即被抑制,RNA聚合酶III则不甚敏感; $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度可抑制聚合酶III,但聚合酶II对此浓度则不敏感。

所有这三种酶的分子量都很大,约500,000至600,000,大约由十多个亚基组成,其中有两个亚基的分子量在120,000—200,000之间,另外的亚基分子量小于50,000,但聚合酶III的小亚基中有一个则在80,000—90,000之间。

除了RNA聚合酶是多亚基蛋白这一点之外,起始RNA链的合成还需要有三个以上的转录因子的参与;而对不同的聚合酶,其必需的转录因子也不同。

除了上述在细胞核中存在的三种RNA聚合酶之外,真核生物

的RNA聚合酶还包括在线粒体和叶绿体中存在的RNA聚合酶。线粒体的RNA聚合酶很难溶解，可能是与膜结合在一道；它是单一的多肽链，分子量在45,000（爪蟾和酵母）与60,000（鼠肝）的范围。具有活性的酶可能是一种多聚体结构。高等植物叶绿体的RNA聚合酶有些像细胞核中的RNA聚合酶II，有两个大亚基和若干个小亚基，但两者在肽图上有差别。此外，在眼虫和高等植物中，都发现叶绿体不止含有一种RNA聚合酶；其中一种是催化rRNA基因的转录。另一种是负责tRNA的合成。

(2) RNA聚合酶I的起始作用

在分部分离研究时，人们可以将核仁与细胞核的其余部分分开。提取各部分RNA时，在核仁部分发现了一种45S RNA。化学分析表明，这种核仁RNA与核蛋白体RNA（简称rRNA）有某种关系。它的核苷酸组成及甲基化的寡核苷酸序列与核rRNA极其相似。实际上，45S分子是rRNA的前体，称前rRNA，它最终可以形成28S，18S和5.8S rRNA。顺便要说的，刚合成的45S RNA是一种未加修饰的初始RNA转录物；被转录产生这种初始转录物的DNA区域称为转录单位。这两个术语，在往后的讨论中我们将常常用到。

许多真核细胞的核蛋白体RNA的转录单位（或称rDNA）已经得以纯化并克隆。由此而得到有关这些基因的知识，加上对动、植物及单细胞真核生物核仁RNA合成研究所获得的资料使人们对rRNA形成有了较全面的认识。

在各种真核细胞中的rDNA序列都有很大的相似性。但各物种之间也有很大的差别，其中最令人感兴趣的是围绕前rRNA附近的核苷酸序列。举例来说，通过对人和大鼠、小鼠前rDNA的比较，说明这三种生物的前rRNA转录物的头19个碱基极为相似，而从转录起始位点外5'端一侧的序列来看，人与啮齿类之间倒没有很大的保守性。但在-16至-20和-33至-44之间有较强的同源性，以及一些散在的碱基如-7，-16和-25的G及-34附近的TTT三联子。这些情况说明RNA聚合酶I启动区有较大的变异。

这种序列上的变化跟离体条件下前rRNA合成的结果是相符的。小鼠或人的聚合酶I均可以既转录小鼠的又可以转录人的rDNA，但却需要一种种属特异的转录因子（蛋白质）。这种蛋白质结合位点是在序列变化较大的5'侧的上游。

(3) RNA聚合酶III的起始作用

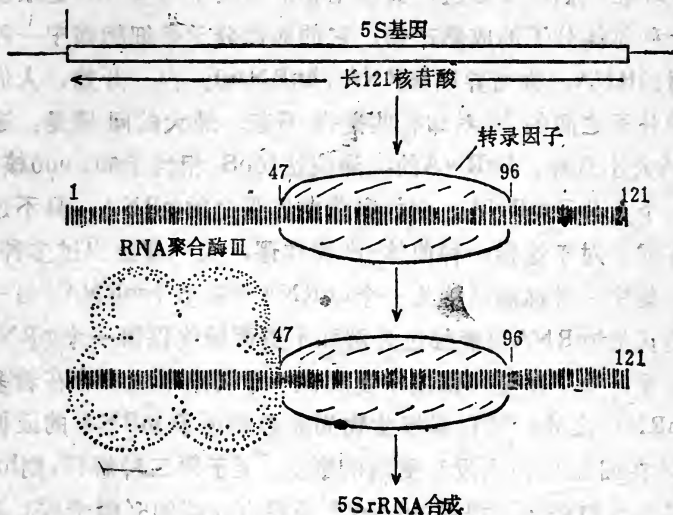
这个酶所合成的分子都是一些长度小于300个核苷酸的小分子RNA，包括tRNA和5S rRNA。由RNA聚合酶III转录的基因的启动区并不在5'侧翼序列而是在基因本身，这是由D. D. Brown及其合作者在研究爪蟾5S rRNA的表达时意外的发现。他们发现该基因的5'侧翼序列可以全部除去而不影响5S rRNA的转录。而且，当编码区的5'端缺失时，依然合成5S大小的RNA，直至这种缺失达到50个核苷酸时，转录效率才下降；基因的3'端的缺失也有相似的情况。这说明5S rRNA（或5S大小的RNA）的合成是由+50至+80碱基所构成的启动区所控制的。这一启动区又称为内部控制区（Internal control region，或简称ICR）。但它不是被RNA聚合酶III识别，而是由一种40kd的转录因子即TFIIIA所识别。TFIIIA结合到ICR后，接着又有TFIIIC和TFIIIB与之结合，形成一个完整的复合体，然后才被RNA聚合酶III所识别。后者的识别位即是在转录起始位点处（图2-18）。

已经详细分析了5S基因内部控制区的精细结构，它含有两个保守的序列要素，即A框和C框。5SA框与下面说到的tRNA的A框在结构和功能上是可以相互交换的。C框则是5S基因所特有的。它们与转录因子的相互作用也基本上已经得到较详细了解。

tRNA基因也有一个内部启动区，但它分开成两个块块即A框和B框（也称D和T框或5'和3'块块）。A框从第8个核苷酸至第19个，包括4个保守的核苷酸。B框从第52至第62核苷酸，包括5个保守的核苷酸。由此看来，这些保守的核苷酸对于tRNA的三级结构和tRNA合成的起始是很重要的。由于tRNA可变区的长短不一及其中有些tRNA基因在此部分有某些插入碱基，因此A框和B框之间的距离一般在30至74bp之间。tRNA基因的5'侧翼序列

对于保证达到最大的转录效率也是重要的,而且跟5SrRNA基因一样,转录起始复合体的形成看来也需要转录因子TFIIIC的参与。

(a) 5SrRNA正常起始位



(b)

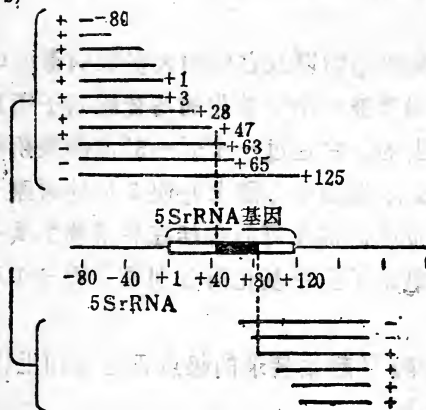


图2-18(a)5S rRNA基因上RNA聚合酶III与转录因子结合位之间的关系。(b)蛙5S rRNA在蛙细胞提取液中精确起始转录的必需区域。方框表示5S rRNA的编码区的120核苷酸。左右两侧的正号(+)表示该段缺失(基因上下方的水平线表示)不影响转录。线端的数表示该缺失的端点。

7S RNA、腺病毒VA RNA及EPstein—Barr病毒等由RNA聚合酶III转录的基因其启动区与tRNA相似。

(4)RNA聚合酶II在帽子位点起始mRNA合成

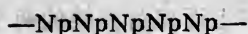
现在人们都己知道，真核生物细胞质中的mRNA是细胞核中的一种前体分子的成熟产物。它的前体分子是细胞核中一种高分子量的RNA，称为异质核RNA (hnRNA)。但一开始，人们对这两种分子之间的关系却有些捉摸不定。最大的问题是，这两种RNA大小悬殊。hnRNA的沉降值达100S，相当于50,000核苷酸，而一个大分子mRNA，例如卵黄前体蛋白的mRNA，只不过6700核苷酸。对于这样一种前体-产物佯谬，人们曾给出过多种的解释。其中一种推测是认为一个hnRNA含有多个mRNA；另一类意见是认为hnRNA可能经过分解和水解而最终保留一个mRNA。迄今为止，除了在非洲锥虫中发现在一个转录单位中存在着多顺反子mRNA之外，其它真核生物尚无多顺反子mRNA的证据，hnRNA在细胞核内也没有更新的事实。至于第二种解释，则hnRNA有一端会被破坏，而在mRNA上需要合成新的5'帽子或3'聚核苷酸。

事实上，真核生物以及它们的大多数病毒的mRNA和mRNA前体在其5'末端都被一个甲基化的鸟苷酸帽子所封闭，这个帽子是转录后加上去的。它通过一个5'—5'焦磷酸桥将鸟苷酸连接到初始转录物的5'末端的核苷酸上并使7位的碳原子上甲基化而形成帽子0。进一步的修饰还可能包括在转录物的头一个或头两个核苷酸的2'位的氧原子上甲基化而分别形成帽子1和帽子2（图2-19）。

RNA聚合酶II起始转录的起点正是被扣上帽子的那个核苷酸上，证据如下：

首先，在hnRNA中没有发现在帽子上游有任何序列可与DNA序列互补。其次，帽子结构（简化为 $m^7GpppNmp$ ）理论上可由两种方式形成：

①RNA链先断裂，然后加上帽子；



或



↓ Gppp加成并甲基化

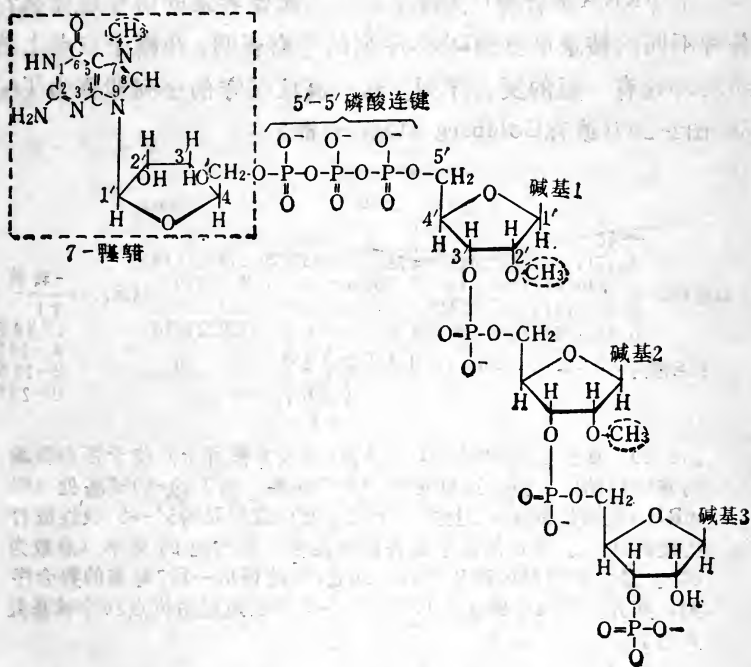
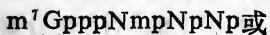


图2-19 真核mRNA的5'甲基帽子的结构。其最明显的特征是：7-甲基鸟苷与mRNA分子的第一核苷酸（碱基1）通过5'-5'磷酸键连接和所有动植物细胞中第一核苷酸的核糖的2'羟基上的甲基。酵母则无此甲基基团。在脊椎动物中，第二核苷酸的核糖也被甲基化。

结合以后，选择那类核苷酸作为RNA合成的起始位则多少有点不拘一格了。聚合酶II通常以一个嘌呤来起始，但嘧啶也可以作为第一个核苷酸（哺乳动物细胞有25%的可能性，低等真核细胞则较少有）。

真核的TATA框颇令人想起原核的Pribnow框即细菌基因中的-10区附近的保守序列。它们之间极为相似。但它们的差别也是不言而喻的（图2-21）。首先，Pribnow框距转录起点约10bp，DNA螺旋转了一圈，而TATA框则远在三圈螺旋圈处。其次，原核生物的起始位点的序列有某种程度的保守性，而真核生物则有更大的可变性。大多数由RNA聚合酶II所转录的基因前面都具有TATA框，但也有一些如SV40的晚期基因和UI snRNA（细胞核内的小分子RNA）基因所含的等价序列与TATA框契合序列相去甚远，充其量也只能称作TATA类序列。

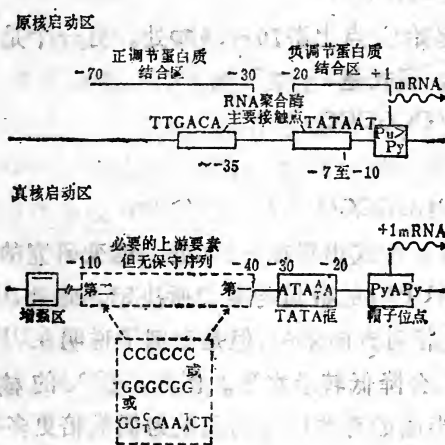


图2-21 原核生物与真核生物中影响转录的DNA序列要素的比较。

前面说过，在原核生物中，转录起始位点上游的-35区也有助于聚合酶的结合。真核DNA的离体转录实验足以说明TATA框的重要性；而其上游序列则对离体反应无多大影响。但当把DNA

经质粒或病毒引入到细胞内，或病毒整合到细胞的染色体时，要使RNA得以合成尚需另外的序列。例如，单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因和人的 β -珠蛋白基因的转录都需要位于-100至-40上的一些序列要素，即所谓上游启动区要素 (upstream promoter element, 简写为UPEs)，它们一般由8—12个碱对组成一特定单元。因此，一个典型的真核生物启动区包括TATA框和一个以上的UPEs。

TATA框的基本作用是确保转录的精确起始，而UPEs的作用是增加转录的速率。目前已经鉴别出许多UPEs (图2-21)。它们距转录起始位点参差不齐 (-40至-110之间)，它们对于促进有效的起始作用是很重要的，但对决定其精确性作用不大。其中有一个所谓CAAT框 (或CCAAT框) 与原核的-35区颇有些相似，其契合序列为：



它一般出现在起始位点上游70—90bp处。另一个是富于GC的序列，或称GC框，通式是



或其互补序列



它可能以多拷贝的形式出现在-100处。诱变研究的结果说明，启动区的强度是由UPEs的数量与类型所决定。此外，UPE的作用与它跟TATA框的相对方向无关。但是有例子说明在UPE与TATA框之间插入核苷酸会降低转录水平。例如，插入的核苷酸数若是DNA螺旋盘转半圈的奇数倍比插入数为偶数倍更多有害。这种情况说明与TATA框结合的蛋白与跟UPEs结合的蛋白之间发生相互作用，这种相互作用需要蛋白质在DNA双螺旋上有特异的空间配置。

除了TATA框和上面提到的UPE之外，真核生物RNA聚合酶II要有效地起始转录还要有第三种DNA区域，即增强区。增强区是首先在病毒中发现的，其后在包括哺乳动物和高等植物在内的

许多基因中都发现普遍存在着增强区。它们看来对真核生物转录起始也起着调制作用。我们将在基因表达的调控中集中加以讨论。

(6) RNA聚合酶II转录作用的终止 一旦RNA聚合酶II转录作用起始后,会在什么地方终止呢?初始转录物在终止转录前一般都要延续通过聚A加成位。用标记的新生细胞核RNA与接近聚A加成位上、下游区域的DNA杂交可以印证这一点。无论是腺病毒、猿猴病毒SV40的转录单位,还是脊椎动物的转录单位(例如小鼠的 β 珠蛋白, α 淀粉酶基因),所得到的结果都说明转录一般通过聚A位点。所有这些细胞的基因,转录都延伸至聚A位点后约0.5至2kb。但是看不到终止是发生在某一特定位置。如果将小鼠染色体中 β 珠蛋白基因负责终止转录的序列转移到另外的基因,也可引起该基因终止转录。因此可能存在着确保真核基因转录终止的保守序列。

如果转录不负责产生mRNA的3'端,它又是如何形成的呢?用重组DNA实验研究mRNA的3'端上的序列提供了令人信服的答案。聚A位上游大约15至30核苷酸处有一保守性很强的契合序列,即AAUAAA,除去这一序列会妨碍由转录单位合成RNA。在AAUAAA中发生突变(比如变成AAGAAA),或除去上述下游序列,这两种情况中均可看到它们是延伸至聚A位点之后的长RNA分子。这些转录物偶而也产生具有聚A正确加成的mRNA。实验说明,AAUAAA序列和聚A下游序列共同作用确定了聚A位点的位置而导致初始转录物的切割和聚A的加成。

在聚A位点上的切割及250个左右腺苷酸残基的加成,这两件事几乎是同时但又是独立发生的。将3'-去氧腺苷酸加进细胞培养物则完全停止细胞内聚A的加成,但初始转录物依然可以正确地切割。甚至在并不接纳聚A的组蛋白mRNA中,其3'端也是通过初始转录物的切割所产生的。而且也需要切割位点下游的序列并借助于特定的细胞核小RNP(有别于01, 02等)

RNA聚合酶III所合成的5SRNA转录物的终止是发生在单一

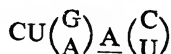
接序列即: (5')外显区{GT.....AG}外显区(3')。

表4 真核生物的小分子RNA

| 种类 | 长度 (碱基) | 丰度拷贝/ 细胞 | 亚细胞定位 | 转录用的 RNA 聚合酶 | 5'端 | |
|---------|------------|-----------------------|-------|--------------------|----------------|--------------|
| U1 | 165 | 1×10^6 | 核浆 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U2 | 196 | 5×10^5 | 核浆 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U3 | 210—215 | 3×10^5 | 核仁 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U4 | 125 | 1×10^5 | 核浆 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U5 | 118 | 2×10^5 | 核浆 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U6 | 106 | 3×10^5 | 核浆 | 可能是II | 修饰的 PPP^N | |
| U7 | 56—65 | 3×10^4 | 核仁 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U8 | 141 | 2.5×10^4 | 核仁 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U9 | ~130 | 未知 | 未知 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| U10 | ~65 | 未知 | 未知 | II | $m_3 G_{PPP}$ | |
| 7S或7SL | 195—300 | 5×10^5 | 胞质 | III | } $5' N_{PPP}$ | |
| 7.1} | 200 | 1×10^5 | 核仁 | } III | | |
| 7.2} | 200 | | | | | |
| 7.3或7SK | 331 | $0.5 - 1 \times 10^5$ | 核浆 | III | | |
| 小鼠Y1 | ~110 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| Y2 | ~95 | 1×10^6 | 胞质 | III | | |
| 人类Y1 | ~110 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| Y2 | ~110 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| Y3 | ~110 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| Y4 | ~95 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| Y5 | ~100 | $10^5 - 10^6$ | 胞质 | III | | |
| 4.5S | 90—99 | 3×10^5 | 核浆 | III | | |
| 5.8S | 158 | 5×10^5 | 胞质 | I | | 5'磷酸 |
| 5S | 121 | 7×10^5 | 胞质 | III | | $5' N_{PPP}$ |
| tRNA | 74—95 | 1×10^8 | 胞质 | III | | $5' N_{PPP}$ |

目前尚未分离到参与mRNA剪接的酶。正确剪接的反应途径第一步是在5'外显子-内涵子衔接处进行切割,在第一个外显子的3'端核苷酸上保留3'羟基,而在内涵子的5'核苷酸即鸟苷酸

上保留5'磷酸(图2-23)。这一步是在U1 snRNP的参与下进行的。下一步是分枝核苷酸结构的形成,需要U2 snRNA的参与。分枝点上的核苷酸不仅有常见的3'→5'的连键与该链下一核苷酸连接,而且它也以2'→5'的连键与内显子5'端的鸟苷酸连接。分枝点上的核苷酸几乎总是腺苷酸,一般距离内涵子-外显子接合处约10至30核苷处。在分枝点区的契合序列为



其中A为分枝点。迄今所考查过的脊椎动物 mRNA 均是这样的序列。脊椎动物分枝点的契合序列CUAAC 与酵母序列的后5个核苷酸很相似:

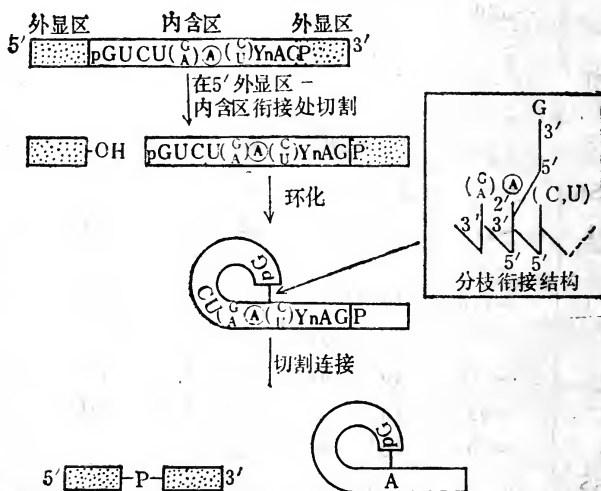


图2-23 mRNA的剪接过程示意

这一序列出现在酵母所有mRNA内涵子的3'内涵子-外显子接合处的上游约50核苷酸处。由此可知,从所有mRNA前体中除去内涵子所进行的反应都牵涉到相类似的识别序列。

至于3'侧的内涵子-外显子接合处的定位以及切割与连接的最后一步的完成,其机制尚未搞清。在迄今研究过的mRNA中,

分枝点下游的第一个AG双核苷酸就是这第二次切割的位点。因为所有内涵子的3'端都是富于嘧啶碱基，在较长范围内缺乏AG序列，因此，推测在CU(Pu)A(Py)序列中形成分枝点之后，要完成剪接反应，就需要某种机制沿着向下游方向搜索出下一个AG序列，经切割第一个外显子的3'羟基即被连接到AG之后的第一个核苷酸的5'磷酸上。

剪接体：异质核RNA-蛋白质复合物与核小分子RNA复合物上一节是关于mRNA剪接过程的生物化学的基本方面。实际上，剪接过程牵涉到包括RNA和蛋白质在内的许多因子。

在细胞核内，异质核RNA(简称hnRNA)和前mRNA这两个词往往可以互用，尽管实际上只有一部分hnRNA是mRNA前体。在细胞内hnRNA并不是裸露的多核苷酸，而是与特定的蛋白质形成复合物，而且这种复合物的形成早在RNA新生链尚未完成时就已经开始。

初步的但比较详细的分析表明，人类HeLa细胞的hnRNA-蛋白质复合物(简称hnRNA复合物或hnRNA颗粒)中大致可分辨出24种不同的多肽，它们的分子量在34KD至120KD之间。这些蛋白质共同组成一种约200埃的颗粒(沉降常数约30-40S)。它们与hnRNA结合，有点像组蛋白与DNA形成的核小体一样。经核酸酶水解后，从每一单体颗粒中可以回收的RNA链长度约在125-800核苷酸之间。显然这些hnRNP复合物沿着RNA链也具有某种程度的周期性(相域)。因此，这些hnRNP显然在mRNA的形成中可能提供了一种基本的结构基础。

RNA剪接过程中，内含区序列的精确切出是一种高度专一的作用。它需要mRNA前体中的特异识别信号，也需要细胞中识别这些信号的特定因子。识别这种信号的因子最有可能是细胞核内的小分子RNA(简称snRNA)及其蛋白质复合物。真核生物的细胞核和细胞质中存在着多种类型的小分子RNA(见表4)，它们的功能尚待进一步研究。但有一点可以肯定，它们本身具有酶的性质。大多数小分子RNA都跟特定的蛋白质相互作用形成复合物

(简称RNP),根据其来源或分布可以分为细胞核的RNP(简称sn-RNP)和细胞质的RNP(简称scRNP)。现已发现有多种snRNPs参与剪接作用。这并不奇怪,不同的snRNA都有一些序列分别可与剪接衔接处的序列或分枝结构序列相互配对。最明显的例子是U1 snRNA。而snRNA可跟8种蛋白专一性地结合,形成U1 snRNP。U1与剪接衔接序列之间有明显的碱基配对的可能性。而U1 snRNA补偿性的变化可以校正前mRNA 5'剪接位的突变这一事实,则说明U1 snRNA是5'剪接位的切割所必需的。但这种碱基配对对于正确切割是不充分的,因为在第3位上碱基的变换并不能被校正。某种蛋白质-RNA的相互作用可能需要,即sn-RNP与前mRNA的结合所导致的某些作用才是正确剪接的真谛。这一点对于3'剪接位可能更为重要,因为在那里没有明显的碱基配对关系。

综上所述,hnRNP蛋白质对hnRNA的结构上所起的作用,在某种程度上尤如染色质中的DNA被组蛋白所包装紧缩。这种包装紧缩会伴之以前mRNA折叠成可被剪接的某种结构,从而有利于snRNP的进一步参与,而完成剪接过程(见图2-24)。

②tRNA的剪接 tRNA的长度平均为70—80核苷酸。而tRNA前体要比其终产物长,因此tRNA前体需要缩短,还需要有许多化学修饰,比如加上甲基和异戊基基团,以及将尿嘧啶转换成假尿嘧啶等等。事实上,一个tRNA分子中,每10个核苷酸就有一个碱基发生某种形式的修饰。

真核生物的某些tRNA基因并不是作为一段连贯的DNA形式存在。例如,酵母在形成其苯丙氨酸tRNA和酪氨酸tRNA时,必需除去初始转录物的中段,并将两端的片段剪接在一起,前一步不需要ATP,后一步则需ATP(图2-25),ATP提供一个磷酸以使两端片段连接起来,连接完成后在拼接处不仅有一般的3'→5'磷酸二酯键,而且有一异乎寻常的2'-磷酸单酯键。

③rRNA的剪接 第三种RNA剪接反应牵涉到某些核蛋白体RNA内涵子的去除。实际上,在mRNA剪接过程明了之前就已经

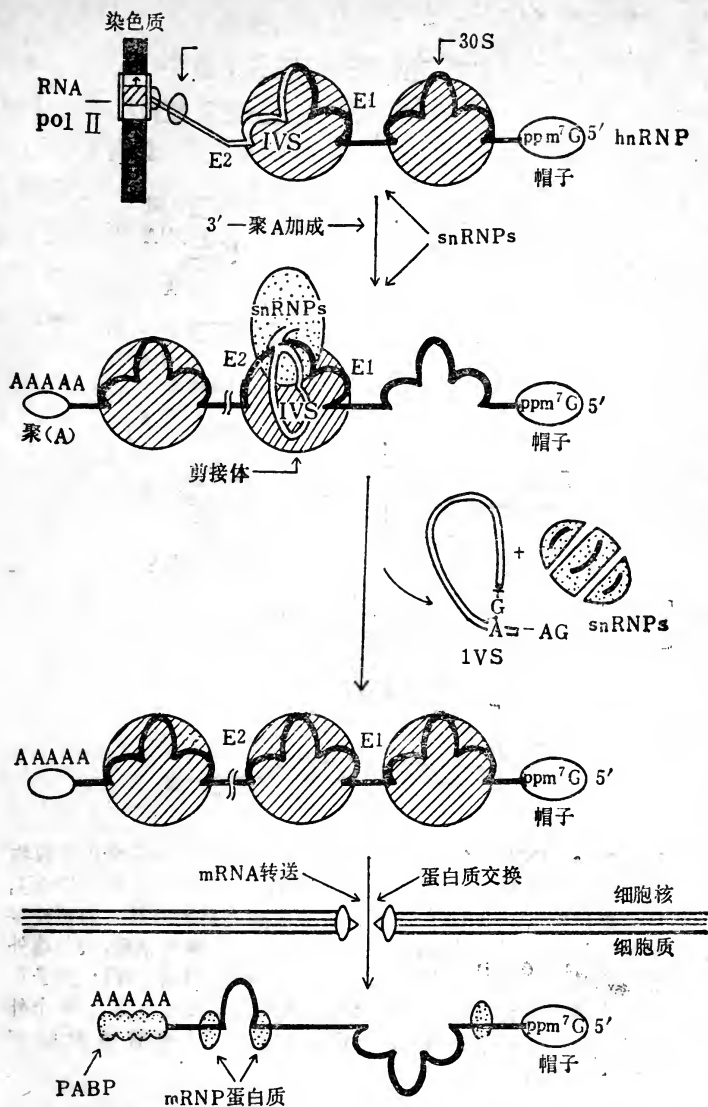


图2-24 剪接体装配及其参与前 mRNA 拼接的模型。剪接体简化为 hnRNP 颗粒和 snRNP 颗粒组合而成。snRNP 的双向箭头表示 snRNPs 可能在 hnRNP 蛋白参加之前或之后参加进去。U1 和 U5 snRNP 首先分别与 5' 和 3' 剪接位结合，而 hnRNP F 蛋白这时可能处于随机的位置。然后 U2 snRNP 与分支点结合，和随之与 U4、U5 和 U6 snRNP 的参与，与 hnRNP 一道形成一个套索结构。最后在 3' 剪接位切割，并同时 will 外显区连接。内含区则以套环的形式游离出来。

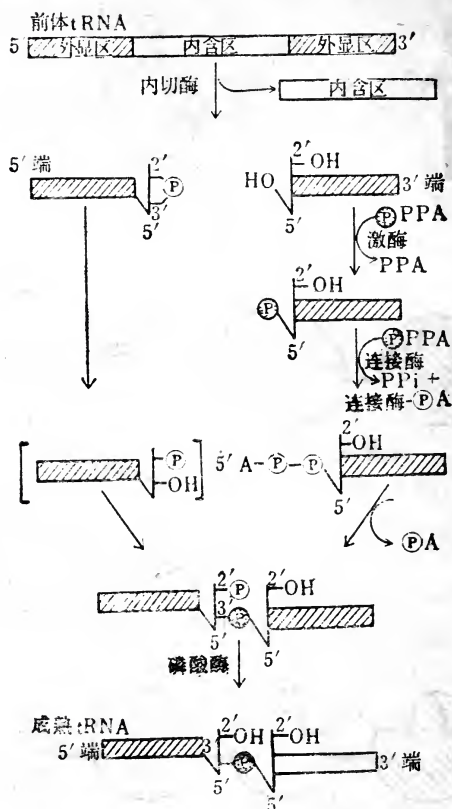


图2-25 tRNA内含区的切出模型。这是酵母的部分纯化提取物所进行的tRNA剪接的两步反应：(1)前体tRNA在两个位点上被精确切割。(2)tRNA的两个外显区随着磷酸的掺入而被连接起来。切割后5'端外显区保有一个2',3'-环磷酸单酯,3'端外显区则是一个暴露的羟基。激酶和连接酶使用两个ATP分子形成一个磷酸酐键(AP-P-)而与暴露的羟基键连起来。两个外显区的相互作用尚不明确,但已确定具有2'-磷酸单酯键和3'→5'键连方式

发现了rRNA的剪接过程,无需蛋白质的参与,纯RNA即可发生,最为人们熟悉的例子是四膜虫核体RNA前体的剪接。在无蛋白质的条件下,将包含413碱基对的内涵子长约1000核苷酸的四膜虫rRNA片段保温(图2-26),第一步即可在5'侧的外显子-内涵子

接合处上切开，这种切割是通过鸟苷酸辅因子所引起（概因其核糖2'和3'羟基的化学活性）。RNA上的切割诱导了鸟苷酸的游离3'羟基连接到内涵子5'端核苷酸的磷酸基团上，而第一个外显子的3'端核苷酸还保留着3'羟基。这个羟基则与连接内涵子3'端核苷酸和第二个外显子5'端核苷酸的磷酸进行转酯作用，释放出内涵子，通过链中已经存在的磷酸将两个外显子连接起来。内涵子本身再进行切割与连接反应，释放出一个小片段的寡核苷酸并将余下的片段环化。

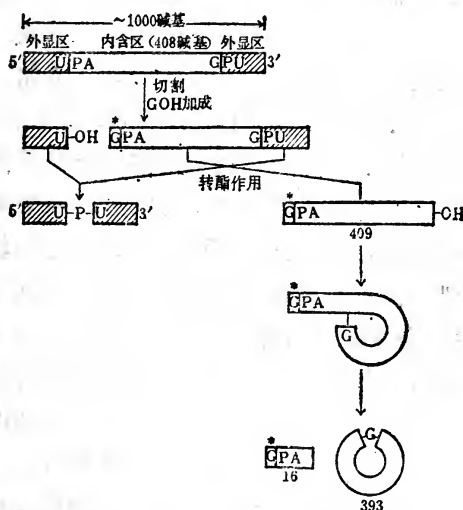


图2-26 四膜虫核蛋白体 RNA 序列在无蛋白质参与下的自剪接。含有部分rRNA前体编码序列的重组 DNA 分子经转录后得到约含1000碱基的RNA分子（两个外显区和一个408碱基的内含区）。此转录物可在无蛋白质参与下进行剪接。在剪接反应中，鸟苷是必需的辅因子

三种RNA的剪接机制在细节上显然是不相同的。但表面上也有相似之处，这可能表明进化上的一定亲缘性。例如 mRNA 和 tRNA 的拼接，两者都牵涉到其中的一个核苷酸的2'→5'和3'→5'的键连。又如，mRNA和无细胞体系中 rRNA的拼接。两者都形成一个环状的中间产物；连接外显子的磷酸是RNA中已经存

在的。

(8) 真核生物 mRNA 的转录单位 我们已经考查了 mRNA 加工中的每一程序。但在变成一个有功能的分子之前,并非所有的转录单位产生的初始转录物都需要通过加工的每一步骤。

根据初始转录物的蛋白质编码能力,可以将转录单位分成两种类型,一种是简单的转录单位,另一种是复杂的转录单位。

简单的转录单位产生的初始转录物只形成一种编码一种蛋白质的 mRNA (图55)。简单的转录单位在细胞核内的 RNA 产物有的需要,有的不需要所有的 RNA 加工程序。所有这些产物都冠之以帽子,但许多 mRNA 都不进行剪接。大多数组蛋白 mRNA 既不剪接也不进行聚 A 的加成,不少 mRNA (例如,干扰素以及有些病毒和大多数酵母)都具有帽子和聚 A,但不需要拼接。珠蛋白和卵清蛋白基因的初始转录物则既需剪接又需聚 A 的加成。

复杂的转录单位的初始转录物可以形成两个或两个以上不同的 mRNA,各自编码不同的蛋白质(图2-27)。复杂转录单位还可以分成几种类型。其一,初始转录物可能有两个或两个以上的聚 A 位点,各自产生一个核 RNA 分子,需经剪接才成为一个 mRNA;其二,初始转录物可以只有一个聚 A 位点,但其剪接可能有两种或两种以上的排列方式,每种剪接方式会导致形成一种 mRNA;其三,前两种类型同时存在,即多个聚 A 位点和多种剪接方式。大多数腺病毒的转录单位,以及 SV40 及反向病毒的所有转录单位都属复杂转录单位这一类型。此外在脊椎动物和无脊椎动物中也报导了其它种类细胞中编码蛋白质的复杂转录单位。最后,也是新近在寄生原生动动物即非洲锥体虫 (*Trypanosoma brucei*) 中发现的一类多顺反子转录单位,这种多顺反子的 RNA 前体是由 RNA 聚合酶 I 转录然后加工成为若干种 RNA,各自编码成不同的蛋白质,如变异体表面糖蛋白 (VSG) 及其表达的有关基因。这种多顺反子转录单位既不同于上述三种,也有别于原核生物的多顺反子的转录单位,比如 VSG 基因 221 所在的多顺反子转录单位,转录起始于该基因的上游大约 60kb 处,转录形成一个很大的前体转录物,

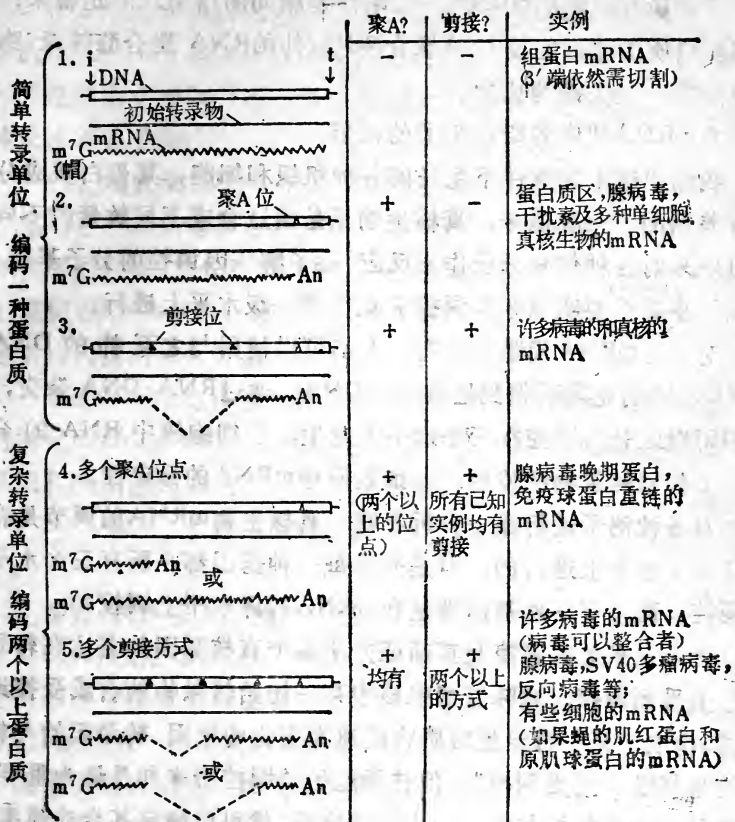


图2-27 编码mRNA的简单转录单位和复杂转录单位的图解与实例。图解显示了DNA上的起始(i)和终止(t)位点;初始转录物的方向与范围(箭头)。由初始转录物衍生的mRNA用齿状线表示。 Δ 为聚A位点; \blacktriangle 为剪接位点。

然后在 3' 端进行聚A加成, 在 5' 端的加工则是通过称为跨接 (trans-splicing) 的方式将一个带有帽子含35个核苷酸的序列(称为小外显区)接上去。而这一5'端的小外显区则是来自一个140核苷酸的RNA前体的5'端。这种加工在多个位点上进行, 因而形成多个mRNA。乍看起来, 这个由RNA聚合酶I转录的多顺反子RNA是有些不可思议的, 因为RNA聚合酶I转录的RNA不具帽子, 而真核mRNA必需有个帽子。但是由于5'端带帽的小外显子

的加成，所有成熟的mRNA的5'端都是相同的结构。由此看来，编码蛋白质的基因能被RNA聚合酶II以外的RNA聚合酶转录-跨接可能是一个关键的机制。

3. mRNA代谢各级水平上的调节

我们知道不同条件下生长的各种组织和细胞，其蛋白质成分是有差别的。一般说来，真核生物正是通过合成不同数量的不同蛋白质来对各种信号分子作出反应。要了解基因调控的分子基础，另一件事就是要明确基因调控究竟在哪一级水平上进行。

对特定mRNA代谢的研究，人们可以使用与之互补的DNA（即cDNA）的克隆而得到足够量纯DNA。通过RNA-DNA杂交，人们可以区分出调控在三个水平上发生：①细胞核中RNA的合成，②初始转录物的使用，③细胞质中mRNA的稳定性。

对各种例子进行逐一分析表明，真核生物mRNA的调节是在上述三个水平上进行的，但是并非每一种基因都在所有三个水平上调控。而且有一些基因则是在mRNA转译水平上调控的。

转录水平上的调控及其确证方法某个真核基因的表达在转录水平上受到调控，意味着细胞核中某一初始转录物的合成受控地增减，构成了某一特定蛋白质合成速率变化的原因。转录起始与转录终止都潜在地受到控制，但转录起始的调控看来却是最为重要。初始转录物的起始与终止位点被确定后，就可以测定其合成速率。

最简单而且是最直接的测定转录速率的方法是将所要研究的细胞暴露在某种作标记的RNA前体中片刻（例如5分钟），测定其掺入量。但对于完整的动物来说，这种方法是不实用的。纵然是培养细胞，用另外一种RNA标记方法则常常更为简易，即用分离核来进行。在反应体系中加入 ^{32}P 标记的核苷三磷酸使之直接掺入到分离核的RNA新生链中可以得到标记强度很高的RNA制剂。遗憾的是，细胞核内各种RNA聚合酶依然仍具活性。在保温进行反应期间会有几百个核苷酸加成到业已起始的RNA链中。当然，用特异的DNA与此方式标记的RNA杂交，可以精确地测出不同基因的转录速率。

表 5 给出的是用上述两种方法标记 mRNA 进行杂交实验所得的结果。不管是丰度高的转录物还是稀少的转录物，在细胞核和完整细胞中都以相同比例形成。因此，分离核显然是直接测定转录速率的手段。

(1) 哺乳动物DNA病毒的转录控制 若干种动物DNA病毒在感染过程中病毒特有的蛋白(和mRNA)的形成都遵循着一种有秩序的程式:首先检查到的是一组早期蛋白(和 mRNA);然后出现病毒DNA复制;最后是大量形成一组晚期蛋白(和mRNA),包括结构蛋白或外壳蛋白。

无论用全细胞作脉冲标记还是用分离核作离体合成,所得到的标记RNA与DNA杂交都证明病毒转录单位使用的不同程式是早期和晚期基因表达这一程序的依据。

DNA病毒,尤其是腺病毒的这些特定的转录程式可以归纳如下:

首先,病毒进入细胞后,立即激活其中的一个转录单位(编码蛋白E1A)(图2-28)。这一激活不需要有新合成的蛋白质,因而必定由细胞中原有的蛋白完成。E1A转录单位的蛋白质产物形成之后,只激活另一组早期转录单位(主要是E1B,2,3和4)。E1A蛋白的合成也引起晚期主要的启动区P 16所起始的转录的低速率进行。

其次,在腺病毒感染期间,一些进行着的转录也发生特定的减少。例如转录单位4先是被强烈地激活,然后是去激活(图2-28a)。但是,转录单位2编码蛋白发生突变的病毒却不会使转录单位4去激活。因此,整个转录调控程序中,起码有部分是由各转录单位产物之间相互作用的结果。

第三,DNA复制是特定启动区转录被激活的前提。例如腺病毒基因组的“左”侧的一段4kb区域有三个转录单位即1A,1B和IX(图2-28b)。前面已经提到1A的转录先于1B,并为1B的激活所必需。感染后5小时左右,1B转录单位已充分被激活;但蛋白质IX的转录单位虽然也同处于一个区域,在早期并不被激活(图2-28c)

蛋白1×的转录单位只有在DNA复制开始后才被激活。DNA

复制看来为这一受限制的“晚期”转录模式准备了一种DNA模板。转录要求模板复制这一事实可通过原有病毒开始复制后再引入另一类型的腺病毒来加以证明。因为另一类型的晚期mRNA可与原先的病毒的晚期mRNA区别开，因此可以确定只有复制了的DNA分子才产生大量的IXRNA和在P16起始的RNA。而另一类型的病毒也需要复制才能使它的IX和P16启动区活化。

表5 测定转录速率的杂交实验所用的两种标记细胞核RNA的方法的比较

| 杂交时所用的DNA序列 腺病毒基因组 | 标记RNA杂交的百分数 | |
|------------------------|--------------|--------------|
| | 全细胞 | 分离核 |
| 感染早期的细胞 | 0.75 | 0.53 |
| 感染晚期的细胞 | 16.6 | 14.4 |
| β -珠蛋白 | 0.01 | 0.01 |
| 由8种中国仓鼠mRNA 制备的cDNA | 0.0001—0.001 | 0.0001—0.001 |
| 卵清蛋白cDNA** | 0.00018 | 0.00024 |
| 伴白蛋白** | 0.00015 | 0.00022 |

• 标记核RNA的制备：全细胞用 ^3H 尿嘧啶标记1—3分钟；分离核用四种核苷三磷酸（包括 ^3P -UTP）

•• 这两种cDNA可代表鸡的卵白蛋白质，全细胞的RNA标记是采用培养的输卵管小块，标记20分钟。

资料来源：J.E.Carnell Jr, 1982, Nature 297;

365; 和G.S.Mcknight & R.D.Palmiter, 1979, J. Biol. Chem. 254: 9050

因此，腺病毒提供了一系列转录调节事件来进行研究，其中转录速率的增减及取决于模板状态（复制前或复制后）的不同转录激活。它提供了一个模型来研究和鉴别引起转录变化的有关蛋白质的作用。

(2) 组织特异和细胞特异的基因调控 重组DNA技术的发展，使研究工作者得以对某些分化细胞中编码为数众多的蛋白质的mRNA进行研究。通过互补于这些mRNA的cDNA的克隆，并

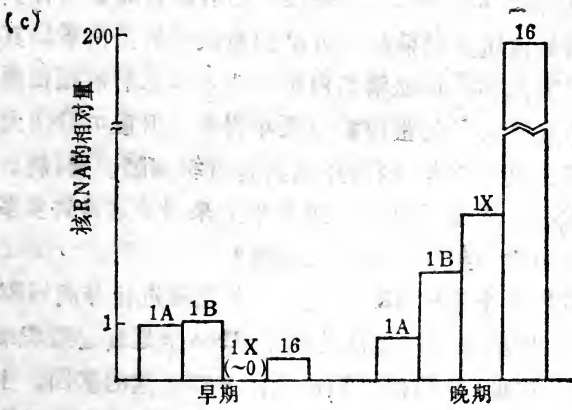
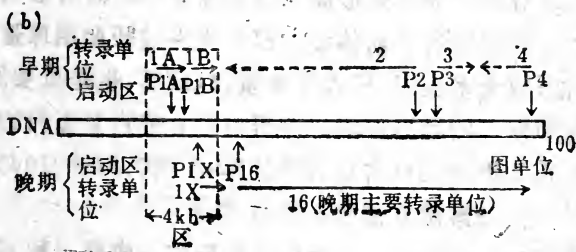
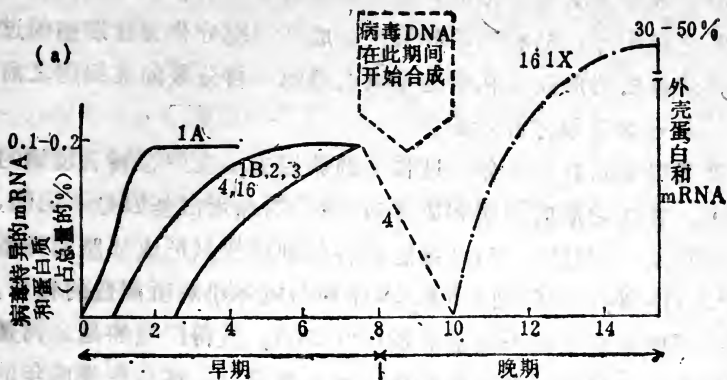


图2-28 腺病毒的生命周期及其基因表达程序

标记分离核中RNA，从而证明，只有在形成特定的分化组织中的那些mRNA时，转录才是基因调控的基本方面。现举例子以说明。

①珠蛋白 在分化的最后阶段，特定基因会变得很活跃。这种现象的一个经典例子就是脊椎动物成红细胞的珠蛋白基因。在

成年时，成红细胞的分化主要发生在骨髓中；而在胚胎期，则发生在胚外组织即血岛和胚胎肝脏内。成红细胞分化为红细胞的过程中，珠蛋白的形成是在细胞变成成熟的不再分裂的红细胞之前的最后4—5次分裂才开始的。

珠蛋白基因在这一分化过程中的调控主要发生在转录起始的水平上。在胚胎形成期间和成年时，活动的珠蛋白基因是不同的，例如在鸡第5天的胚胎中，红细胞前体的细胞核只形成胚胎期珠蛋白mRNA序列；12天后则其mRNA序列与成体小鸡所制造的相同。其它组织的细胞核则不制造珠蛋白mRNA。值得注意的是，同是前体细胞，其分化并非先是形成胚胎期珠蛋白，然后形成成年的珠蛋白；而是5天前所有的前体细胞都分化生成胚胎期珠蛋白，而12天后，全部（或大多数）生成成年珠蛋白。最后，也是重要的一点，虽然在红细胞发育的最后阶段，珠蛋白的合成占总蛋白的50—90%，但珠蛋白基因转录只占总异质核RNA的0.01—0.04%，所有其它mRNA序列正继续在细胞核内合成。

②小鼠肝脏 mRNAs 脊椎动物肝脏合成数十种其它器官所不合成的蛋白质，包括酶和分泌到血液中的蛋白质。其中有的蛋白质占很大比例，如血清蛋白组分1占全部肝脏蛋白质合成的1%，但许多肝脏特异的蛋白数量要小得多。肝脏mRNA无论含量多少都克隆了其cDNA。因而知道其它组织如脑、肾、脾、等不合成这些mRNA。那么是在哪一级水平上来调节这许许多多含量参差各异的蛋白质的组织特异性表达呢？

用肝脏的12个不同mRNA的cDNA克隆进行分离核RNA合成的分析表明，肝细胞核所生成的新生RNA量是其它组织细胞核的20—500倍。因此，各种以组织特异性方式表达的基因，主要在转录水平上调控。在这一杂交实验中，还包括肌动蛋白基因和微管蛋白基因，但其新生RNA的合成在各种组织中是相似的。由于这些蛋白质（及其mRNA）在不同的组织中也有差异，这些“公有”基因的调控必定涉及某些转录后机制。

③鸡的卵清蛋白质 在某些情况下，诱导某一转录增加的

信号是已知的。例如雌性激素引起鸡输卵管里的表皮细胞在数量与大小上的增加和分泌一些蛋白质。这些细胞分裂时，开始产生6—7种卵白蛋白质，其中以卵清蛋白的量最大(Ovalbumin)。待到这一过程終了，输卵管细胞合成的总蛋白有一半是卵清蛋白质。雌性激素也刺激卵黄原蛋白(vitellogenin)的合成，它是一种卵黄蛋白质，通常在雌性的肝脏中合成然后通过血清输送至输卵管并进入卵中。

与不作处理的比较，雌性激素处理的小鸡细胞中，这些基因的转录速率急剧增加。

在雌性激素处理的输卵管细胞内，卵清蛋白基因的RNA只占总核RNA的0.05%，但是这些细胞中总蛋白的30%是卵清蛋白(其它卵白蛋白占20%)。看来雌性激素引起的转录增加不是卵清蛋白mRNA大量增加的唯一决定因素。其它mRNA的累积必定以某种方式减少；卵清蛋白mRNA的半衰期在雌性激素刺激期间也有所延长，关于类固醇引起mRNA稳定性的增加已经知道的还有几例，后面再加讨论。

(3) 组蛋白生成的转录控制和转录后控制 组蛋白基因的例子代表了另一种情况，即其中转录控制起着重要作用，但并非是唯一的作用。首先，在动物中(如海胆)至少有两大组的组蛋白基因。这两组基因各自都是以串列重复的形式出现。其中一组在卵中合成，受精之后其组蛋白mRNA则由另一组基因来合成，并在以后的生长发育中继续使用这一组基因，因此这两组不同的基因在胚胎形成早期和晚期的表达受转录水平上的控制。

图2-29a的模型简单说明了海胆组蛋白基因表达的情况；成熟个体这一组组蛋白起码含有略微不同的组蛋白的晚期基因丛。此外，在早期胚胎形成期间，组蛋白的早mRNA的转译也有一定的选择性。虽然如此，总可以说，组蛋白早晚两组基因的表达主要属于转录控制。

组蛋白基因也呈现有另一水平的调控。在哺乳动物的培养细胞中，组蛋白mRNA主要出现在细胞周期的S期，组蛋白的合成

也发生在这个时候，但在整个细胞周期，组蛋白基因都以低速度进行转录。组蛋白转录在S期约增加4倍，而同期组蛋白mRNA的量却增加16倍(图2-29b)。因此组蛋白mRNA的稳定性在此时期也必定有所增加。这一基因家族在不同情况下看来采用不同的基因调控模式。

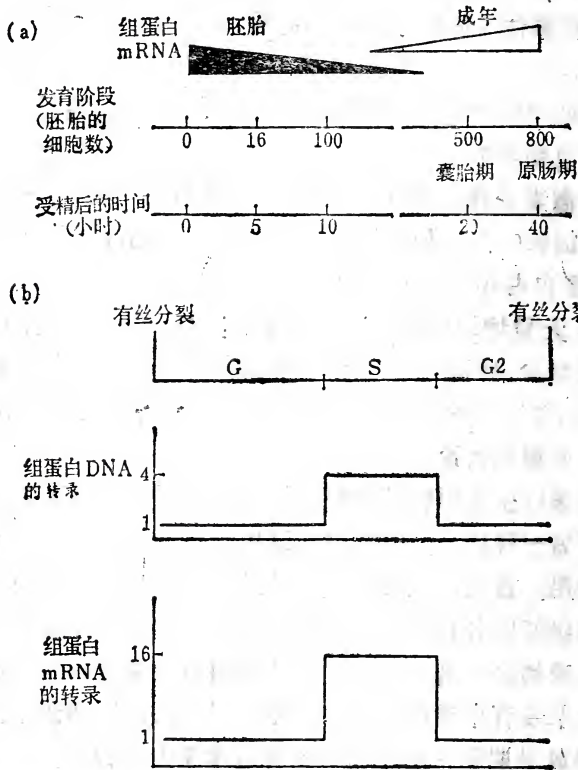


图2-29 组蛋白基因的调控(a)在海胆的生命周期中,不同时间使用不同的组蛋白基因。其它动物亦然。mRNA的合成是在转录水平上受到控制。(b)在培养的HeLa细胞的细胞周期中,对其组蛋白及组蛋白mRNA合成的分析表明,在S期,转录增加4倍,但mRNA浓度则增加16倍,说明组蛋白mRNA也在积累水平上受到控制。

单细胞真核生物的转录控制 长期以来一直都有这样的假定,即酵母中蛋白质合成速率的变化的主要依据是转录控制。由于从酵母细胞难以分离出RNA不受破坏的细胞核,同时也由于

分离核在离体转录期间其功能很差，因此一直没有对其细胞核RNA合成进行过直接的测定。但是也用酵母细胞的总RNA与克隆了的基因进行过杂交实验（如核蛋白体蛋白基因和乳清酸脱羧酶-*orotic acid decarboxylase*基因）。结果表明，mRNA浓度增加时， ^3H 尿嘧啶在特定的mRNA中的掺入量也增加。因此极有可能酵母基因的控制是在转录水平上。后面我们将看到，许多酵母基因是由蛋白质调节的，这些蛋白质通过与DNA结合这种方式而发生作用。

就粘霉菌(*Dictyostelium discoideum*)而言，已经用分离核来说明其生命周期的不同时期起作用的许多基因是转录水平的控制，所以较简单的真核生物的基因调控看来也是转录水平上的。

(4) mRNA加工水平上的控制

自从发现异质核RNA(hnRNA)及推断其作为mRNA前体的作用以来，分子生物学家就认为RNA的选择性加工可能是基因调控的一种因素。鉴于现在已经知道了真核生物转录单位的结构及其转录后修饰（加帽子，甲基化，聚A加成及剪接等），初始转录物选择性加工的机制则可以精确地加以说明，目前也已有许多关于RNA加工水平上基因调控的例子。复杂的转录单位至少有两种类型的初始转录物，即

①初始转录物可能有两个或两个以上可选择的聚A位点，而在mRNA形成中，一种分子只使用其中的一个位点；

②初始转录物可能只有一个聚A位点，但可以剪接成两个或两个以上不同的mRNA。

细胞在同样的初始转录物中可以在聚A位点或剪接位点之间“随意”抉择即构成由RNA有区别地加工所行使的基因调控。

另一种调性节选择也可以在转录后水平上起作用。假设初始转录物在某一生理条件下或某一细胞类型中被正确地加工，而在另一条件下或另一细胞类型中却摒弃不用，这种选择即称为加工一摒弃选择。

认为有加工一摒弃选择的理由是：细胞核中的许多RNA分子

显然不被用来生成 mRNA，也就是说它们的序列在细胞质中并不出现。例如，表6中是用仓鼠培养细胞进行的一次实验结果，含聚A的总核RNA中，含mRNA序列的占25%，而其余的75%中含mRNA序列的浓度极低。正如前面提到过的那样，除了组蛋白mRNA，目前尚未发现缺乏聚A的mRNA，加工-摒弃选择的说法可能有助于探寻缺失聚A的异核RNA，是否它们以摒弃的方式被转录。加工-摒弃选择可能是加工调控的一种开关形式，被摒弃的转录物可能只是暂时被关闭，或者，它们可能代表着进化过程中已经变成假基因的那些基因。

最近已经有了两个关于激素控制的加工-摒弃选择的例子：肾上腺类固醇激素引起肝细胞累积一种糖蛋白($\alpha 1$)的mRNA；甲状腺激素引起肝细胞积累一种未知功能的蛋白质(根据电泳行为，称为斑点12的蛋白)的mRNA。由于在这两个例子中，各自的转录速率没有差别，而细胞核RNA的稳态合成却有所增加，因此这些mRNA的增加可能是由于在另外的情况下被摒弃去不用的那些核转录物得以保留。目前尚不知道这种“选择”机制是否在于聚A的加成。

表6 仓鼠培养细胞中异核RNA的比较

| 异核RNA种类 | 在聚A ⁺ 部分的百分比 | 在聚A ⁻ 部分的百分比 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| 总标记异核RNA | 25 | 75 |
| 含帽子的异核RNA* | 25 | 75 |
| 具有mRNA序列的异核RNA | 70—90 | 10—30 |

* 根据这些百分比，所有异核RNA都是有帽子的。这就意味着主要是转录后修饰决定着预将变为细胞质中稳定的mRNA和将不含聚A的序列分野。

① 细胞核RNA的差异加工方式 腺病毒 mRNA 形成的研究启迪了证明mRNA转录后调节的方法。第一个关于聚A的不同选择和不同剪接的例子是在腺病毒的侵染周期中观察到的。有大量的例子说明细胞内基因的有差异加工(表7)。

聚A的不同选择导致剪接的不同排列时，正是聚A的不同选

择而指令着剪接的不同排列。

果蝇原肌球蛋白 (tropomyosin I) mRNA的形成是差异剪接的一个清晰的例子(图2-30), 在胚胎和成虫中, 这一mRNA的3'端与5'端是相同的, 但成虫mRNA中有一个外显子是胚胎mRNA中所没有的。因为在每一种情况下, 转译终止在第三个外显子, 因此, 这两种蛋白质的羧基端有27个氨基酸的差别。

尽管有许多细胞的mRNA都表现出来自同一转录单位, 却有着不同的外显子和不同的聚A位点。但要想对核RNA的研究来直接证明这种差别是基于细胞核中不同的加工而不是mRNA稳定性

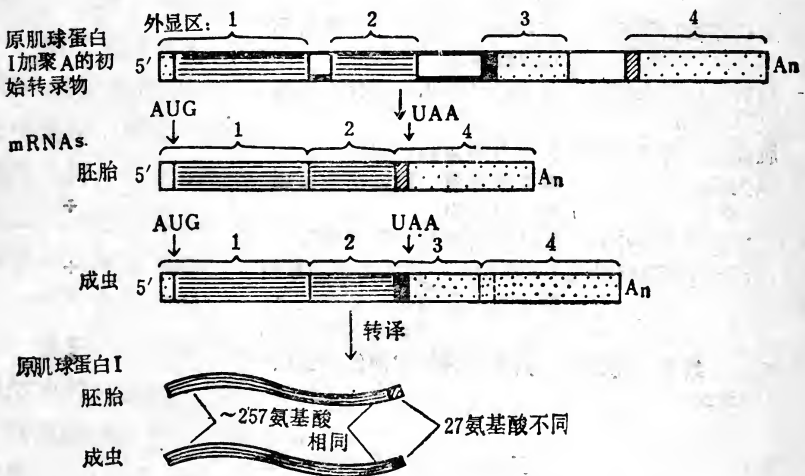


图2-30 果蝇原肌球蛋白I基因差别表达中的剪接。原肌球蛋白I转录单位有四个外显区。胚胎肌肉中的mRNA含有外显区1, 2和4, 而成虫胸肌中的mRNA则含全部四个外显区。由这两种mRNA转录的蛋白质在前面的一段257氨基酸是相同的, 最后的27个氨基酸则不同。

的差异, 总是不大容易的。然而, 表7中所列的例子看来几乎可以肯定是加工上的差异, 因为这些产物在组织中只可能含一、两种。由于mRNA稳定性的差别是以一种全或无的方式起作用, 因此, 产生这种结果似乎不大可能是不同的稳定性所造成。

②加工差异的可能机制 目前尚不知道有什么因子控制着

| 基因产物 | 关于不同产物的说明 | 不同控制的依据 | |
|---|--|---------|------|
| | | 聚A选择 | 剪接变异 |
| 哺乳类 | | | |
| 钙磷留素 (大鼠) | 两种蛋白: 钙磷留素(Ca ⁺⁺ 调节激素)和与钙磷留素亲缘的神经肽, 它们的羧基端有差别 | + | |
| 激肽原 (牛) (Kininogens) | 均生成控制血压的舒缓激肽 (bradykinin) 的两种前激素, 对蛋白酶具不同的敏感性 | + | |
| 免疫球蛋白重链 (小鼠) | 在不同的抗体分子中具有不同的羧基端 | + | |
| 肌钙蛋白 (大鼠) (Troponin) | 在大鼠骨骼肌中两种不同的肌肉蛋白质 | + | |
| 肌红蛋白轻链 (大鼠)* | 长度分别为140和180个氨基酸的两种蛋白质, 在急促痉挛的肌肉中 | | + |
| 前原连激肽 (牛) (Preprotachykinin) | 生成两种前激素释放物质P (一种影响平滑肌的神经肽); 较大的一种前激素还释放物质k (一种未知功能的神经肽) | | + |
| 纤维连结蛋白 (大鼠) (Fibronectin) | 具有三种形式的结构蛋白 | | + |
| 果蝇 | | | |
| 原肌球蛋白 (Tropomyosin) | 在胚胎和成虫中呈现差异的两种肌肉蛋白质 | + | |
| 肌红蛋白重链 | 胚胎和成虫间呈现差异的两种肌肉蛋白质; 在蛹和成虫中还发现第三种 | + | |
| Ubx | 在早期胚胎和幼虫中控制胸肌发育的不同基因产物 | + | |
| 甘氨酸核苷酸转 甲酰酶 (Glycinamide ribotide trans- formylase) | 由一种长mRNA编码的酶; 较短的mRNA编码另一种肽; 其中有几个外显子是相同的。 | + | |

* 大鼠肌红蛋白的轻链蛋白自由在5'端有差别的两个不同的重叠转录物加工而成, 所生成的mRNA在重叠区域中也含不同的外显子, 另外的四个外显子很相似。鸡的肌红蛋白基因的情况几乎相同。

聚A的不同选择和加工差异。我们前面提到过初始转录物终止在聚A位点下游，但一旦在RNA聚合酶通过聚A位点后，RNA马上被切割。我们现在尚不清楚想像中的识别因子是否通过与新生的核RNA结合而决定聚A的位置，或者是否它们与DNA结合而为使用某一特定聚A位点提供某种信号。

在加工差异的例子中，细胞核中的RNA小分子(snRNA)与蛋白质相结合(snRNP)可能起着某种作用。如前所过，UI snRNA有些序列至少是互补于许多剪接位的5'衔接处，因此snRNP的作用可能是把转录物的两个部分挂起来。如果不同的snRNP具有不同的专一性，那末它们在浓度上的差异可能会导致剪接的差异。

加工差异的另一个可能的机制是细胞核RNA甲基化上的差异。例如在未剪接时，如果核RNA被 m^6A 残基（在碱基的6位碳上甲基化的腺苷酸残基）所加成，则聚A位点的选择上可能起着某种作用；或者这种甲基化会保护某些剪接位点却导致利用另外的位点。这些都是很有兴趣的问题，吸引着许多研究工作者。相信在不久的将来会得到解答。

③重叠转录单位

容易与加工调控相混淆的是一个转录单位的排列所导致一种精细的转录控制。 α -淀粉酶是在肝脏和唾液腺中水解淀粉的酶。在这两种组织中，这种酶具有相同的氨基酸序列，但在唾液腺中，浓度要高100倍。淀粉酶的编码序列是相同的，但两种mRNA在5'端有所不同。它们的帽子位点不同；在基因组DNA中，两者相距2.8kb不同的帽子位点产生不同的5'外显子（两种情况下，5'外显子均不转译）。因此，转录的起始点与转录的速率是组织特异性的。这两种mRNA的第一个剪接的3'接合点相同，其余部分也相同。这两种mRNA实际上是来自两个不同而且重叠的转录单位。其组织特异性在于各自选择不同的转录起始位点。

酵母中的转化酶(invertase, 分解蔗糖的双糖酶)也具有相似的情形。该酶的转录单位也有两个不同的转录起始位点；一个是定制型转录时所用，另一个则是酶被蔗糖诱导时所用。现在尚

不知道其可诱导位点是属正调节抑或负调节，进一步研究这一问题倒是饶有兴趣的。

(5) 细胞质中的基因调控

在这之前我们所讨论的是在细胞核中特定 mRNA 生成的调节事件。真核生物的大多数基因可能归属于细胞核中的调节，但细胞质中的调节也是重要的。蛋白质合成的速率受到 mRNA 进入细胞质的速率的影响，也受到 mRNA 在细胞质中的寿命及转译频率的影响。最后甚至转译后的事件也起着调控基因表达的作用。不过在这一节里，我们仅限于讨论紧接着转录后的控制：即 mRNA 稳定性的差异和转译差异。

mRNA 稳定性上的变化所引起的基因调控

在脊椎动物中，作用于组织特异性的一些激素常常造成 mRNA 稳定性的差异。这类调控往往伴随有转录的增加，结果会是特定蛋白质合成量的增加。目前尚不明瞭 mRNA 在代谢上不稳定的原因，因此对 mRNA 稳定性的变化几乎是一无所知。

① 泌乳激素在延长酪蛋白 mRNA 半衰期中的作用 酪蛋白在乳汁中含量丰富。它是在激素（包括多肽激素泌乳激素）的作用下在乳房组织的表皮细胞中合成。将小块的乳房组织培养在不含泌乳激素的培养基中，这时每一细胞只含大约 300 个酪蛋白 mRNA，而在加入泌乳激素时，每个细胞酪蛋白 mRNA 分子达 30,000 个，但是培养的乳房组织细胞的细胞核中，在上述两种情况下，酪蛋白 mRNA 序列数只有 3 倍之差。

泌乳激素的存在会使酪蛋白 mRNA 的半衰期增长 30 倍至 50 倍，这也就是酪蛋白 mRNA 浓度在泌乳激素作用下增加 100 倍的主要原因。图 2-31 所给出的实验结果充分说明了这一点，即泌乳激素诱导下酪蛋白 mRNA 量上的增加与其说是合成量的增加，毋宁说是由于 mRNA 稳定性的增加。

② 肝脏中卵黄原蛋白 mRNA 稳定性取决于雌性激素 前面曾说过，卵黄原蛋白是在雌性鸡和蛙的肝脏中被雌性激素诱导合成的。合成后即转运到输卵管。在雌性鸡的肝脏中，它也对实验

中加入的雌性激素（如 estradiol）有所应答，但不作雌性激素实验处理。雌性个体中，卵黄原蛋白的半衰期大约是24小时。急速除去雌性激素，卵黄原蛋白的浓度很快减少，这时半衰期不到3小时。因此，这种蛋白的激素控制显然是在两个水平上——转录起始和mRNA稳定性。

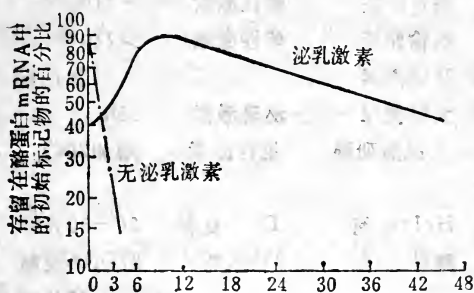


图2-31 泌乳激素引起乳房细胞中酪蛋白mRNA稳定。将泌乳的大鼠乳房组织放入缺泌乳激素的培养基中4小时后，取一份加入泌乳激素并用³H尿嘧啶标记，另一份作用样标记但不加泌乳激素。3小时后除去标记物，再加入无同位素标记的核苷酸进行“追补”，然后隔一定时间提取RNA，用杂交法测定酪蛋白mRNA的量。培养基无泌乳激素时，最高值是在标记物撤除之后但标记的mRNA迅速衰减（不到1小时即衰减一半）。有泌乳激素存在的情况下标记mRNA的累积持续若干时候（由于追补失效），且衰减较慢（衰减一半高40小时）。因此，泌乳激素大大减小了酪蛋白mRNA的更新，其稳定主要跟乳房细胞中酪蛋白mRNA含量高有关。

③其它mRNA半衰期的变化 前面的例子说明mRNA稳定性可以被蛋白质类激素或类固醇类激素调节。可使mRNA稳定性增加和减小的还有其它一些因素（表8）。使半衰期变化的精确信号往往不清楚，病毒蛋白质在侵染晚期的累积可以使腺病毒某些早期mRNA增加稳定性。

细胞骨架成分的mRNA浓度的变化甚至在转录速率不变的情况下也可检查出。例如肌动蛋白和微管蛋白mRNA在再生肝中浓度的增加不是由于转录量的增加。同样，在转录速率没有明显变化的情况下，这些mRNA的浓度在不同组织细胞之间却有差异。这种变化很可能由RNA加工所导致的mRNA稳定性的差异所造成。

表8

mRNA稳定性呈现受调节的生物系统

| mRNA | 组织或细胞 | 调节信号 | mRNA半衰期 | |
|---------------------|--------|--------|-------------------|-----------------|
| | | | 具效应物 | 不具效应物 |
| 卵黄原蛋白 | 蛙肝脏 | 雌性激素 | 500h | 16h |
| 卵黄原蛋白 | 雄鸡肝脏 | 雌性激素 | ~24h | <3h |
| 卵清蛋白 | 鸡输卵管 | 雌性激素 | >24h | 2-5h |
| 伴卵清蛋白 | 妊娠激素 | | | |
| 酪蛋白 | 大鼠乳腺 | 泌乳激素 | 92h | 2-5h |
| 前列腺类固醇结合蛋白 | 大鼠前列腺 | 雄性激素 | 增加30倍 | |
| 组蛋白 | HeLa细胞 | DNA复制 | 30-60分钟 | <10分钟 |
| 组蛋白 | 酵母 | DNA复制 | 即DNA复制 期间>15分钟 | 即复制后: 5分钟 |
| 腺病毒1A和1B (早mRNA) | HeLa细胞 | 病毒晚蛋白 | 即侵染晚期 60-100分钟 | 即侵染早期 6-10分钟 |
| 细胞质肌动蛋白 | 肝 | 再生肝 | 增加10倍 | |
| 细胞质β微管蛋白 | 肝 | 再生肝 | 增加10倍 | |
| 细胞质β微管蛋白 | 小鼠培养细胞 | 解聚微管蛋白 | 减少>10倍 | |

尤其需要指出的是,微管蛋白亚基可能在调节微管蛋白mRNA稳定性上起着某种作用。当微管在秋水仙素作用下解聚时,微管mRNA迅速减少。显然,微管解聚使微管蛋白趋向不稳定,这意味着正常情况下,微管蛋白在稳定其本身的mRNA起着某种作用。这一机制即构成了某种基因在细胞质中的自动调节。

④特定mRNA转录效率的控制

如前所述,mRNA更新的差异是细胞质中基因调控中的一种类型。转译的差异也能大大影响基因表达。转译调控的发现首先是与观察到卵细胞中贮存的所谓“母亲”mRNA的延迟使用这种现象有关。在许多脊椎动物和无脊椎动物的未受精卵细胞质中贮存的RNA有着mRNA的特征,即正确的长度,5'帽子和3'聚A。在卵未受精时,蛋白质合成很慢;受精后,蛋白质合成急剧增加。由于这时蛋白质合成的增加是在没有任何新mRNA形成的情况下

发生的，因此，肯定与转译控制有关。

蛋白质合成的这种变化不但是量的而且也是质的。例如，贻贝 (*Spisula solidissima*) 卵中，受精前形成的某些蛋白质在受精后的合成几乎都不是那样快。而其它蛋白质在受精后则大量出现。但是，从受精卵和非受精卵提取总RNA并用细胞提取液进行转译时，却可以看到受精前、后都存在同样的mRNA。原先转译“暂停”的某些蛋白在胚胎发生的某一时期看来得以起始，因为不管是受精卵和非受精卵，其不转译的mRNA是不与核糖体结合的。

哺乳动物的核糖体蛋白也呈现转译调控。若将培养细胞置于无蛋白培养基中而使生长暂停，核糖体蛋白的mRNA则不与多聚核糖体结合，因而不再转译。若培养基中再补充血清，mRNA则再次被核糖体结合而转译。

HeLa细胞被腺病毒感染后，晚期也呈现转译调控。细胞的原有mRNA依然存在但不转译；病毒的晚期mRNA转译构成了所合成的蛋白质90%以上。除了病毒mRNA之外，病毒基因组还编码一种小RNA (160核苷酸)，它是由RNA聚合酶III所合成。这一RNA称为VA RNA。在细胞内，VA RNA是细胞质和细胞核中均存在的核糖核蛋白颗粒的一部分。若编码VA RNA的病毒序列缺失，所合成的病毒RNA与正常病毒感染时所合成的相同，但病毒mRNA的转译都减少10倍。这种情况说明，这种小的核糖核蛋白颗粒在转译中起着某种直接的作用。推而广之，看来有可能各种mRNA也需要某些小的核糖核蛋白颗粒来帮助其有效的转译。

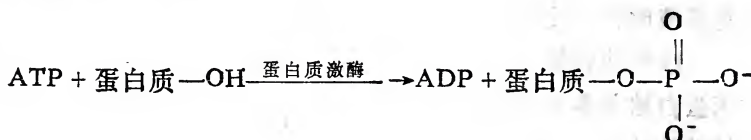
(6) 转译总速率的控制

只有为数很少的特定蛋白质行使转译控制。但各种细胞要使蛋白质合成正常速率发生变化，所有mRNA都行使转译控制的机制。例如，如果将温度升到40℃以上，哺乳类和昆虫培养细胞的大多数转译起始都被抑制，但却刺激了热激蛋白的形成。热激蛋白质基因的转录的增加有利于热激mRNA的转译。

蛋白质合成普遍抑制的另一个例子是发生在各细胞周期。当细胞进入有丝分裂期，转译起始则降低速度，蛋白质合成速度比

正常情况下降30%。起始频率下降是由于多聚核糖体数量减少，即每个mRNA得到较少的核糖体。虽然有丝分裂期间RNA合成大幅度下降，但mRNA数目的减少尚不足以成为蛋白质合成减少的原因；显然转译控制也是一个因素。

细胞也采用抑制总蛋白合成的机制。其中的一种机制可能是蛋白质激酶使起始因子磷酸化。这些激酶将磷酸加到丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上，即，



例如，当蛋白质起始因子eIF₂（真核的起始因子2的缩写）被磷酸化时，它就处于失活状态。在图2-32所描述的实验系统中蛋白质激酶在缺乏血红素或有双链RNA片段存在时可以触发磷酸化

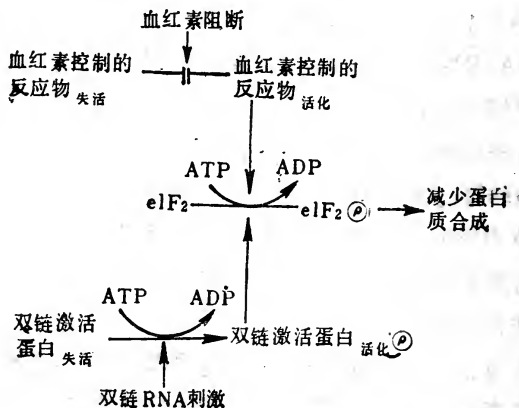


图2-32 红细胞蛋白质的转译总速率控制机制，其核生物转译起始因子2(eIF₂)可以通过两种可能的机制被磷酸化，致使在促进蛋白质合成的起始时活性很低。血红素控制的反应物是一种含激酶的抑制性复合物，只在血红素缺乏时被激活。因此，在有双链RNA存在时，或缺乏血红素时，才导致eIF₂的磷酸化而减少蛋白质合成的起始。

作用。因为血红蛋白含血红素和珠蛋白，两者的平衡由转译控制来维持；血红素的减少导致珠蛋白mRNA转译的减少。所有细胞都可能含有这些蛋白质激酶，除了血红素和双链RNA之外，许多因子也可以影响它们的活性。

(7) rRNA与tRNA的调控

前面各节讨论的是蛋白质编码基因的调控。当然蛋白质编码基因比其它类型基因来得多，而且大多数细胞的特异性寓于蛋白质编码基因的调控。虽然如此，细胞生长与发育中的一个重要因素是RNA聚合酶I所转录的核糖体基因和由RNA聚合酶III所转录的小RNA基因的调控。

核糖体RNA合成的调控在各种细胞类型和各种生物中并不在同样的水平上。在营养物贫乏，如缺乏氨基酸的培养基中的细菌比在丰富培养基中的生长要慢得多。这时生长缓慢伴随着前rRNA合成的停止。细菌中前rRNA合成的控制要有多聚磷酸5'ppGpp，在不生长的细胞中，这种物质的浓度会增加。ppGpp在抑制核糖体基因转录的起始中起着直接的作用。这种所谓即时的“严谨型”应答引起核糖体形成的大量减少。酵母细胞也有这种停止核糖体形成的严谨型应答。饥饿或孢子形成时，核糖体RNA的形成至少减少80%。

但在哺乳类的培养细胞中，在必需氨基酸饥饿时，前rRNA继续合成，并维持在正常速率的30—50%的水平。这时没有新的核糖体蛋白的合成，因此没有新的核糖体的装配；前rRNA甚至也降解。现在已知在脊椎动物中发生的一些核糖体基因转录的调控。例如，蛙的胚胎在受精后16小时才开始前rRNA的合成（图2-33）。在形成卵期间，核糖体的各种基因上千倍地放大，前rRNA合成和核糖体的形成也相应增加。这时核糖体贮存在卵中，在胚胎早期的细胞分裂时，这些核糖体随之分配到各子细胞中，直到大约12—14次分裂之后，前rRNA的合成才激活。但哺乳动物的卵中，核蛋白体并不大量贮存，前rRNA转录在两个细胞期即开始。

前rRNA的合成

| | 细胞生长时 | 氨基酸饥饿 (无细胞生长) 时 | | |
|----------------------|-------|-----------------|--------------|--|
| 细菌 | + | - | | |
| 酵母 | + | - | | |
| Hela细胞 (及哺乳类的其它培养细胞) | + | - | (但无新的核蛋白体形成) | |

| | | | | | | |
|---------|-----|--------------------------|-------------------------|--------------|---------|---------|
| 蛙生命周期: | 受精卵 | → 早期细胞分裂 (4000—16,000细胞) | → 囊胚中期 | → 胚胎成蛙 | → DNA放大 | → 卵胚种细胞 |
| | - | - | + | + | | |
| 小鼠生命周期: | 受精卵 | 两细胞期 | 胚胎 | 组织 (肝、脑、脾、肾) | | |
| | ? | + | + | + | | |
| 肝再生: | 正常肝 | 再生肝 | + (前rRNA加I增加 → 核糖体形成增加) | | | |

图2-33 不同生物中前rRNA合成的控制型式

也许大部份哺乳动物细胞对前 rRNA 合成行使较小的转录控制。各种组织的细胞中,前rRNA的合成却处于大致相同的速率,它们的差别则在于细胞更新的速率。有些情况下,前rRNA加工的效率显然调节着核糖体的形成。例如,哺乳动物在肾切除后,剩下的肾有一种代偿性异常肥大(生长),重量至少增加50%。伴之以这种重量增加,核糖体形成量也增加,但核仁RNA的合成并不增加。显然,前rRNA是被有效地加工。

再生肝也有同样的现象。哺乳动物在失去大量的肝组织——如手术,感染或化学中毒时,余下的肝组织在数天内再生成正常大量的肝。这时细胞质中新的核糖体也增加,但细胞核内前rRNA合成并不增加。因此在成年哺乳动物细胞中,控制 rRNA 形成的方式看来是前rRNA的这种差动式加I。当然,再生期间新的核糖体蛋白也需要使同样量的mRNA转译增加。

4. 转录调控的机制

关于真核基因调控的大多数实验及其推理都是围绕和集中在转录调控。这是不无道理的。因为转录起始及其发生的频率是基

因调控最基本的。相当多的蛋白质编码基因可能正是在这一水平上，而不是其它水平上进行的调控。

在考察真核生物的转录调控的机制时，有两个主要的层面需要着重加以分析。首先，如前所述，真核生物没有像原核生物那样的操纵子及与其紧密结合在一道的调节基因。真核生物的转录受到特定的同域作用序列（cis—acting element of DNA）的影响，这些同域作用序列有些可能与受它调节的基因保持一定的距离（如增强区或类增强区）；同时也受到所谓跨域作用因子（trans—acting factor）的调控，这些跨域作用因子是一些可扩散物质，诸如蛋白质或激素-蛋白质复合物。很多场合下，转录调控是通过同域作用序列和跨域作用因子复杂的相互作用而实现的。蛋白质与RNA聚合酶结合也可能改变其活力与特异性。研究这些特异性的序列要素及与之作用的调节物的特异性及其分子细节是弄清真核基因调控机制最基本也是至关重要的一个内容。

其次，真核生物的转录是在真核染色质上进行的位点专一的作用，它取决于染色质结构在特定区域中松弛或解盘绕而游离出特定的DNA。这种变化可能包括核小体的消除和结构的改变，或DNA本身局部结构的变化，如螺旋的转开，正常的右手螺旋转换成左手螺旋即Z-DNA的形式，或DNA的局部超盘绕等等（图2-33）。DNA拓扑学上这许多的变化可能通过拓扑异构酶（改变DNA盘绕程度的酶）的作用。染色质上结构的变化或许导致“裸露”出的基因的自动转录；或许这些“裸露”的基因进一步受到特异性因子的正调节或负调节。确实，活动着的基因与不活动的基因之间在染色质结构上有着很多的差异。研究这种变化的细节及其所达到的境界（结构上的和功能上的）恐怕也是弄清真核生物基因调控机制所不可或缺的一个方面。

真核基因的转录调节区

真核生物基因的转录调节区要比原核生物的复杂得多。一个真核基因的转录调节区有三个层面的组织结构。在第一个组织层面上它可以分成近端启动区（包括TATA框、CCAAT框等序列要

素)和增强区,这两种结构要素之间的距离有时可达10kb尚可激活转录。增强区也有其结构层次。首先,它是由一些相互距离不到100bp的能增强转录作用的序列要素或简称增强区要素(enhancer element)组织而成的;而增强区(序列)要素则是由一些成对出现且紧挨在一起的序列亚单位组织而成。这种序列亚单位看来是增强区最基本的结构元素,因此称为增强元(enhancon)。所有这些结构成分统称为真核生物基因转录调控的同域作用成分,它们之间的相互关系可用图2-34来表示。

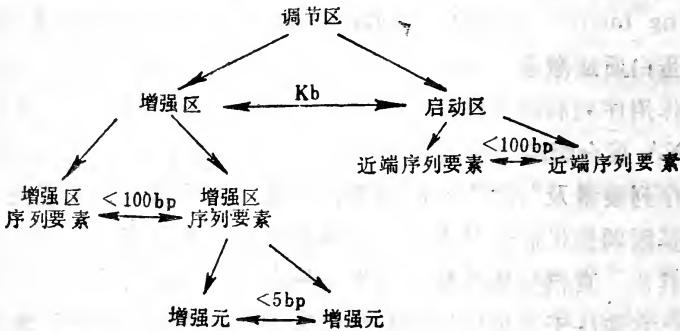


图2-34 真核生物调节区中的三种层次的组织

RNA聚合酶II启动区的多元性

通过详细的分子遗传学分析,现在已经揭示出各种不同的真核基因启动区具有一种共同的结构形式。扼要地说,一个典型的启动区包括一个AT富集的区域即所谓TATA框,和一个在起始点上游近端由8至12bp组成的序列要素,即近端启动区要素(proximal promoter elements)。

根据一般的定义,所谓启动区,就是确保转录精确而有效地起始的序列成分。前面已经介绍了启动区的基本构造,这里我们只讨论启动区的界定问题。

大多数真核生物编码mRNA的基因都具有一个TATA框。无疑,它是启动区的关键序列,因为在离体转录系统中,它可以使转录得以精确地起始;将它除去,起始依然可继续进行,但转录起点则会有所飘移。另外的两个区域,即大约在-50与-70之间和

-80至-110 之间的两个上游启动区序列，也是有效起始所必需的。图2-35所示是利用点突变来研究上游的近端启动区要素对有效转录的影响。在这三个启动区序列要素中，任一碱基的突变都导致在Hela细胞中转录下降3—5倍，而其它部分的碱基替换则没有什么影响。在CAAT框中，取代两个不同的碱基则导致转录增加3—3.5倍，这可能说明这些变化有助于蛋白质与之相作用。

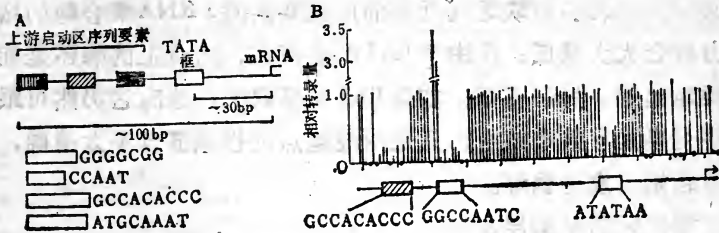


图2-35 (a) 上游启动区的位置及代表性序列。(b) β -珠蛋白基因启动区点突变的生物效应。图中每一直线的高度代表单一碱基突变所得到的相对于野生型启动区的转录量。黑圆点则表示在该处的突变不能成功。

我们把近端启动区各要素统归入启动区这一范畴，这是因为一个启动区的强度一般是由这些序列要素的数目与类型所决定的。近端启动区序列要素相对于TATA框的取向虽然并不影响转录的起始特性（这一点与增强区相似，见后），但如果在两者之间插入核苷酸则会使转录有所减弱，例如，插入的核苷酸是DNA双螺旋半圈的奇数倍比之偶数倍对转录有更大的损害。在疱疹病毒的胸苷激酶（TK）基因和人的 β -珠蛋白基因的启动区的两个上游要素之间插入15个以上的碱基，则启动区就失去功能；当它们与TATA框的距离大于30bp时，启动区的功能也受到影响。

一个启动区既然由若干独立的序列要素组成而它们所蔓延的距离远大于RNA聚合酶所能覆盖的范围。那末RNA聚合酶如何利用它们来起始转录呢？一种可能的解释是RNA聚合酶先与上游较远的位点接触，然后移向靠近起始点的位点。另一种可能是，生物体内DNA并非以直线的形式展开，亦即染色质式的紧缩构造可能使一些位点并置在一起。RNA聚合酶的结合位可能是由某

些不相邻近的序列组成，但可以通过与 DNA 结合的蛋白质使它们靠拢起来。这种情况也进一步说明启动区的各序列要素间的距离是很重要的。

上述的这两种可能性中，不管是哪一种，都说明距起始点较远的近端要素对 RNA 聚合酶的最初结合是重要的，而距离较近的近端要素则是使该酶维持着某种构象以便能正确识别转录起始点所必需的。因此，当缺乏远近端的序列要素时，RNA 聚合酶的结合能力就会大大减低；但由于 TATA 的存在，结合上的酶还是能够精确地起始。另一方面，如果 TATA 框缺失，这时它仍然可跟近端序列要素有效地结合，只是围绕起点的接触部分不太精确，而导致起始位发生飘移。

增强区的结构层次

增强区是能使与之连锁的基因转录活性增加的 DNA 序列。SV40 增强区是一个很好的例子。它是在缺失突变研究中发现的第一个增强区，是位于 SV40 早期转录单位上游的一段 140bp 的序列，实际上是两个 72 碱基对的串列重复。最初的实验是将这一序列与 β -珠蛋白基因或 SV40 的 T 抗原基因连锁在一起，不管它以什么方向排列 ($5' \rightarrow 3'$ 或 $3' \rightarrow 5'$)，甚至与基因相距 3000 碱基对以上，或是把它置于基因的下游，均可使基因的转录增加达 2 个数量级之多。这是有史以来首次发现的增强区效应。简单地说，增强区有两个显著的特性：第一，增强区对特定启动区有一种远程效应，且这种效应与其位置和取向无关；第二，增强区的生物学效应需要特定的蛋白质因子的参与。

离体诱变实验表明，SV40 启动区是由三个有功能的序列要素或称主区 A、B 和 C 构成（图 2-36）A 或 B 或 C 序列要素单独存在时，其增强区活性会减弱；但每一序列要素的单纯倍加或任两种序列要素组合起来则使活性提高，这种协同效应也与它们位置和取向无关。突变分析还表明这三种序列要素中的任一个的突变都可使增强区失活，但这时若将其余两个当中的一个序列要素倍加又可使其活性复原。虽然每种序列要素中的序列彼此不相同，但

它们有着相似的作用，因为只要有足够数量的野生型序列要素（不管哪一种或什么样的组合）都可产生增强区活性。

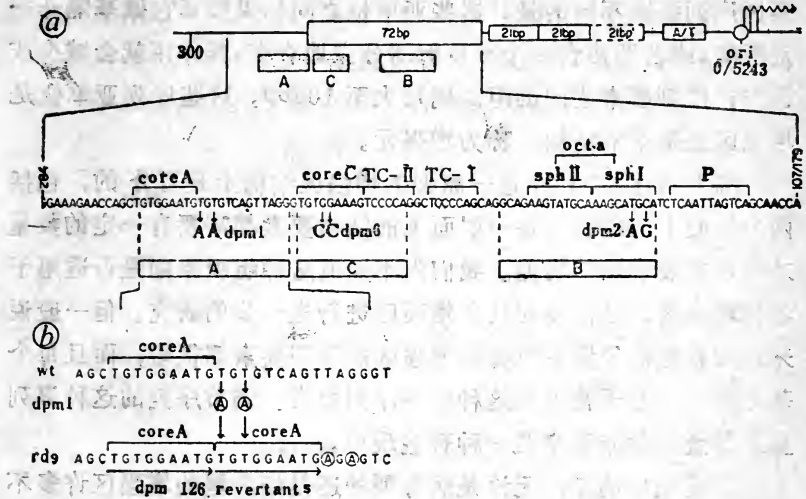


图2-36 SV40早期基因的启动区、增强区

a. SV40早期启动区的示意图。自右至左：

转录起点、复制起点、TATA框、三个完整的21碱基对重复序列（其中两个有完全相同的序列），和一拷贝的72碱基对的重复序列。下方的A、B和C方框代表三个增强区序列要素及其相应位置。增强区的核苷酸序列（179—284）下方三个点突变（dpm1，dpm2和dpm6）的碱基变化和三个序列要素的位置；上方标明了一些重要序列图式即增强元的名称。b. 野生型A序列要素及其侧翼部分的序列。圆圈的字母表示dpm1突变。rd9的结构是在dpm126的三个回变株即rd 51，rd110和rd136中发现的core A倍加。

这种倍加效应反证了增强区在序列要素的层次上分成两个部分的状态，或者说，它们是一分为二的。这种属性在增强区序列要素低一层的序列亚单位中又一次再现。SV40增强区缺陷型突变株dpm126是A、B和C序列要素的三联突变。通过core A这种序列亚单位的渐次倍加可以得到回变株，第一次倍加得到了9 bp的core A的倍加，第二次倍加则得到两个拷贝的18 bp的新片段。两次倍加的结果说明，core A的倍加产生出一种新的增强区序列要素。SV40增强区序列要素A和B都是含有亚单位的（core A或

sph序列图式,见图2-36b),而且都是双元的。这些亚单位的同种倍加或是不同种的组合都可以产生新的增强区序列要素。但与增强区序列要素不同的是,这些亚单位之间如果被其它碱基隔开一定距离,或者即使含多个单位但却分立地存在,其作用就会减少或消失;序列要素之间的距离则可大至100bp。这些序列亚单位是增强区最基本的结构,称为增强元。

综上所述,SV40这一原型的增强区结构上是可分的,包括两个层面上的组织,每一层面上的结构要素都需要有一定的数量才有可能表现出其功能。我们尚不知道这种组织原则是否适用于各种增强区,这需要对其它增强区进行进一步的研究。但一般说来,对特定信号发生应答的增强区的序列要素都很短,而且每个基因都含有若干拷贝的这种应答序列要素。调节序列的这种串列重复的叠加效应看来是一种普遍现象。

还应指出的是,无论是病毒型的还是细胞型的增强区许多不同功能特征的序列要素,诸如正调节和负调节的序列要素,定制型表达和诱导型表达的序列要素,除此以外,细胞型的增强区还可能包括拓扑酶结合的序列要素和核基质附着的序列要素等等,所有这些序列要素都是特定基因的表达所必需的。

跨域作用因子(trans-acting factor)

如上所述,转录调节区是与特定的蛋白质编码区连锁在一起的DNA序列成分,因此称为同域作用成分(cis-acting element)。它们是有组织的、由特定序列要素有机组成的,虽然不同的同域作用成分具有不同的结构要素。同域作用成分的作用模式尚有许多未知的内容,需要进一步深入研究。但是有一件事是明显的,这就是这些序列要素是作为一些可扩散的,与DNA结合分子的靶位;它们正是通过与这些DNA结合分子相互作用而表现其特定的功能。这些DNA结合分子则统称为跨域作用因子。其中有一些如类固醇激素受体蛋白复合物早已有过不少研究并已加以纯化。当然有些尚待发现。

跨域作用因子由它所作用的基因以外的基因编码

sequence, 简写UAS), 引起各酶mRNA的增加。GAL4蛋白本身则受到另一基因产物 (gal 80) 的负调节。但目前尚不清楚GAL80蛋白是否与DNA结合。

专一性地与同域作用序列要素相结合的跨域作用因子

如前所述, 真核生物基因的启动区与增强区是由若干各自可以区分的序列要素所组成。离体转录研究表明, 由RNA聚合酶II转录的基因 (亦即II类基因) 转录的精确起始需要一些可溶性因子, 如TATA框识别因子 (TFIID)。这种因子直接结合在启

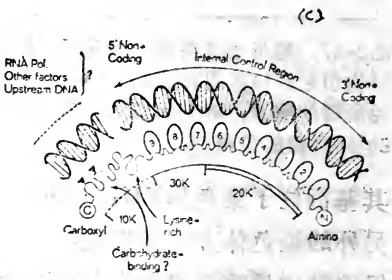
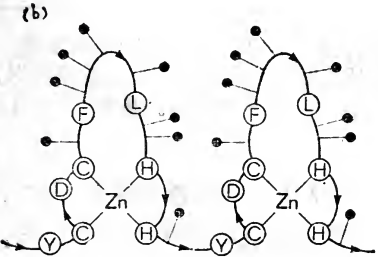
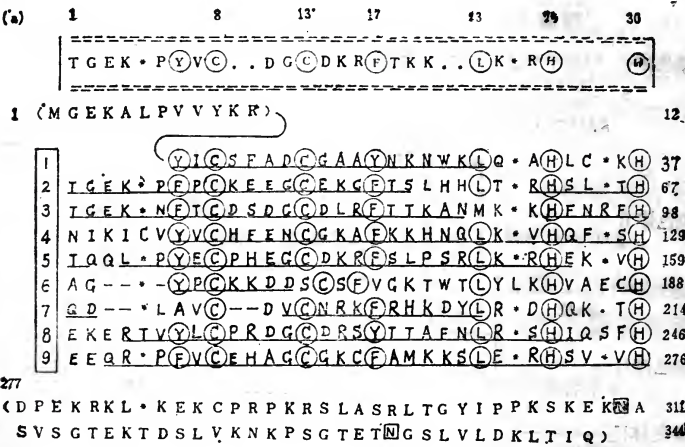


图2-38 (a) 爪蟾转录因子TFIIIA的氨基酸序列。注意9个大致相似的重复单位; 上方的方框给出了这9个重复单位的契合序列, 其中8和13位的半胱氨酸和26和30位的组氨酸与锌离子(Zn^{2+})络合成如 (b) 中所示的结构。(c) TFIIIA的结构特征及其与DNA相互作用的模型。

动区的近端序列要素上。此外还有各种各样的蛋白质结合到增强区或启动区的远端,参与基因转录的调节。在已知的转录因子中,有些是大多数基因表达所必需的,如Spl, CTF等(表9);而大多数因子则只限于在特定的基因上起作用,如 HSTF, USF/MLTF等。还有一些则参与特定基因对特定生理条件和发育程序中其它基因产物的应答中诱导基因的表达。

既然转录因子是专一地与DNA上特定的序列要素相结合而

表9 某些转录因子及其所结合的序列要素

| 因子 | 种属 | 启动区 | 识别位点 |
|---------------------|----|----------------------|---|
| B | 果蝇 | 启动区TATA框 | TATA框/起点 |
| TF11D | 人 | 腺病毒 | TATA框 |
| CTF/CBP | 人 | 腺病毒, 珠蛋白, TK | CAAT框 |
| USF/MLTF | 人 | 腺病毒, 晚基因 | GGCCACGTGACC |
| Spl | 人 | 启动区GC框 | $\begin{matrix} G & GGGCGG & GGC \\ T & & AAT \end{matrix}$ |
| HSTF | 果蝇 | 热激蛋白基因 | 热激通式序列 |
| OTF-1 | 人 | 纤维蛋白H2b | ATTGTCAT |
| OTF-2 (B细胞特异) | 人 | 免疫球蛋白 SV40 | ATGCAAAT |
| f-EBp | 人 | c-fos增强区 | $\begin{matrix} \longrightarrow & & \longleftarrow \\ GATGTCATATTAGGACATC \end{matrix}$ |
| Ap1 | 人 | 佛波酯诱导增强区 | } TGACTCA |
| GCN4 | 酵母 | 氨基酸生物合成基因 | |
| pJ ^{an} 19 | 人 | 原癌基因 | } CGG (N ₁₁) CCG |
| GAL4 | 酵母 | 酵母基因上游激活序列 | |
| Ap2 | 人 | hMFI _A | $\begin{matrix} TCC & A & GCG \\ CTT & C & CCG \end{matrix}$ |
| NF-1 | 小鼠 | 白蛋白启动区 | TGG $\begin{matrix} A \\ C \end{matrix}$ N ₅ GCCAA |
| NFY | 人 | MHCII类Ea基因 Y-序列要素 | $\begin{matrix} T & T & & T & AA \\ & G & CTGATTGG & & CT & CC \end{matrix}$ |
| coup | 鸡 | 伴白蛋白基因上游启动区 | GGTGTCAAAGGTCAAAC |
| E2F | 人 | 腺病毒E2启动区 | TTTCGCG $\begin{matrix} C \\ G \end{matrix}$ |
| mycPCF | 人 | 原癌基因c-myc启动区 | AGAAAGGGAAAGAA |

起作用，那末，蛋白质分子上的DNA结合区的特性将是有趣味的问题。对爪蟾的5S RNA的转录因子TFIIIA的分析表明，这种蛋白质具有9个相似的串列重复单位（图2-38a）；每一单位大约由30个残基组成，其中有两对固定位置的半胱氨酸和组氨酸残基与锌离子络合而令其间的一些残基回折成为一种指状结构而有锌指区（Zinc finger）之称（图2-38b）。这些锌指区可能很好地逐个适配于DNA双螺旋的大沟螺程（图2-38c）。

TFIIIA含有这样多的锌指区，从进化的角度上说可能是通过基因的倍增而来的；而由于锌指区是具有核酸结合能力的一种自我完善的小区域，就有可能出现于其它有类似功能的蛋白质中。事实上，自从1985年TFIIIA这种锌指结构得以确认以来，已经发现了许多蛋白质具有这种结构特征，表10所列的只是其中一部分。

需要指出的是，以锌为重要成分的蛋白质折叠小区的这种三级结构与原核生物的调节蛋白的结构图式有明显的不同。后者常常形成一种较大的蛋白质二聚体，呈对称的形态与DNA上的回文序列结合。相反，锌指结构无需参比DNA的对称性，它以串列重复单位的形式识别不同长度的DNA（或RNA）序列；各单位有大致相似的框架与少量的碱基对（就TFIIIA而言约为5对）相互作用。其作用的强度、锌指区的数目及它们之间间隔距离等使识别和结合达到高度的专一。

类固醇和甲状腺激素受体蛋白集多种功能于一身

类固醇和甲状腺激素本身造成多种多样的刺激而导致在发育、分化和生理上一系列复杂而协调的反应。这些激素分子通过与细胞内特定的受体蛋白分子相结合而激活特定的基因网络，在生理乃至行为的舞台上演出有声有色的戏剧来。

这些相对说来比较简单的激素分子是如何诱导出种类如此繁多的应答呢？早在70年代，人们将激素加以同位素标记，发现它可以使受体蛋白产生某种变化，使后者能结合在染色体的一些高度亲和的位点上，进而导致一些基因（每细胞中50—100）的表

表10 含有与TFIIIA锌指区同源序列的一部分蛋白质或DNA序列。

| 序列或蛋白质名称 | 类型 | 锌络合或DNA结合 |
|-----------------|-------------|------------------|
| 爪蟾 TFIIIA | CC-HH | Zn, DNA/RNA |
| Xfin | CC-HH | |
| 果蝇 Serendity | (one CC-HC) | |
| Krüppel | CC-HH | |
| Hunchback | CC-HH | |
| mk1, mk2 | CC-HH | |
| 小鼠 Sp1 | CC-HH | DNA |
| 哺乳类细胞 CSV40 | ADR1 | CC-HH DNA |
| 酵母 SW15 | (one CC-HC) | CC-HH Zn, DNA |
| GAL4 | CC-CC | Zn, DNA |
| PPR1 | CC-CC | |
| ARGRII | CC-CC | |
| 人 雌激素, 受体 | CC-CC | Zn?, DNA |
| 葡萄糖皮质类激素受体 | CC-CC | DNA |
| C-erbA(甲状腺激素受体) | CC-CC | |
| 大鼠 葡萄糖皮质类激素受体 | CC-CC | DNA |
| 鸡 雌激素受体 | CC-CC | |
| 孕酮受体 | CC-CC | |
| 大肠杆菌 UvrA | CC-CC | Zn?, DNA |
| 逆转录病毒 核酸结合蛋白 | CC-HC | RNA |
| 大肠杆菌 基因32蛋白 | CH-CC | Zn, ssDNA, ssRNA |

达或受抑制。到80年代初,许多激素的受体蛋白已得以分离纯化;随之也鉴定出了许多糖皮质类激素的应答基因,并证明它们的转录是受激素调节的。这些基因都含有一段大约20对碱基的同域作用序列,是转录激活所必需的。这些序列,或者称为激素应答序

列要素（简称HRE），具有类似于增强区的特性，即它们不管是处于什么位置或取什么方向均可起作用。所不同的是它们的活性受到激素有无的制约。这些结果表明，转录调节源出于激素-受体蛋白复合物结合在DNA的HRE上。足迹法分析确证了许多激素（包括糖皮质类激素、雌激素、孕酮及甲状腺激素等）的受体蛋白分子与应答基因的HRE所结合的序列具有双价对称性，说明它们可能是跟二聚体形式的受体蛋白相互作用。

从上述这些经典的研究中人们认识到，要了解这种复杂的调节系统的根底及其赋予生物体的“养生之道”，关键的是要分析研究激素受体蛋白分子。因为根据类固醇/甲状腺激素作用的经典模型，激素配体与受体蛋白分子的结合引起了某种异构变化，而使受体激素复合物得以与应答基因启动区上的应答序列结合。正是这种结合导致了基因表达的调节。最近几年，由于受体蛋白cDNA的克隆，为阐明激素作用的分子基础提供了可能。

首先，人们利用两种表达载体来共同转染培养细胞的方法，鉴别了受体蛋白分子的三种功能区，即激素结合区、DNA结合区和转录激活区（图2-39）。这两种表达载体，一种是跨域载体（Trans-vector），它可以使正常情况下不表达受体蛋白基因的细胞有效地产生受体蛋白分子；另一种是同域载体（cis-vector），这种载体的构建是将某种激素应答的启动区与虫发光素酶（Luciferase）基因（或是任一种功能便于监测的基因）连锁在一起。这样，利用激素可将虫发光素酶基因激活，而使细胞提取液发出光来。如果要分析糖皮质类激素，同域载体可使用乳房瘤病毒的启动区，因为这种启动区有该激素的应答序列要素。共转染后，同域载体的表达在激素诱导下大约会提高500倍。通过这种双表达载体共转染的方法，可以研究突变对受体蛋白活性的影响。

通过功能分析和序列比较，现在已经意外地发现类固醇激素甚至甲状腺激素的受体蛋白分子都有同样的结构框架。并且从突变研究得出的结果意外发现了糖皮质类激素蛋白的激素结合区。如果丢失某一部分就会使它变成一种定制型的活性分子，也就是

说这时无需有激素的诱导也会有刺激转录的活性。这些结果使人们对它们的转录激活机制有了初步的了解：无论是受体蛋白的激素结合区还是激素本身，都不是DNA结合和转录激活这两种功能所必需。或者从另角度说，激素结合区在正常情况会妨碍DNA结合区和转录激活区发挥其功能。而要冲破这种妨碍，则需要有激素的参与。

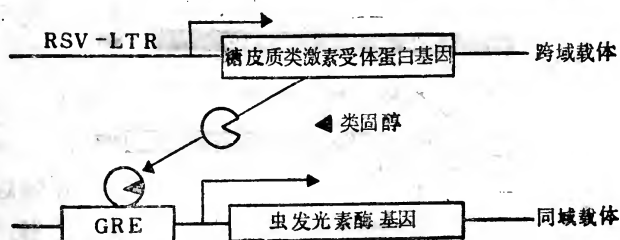


图2-39 共转染测活系统，培养细胞用含受体蛋白cDNA的表达载体转染。受体蛋白这一转录因子的功能可以通过连锁着适当的激素应答启动区的监测基因（如虫发光素酶基因）的活性来测定。此图作为例子，GRE（糖皮质激素应答序列要素）可以来自小鼠乳房瘤病毒（带有GRE增强区）

功能区这种结构上的可分割性不仅于此。人们开始推测受体蛋白分子中段高度保守的序列是DNA结合区，因为它有三个特征可以附和这种看法，即：(1) 存在着半胱氨酸富集区的结构图式；(2) 各种受体蛋白的这一中段序列高度同源；(3) 具有成丛的可能与DNA相互作用的碱性氨基酸。有些突变体可以跟激素结合，说明蛋白质结构是完整的，但不能与DNA结合。将人的雌激素受体蛋白中推测的DNA结合区换成人的糖皮质激素受体蛋白的相应部分，则发现模板特异性也发生了预料的改变。这种置换法，即所谓换指法 (The finger swap) (见图2-40)。利用这种技术，人们可以探寻和确定新的激素受体蛋白。

通过各种激素受体蛋白的DNA结合区氨基酸序列进行比较后发现，虽然这些受体蛋白分子在进化上有很大趋异，但DNA结合区却有明显的相似。它们的氨基酸序列特征使人们想起了转录因子TFIIIA；它们显然和锌离子形成指状结构。定位突变也证明

半胱氨酸残基的这些保留位置是DNA结合能力所必需的。第一个锌指区亲水性更大，预期与DNA结合的碱性残基则少见；第二个锌指区富含赖氨酸和精氨酸等碱性残基。虽然一般比较注意锌指区本身，但两个指区之间的残基及紧靠第二个指区之后的残基也有较高的保守性。因此这些中介的残基很有可能是DNA结合功能所不可缺少的。

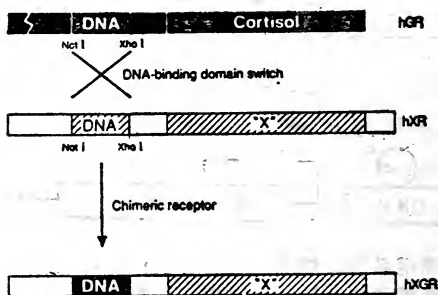


图2-40 换指法示意图。类固醇激素受体蛋白的调节结构可以互相交换而产生一种具有功能的嵌合分子。因此，若某一受体蛋白的DNA结合区被糖皮质激素受体的相应区域所置换，则嵌合的受体分子就会在相应的糖皮质激素存在时激活所换上的启动区。

要确定激素受体蛋白分子DNA结合和转录活性功能是否可分还需要进一步深入研究。跟高度保守的DNA结合区相反，受体蛋白分子N端部分的序列在长度和氨基酸组成上是高度可变的。虽然如此，它是具功能的。例如糖皮质激素受体这一区域有所缺失，其活性会减少10—20倍。有一种天然的受体蛋白突变体NTⁱ，其N端有417个氨基酸的缺失，能与激素及DNA相结合，但却无转录活性。然而野生型受体蛋白在相应部分的缺失并不失去转录活性。可能NTⁱ尚有另外的突变导致DNA结合和转录激活这两种功能无法耦联。或者换句话说，DNA结合和转录激活这两种功能的耦联可能需要某些中介的序列或结构。因此转录激活与DNA结合这两个功能区是否可以分割尚有待去确定。但在其它转录因子如酵母的GAL4和GCN4中，这两种功能是可分的。如果受体蛋白也

是这种情况，就有可能鉴定出能与DNA正常结合，但失去转录活性的受体蛋白突变体。然后也会有可能根据这些知识去建立分析转录激活过程的有效方法。

启动区与增强区的结合蛋白通过其它蛋白质的修饰起作用。有些蛋白质的调节作用可能不是直接与特定的DNA序列相互作用，而是通过对启动区或增强区的结合蛋白进行修饰而起作用。前已提及，腺病毒的早期转录单位E1B、E2A、E2B、E3和E4，如果没有E1A蛋白的出现，它们不会迅速转录。这些转录单位的上游区域没有明显的同源序列表明它们能与E1A蛋白相结合；纯化的E1A蛋白确实也不结合到纯化的病毒DNA上。E1A蛋白还可以激活某些细胞的基因，如 β 珠蛋白、热激蛋白基因，也不是通过与特定的DNA序列结合而起作用。这说明E1A蛋白激活其它早期转录单位并非通过与它们的序列要素结合的方式来实现。

最近从Hela细胞中分离到一种启动区结合蛋白(E2F)，在野生型腺病毒感染细胞的情况下，E2F与启动区的结合能力明显提高，但在失活E1A基因的突变病毒感染细胞时，则没有结合活性。在不受腺病毒感染的未分化胚胎肿瘤(EC)细胞中，也有使E2F与启动区结合提高的现象。显然，未分化的EC细胞有某些与E1A蛋白相似的成分。这种细胞基因产物与病毒基因产物E1A的相似性还表现在它们对依赖于增强区的转录作用有阻遏作用。许多病毒增强区既受E1A的阻遏，也受未分化的小鼠EC细胞某种因子的阻遏。在后一种情况下，当细胞被诱导分化时，阻遏作用则被消除。这说明分化可能导致某种与增强区直接作用的阻遏物的失活。

上述例子说明，对一些与启动区和增强区相互作用的因子的修饰可以实现基因调控中的正调节和负调节。这种因子修饰作用还可以通过佛波醇酯(phorbol esters)处理细胞时，Sv40和多瘤病毒增强区活性提高的情况得到说明。佛波醇酯可以激活一些蛋白激酶的活力。这说明增强区的结合因子或是与这些因子相互作用的蛋白质可能通过磷酸化作用来修饰。就目前所知，转录因子Ap1, Ap2, Ap3和NF- κ B都可介入对佛波醇酯的反应。这就提

出这样的可能，通过蛋白质激酶C激活是许多增强区结合蛋白的调节模式。免疫球蛋白 κ 链增强区的转录因子NF- κ B的转译后修饰可以提高其结合亲和力是结合因子本身修饰的一种例子。 κ 链基因增强区有两个不同的位点，分别由两种不同的因子与之结合。其中的一种因子存在于所有的细胞；而另一种因子则只在成熟的B细胞中可测到。原来以为这后一种因子只存在于B细胞中，故称NF- κ B。但后来发现它在许多细胞中是以一种失活的形式存在。只是需经过某种修饰才能与 κ 链基因增强区专一性地结合。例如早期前B细胞的提取物中及其它类型非淋巴细胞中均测不到NF- κ B；但用脂多糖、佛波醇脂或环己亚胺这些 κ 基因表达诱导剂处理前B细胞时，即可在其细胞核提取物中测出NF- κ B。更奇怪的是T细胞和HeLa细胞经佛波醇酯处理也可以诱导出NF- κ B的结合活性，而这两种细胞一般并不表达 κ 链基因。显然，NF- κ B在这些细胞中的活性乃至在细胞调节中的作用是受到佛波醇酯刺激的蛋白激酶C这种信号传导系统的调控的。

有些转录因子不止受到一种而是两种以上的信号传导系统的控制。例如转录因子Ap2除了受佛波醇酯-蛋白激酶C的控制外，还受到cAMP-蛋白激酶A的控制，也就是说它能够应答两种不同的第二信使。能与不止单个信号传导系统发生联系的转录因子，可能成为不同系统之间的桥梁而协调它们的效应，从而确保细胞生长时必需的一些基因在应答许多不同的信号时得以表达。此外，能被几种不同的第二信使激活（不同途径进行修饰）的因子可能要比只对单一信号作出反应的因子有更持久的转录应答，因为它们可能是连续地被某种级联的第二信使和蛋白激酶所修饰和激活。

转录调节因子通过修饰而激活的这种方式可能对回答发育期间的调节回归问题给人们某种启迪。所谓调节回归问题，就是调控基因本身的表达是如何调控的？如果全都是通过转录水平上的调控而实现，那末跨域作用因子本身的基因的渐次激活就必定牵涉到一些调节性的级联反应。另一方面，根据转译后修饰的激

活机制，组织特异性表达所需的各种因子存在于未成熟的前体细胞中，只是没有活性。这时，在新的转录作用未开始之前，细胞分化的诱导物会发生作用，将某些调节因子从失活状态转换为具有活性的形式。

同域作用序列要素与跨域作用因子的相互作用

启动区与增强区等同域作用序列要素是真核转录单位的转录所需的模板结构要素之一；跨域作用因子是与这些结构要素有高度亲和力的调制成分。显然，研究跨域作用因子之间及其与同域作用序列要素之间的相互作用的分子过程是了解真核基因调控机制的一项重要内容。

我们前面提到，一个调节区是多层面的双元组织。增强区序列要素是由增强元的同质或异质叠加。这就意味着有限的跨域作用因子有着很大的调节自由度。例如，由core A/core A和SphII/SphII所构成的一个增强区只可能应答两种不同的增强元特异的转录因

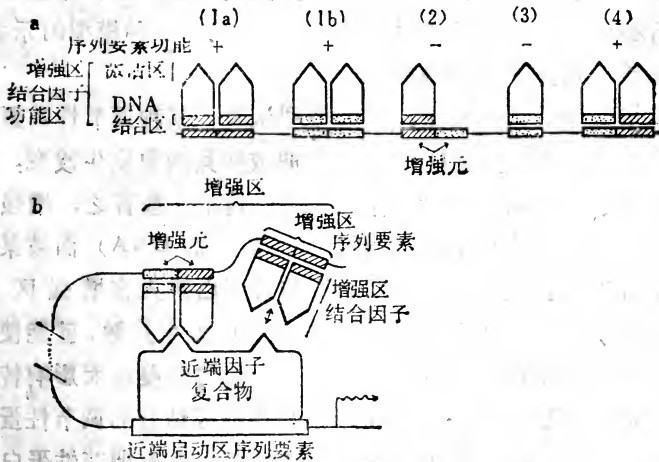


图2-41 增强区、增强区序列要素及增强元的组织层次及其与转录因子的相互作用模型。(a)跨域作用因子与增强元之间可能形成的有功能的和无功能的复合物。(b)示例两个有功能的增强区序列要素和跨域作用因子复合物与一个近端启动区因子复合物的相互作用。双向箭头表示这两种因子在转录过程中可脱离和再接触。

子；但core A/sphII这样的序列要素就可以依赖于这两种转录因子了（图2-41）。在两种增强元所组成的单一层次二元序列要素和两种因子（A和B）组合的简单情况下，就可产生四种不同的调节组合（AA，BB，AB和BA），而如果是两个层次的双元组织，则会有六种不同的可能组合（即AA-AA，AA-AB，AA-BA等）。如果再加上这两种因子的活性状态，出现的时间和空间、以及它们之间可能有的互相排斥或功能叠加等等，则会出现细胞特异或阶段特异的不同调控形式。

增强区作用的三种模型

第一个增强区的鉴别至今尚不足一个年代，但含增强区的基因的数目在文献中却急剧增加。对增强区作用机制的解释也各种各样。其中有三种概念是比较流行的，而且各自都有一定的代表性，这三种概念是：（1）增强区可以影响DNA结构的拓扑学型式，并因此而影响转录因子的活性；（2）增强区可以通过DNA的回折而与启动区相互作用，尽管它们之间距离很远；（3）增强区可能是放行必要的转录因子的报关站。图2-42是这三种模型的示意图。下面仅就此示意图作些说明

①增强区的拓扑模型：这一模型认为，某种调节性的蛋白质在增强区上结合可能使DNA发生扭曲或使其构象发生改变，而导致其它因子在启动区上发生作用而促进转录。换言之，增强区可能作为拓扑学的特化结构（“开放或解旋”的DNA）而被某些转录因子所识别。这一模型表明，调节性蛋白质先在增强区上与DNA起作用，而一旦蛋白质因子与增强区发生接触，就能使“开放或解旋的构象在整个分子上发生一种扭力的蔓延而影响转录。

②弯卷模型 这一模型认为，与增强区结合的调节性蛋白质可以通过DNA的弯曲而到达转录起始点。在有调节性蛋白质存在的情况下，DNA弯曲折回的例子是不乏见的，例如位点特异重组和DNA复制起始等这些较高的分子精度的事件都利用DNA的弯曲折回而使DNA与蛋白质相互作用。而且从热力学的观点来看这在能量上是比较“合算的”。这一模型预言了一个增强区和与

其反应的启动区的相互作用比较不受它们之间的线性距离大小的影响。

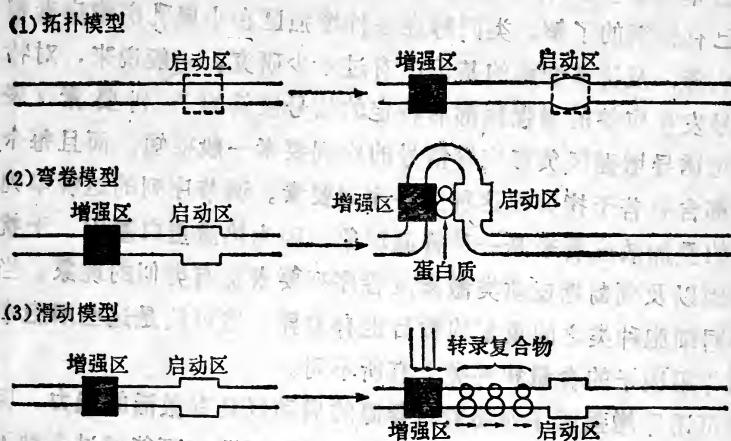


图2-42 增强区作用的三种模型

③滑动模型 此模型的要点是蛋白质因子可以与增强区的DNA序列结合,然后沿着DNA滑动到转录起始点。人们认为,增强区的专一性取决于增强区结合蛋白识别的正确性,也取决于将所产生的效果传送到所作用的启动区的精确性。由于增强区和启动区有着一定的空间距离,因而可以想象增强区激活转录通过两个不同的步骤进行。事实上前面两个模型也是把两种作用分开的。在此模型中,第一步的反应即蛋白质与DNA相结合,与前两个模型相同,但一旦结合之后,蛋白质因子则是线性地滑向附近的启动区而影响转录。

上述这三种模型,各自都有一些支持的证据,也有一些反对的证据。自然,既然转录机构的成分无论是结构上或功能上都是多种多样的,那末增强区的作用机制就没有理由是单一的。上述这些模型所代表的增强区作用模式,在任一场合下,既可以是单独起作用,也可能是与另一种机制同时起作用。

(3) 可诱导增强区的调节作用

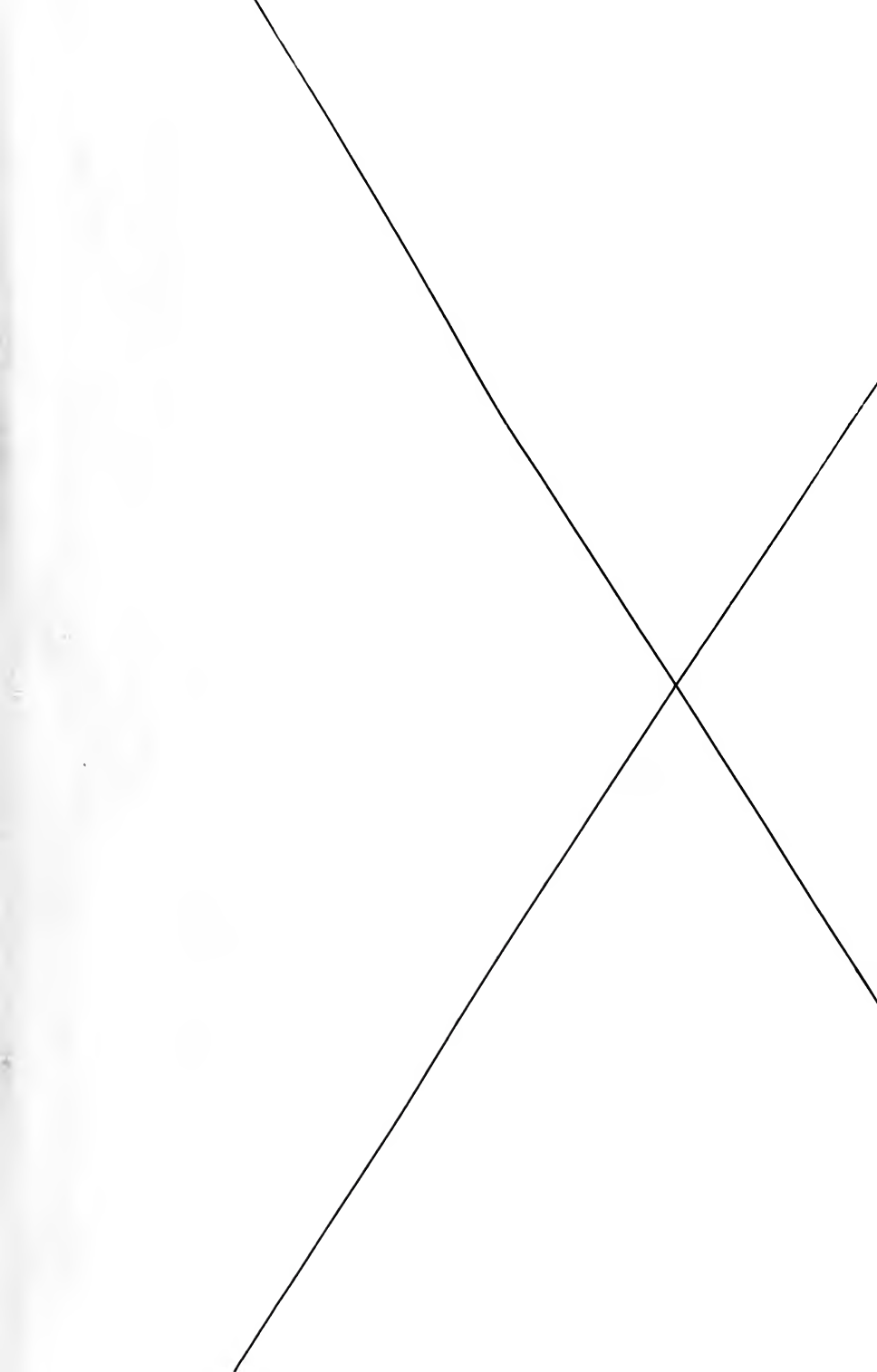
可诱导增强区包括那些对热激、重金属、病毒感染以及对生

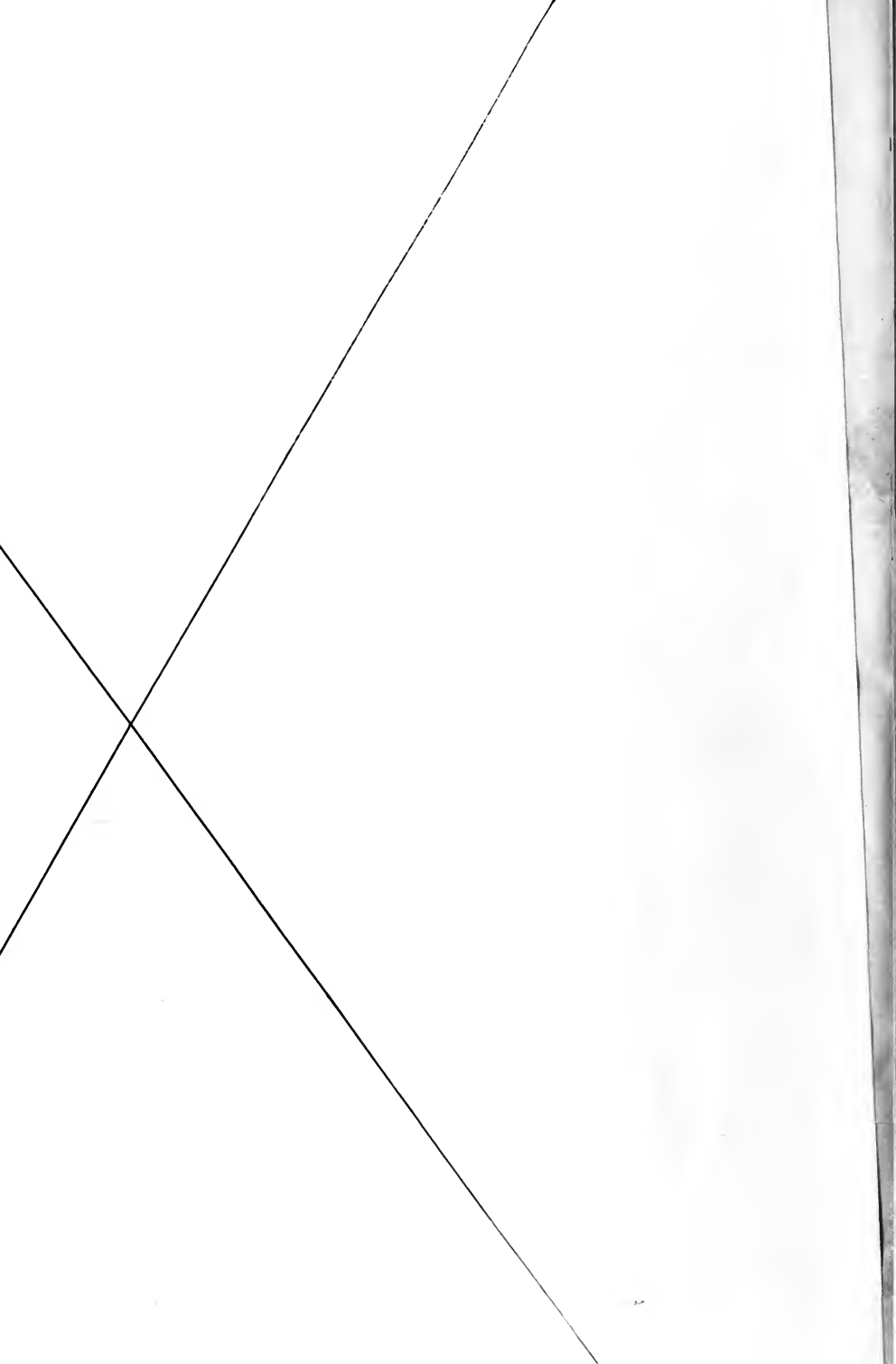
长因子和类固醇激素等信号发生应答的增强区。许多基因包括热激蛋白基因、金属结合蛋白基因、 β -干扰素基因和c-fos基因的增强区已有详细的了解。类固醇应答性增强区在小鼠乳房瘤病毒和肉瘤病毒，及许多细胞的基因中有过不少研究。一般说来，对特定信号发生应答的增强区都有特定的信号应答的序列要素（表11）。可诱导增强区负责应答信号的序列要素一般很短，而且每个基因都含有若干拷贝的这种应答序列要素。调节序列的这种串列重复的叠加效应看来是一种普遍现象，因为热激蛋白基因、干扰素基因以及葡萄糖皮质类激素应答序列要素都有类似的现象。当然不同细胞种类之间重复的数目也有差异，这可能是这些细胞中跨域作用因子的含量和种类上有所不同。

可诱导增强区序列要素对异源的启动区具有激活的能力，因此，原则上说它起着正调节的作用。这种正调节可能通过多种不同机制达到，包括正调节因子的合成或激活，或是负调节因子的失活。换言之，增强区的激活可能是某种阻遏物失活，也可能是正调节因子激活的结果。

果蝇的热激蛋白hsp26基因的温度诱导就是一种正调节因子激活的简单例子。已从果蝇中分离到一种因子即热激转录因子（HSTF这种蛋白不是由热激蛋白基因编码），它能够以果蝇、酵母及人的热激应答序列（HSE）相结合而促进转录作用。虽然在未作热诱导的细胞提取物中，这种因子是具活力的，但诱导后却大大增加它与HSE的结合活力。无论在活体内或在离体条件下，HSTF常常占据不止一个HSE结合位点，而且在多个位点上结合的HSTF可以相互配合。第一个HSTF分子结合后，引起DNA弯曲，这可能有助于第二个HSTF因子的结合；而第二个HSTF因子结合后使DNA再发生另外的构象变化，这种构象上的变化对触发转录是很重要的。

干扰素基因的调控则基本上是一种负调节机制。干扰素的合成一般在正常生长的培养细胞或在动物体内是检测不到的。但若遇到诱导物如病毒或双链RNA，则I类干扰素即 α 和 β 干扰素含量





就会增加。诱导主要是促进转录。干扰素基因的调节区 (VRE) 由两个调节区要素组成, 一个为负调节序列要素, 另一个为定制型转录序列要素, 两者序列略有重叠。负调节序列要素的缺失突变会导致在不存在诱导物的情况下也会大量转录。若将负调节区与异源的启动区组合起来, 则会抑制转录; 而将定制型序列要素与异源启动区组合, 则它可起着定制型增强区的作用, 即无诱导物存在时也促进转录作用。足迹法分析也表明, 负调节区在诱导前不被脱氧核糖核酸酶 I 的水解, 而诱导后则被水解。当然, 定制型转录区也可能对诱导产生应答。因为若将它置于异源启动区上游也有少量的诱导效应。综合以上结果可以说明, 干扰素基因的激活既包括在负调节区上阻遏物的驱除, 也包括正调节的转录

表11 可诱导增强区的一些信号应答序列要素

| 所属基因 | 应答信号 | 序列要素 |
|-------------------------|------------|--|
| MMTV | 糖皮质 类激素 | GGTACANNNTGTTCT |
| MSV | | |
| 人生长液素 | | |
| 小鼠金属结合蛋白II _A | | |
| 酪氨酸转氨酶酸 | | |
| 色氨酸加氧酶 | | |
| 鸡溶菌酶 | 雌二醇 | GGTCA _G ^C N _G ^A TGTCCT |
| 大鼠泌乳激素 | | |
| 凡螾卵黄原蛋白 | | |
| 鸡卵黄原蛋白 | | |
| 鸡伴白蛋白 | 干扰素 | TTCNCNACCTCNGC- AGTTTCTCTTCT-CT |
| MHC I类 | | |
| HLA-A ₃ | 镉 | T _C - ^G _T CG-CCC ^T GGC _C ^T |
| 金属结合蛋白 | | |
| 核酸二磷酸羧化酶 | 光 | CATTATATATAG _A ^C |
| 热激蛋白 | 热激 | CT-GAA-TTC-AG T _C CAGAAAGTT _{TC} ^{CT} AG |
| | | |
| 大豆 | | |
| c-fos | cAMP | TGACGTCA |

因子的激活。

(4) 组织或细胞特异性表达中跨域作用因子与同域作用序列要素的相互作用

在同域作用序列要素控制下的组织特异性表达需要一些只在分化了的细胞中才存在或激活的起正调节作用的跨域因子与之相互作用。在非特异性的组织或细胞中,或者没激活或者被“熄火”。因此,组织特异性表达的调节主要是正调节或负调节,或是两者兼有之。

白蛋白基因在哺乳动物发育中的表达具有组织特异性和时序调节的方式。在成年个体中,白蛋白(主要的血清蛋白质)由肝细胞合成,胎儿发育早期其浓度处于低水平,出生后则很快达到高而稳定的水平。胎儿的肠管或卵黄囊也少量合成白蛋白,但是成年个体则毫无例外地是在肝细胞中合成。

啮齿类肝脏发育中以及在不同的肝癌细胞株中,主要在转录起始这一层面上调节白蛋白的合成。组织特异性所涉及的DNA序列则位于帽子位点上游的约170碱基对内。这个区域的序列在大鼠、小鼠和人之间保守程度很高,在大鼠中这个区域可以界定出两个启动区近端序列要素即PE和CCAAT区,及三个远端序列要素即DEI, DEII和DEIII(图2-43见插页)。足迹法分析表明,这些序列要素都有特定的蛋白质(或蛋白质复合物)与之相结合,在大鼠中,这段约50bp区域同样也可以界定出近端的A和B两个序列要素,及远端的C、D、E和F四个序列要素。这些序列要素也都有特定的蛋白质(或蛋白质复合物)与之相结合。大鼠与小鼠的情况惊人地相似,白蛋白基因启动区上几乎每一个核苷酸都被调节因子所占据而形成多蛋白质DNA复合物。

在小鼠白蛋白基因的近端启动区,来自肝脏的和其它非特异性组织的白蛋白的结合方式与范围有所不同,如肾脏没有任何蛋白与之结合,脾脏与肝脏相比,有不同的结合形式,脑来源的蛋白比肝脏的结合范围要大等等。而在远区DEII约-100处,脑、肾的蛋白没有明显的结合。在DEII(约-120)区,肝脏蛋白因子比其

它组织的结合得更完全。分化的肝癌细胞 (H4II) 及其去分化细胞 (H5) 相比, 也有明显不同。前者可以有效地转录白蛋白基因, 如肝脏一样。后者则不能转录该基因。H4的提取物与启动区的结合型式与肝提取物相同。而H5提取物虽也能结合, 但在远端区的结合则有明显的差别。这些蛋白结合(尤其与DE1和DE2的结合)与转录之间的关系说明这些因子起着正调节的作用, 但也不排除有负调节。若将分化的肝癌细胞与成纤维细胞或去分化细胞融合, 则白蛋白基因(及其它肝功能基因)转录就会停止。这说明非肝细胞有某种负调节因子, 防止正调节因子的作用(通过干扰其合成或干扰其结合)。H5细胞确实有某种蛋白与DEI, II和III区结合的因子, 而与H4的结合足迹明显不同。

与小鼠情况相似, 大鼠白蛋白基因 5' 侧的-172至-58之间的序列也为有效的肝特异性表达所必需。其中C区(即相当于小鼠近端的CCAAT区)也都可以与肝脏及非肝组织的蛋白质结合。而结合在这端的四个位点中的三个, 即D, E和F位点上的因子, 在肝脏中比其它组织(如脾与脑)浓度更高。E区(约-120处)与小鼠的DEII(约-120区)一样也可与NF1及其修饰型因子结合。NF1和NF1修饰型因子均存在于肝中, 它们的含量明显地比其它组织中的含量要高, 目前尚不知道与大鼠E位点(或小鼠的DEII)相结合的不同蛋白形式是一种或同种蛋白的衍生物还是具有同种结合专一性的不同蛋白质。但是两种情况都是有案可查的。 λ 噬菌体的cro蛋白与阻遏物就是两种不同调节蛋白的最好例子。而免疫球蛋白 κ 链增强区的转录因子NF- κ B的转译后修饰可以提高其结合亲和力则说明了另外的一种可能性(详见修饰作用一节)。

白蛋白或免疫球蛋白基因都是只在一种组织或细胞中表达。许多基因则是在若干组织中或在发育的不同时间表达的。这是更复杂的基因调控。根据现在的认识水平, 关于基因在多种组织中有区别表达的调控机制, 可能想像到的大致有两种可能性, 或者说两种模型。一种模型是: 某一基因在不同组织的表达受到不同的跨域作用因子所控制。换句话说, 组织特异表达的依据是组织特

异的跨域作用因子，这种组织特异的因子或者与各别的增强区或者与同一启动区发生作用。在后一种情况下，不同的因子识别同一增强区中特征各异的序列成份，就像 SV40 增强区中的情形那样。这些组织特异的跨域作用因子对某一特殊组织中许多基因的表达进行调控。

另一种模型认为：在一基因得以表达的各种类型的细胞中存在着共同的对该基因行使控制的跨域作用因子。这些因子在各种类型的细胞中，以同样的方式与同一增强区相作用。

对果蝇的一些基因调节区域所进行的缺失突变研究表明，同一基因在不同组织中的表达需要不同的 DNA 序列，从而说明特定一个基因在不同组织中的表达是由不同的跨域作用因子进行调控的。果蝇中歧路转录的卵黄蛋白基因 *yp1* 和 *yp2*，在脂肪体和卵巢中的表达都受到 5' 侧同一启动子所控制，但在两种组织中使用的两个同域作用序列是不同的。

果蝇 (*D. Mulleri*) 幼虫乙醇脱氢酶基因 *Adh1* 在脂肪体中的表达是更为复杂的组织特异性表达。该基因经转化到果蝇 *D. melanogaster* 后，在脂肪体，马氏小管、前中胃和中胃都得到表达。在这四种组织中，该基因的最佳表达至少需要三种序列要素的控制。其中的两种序列要素位于 5' 侧的 300 对碱基中，另一个则在转录起始的 3' 侧。但若用 3' 侧的序列要素再加上 5' 侧的当中一个，则在这四种组织中的表达都处于较低水平。不同细胞类型中，使用不同的序列要素可能反映出四种组织中不同的因子有着不同的浓度，或者每一组织中不同的因子以不同的方式与这三种序列要素相作用。

5. 染色质结构与转录调控

由于染色体的许多区域中染色质的凝聚性质，人们一直认为，转录需要染色质的“束缚”状态有所“松弛”（图 2-44）。早已知道，离体条件下，组蛋白能以一种非专一的方式对 DNA 的任何转录都具抑制作用。而核小体以一种有序的螺旋状态形成的螺管结构，可以防止参与转录作用的各种成份接近转录起始点。许多

研究表明，处于转录活动状态的基因与处于不活动状态的基因，无论在DNA上的蛋白质束缚还是DNA-蛋白质结构的进一步折叠和超盘绕上都表现出明显的差别。

(1) 转录活性中心对脱氧核糖核酸酶的敏感性增加 用胰腺的脱氧核糖核酸酶处理各种组织的完整细胞核时，可以看到活动状态基因上DNA-蛋白质结构发生某种变化。这种酶可以在纯的DNA上的大多数区域进行切割，但对完整核内的DNA，则其结构有所不同。例如红细胞的前体即成红细胞的细胞核中，珠蛋白基因的DNA则比其它DNA序列更多受到脱氧核糖核酸酶的切割。

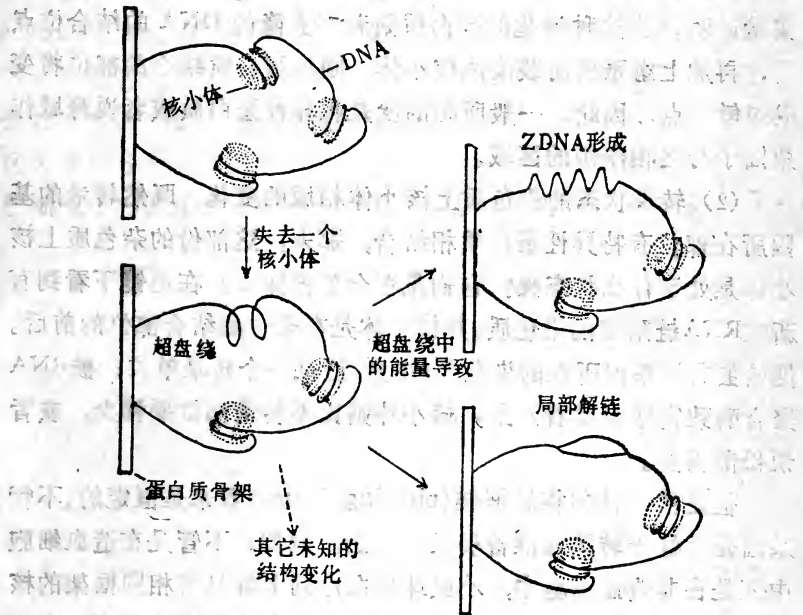


图2-44 染色质解盘绕的可能导致的结果

一个核小体的失去可能导致DNA 额外的超盘绕。超盘绕的能量可能引起DNA 的一些区域的局部解链或变呈Z构型，或者还有其它构型上的变化

而另一方面，鸡输卵管细胞核中，卵清蛋白基因的DNA序列又比珠蛋白基因的DNA更敏感。活动状态的基因对核酸酶敏感性增加，说明它们所结合的蛋白质比之不活动基因上的蛋白质是处于

一种保护性较差的构型。

活动状态的基因所在的染色质存在着对脱氧核糖核酸酶的过敏位 (hypersensitive site), 这就是那些首先受到核酸酶水解的部位, 一般是在转录起点附近。实际上这些过敏位的出现在转录开始之前。看来在这些位点上, 蛋白质与DNA之间的相互作用的性质与其它部位会有所不同。鸡的 β -珠蛋白基因5'侧近邻约200核苷酸对中有组织特异的过敏位。已经从鸡的红细胞中纯化出一种蛋白质, 这种蛋白质能专一性地与这个区域相结合, 而这DNA区域也正是成红细胞中对核酸酶敏感的位点。离体条件下的模拟实验说明, 当这种纯化的蛋白质附着在克隆的DNA的结合位点后, 再加上组蛋白而装配成核小体。则该蛋白质结合的部位将变成过敏位点。因此, 一般所指的就是特异性蛋白质或者说跨域作用因子与之相作用的区域。

(2) 转录状态的染色质上核小体相域的变化 既然转录的基因所在部位有特异性蛋白质相结合, 那末, 这部分的杂质上核小体是处于什么状态呢? 它们是否全部被除去? 在电镜下看到有新生RNA链附着的染色质, 其核小体是在聚合酶结合部位的前后。但核蛋白体基因所在的染色质(注意:这是一个转录单位;被RNA聚合酶致密地束缚着)上, 核小体则比不转录部位要稀少, 或者说松散得多。

但是核小体的相域框架(phasing frame)看来是恒定的。不管基因是否处于转录或准备转录的状态。例如, 不管是在造血细胞中还是在非造血细胞中, 小鼠珠蛋白序列上都具有相同框架的核小体相域。在红白血病细胞中, 诱导珠蛋白基因表达前后, 在启动区处看来只除去四个核小体, 但与成纤维细胞比较, 并不扰乱附近的相域框架。由于例子有限, 要归纳出一般规律尚为时过早, 但看来, 核小体所处位置有利于跨域作用因子与其所在的DNA序列可逆的相互作用。

(3) 同域作用序列要素在染色体侧环结构的基部被组织起来作为RNA聚合酶分子的进入位, 比较容易想像启动区的“开

放”状态如何导致染色质向转录状态的转变。但增强区有时距离启动区几百对碱基之外，也具有其核酸酶过敏点。这可能是通过结合于过敏点上的跨域作用因子之间的相互作用使增强区与启动区相互接触，而导致增强区与启动区之间的间隔序列向外形成侧环(looping out)。在这种侧环的基部上的多蛋白复合体会强烈吸引RNA聚合酶而起始转录。

最近的研究已明确了这种侧环的附着基部(primary loop anchorage)有一类很特异的序列，称为核基质结合区(matrix association region, 缩写MAR)或染色体骨架附着区(scaffold attached region, 缩写SAR)。有趣的是，这些序列一般都靠近增强区，而且它们都包含着与拓扑异构酶 II相互作用的序列。免疫球蛋白的重链(IgH)基因的增强区就是一个很好的说明。IgH增强区大致可分为三个主要的区段(图2-45)，中央的增强区区段在淋巴细胞中起着正调节作用，它还可以细分为多个序列要素。两翼

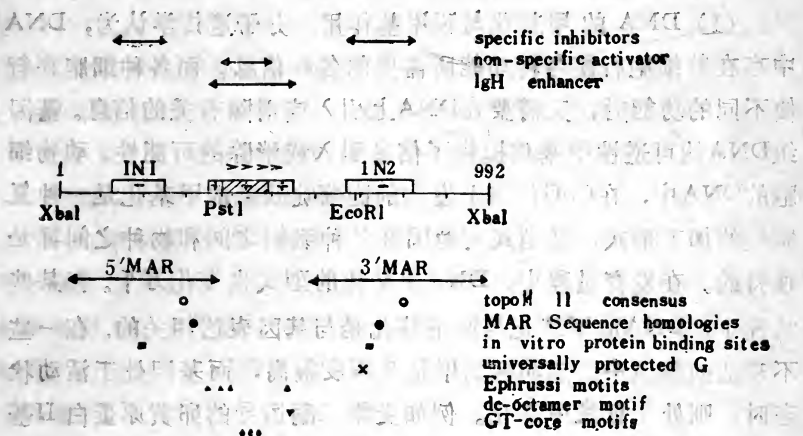


图2-45 IgH增强区的正、负调节序列要素及有关序列要素分布一瞥。这段992的XbaI片段是IgH的内含区部分、含有两个负调节序列要素(IN1和IN2)，它们在成纤维细胞中具有活性，但在骨髓瘤细胞中却无；中心部分(+)为在B细胞转异的正调节区。同时给出了(i)拓扑异构酶的契合序列；(ii)核基质附着序列；(iii)跨域作用因子离体条件下与IN1和IN2结合部位；(iv)G保护区；(v)普遍存在于许多增强区的GT-core序列要素等的相应位置。

的两个区段IN1和IN2首先是在非淋巴细胞中鉴别出来，它们与非淋巴细胞的跨域作用因子相结合，连同中央区段的中心部分在淋巴细胞中起着负调节的作用是由于IN1和IN2上结合的蛋白质分子对中央增强区所造成的空间障碍所致，因为，它们之间的距离达150碱基对。毋宁说，IN2和IN1所结合的蛋白质相互作用而形成一个侧环，而把起正调节作用的增强区夹带其间，从而防止增强区与启动区之间形成侧环结构。IN1和IN2部分确实也含有核基质结合区的同源序列ATATTT。这就产生这样的可能性，即IN1或IN2能与核基质结合。此外在IN1和IN2也存在着拓扑异构酶II识别的契合序列。从而也说明在侧环基部的杂色质区域可能引入扭曲张力。需要指出的是，淋巴细胞和非淋巴细胞的IgH的MAR都附着于核基质，并且与增强区或与IN1和IN2结合的许多蛋白质因子是共同的，但是也有某些差别。

6. 化学修饰调控

(1) DNA的甲基化与脱甲基作用 分子遗传学认为，DNA中存在着细胞行使各种功能所需要的各种信息。而各种细胞在行使不同的功能时，又需要在DNA上引入或消除有关的信息。基因组DNA的可逆性甲基化提供了信息引入或消除的可能性。动物细胞的DNA中，在CpG位点上发生的胞嘧啶残基的甲基化是一种复制后的加工形式，其型式与范围在各种组织之间和物种之间都是独特的。在发育过程中，DNA甲基化的型式也变化万千。在某些情况下，DNA的甲基化与脱甲基化是与基因表达相关的。在一些不表达的基因中，启动区的甲基化程度很高，而基因处于活动状态时，则处于低度甲基化。例如受雌二酮诱导的卵黄原蛋白II基因，其5'侧的调节区含有四个CpG位点，〔即在一525(A)，-587(B)，-612(C)和-618(D)，图2-46〕，C和D位点这部份DNA是雌二酮-受体蛋白复合物的结合部位。在雌激素处理后，在-612(C)的HpaII位点处于低度甲基化。红细胞DNA的两条链上所有这些CpG位点全部甲基化。但在肝DNA中，只在B位点处的上一段链全部甲基化，下一股链则只有50%甲基化。经雌二酮处理后数

小时内，肝DNA甲基化的型式发生急剧变化：上一股链中所有四个CpG位点变成脱甲基，与卵黄蛋白mRNA的出现相吻合。而另一股链上与之互补的CpG位点的脱甲基化则延后大约24小时。这一结果提供了一个基因受到激活时甲基化型式变化的具体细节。它异乎寻常地告诉人们，肝DNA在正常情况下，卵黄蛋白基因的5'侧翼区域具有部分的半甲基化位点，而激素处理则只引起其中调节区中一段DNA链迅速脱甲基作用，而保留另一股链上的甲基，处于半甲基化状态。

小鼠 β -珠蛋白基因5'侧翼区的甲基化型式是在离体条件下用啮齿类红白血病细胞部分纯化的DNA甲基转移酶所进行实验的结果。其5'侧翼区的-307位上有一个单独的CpG位点。另外四个比较集中出现(图2-46)。离体甲基化结果表明，-307位上的CpG不发生甲基化，而四个集中出现的CpG中，a, a'和d'甲基化程度不显著，而b, b', c, c'稍有甲基化，大量的甲基化则出现在d，在-153位上产生半甲基化。无论用从诱导的或不诱导的细胞所得到的纯化酶或粗制酶其结果都是一样的。这一结果表明，酶对CpG位点的甲基化是有选择性的，对链的要求也是有差别的。

(2) mRNA帽子的修饰 mRNA的5'端帽子的存在，可以防止外切酶的水解，从而增加了转录物的稳定性。此外，帽子的存在不但可增加前mRNA剪接的效率和精确性，而且mRNA 3'端的有效加工也是由帽子决定的。帽子对mRNA生成在稳定性、剪接和末端决定上的多重效应可能是与帽子参与了DNA-蛋白质复合物有关，而这种RNA-蛋白质是前RNA变成有功能的mRNA的过程所必需的。

帽子对mRNA的转译也有显著影响。在蛋白质合成起始时，核蛋白体的40S亚基与mRNA的结合是由帽子推动的，因为如果将帽子结构换成 $m^7G^{5'}p$ 或其它类似结构，则这种结合就会受到抑制。现已从网织红细胞中纯化了一种帽子结合蛋白(cap-binding protein)，分子量约24KD。离体条件下，这一蛋白可以有区别地促进有帽子的mRNA的转译。帽子还可以与一个220KD的

(A) 鸡卵黄蛋白II

-620
 D | C
 5'-GCGTGA CCGGAG CTGAAAGAA CACA TTGAT CCCGTG...ATGTGGC GTTGGTGC
 B | A
 -531
 3'-CGCA CTGG CCTCGA CTTTCTTG TGTAA CTAGGGCAC...TACA CGCAA CCAACG

(B) 小鼠珠蛋白(大)

-313
 a | b
 5'-AAA TGCGT TGCC...AAATAT CGGCTT CGT CCTCA CCGAAG CCTGATT CCGTAGAGC
 c | d
 -187
 b' | a' | c' | d'
 3'-TTTAGCAA CCG...TTTATAG CCGAAG CAGGAGTGGCTTCGGA CTAAGGCATCTCG

图2-46 鸡卵黄蛋白和小鼠β珠蛋白基因的5'侧翼的调节区

蛋白质(p220)及一个45KD(的多肽相当于转译起始因子 eIF-4A) 结合而形成稳定的复合物。Hela 细胞被脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 感染后, 这一帽子结合蛋白复合物被修饰而失去功能。这是颇为耐人寻味的, 因为宿主细胞被感染后, mRNA的转译是被关闭的, 而脊髓灰质炎病毒的RNA是罕见的戴帽子的天然信使。

7. 基因表达的RNA调控

(1) 反义RNA (antisense RNA) 所谓反义RNA就是其序列互补于mRNA的一种RNA。显然具有潜在的调控基因表达的可能性。在活机体内, 其调制程度有多大尚难肯定, 但无论在原核生物或是真核生物都有一些例子。

其中的一个例子就是在大肠杆菌基因组中可以随机嵌入的可转位成分Tn10、Tn10长约9300bp, 其嵌入序列 (IS10) 两端是反向重复序列。IS10的右侧序列负责编码转座酶 (催化该成分整合到染色体中)。这个基因具有两个启动区, 其中一个负责转录该酶的mRNA; 另一个启动区所起始的转录从编码区内开始, 往上游方向行进, 形成一段与酶mRNA的5'端互补的RNA (图2-47)。看来mRNA与反义RNA之间形成的一股双链对酶蛋白的转译行使负调节。

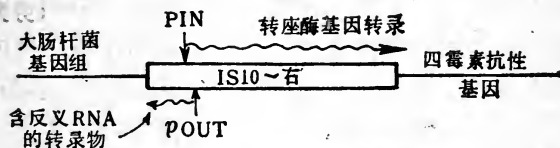


图2-47 嵌入序列IS10的转录。PIN为转座酶基因的启动区; pOUT是一个强启动区, 其负责合成的一段含36个核苷酸的反义RNA可蒙蔽转座酶基因的起始部分的码组。

真核生物中的例子是小鼠的二氢叶酸还原酶基因。该基因的5'侧翼区以相反的方向取向, 转录时产生一段180—240个核苷酸的反链RNA, 在细胞核中, 其含量很丰富, 不具聚A结构, 尚不知是否对二氢叶酸还原酶基因的表达行使调控作用。

(2) 标识序列 (identifier) 最初在大鼠的基因组中发现一

种82bp的序列，它以多拷贝的形式存在。可被RNA聚合酶II和III转录。其转录物占脑细胞核转录物的62%。这种RNA序列，命名为标识序列（简称ID序列）。原来以为它是脑特异性表达的调控成分，但最近在肝、肾、肌肉等组织中也发现了，并且存在于不同基因的mRNA的3'端，以重复形式存在。处于静止状态的成纤维细胞，用生长因子诱导后，这种mRNA可达到生长状态的水平，用脊髓灰质炎病毒及ras和myc癌基因转化后，也看到同样现象。ID序列可能是一个决定性因素，因为在兔子β-珠蛋白基因的3'非编码区插入的一个单元的这种序列，在SV40启动区的控制下，也发现类似的表达形式。ID序列的位置除了在3'非编码区外，还有若干例子说明它们也可能存在于内涵区。它们如何对基因表达实行调控，目前尚属推测。一种意见认为，是在RNA拼接的水平上进行调控含有ID序列的基因。其转录物的大小是参差不齐的，大致可分为两类，一种是大的mRNA分子，另一类是异质的小分子转录物，前者由RNA聚合酶II转录，后者可能为RNA聚合酶III所转录。会不会由于RNA聚合酶III转录的为RNA分子的调节，导致会有同种序列的大分子mRNA加工的转化呢？

(劳为德)

第三节 基因定位

基因定位 (gene mapping) 包括将基因定位于某一特异的染色体上，以及测定基因在染色体上线性排列的顺序与距离这两个内容。直至六十年代末，除了极少数遗传学的经典实验材料外，绝大多数生物种的基因定位工作进展相当缓慢。随着染色体分辨

技术、蛋白质分析技术、体细胞遗传操作技术以及重组DNA技术的发展，基因定位的方法不断增多。目前已有二千个左右的基因被定位在人的染色体上。

由于生物类型繁多，所用的基因定位方法也各有异同。有人根据生物的类型将基因定位方法分成病毒染色体定位、细菌染色体与质粒定位以及真核生物染色体定位三大类。这种分类方法使用起来较为方便，但是互有交叉、重复。根据定位方法的特点，例如只是将基因定位在某一特殊的染色体上，还是测定基因间的相对或绝对距离，也可以将基因定位方法分成三大类。这种分类方法比较清楚，但不够精细，反映不出基因定位的原理。本文结合定位的原理和方法的特点将基因定位分成七大类：遗传重组值定位，家系分析定位；利用非整倍体定位；细胞学定位；体细胞杂种定位；基因转移定位和物理学定位。

通过遗传重组所得到的基因线性排列图称为遗传图谱 (Genetic map)。如将遗传重组值作为基因间的距离，所得到的基因线性排列图称为连锁图 (Linkage map)。而用遗传重组以外的基因定位方法所得到的基因线性排列图称为物理图谱 (physical map)。根据这些图谱的结果综合绘制成的基因在染色体上的线性排列图称为基因图 (Gene map)。应当指出，有些定位方法用来表示基因间距离的单位是不同的，它们之间的转换并非易事。如分摩即CM (重组值单位)与碱基对之间的换算，在不同的基因组及基因组的不同部位是不一样的。

(一) 遗传重组值定位

每一条染色体实际上都是一个连锁的基因群。实验表明，位于同一染色体上的连锁基因并不总是作为一个完整单位遗传的，只是具有一起遗传的趋势而已。据此，摩尔根提出了“连锁的强度依赖于染色体上连锁基因的位置”的假说。这一假说导致了基因在染色体上呈直线排列的理论。A. H Sturtevant (1913)进而提出以基因重组的交换值 (又称重组值或重组频率) 作为染色体

上基因间距离的标准，从而奠定了遗传重组值定位工作的基础。重组频率定位是应用很广泛的一类方法，它可应用于各种不同的生物材料中。它的基本原理就是，成对的染色体在减数分裂过程中发生交换，交换的结果使染色体上的基因发生重组。两个基因之间发生重组的频率取决于它们之间的相对距离。因而可以重组率来表示它们之间的相对距离。下面介绍几种利用重组频率进行定位的方法。

1. 二点测交

本方法适用于通过有性杂交过程产生二倍体的真核生物。

以果蝇为例，首先要得到突变基因型 $\frac{+ +}{a b}$ 的杂合子。符号a、b分别为一条染色体上的两个突变基因，而+、+为相应的两个正常基因。将待定位的显性纯合的生物个体 $(\frac{+ +}{+ +})$ 与此位点为隐性的另一纯合子个体 $(\frac{ab}{ab})$ 杂交，其F₁代便是 $\frac{+ +}{a b}$ 的杂合子。这种双杂合子在减数分裂中，没有发生重组的配子分别为++和ab，发生重组的配子是+b和a+。将此双杂合子的个体与隐性纯合子 $(\frac{ab}{ab})$ 或半合子 $(\frac{a b}{\rightarrow})$ 的个体测交(这里 \rightarrow 表示Y染色体)时，由于这些纯合子或半合子果蝇产生的配子只携带隐性的ab或只携带有Y染色体，所以显性性状在后代中充分表现。在未发生重组的情况下，后代个体均为双显性或双隐性性状。如有非亲本性状出现，则表明发生了重组。这样，根据显隐性关系就可知道发生重组的配子数，从而推算出重组值。重组值的大小反映了两个基因间的相对距离。

2. 三点测交

二点测交法，虽可以推算出基因间的距离，然而并不清楚基因间的相对位置。三点测交因可直接反应出基因位点的顺序，故更适用于基因定位。

经典的果蝇三点测交实验是用三个性连锁的基因来做的。所用的雌性纯合子是：黄体(y)、棘眼(ec)、和残翅(ct)。它与野生型的雄果蝇杂交，F₁代雌果蝇的表型为野生型的杂合子 $\frac{yecct}{+++}$ 。将它与 $\frac{yecct}{+++}$ 的雄果蝇杂交时，这种雌果蝇共产生八种不同基因型的配子：yecct, +++, y++, +ecct, yee+, ++ct, y+ct 和 +cct。由于半合子 $\frac{yecct}{+++}$ 的雄果蝇只携带隐性的y ec ct和y染色体，这八种配子都可在后代中充分地表现出来。根据后代的表型，可统计出F₁雌果蝇产生的各类配子的比例，从而求出重组频率（参见教学实验五）。

3. 同功酶标记定位

用电泳方法及酶的染色技术，可以分辨等位基因编码的酶，在用酶作为遗传标记的基因定位工作中，同功酶是用得最多的。同功酶是指同一种酶的多种形式，它们催化同样的反应，只是反应的最适pH和最适底物浓度不同，同功酶是由不同的多肽亚单位形成的复合蛋白质。构成同功酶的不同单体是由不同的基因位点编码的。

在大量的表型标记已被定位的物种中，通过同功酶位点与已知位点的标记基因进行二点、三点实验，便能将同功酶定位在特定的染色体上。

即使没有已被定位的标记基因，同样可以测定编码酶的基因间的连锁关系。这需要将不同种类的同功酶位点配对组合加以检测。与表型标记不同的是，同功酶位点的等位基因通常是共显性的，因此从理论上来说，如果能够得到对于足够多的同功酶位点均为异质的F₁代，便能得出多个位点间的连锁关系。

4. 限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 标记定位

经典的连锁分析，只能对表型突变的位点进行定位，同功酶标记定位虽然突破了这个问题，但同功酶标记位点的数目有限，而且只分布在染色体组的部分染色体上。RFLP是一种更广泛的

遗传标记，用它来定位的原理与上述同功酶定位的原理完全一致。

在分子水平上，同一位点的不同等位基因有着不同的DNA序列，这种差异能以限制性内切酶片段长度的多态性(RFLP)表现出来。这种DNA的多态性也可能具有表型效应，但许多DNA的多态性并没有任何典型的形态学表现。用Southern印迹法（见基因工程的基本技术一章）很容易鉴定出这种因DNA序列差异而导致的多态性，从而得出大量的多态性标记位点。

一般情况下，RFLP与同功酶标记位点一样，是按孟德尔式共显性标记遗传的。在用RFLP标记定位时，并不需要知道有关性状的任何生化性质，也不必分离特定的基因，只要有单一顺序的即可。由于能够得到大量的这种DNA顺序标记，所以对不同物种cDNA来说，利用其它位点与RFLP位点的连锁分析，最终可以得出整个基因组的基因连锁图谱。有人推测，对于人的基因组来说，只需150多个RFLP标记位点，即可得到人基因组完整的基因图谱。

5. 缺失重组定位

具有不同缺失突变位点的材料也可通过DNA重组来进行定位。含有缺失突变的两个个体重组时，若缺失部分重叠，则子一代中不可能有产生野生型的重组子。图2-48是Benzer描述的噬菌体T4rII区域的一系列缺失体，每一缺失均用特定的数字表示。用该系列突变体，可以很容易地测定任何一个在rII区域的突变位置。例如将一个其位点突变尚不确知的突变体与七株带有七个大缺失片段（见图2-48上部）的突变体重组。若点突变发生在A3e片段，则此突变体就不可能与 r_{1272} 、 r_{1241} 、 J_3 发生重组产生野生型的重组体。因为这三种突变体也存在着A3e的缺失。据此可确定该点突变发生在 J_3 和 PT_1 缺失之间，进一步再用小的缺失突变体，如 r_{1231} 、 r_{184} 、 r_{250} 和 C_{33} 与A3e点突变的突变体重组，发现只有 r_{1231} 不能与此点突变体产生野生型重组体，而其它突变体均能与突变体重组产生野生型重组体。这样便可将此突变位点定位在A3e片段上。最后，可将此点突变与A3e片段的其它点突变体重

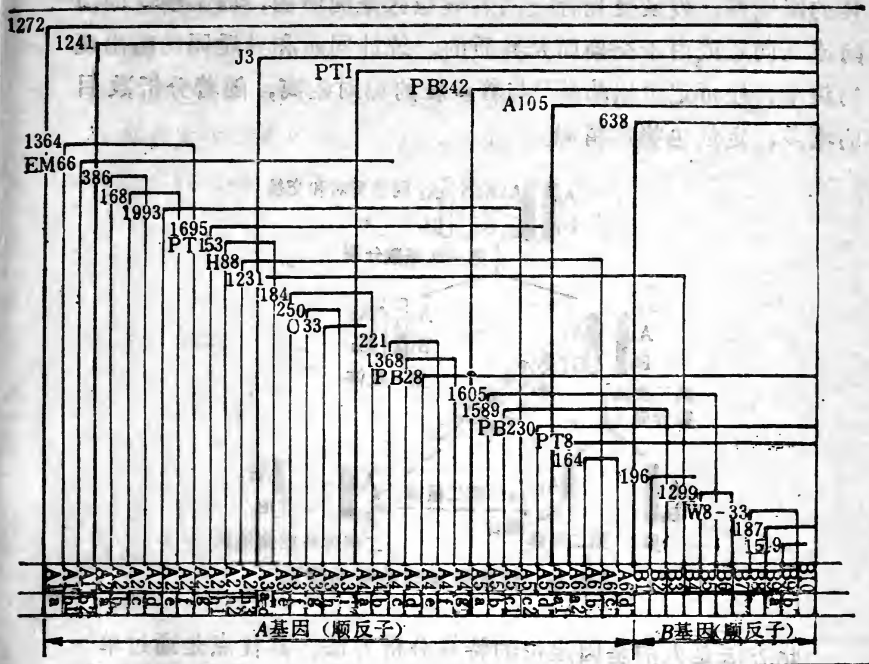


图2-48 噬菌体T₄的rII区缺失突变型的突变部位

组，检测野生型的重组体，从而构建出此基因的精细结构图。

6. 利用卵巢畸胎瘤进行基因定位

前人的研究表明，囊形卵巢畸胎瘤是由胚性细胞形成的。通过分析发现，宿主妇女的核型是异质的，而畸胎瘤细胞的核型却是纯合的；这有两种解释(图2-49)：可能是第二次减数分裂被抑制，或是卵细胞核与第二极体融合产生二倍体细胞。

既然在畸胎瘤中，每个染色体对的着丝粒是由单一的母性宿主染色体而来，那么，靠近着丝粒的染色体标记和基因位点很可能是纯合的。离着丝点远的位点则由于交换的缘故很可能是异质的。这样我们可以测定出基因与着丝粒的距离。

假定一宿主母体13号染色体上的着丝粒是异质的，并且酯酶D也是异质的(此基因已定位在13号染色体上)。分析来源于该母

体的畸胎瘤，发现荧光标记的着丝粒区是同质的，而酯酶D同功酶或是同质或由于交换而是异质的。统计同质和异质同功酶出现的频率，便可定位出酯酶D与着丝粒的相对距离，随着分析数目的增多，定位也将愈精确。

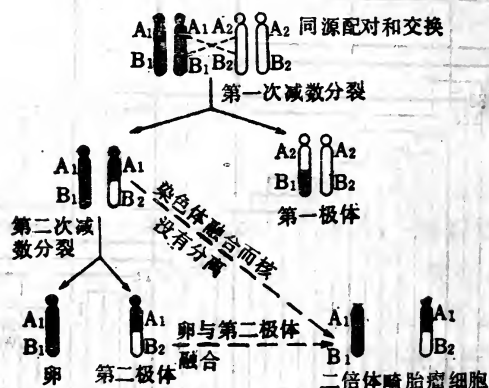


图2-49 形成卵巢畸胎瘤的假说

此方法是人的基因定位的特殊分析方法。其优点是通过单一的宿主——畸胎瘤分析，便能知道基因与着丝粒间的距离，但不能定位与着丝粒相距较远的基因。

7. 近端着丝粒染色体分析

要想得到一个完整的基因图，必须知道基因与着丝粒之间的距离。因着丝粒并不是一个基因，不能从表型测知，故三点测验是无法达到此目的的。在某些植物材料（如小麦）中，某些正常染色体在着丝粒附近断裂形成异常染色体，即顶端（或近端）着丝粒染色体。小麦有42条染色体，目前已获得全部42条染色体的近端着丝粒染色体。下面我们介绍怎样用近端着丝粒染色体来对基因与着丝粒的距离进行定位。

将带隐性基因aa的近端着丝点染色体个体作母本，而正常染色体上带显性基因AA的个体作为父本，二者杂交后，得到一条带A基因的正常染色体和一条带a基因的近端着丝粒染色体的杂合个体，将此杂合体作父本再与携带aa双隐性基因的母本回交。如

果未发生交换,则产生图2-50中①与②二种基因型的后代;如发生交换,则新产生的后代的基因型为图2-50中的③与④。由于端着丝点染色体的花粉无法与正常花粉竞争,故在上述实验中,只存在没有发生交换作用的后代Aa(图中的①)和A与着丝粒发生过交换的后代aa(图中的④)。将发生交换的后代数目除以总后代数

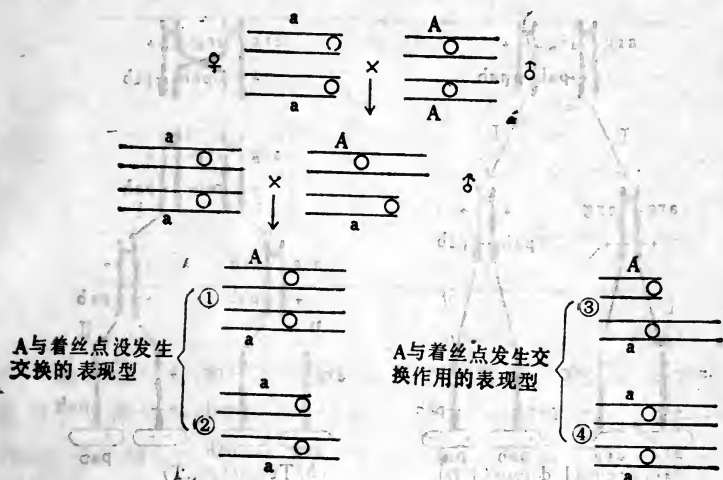


图2-50 近端着丝点染色体分析确定基因与着丝点的距离

目,所得的数值便是基因与着丝点之间的相对距离。

8. 四分体分析

所谓四分体 (tetrad)分析,就是分析单一减数分裂后所形成的四个单倍体产物。许多较低等的单倍体生物均能产生四分体。由于四分体是单倍体,不存在显隐性的问题,基因型可直接从表型得知,因此非常适用于基因定位的工作。通过对四分体分析,我们不仅可以确定基因之间的距离,还可以得知基因与着丝点之间的距离。

(1) 二连锁基因的定位

此法与二点测交的原理一样,但不需要测交实验,而只需分析四分体,即可推知重组值。

由图2-51可见,对于含A、b基因的二条同源双价染色体及含

a、B基因的二条同源双价染色体来说，有三种可能分离的方式：一种是Ab、Ab、aB、aB，即亲本二型(PD)；另一种是Ab、AB、aB、ab，这是由于二条染色体发生交换的结果，即四型(T)；还有一种是AB、AB、ab、ab，这是由于四条染色体均发生交换的结果，即非亲本二型(NPD)。

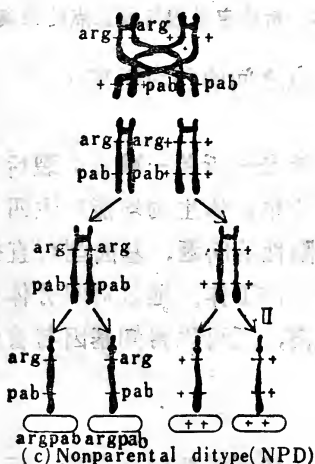
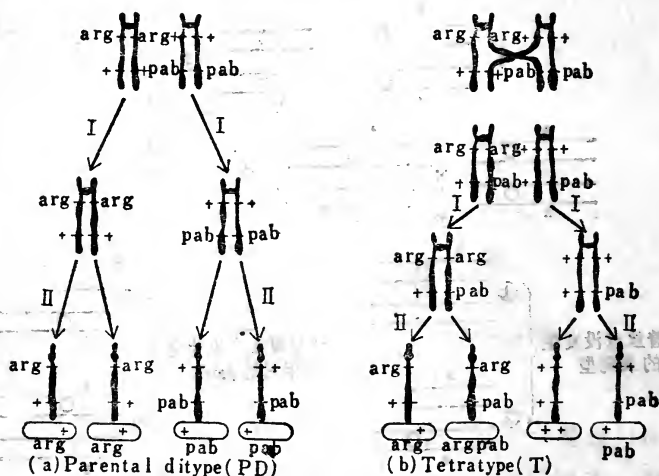


图2-51 二连锁基因的四分体分析。chlamy elamonas中arg+ X+ pab所产生的四分体，I和II代表二次减数分裂

当两个基因的标记性状为非连锁遗传时，则PD与NPD四分体的比值为1:1，而两个基因（如图所示）为连锁遗传时，则PD:NPD \gg 1。例如在 *chlamy elamonas reinhardi* 的 *arg+* 与 *+pab*（这里Arg为精氨酸需要型，Pab为对氨基安息香酸需要型）的杂交中，可得到如下的四分体：

| PD | NPD | T |
|-------------|----------------|----------------|
| <i>arg+</i> | <i>arg pab</i> | <i>arg +</i> |
| <i>arg+</i> | <i>arg pab</i> | <i>arg pab</i> |
| <i>+pab</i> | + + | + <i>pab</i> |
| <i>+pab</i> | + + | + + |
| 119 | 1 | 71 |

总数：191

重组值可根据上述数值用两种方法推算出来。一种方法是將所得子代作为个体来分析。这样共191个四分体，则有 4×191 个，即764个子代细胞，其中4个是NPD类，全是重组体，284个T类，一半是重组体。根据公式：

$$R = \frac{\text{重组子代数}}{\text{总子代数}}$$

$$\text{得： } R_{\text{arg/pab}} = \frac{4 + 142}{764} = 19.1\%$$

另一较为简单的方法是将四分体作为一个整体来考虑。

利用公式：

$$R = \frac{\text{NPD} + \frac{1}{2}\text{T}}{\text{PD} + \text{NPD} + \text{T}}$$

得：

$$R_{\text{arg/pab}} = \frac{1 + \frac{1}{2} \times 71}{191} = 19.1\%$$

即：*arg*与*pab*的图距为19.1

根据同样的原理，可以进行三连锁基因的定位。

(2) 基因——着丝粒距离的测定

四分体分析的一个特殊用途便是测定基因与着丝粒的相对距离。一般情况下，同源染色体的着丝粒分离总是发生在第一次减数分裂时期。如果基因b离着丝粒非常近，则b将在第一次分裂时与其等位基因相分离，产生的四分体均是++bb的四分体。然而，如果基因b离着丝粒较远，由于基因b与着丝粒点间会发生交换，第二次分裂的结果将产生+b+b的分离四分体。因为每次交换时，在配对的双价染色体中只有四条中的二条参加了交换，所以基因与着丝粒间的重组频率是分离四分体出现频率的 $\frac{1}{2}$ 。

上述重组定位技术尚有许多不足之处，例如：不同遗传因子的重组频率是不同的；重组频率受环境影响；换算长度单位时不够准确；必须有足够的突变体，但染色体的某些部分很难诱导突变，等等。

(二) 家系分析 (Pedigree studies)

家系分析定位是高等生物非常有效的基因定位方法。在建立体细胞遗传学定位方法之前，哺乳动物的基因定位多是用此法完成的。

1. 性连锁

家系分析方法能迅速地将某一基因定位在性染色体上。如某一性状只出现在雄性中，就可将控制此性状的基因定位在Y染色体上，现在已定位在Y染色体上的基因是相当少的。

因为雄性的X染色体总来自于雌性，X连锁的最明显标志，是不存在“雄性—雄性”的传递方式。所以通过传递方式就可以确定，基因是否在X染色体上。

2. 基因—染色体连锁

通过阐明标记染色体与基因的连锁关系，就可以将基因定位在该特定的染色体上。从原理上说，这与二点测交没有什么不同之处，因为标记的染色体可看作连锁群中的一个遗传因子（实际

上是一明显的位点)。用此法定位在人常染色体上的第一个基因是 Daffy 基因。

Daffy 血型是单基因控制的位点，通常此基因是 fy^a 和 fy^b 。

细胞学观察发现，某一临床正常人的一条 1 号染色体的长臂，在靠近着丝粒的区域变长了，进一步的研究表明此区域变长不是额外染色体的插入引起的，而可能是 DNA 双螺旋数改变所致。家系分析证明，此染色体结构的变化是遗传的。由图 2-52 所示的家系图可见此染色体异常的 Daffy 血型位点的遗传情况。与此同时，另外几个家族亦有类似的情况。将 Daffy 血型位点与此变化区域（将此变化区域当作一基因位点处理）进行遗传分析时证明，二者确有连锁。由此，将 Daffy 血型基因位点定位在 1 号染色体上。

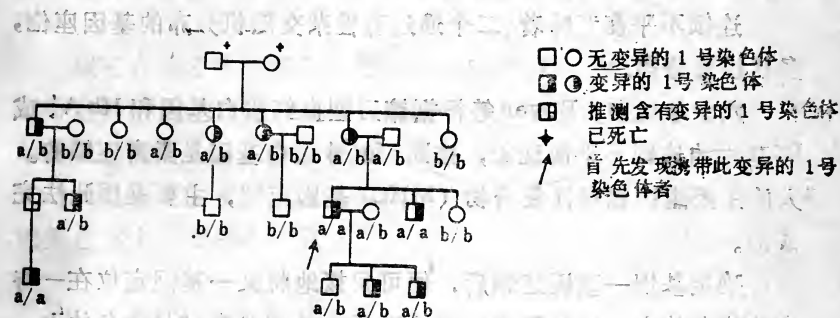


图 2-52 进行连锁实验的家系分析 a、b 分别代表 fy^a 和 fy^b 等位基因

3. 基因—基因连锁

对于实验生物来说，建立基因—基因连锁的最常用方法，是前述的二点乃三点测交。对人来说，要建立基因—基因连锁，其原理和具体方法均与上述的 Daffy 血型位点的定位一致。只是用另一多态性基因替代了标记染色体上的拉长区。用此法可计算出两个基因间的交换值并得出基因间的相对距离。

4. 杂种蛋白质的氨基酸顺序分析定位

遗传分析表明，两个相距很近的基因位点，有可能发生非同源配对和不等交换，从而产生杂种蛋白质。通过对一些特异蛋白

质氨基酸序列分析，可以间接地推测基因是否连锁。例如，分析异常血红蛋白 tepore 的氨基酸顺序时发现，此蛋白有一条血红蛋白 β 和 δ 链融合形成的杂种链。由此推测，决定 β 和 δ 链的基因是紧密连锁的。另一种异常的血红蛋白 Kenya 有一条 δ 和 γ 链融合的杂种链。所以 β 、 δ ，和 γ 的基因很可能是紧密连锁的。

5. 连锁不平衡的分析定位

与杂种蛋白的氨基酸序列分析一样，连锁不平衡的分析只能间接地推测出基因是否紧密连锁。

在某一群体中，每一性状的出现频率是一定的。当两个多态性状同时出现的频率远大于或小于它们单独出现的频率推测值时，就可以推测这两个多态性状的基因座位是紧密连锁的。

连锁不平衡意味着：二个通过有性杂交随机分布的基因座位，多代没有分离。

六十年代初，Boyer 等根据镰刀型血红蛋白基因和 Hb A₂ 或 B₂ 基因的连锁不平衡现象，推断 β 和 δ 球蛋白基因是紧密连锁的。人的主要组织相容性复合物 (MHC) 基因定位，主要是用此法完成的。

确定基因—基因连锁后，便可间接地将某一基因定位在一特定的染色体上。例如已知 α -结合球蛋白基因是在 16 号染色体上，现测知 LCAT (卵磷脂、胆固醇酰基转移酶) 基因与之连锁，就可知 LCAT 基因也是在 16 号染色体上。

(三) 非整倍体定位

利用非整倍体可有两种不同的定位方法。一是经典的非整倍体分析定位，它是通过计数非整倍体与正常个体杂交后的后代分离比来定位基因的。另一类定位方法是用酶作标记，测定非整倍体杂合子后代中的等位剂量，从而定位酶基因。

1. 非整倍体分析定位法

许多植物的基因定位是用非整倍体分析完成的。非整倍体包括单体、缺体和三体。由于二倍体植物中，单体和缺体无法存活，

所以单体、缺体的分析只适用于诸如小麦、烟草之类的多倍体植物，而三体分析则用于二倍体植物的基因定位。

(1) 单体分析

单体($2n-1$)是指正常的双体($2n$)中，少了一条染色体。用单体分析法定位基因时，首先要得到一整套单体材料。如小麦($2n=42$)中现有21个单体材料，而且这些材料都易于保存。

如果是隐性基因的定位，则将带隐性基因的个体分别与带显性基因的整套单体杂交。如果 F_1 代出现的隐性个体均为单体，而显性个体均为正常的双体，并且 F_1 单体自交所得的 F_2 几乎100%为隐性，而 F_1 双体自交后却出现3:1的显隐性比时，则可将待测的基因定位在此杂交组合所含有的单体染色体上。现略加说明如下：

假定在小麦中发现带有a的隐性基因植株，并将a基因定位在特定的染色体上时，可将此带隐性基因a的正常双体小麦与21个单体逐个进行杂交，结果将有两种情况。

一是正确的交配，就是说欲定位的基因恰好在此所测试的单体的染色体上，如图2-53所示。

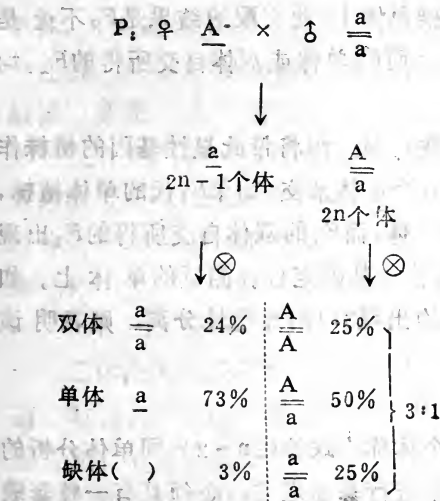


图2-53 正确交配法的单体定位

结果 F_1 中，单体植物全为隐性（其单价染色体均来自隐性的父本），双体植物全为显性杂合子。 F_1 的单体自交时，所得 F_2 仍全为隐性，而 F_1 杂合双体自交所得 F_2 中，显隐性分离比为3:1。

需要说明的是图2-53中， F_1 单体自交之所以出现单体73%，双体24%，缺体3%的比例，是因为单体在减数分裂时可形成 n 和 $n-1$ 两种配子。根据正常双体小麦与单体小麦的正反交测定知道， n 和 $n-1$ 的雌配子传递率是不同的。 $n-1$ 卵的传递率平均为75%， n 卵细胞为25%，而 $n-1$ 雄配子传递率平均为4%， n 雄配子为96%（如下表）。

| | | 雄配子 | |
|-----|-----------|---------------|--------------|
| | | n | $n-1$ |
| 雌配子 | n 25% | 96% | 4% |
| | $n-1$ 75% | $2n$ 24% | $2n-1$ 1% |
| | | $2n-1$ 72% | $2n-2$ 3% |

另一种结果是非正确交配所致。所谓非正确交配是指欲定位的基因不位于所测试的单体染色体上。此交配的结果是 F_1 不论是单体或双体，其表型均显性，而 F_1 单体或双体自交所得的 F_2 ，均出现3:1的分离比。

如果待定位的基因是显性基因，则将带此显性基因的植株作父本，分别与具隐性基因的21个单体杂交。如果 F_1 代的单体植株，自交所得的 F_2 基本上为显性个体，而 F_1 的双体自交所得的 F_2 出现3:1的显隐性分离的话，则可将该基因定位在测试的单体上。如果 F_1 单体和双体的自交后代均出现3:1的显隐性分离，则表明该基因不在所测试的单体上。

(2) 缺体分析

缺少一对同源染色体的个体称为缺体($2n-2$)。同单体分析的情况一样，要通过缺体分析来进行基因定位，必须具有一整套缺体材料。

① 隐性基因分析

用一隐性纯合小麦个体，分别与21个小麦缺体交配，如 F_1 单体是隐性的，便可将该基因定位在此缺失的染色体上。假定某一隐性基因为a，带此双隐性基因a的个体与21个缺体杂交时，将有两种结果：如果 F_1 代全为隐性，说明a基因正好位于该缺体所缺的染色体上；如果 F_1 代全表现为显性性状，则表明a基因不在该缺体所缺染色体上。

② 显性基因分析

用显性纯合个体与所有21个缺体材料杂交，然后将 F_1 的单体自交，如果后代的97%为显性，而只有3%为隐性，则此基因就可定位在该缺体所缺的染色体上；但如果 F_1 单体的自交后代为3:1的显隐性分离比，则此基因就不在此缺体所缺的染色体上。

③ 隐性基因在单剂量时不表现其性状

隐性基因在单剂量时不表现其性状是指：当某一隐性基因单独存在时，无论显性基因存在与否，均不表现隐性基因的性状。例如根据小麦单体 $n-1, n$ 雌雄配子的传递频率，可推测出，用双隐性双体与显性缺体杂交所得的 F_1 单体自交时，所得的 F_2 将是73%单体，3%缺体和24%双体。在正常交配时，单体、缺体均为显性性状，双体为隐性性状，而在不正常交配时，其双体、单体、缺体均呈现3:1的显隐性比。换句话说，如双隐性双体与显性缺体杂交所得 F_1 单体的自交 F_2 中，单体、缺体均为显性性状，则此基因就可定位在该缺体所缺的染色体上；但如果其双体、单体、缺体均呈现3:1的显隐性比，则可断定，此基因不在此缺体所缺的染色体上。

(3) 三体分析

三体分为初级三体，次级三体，三级三体及近端着丝点三体。通过对它们的分析可将基因定位于某一染色体，甚至染色体的特定片段上，现简述如下：

① 初级三体分析

初级三体是指正常染色体组中多了一条与某对染色体同源的

染色体。三体在作母本或父本时分离比率不同。以 $\frac{A}{A}A$ 三体为例,当作母本时,配子的比率为 $1AA:2Aa:2A:1a$,用作父本时,由于 $n+1$ 的雄配子通常不能存活故其配子比为 $2A:1a$ 。若A对a是完全显性,则此三体自交后的表型比率将是 $17A:1a$,如下表所示:

| 雌配子 \ 雄配子 | 1AA | 2Aa | 2A | 1a |
|-----------|------|------|-----|-----|
| 2A | 2AAA | 4AAa | 4AA | 2Aa |
| 1a | 1AAa | 2Aaa | 2Aa | 1aa |

由于三价体雌配子之中有一条往往会在减数分裂过程中丢失,所以实际观察到的分离比常常不同于期望的分离比。

在应用初级三体决定基因与染色体的关系时可作如下处理:将双隐性突变体分别与所有的三体逐个杂交, F_1 初级三体自交或与隐性亲本回交,然后检测 F_2 代或回交后代的显隐性分离比。如果所得的自交或测交后代的显隐性为 $3:1$ 或 $1:1$ 时,则证明此基因不位于新测试的三体上,如果自交或测交的分离比不是 $3:1$ 或 $1:1$,则就可将此基因定位在此杂交组合的三体染色体上。

②次级三体分析

次级染色体三体又称同臂染色体三体,即所增加的染色体是同臂染色体。如图 $\frac{A}{A} \circ \frac{A}{A}$ 用它来定位时,可将双隐性二倍体与三显性三体杂交,所得 F_1 自交后代中,如双体显隐比为 $3:1$,而三体全为显性性状;测交后代双体的显隐比为 $1:1$,而三体全为显性性状时,就可将此基因定位在所测试的次级染色体中。但由于同臂染色体自己能配对,故常常影响结果的准确性,所以一般不采用此方法来定位。

③三级三体分析

将基因初步定位在某一特定的染色体上后,进而可用三级三体分析方法确定该基因在此染色体的哪一条臂上。

本三级三体所增加的染色体为一易位的染色体。由于易位染色体本身有部分缺失，任何只含三级三体染色体而不含正常染色体的配子是不能存活的。在用三级三体分析定位基因时，先用双隐性个体与所有的三级三体杂交，再将F₁三级三体自交或与隐性亲本回交，统计F₂或回交后代中三级三体的表型。如果F₂或回交后

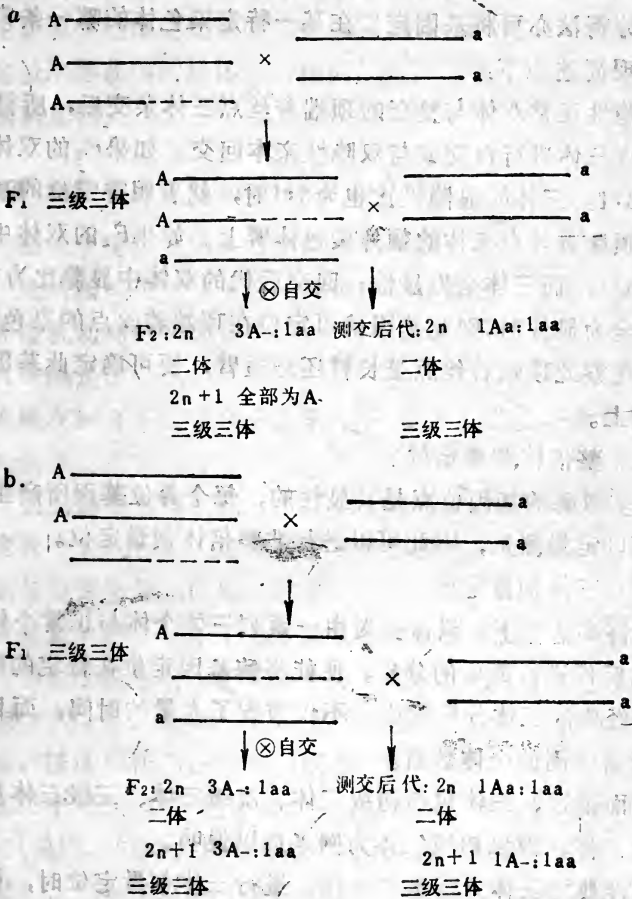


图2-54 三级三体分析定位

- a: 表示正确的配对，即待定位的基因在此三级三体的易位染色体臂上
- b: 表示不正确的配对，即待定位的基因不在此三级三体的易位染色体臂上。

代的三级三体全为显性，则表明该基因必定位于该易位染色体的臂上。反之，如果 F_2 或回交后代的三级三体中显隐性比为3:1或1:1，则证明该基因不在该染色体的臂上。（见图2-54）

④顶端着丝点三体分析定位

顶端着丝点三体是指增加的一条染色体为顶端着丝点染色体，此分析法亦可将基因定位在某一特定染色体的哪一条染色体臂上。现简述如下：

双隐性正常双体与整套的顶端着丝点三体杂交后，所得 F_1 顶端着丝点三体进行自交或与双隐性亲本回交。如果 F_2 的双体显隐性比为3:1，三体的显隐性比也为3:1时，就表明待定位的基因不在这个顶端着丝点三体的额外染色体臂上。如果 F_2 的双体中，显隐比为3:1，而三体全为显性；回交后代的双体中显隐比为1:1，而三体全为显性时，则此基因就可定位在顶端着丝点的染色体上。进一步观察此顶端着丝点是长臂还是短臂，便可确定此基因在哪一条臂上。

2. 非整倍体剂量定位

大多数酶的基因位点是共显性的，每个等位基因所产生的酶量也可以定量测定，因此可以进行非整倍体剂量定位。

(1) 三体剂量定位

在许多情况下，只需要对由一系列三体个体与正常个体杂交所得的后代进行简单的分析，便能将酶基因定位在特定的染色体上，与经典的三体分析相比，不仅节省了大量的时间，而且可以缩减所需检测的个体数目。

前面说过，三体包括初级三体、次级三体、三级三体及顶端着丝粒三体，现以初级三体系为例来加以说明。

同经典的三体分析定位一样，进行三体剂量定位时，首先也是将合适基因型的二倍体个体作母体，并和整套的三体（作父本）逐个杂交，如果待定位的酶基因正好在所测试的三体上，则分析 F_1 代中三体个体的酶剂量就可以得知。用此方法已定位了不少的基因。

(2) 单体、缺体和其它非整倍体剂量定位

多倍体植物的基因定位，主要是用三体之外的非整倍体基因剂量定位来完成的。在六倍体的小麦中，利用每一条染色体均含0到4的系列材料，检测这些非整倍体材料中某一特定的酶是否存在，从而将编码酶的基因定位在特定染色体上。

在异源多倍体的烟草(*Nicotiana tabacum*)中，利用从单体植株的花粉培养获得的缺体作为材料，通过酶剂量分析，便可定位酶的编码基因。

(四) 细胞学定位(Cytological mapping)

当细胞学观察的染色体异常与某一基因所表达的异常同时出现时，此基因就可定位于这一染色体的异常区。此法一般用于对果蝇和哺乳动物的基因定位。

1. 缺陷定位

果蝇在纯合子或半合子的条件下，绝大多数缺陷型是致死的，所以缺陷型只能在杂合子的果蝇中存在。若果蝇的一条染色体有缺陷，而同源染色体的同一位点是隐性非致死的突变，则此隐性突变就会表现出来。此现象被称为假显性。这样便可以将缺陷的位点与遗传标记基因联系起来。

缺陷定位的一个例子是果蝇染色体的分析图2-55a是多线X染色体的非着丝粒末端。若果蝇携有末端缺陷的X染色体，则其多线染色体如图2-55b和c所示。正常X染色体在此部分含有一系列带状结构，按透视作图法可知缺陷型的结构。

从图中可见(b)染色体缺少正常染色体(a)中出现的一条带206—1(见图2-55a)。用带有隐性标记的y(黄体)、ac(影响体节数目)、和sc(影响小盾鬃形成)的果蝇与此缺陷体杂交构成杂合子。所有的三隐性基因均能表达，故可将此三基因定位于此X染色体末端。当此突变体与图2-55c所示的缺陷体(图2-55a中所用片段206—2表示的八条带缺失)构成杂合子时，只有y和ac表达，因此可将sc基因定位在(c)染色体上而(b)染色体中不存在的

几条带上。

2. 病毒影响定位

某些病毒能使特定染色体区域产生持久的表型变化。例如由腺病毒-12产生的人的第11和17号染色体的变化，类似于昆虫和某些其它生物染色体上观察到的“疏松”(Puffing)。这些变化区域代表了激活的基因位点，主要是与核酸有关的激酶。用体细胞杂种的方法发现腺苷酸激酶-2，鸟苷酸激酶-1和可溶性的胸腺嘧啶激酶的位点在此变化的区域。

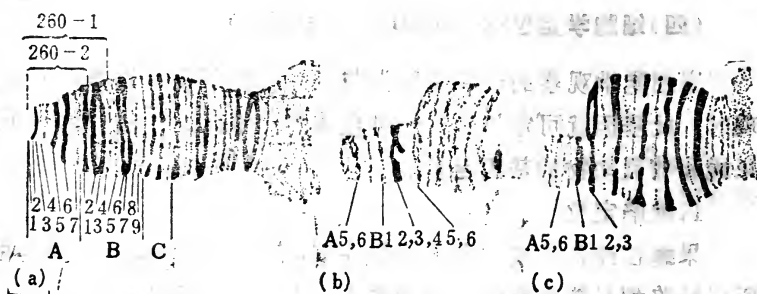


图2-55 缺陷定位，(a)正常果蝇的X多线染色体，(b)和(c)缺陷杂合子的X多线染色体。

3. 基因剂量定位

利用基因剂量效应来定位可分为两类，即质量剂量效应定位和数量剂量效应定位。所谓质量剂量效应定位是通过对等位基因的数目与其表达产物的关系的比较来定位基因；数量基因效应定位则是通过分析基因数目与其表达产物的量的关系来定位基因。

(1) 质量剂量效应定位

此方法主要依据以下的假说：同时出现的罕见的遗传现象常常是相关的。如果某一个体，应有的两个不同等位基因位点中，只发现一个等位基因，而同时此个体中有染色体的缺失，我们就可将此位点定位在此缺失的片段之中。当然，这里必须小心地排除另外一种可能，即出现单一的等位基因并非由于缺失，而是由于此基因位点含有一个不起作用的等位基因。

我们还可以从另一个角度来利用质量剂量效应的定位方法。若某缺失个体中有一异质位点，则此异质位点显然不在缺失区。这种排除定位(exclusion mapping)对检测基因是否连锁是很有用的。通过排除基因在一定位点的可能性，可以将此基因定位在正确的位置上。

一种特殊的质量剂量方法可以用来定位X染色体上的基因。此定位的原理基于如下的假设，即遗传异质的雌性个体，在任何一个体细胞或由其衍生而来的无性后代中，只有一条X染色体是有活性的。例如，有一睾丸雌性化患者，当追踪其家系时，发现患者的母亲在睾丸雌性化基因(二氢睾丸酮受体基因)位点是异质的。进一步的检测发现，从患者母亲来源的二个细胞群中，一个细胞群具有二氢睾丸酮受体，另一个不具有。这样就排除了此性状是由染色体显性基因控制的可能性，从而将其定位在X染色体上。

(2) 数量剂量效应

利用数量剂量效应来进行基因定位是基于如下的假定：基因表达的量与此基因的拷贝数成正比。已用此方法定位了不少基因。例如在人的2号染色体三体的部分细胞中，观察到酸性磷酸酯酶2的量增多，从而将此基因定位在2号染色体上。但是用此方法定位的基因，还需用其它的方法加以验证。

(五) 体细胞杂种定位

亲缘关系较远的动物或植物细胞融合后，往往会出现染色体丢失的现象。一般说来，总是某一方的染色体容易丢失，特别是在人—鼠杂种细胞中，常专一性地丢失人的染色体。目前已发现其它种类的许多体细胞杂种，也有专一性地丢失一种亲本染色体的现象，这为基因定位工作带来了许多方便。人及哺乳动物的许多基因就是用此方法定位的。

1. 同线性测验(Synteny Testing)

连锁(Linkage)最早是指减数分裂时非随机分离的类群，后来也用于将基因定位在性染色体(X—连锁)或常染色体上，(常

染色体连锁)。Renwick(1969) 建议用同线性 (Synteny) 来描述同一条染色体上的基因间关系。这些基因无需用减数分裂重组值来表明连锁。

同线性实验基于如下的假设, 在杂种细胞中, 位于同一染色体上的基因将同时出现或消失。在染色体分辨技术建立前, 通过对杂种细胞株中, 不同基因共同出现或消失的观察已确定了不少的同线性群。如果一个基因被定位在某一条染色体上, 则与此基因同一线性群的其它基因也可被定位在此染色体上。但由于体细胞杂种中, 广泛存在着染色体重排的现象, 所以需用染色体分析对同线性测验的结果加以检验。

2. 选择定位

用啮齿动物——人的杂种细胞定位的第一个人的基因TK(即胸腺嘧啶激酶基因), 就是通过选择定位来完成的。

TK(胸腺嘧啶激酶缺陷型) 的小鼠与人的体细胞杂交后, 在HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤, 胸腺嘧啶)培养基中选择杂种细胞, 由于TK⁻细胞不能在含HAT的培养基中生存, 故存活的杂种细胞一定含有人的TK基因。选择出来的杂种细胞培养几代后, 绝大多数只剩下一条人的染色体, 鉴定证明剩下的这条染色体是人的17号染色体, 而且还发现, 17号染色体丢失时, TK基因亦不表达, 由此将TK基因定位在17号染色体上。

由于非选择标记的基因, 可与其同线性的选择性标记基因共同保留或消失, 所以选择定位的方法可以间接地对非选择标记基因定位。在以TK为选择压力下, 半乳糖苷激酶与TK基因同时出现, 而去掉对TK的选择压力, 两者便同时消失, 从而可将半乳糖苷激酶基因定位在17号染色体上。

负选择同样可用于基因定位, Creagan等(1975)对白喉毒素敏感基因定了位。实验发现, 在白喉毒素处理的频率较高, 而毒素处理后, 存活的杂种细胞全部丢失了5号染色体。由此将白喉毒素敏感基因定位在5号染色体上。

3. 易位定位

易位染色体可通过染色体的长度和带型的改变识别出来。如图2-56a中一大段X染色体易位到了第14号染色体上。当杂种细胞丢失了此易位染色体时，Hgp_rt(酶HGPRT)Pg_k.(磷酸甘油激酶)，G6Pd.(6-磷酸葡萄糖脱氢酶)和Np(核苷磷酸激酶)等便不能表达。已知位于X染色体上，后一标记在14号染色体上，据此可以推知，前三个基因位点是在X染色体q₁₅带以远的片段内。

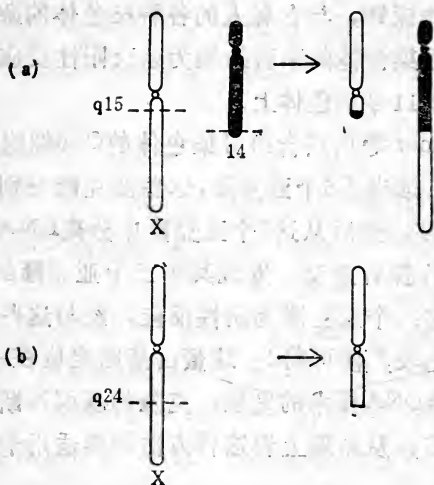


图2-56: a为易位. b为缺失

4. 缺失定位

图2-56b中，一杂种细胞系丢失了X染色体q₂₄带以远的片段，这个细胞系能表达人的PgK基因，但缺失了Hgp_rt和G6Pd标记，将此结果与上面的易位定位所得的结果比较，就可知PgK基因位点在q₁₅与q₂₄带之间，而Hgp_rt和G6Pd则位于q₂₄带与末端之间。

5. 蛋白质的分析定位

此方法是把杂种细胞中多余的一条染色体与蛋白质凝胶电泳结合起来分析。例如Cox等制备了一对人——鼠杂种细胞系，其中一个杂种细胞系比另一个多了一条人的X染色体，分别提取此两种杂种细胞的蛋白质，二是被凝胶电泳的结果，发现人X染色体的杂种细胞多五种蛋白质，经鉴定其中两种为G6PD和HGPRT。

这样便将G6PD和HGPRT定位在人的X染色体上。

6. 点杂交定位

上述的杂种细胞定位方法,只适用于在培养细胞中能够表达,并且能通过表型实验测出来的那些基因定位。但并不是所有的情况均是如此,例如血红蛋白的基因。

点杂交的方法即可为这类基因定位。例如用克隆的人 β -球蛋白的DNA作探针,与含有人的各种染色体的杂种细胞杂交,发现只有含11号染色体的杂种细胞为杂交阳性反应,这样便将此基因定位在人的11号染色体上。

D. Housman等用只含11号染色体的Cho细胞系作原始材料,诱变处理后,选出了5个亚克隆,这些亚克隆分别丢失了11号染色体上不同片段,然后从这5个亚克隆中分离DNA,用上述的人 β -球蛋白DNA作探针杂交,发现其中三个亚克隆的DNA杂交为阳性反应,其它二个亚克隆为阴性反应,经与这些亚克隆的染色体缺失片段相比较,便可将 β -球蛋白基因定位在一个小片段内。

随着克隆DNA技术的发展,克隆的基因不断增多,定位的基因也愈来愈多,从原理上说这种方法同样适用于其它生物材料的基因定位。

7. Southern blot定位

点杂交定位基因的方法依赖于基因探针的特异性,如果受体细胞DNA中,有与此探针同源的序列,即不适用此法。这时可以利用杂种细胞中,两亲本的DNA在此基因位点或其周围的限制性内切酶位点的差异(见前面遗传重组值定位的RFLPS定位)用Southern blot技术来解决。将小鼠的K λ 和重链复合物基因分别定位在6.18,和12号染色体上的。

8. 利用放射性处理细胞来定位。

Goss等用适量的 γ -射线处理人的正常二倍体体细胞,然后将这些细胞立即与小鼠HGPRT细胞融合,在HAT选择培养基上,人的HGPRT基因将被选择,由于已知HGPRT是在X染色体上,所以X染色体的其它基因能否保留在杂种细胞中取决于二个因素,1.此

基因位点与HGPRT位点的距离，2. 辐射的剂量。由此便可得到X染色体上的基因与HGPRT的距离图谱，从原理上说，只要找到合适的选择标记，此方法也适用于其它连锁群的基因定位。

(六) 基因转移定位

基因转移的方法很多，如染色体介导的基因转移 (GMGT)，裸DNA介导的基因转移 (DMGT) 及载体介导的基因转移 (如Ti质粒作载体的植物基因转移) 等。这些均可用来进行基因定位工作。

1. 染色体介导的基因转移定位

有关的经典实验是：将处在细胞分裂中期的人培养细胞，用秋水仙素处理，机械法破裂细胞分离染色体，再将此染色体转化受体细胞。

转化细胞有两种类型，一是不稳定的转化体，此转化体中被转移的染色体或染色体片段很快会从受体基因组中丢失。共同转化并在以后的培养过程中同时丢失的基因，可能是连锁在一起的，可用此体系进行连锁定位。转化的第二种类型是稳定的转化体，即供体的染色体片段已插入到受体细胞的基因组中。在以人的染色体作供体，小鼠的细胞作受体所得的稳定转化体中，由于人的染色体片段颜色较浅，鼠的染色体颜色较深，细胞学观察可见人的染色体片段或者插入在着丝粒附近或者连接在染色体的末端。例如此杂种染色体中所携带的人的染色体片段均含有 T_k 基因，分析与此基因连锁的其它基因 C_k (半乳糖苷激酶) 和 $P.I$ (I型原胶原肽段) 的表达情况时，发现携带最短的人染色体片段的三个细胞系丢失了 C_k 基因，但仍含有 $P.I$ 基因。带型分析表明所丢失的包含 G_k 基因的染色体片段是紧靠17号染色体着丝粒的部分。这样便可得到如下的基因顺序排列：着丝粒—(T_k , $P.I$)— G_k 。

2. 载体介导的基因转移定位

由上述可知，CMGT定位方法，只能将基因大致定位在某一染色体上，但用载体介导的基因定位方法，则可得到精细的基因

结构图。DMGT定位方法与此原理一样，只是基因转移的方法有差异。下面以小麦的叶绿素a/b结合蛋白—1 (Cab—1) 基因的光调区的定位来加以说明。

原有的研究表明，Cab—1基因的表达是受光调节的，但是基因的哪一部分起光调作用呢？FERENCE Na等将此基因的上游序列（—1816到+21）与细菌的氯霉素转移酶基因(CAT)连接起来，然后将连接好的镶嵌基因转移到Ti质粒上去，并用此Ti质粒转化烟草。结果在转化的烟草中发现：CAT基因的表达是受光调控的。这样便可将Cab—1基因的上游序列定为光调区。实际上，用同样的思路已定位了许多组织特异性作用的控制区位点。

3. 细菌接合转移定位

细菌进行基因转移有三种途径：转化 (Transformation)、转导 (Transduction)和接合转移 (Conjugation)。此三种方法均可用于基因定位。

接合转移是指两个单细胞通过彼此间的暂时连接，使其中一方接受另一方的遗传物质的现象。在细菌的接合转移中，供体细胞称雄性细胞，受体细胞称雌性细胞。这种“性别”差异是根据它们是否具有F因子而区分的。

F因子亦称可育因子。它在细菌中以两种状态存在，一是独立于染色体外的游离状态，此时的细胞称为F⁺细胞。F⁺细胞可通过接合转移将F因子转移到F⁻受体细胞。F因子亦可整合在细菌的染色体上，即以整合状态存在，此时它可将细菌的染色体高频地转移到F⁻受体细胞中，故称此细胞为高频重组 (Hfr) 细胞。

在接合转移中，有三种不同的方法可用作细菌染色体的基因定位：转移梯度定位，时间单位定位与计数重组体定位。

(1) 转移梯度定位

先将Hfr雄性细胞与F⁻雌性细胞在液体培养基中混合25分钟（所用Hfr及F⁻细胞特性和表12），然后将此混合液涂布于含有链霉素的合成培养基中。Hfr细胞因为有str^{-s}，故不能在含链霉素的培养基中生长；F⁻细胞由于不能合成亮氨酸和丝氨酸，故不能在

缺失亮氨酸和丝氨酸的合成培养基中生长。只有那些 thr^+ ; leu^+ (来自 Hfr_1) 与 str^r (来自 F^-) 的重组体, 才能在 str^r ; leu^- ; Thr^- 的培养基上生长。将上述重组体放在含有叠氮化钠 azi 噬菌体 T_1

表12

Hfr与 F^- 细胞的特性

| 性质 | Hfr细胞 | F^- 细胞 |
|---------------|---------|----------|
| 丝氨酸合成 | thr^+ | thr^- |
| 亮氨酸合成 | leu^+ | leu^- |
| 叠氮化钠敏感性 | $azi-s$ | $azi-r$ |
| 噬菌体 T_1 敏感性 | T_1-S | T_1-r |
| 乳糖发酵 | lac^+ | lac^- |
| 半乳糖发酵 | gal^+ | gal^- |
| 链霉素敏感性 | Str^r | Str^s |

侵染以及乳糖或半乳糖作为唯一糖源的合成培养基中生长。结果表明, 在所有的 thr^+ ; leu^+ ; $str-r$ 的阳性克隆中, 90%是 $azi-s$, 70%是 T_1-s , 40%是 lac^+ , 25%是 gal^+ 。其百分比正好代表了连锁强度, 据此可作出连锁图。

| thr | leu | $ati-s$ | T_1-s | lac^+ | gal^+ |
|-------|-------|---------|---------|---------|---------|
| | | 90% | 70 | 40 | 25 |

(2) 时间单位定位

遗传梯度定位及后面将要谈到的计数重组体定位, 只能得出基因在染色体上的相对位置。为了得到特定基因在染色体上排列的绝对位置, 可用时间单位定位法。将上述的Hfr和 F^- 细胞在液

表13 不同的基因从Hfr转移到 F^- 细胞所需时间间隔

| 分钟 | Hfr转移的基因 |
|-----------|------------------------------------|
| 0 | thr^+ |
| 8 | thr^+leu^+ |
| $8^{1/2}$ | thr^+leu^+azi-s |
| 9 | $thr^+leu^+azi-s T_1-s$ |
| 11 | $thr^+leu^+azi-s T_1-s lac^+$ |
| 18 | $thr^+leu^+azi-s T_1-s lac^+gal^+$ |
| 25 | $thr^+leu^+azi-s T_1-s lac^+gal^+$ |

体培养基中混合,每隔一定时间取样,并用搅拌器搅拌以中断接合转移,然后涂布于特殊的选择培养基上,检测哪些基因已从供体整入到受体染色体中。表13的结果表明:供体染色体是线性地进入受体细胞的,假定供体染色体的转移速率是定值,则表中的数据代表了基因的确切位置,可用来作细菌染色体的细胞学图。实验表明,37℃时,大肠杆菌整个染色体的转移需要90分钟。已知大肠杆菌染色体为环状,故可以时间为单位作出下图。

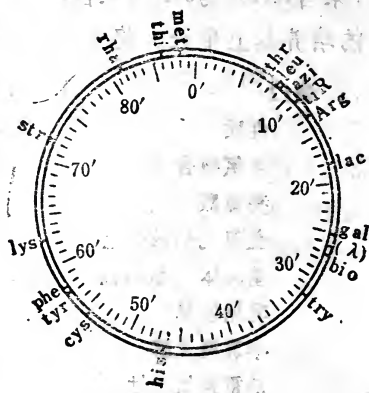


图2-57 E. coli k12的环状连锁图
(以时间为单位)

(3) 计数重组值基因定位

通过计数重组值来推算基因的重组值,从而进行基因定位的方法称为计数重组值定位。在细菌接合转移中,只有部分染色体呈暂时的二倍体状态,为了保证转移的染色体部分包含所需研究的基因,所选择的供体染色体必须包含一个已知位点的基因。

例如,将 $thr^+ leu^+$ 的Hfr细胞与 $thr^- leu^-$ 的F⁻细胞融合,从上面的时间图谱数据得知,leu基因在thr基因之后进入F⁻细胞,所以任何 leu^+ 的重组体均有可能是 thr^+ 。如果这两个基因之间没有发生交换,则将出现 $thr^+ leu^+$ 的重组体。若两个基因发生重组,则重组体是 $thr^- leu^+$ 。我们可以从计算重组体($thr^- leu^+$)与非重组体加重组体的总数($thr^+ leu^+ + thr^- leu^+$)的比值来推测二基因间的重组频率。对于 $thr-leu$,其比值为0.10,或者说重组频率为10%。

将重组单位与时间单位相比较,可以发现一个时间单位相当于20个重组单位。一般来说,当基因间的距离少于3个时间单位时,用重组频率能得到很好的结果;若大于3个时间单位,即大于60个重组单位时,两个连锁基因重组分析的结果会不连锁。所以,在这样情况下不能用重组频率的分析方法来定位。

(七) 物理学定位

之所以把以下的方法归为物理学定位，因为它们不属于上述的任何一类定位方法，另外用这些定位方法只能得到物理图谱。

1. 变性定位

一般用此方法来对分子量较小的基因组，如 λ DNA的基因定位。

将染色体或DNA片段加热，使AT丰富区变性分离，而氢键力较强的GC区却不变性。在电镜下即可观察到DNA的AT丰富区形成“泡”状结构。这种“泡”状结构可作为物理标记位点。在进行实际定位时，首先用野生型染色体作材料，测量“泡”状结构间的距离，然后与不同缺失突变的泡间距离比较，从而对缺失部位基因位点的物理位置和不同缺失片段的长度作出推断。

2. 转录R—环定位

这是一种在电镜下观察真核特异性RNA与双链DNA片段互补区的技术。RNA—DNA杂交区多出一条DNA链，形成环状结

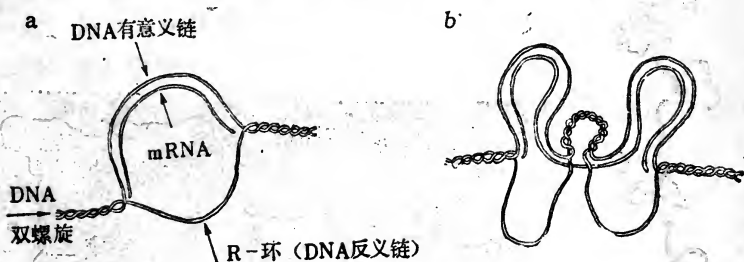


图2-58 R-环定位 a. 没有插入序列 b. 含有一个插入序列

构，因此叫R—环定位。(见图2-58a)在电镜下双链区似乎比单链区更粗，由于内含子不能与成熟的mRNA杂交，因此一个内含子导致2个R—环结构(图2-58b)，二个内含子产生3个R—环。

一般来说，R—环定位主要用于上述真核基因的内含子定位，但也可用以定位染色体的活性区域。如图2-59是一个完整的 λ 染色体，体外转录八分钟后将DNA变性，使新合成的RNA与模板DNA杂交，形成DNA—RNA杂种分子，产生的R—环“泡”由箭

头标出，此箭头所标出的位置便是 λ 基因组中三个主要的启动子的精确位点。

3. 异源双链定位

此法常用于分辨染色体或DNA片段的非同源区。例如二条 λ 染色体，一条带有长的 b_2 缺失，但含有 b_5 序列；另一条是 b_2^+ ，并带有 i^1 序列， i^1 不同于 b_5 。为了构建变性图谱，首先将二条染色体变性成单链，然后混合，复性。形成的杂种链明显地含有二个不连续的区域(如图2-60)。非同源的 i^1 和 b_5 不能退火，故形成对称的“泡”；而 b_2^+ 在 b_2 缺失区形成不对称的“泡”。形成不对称的“泡”。此种方法可以精确地测定缺失片段和非同源区的位置。



图2-59 转录R一环图
Ag₁WES, NcDNA体外
转录八分钟后的R一环
图。P_R, R_L和mt启动
子定位在箭头所指的
环的位置

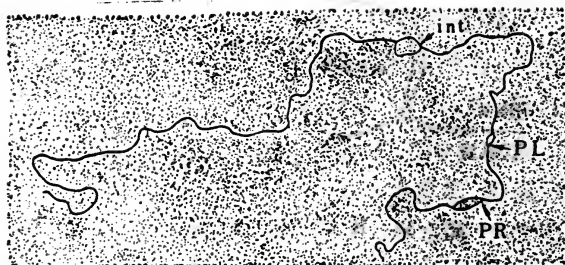


图2-60 λ 染色体的异源双链定位。图中第一个不连续区是 i^1 与 b_5 非同源区，第二个不连续区是 b_2 缺失区。

4. 限制性内切酶分析定位

以SV40为例来说明。SV40DNA是环状双链DNA。K.J. Danna是首先用限制性内切酶作出SV40限制性图谱的学者之一。他首先用HindII消化SV40DNA得到11个片段(如图2-61)。其中Hin-A

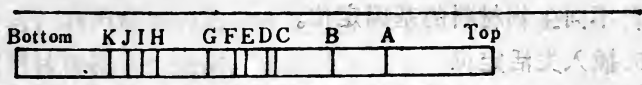


图2-61 HindII消化后SV40染色体形成的片段

片段最大，Hin-K最小。怎样重建这11个片段呢？一种设想是，用二种内切酶同时作用或先后作用于SV40DNA。例如SV40DNA的HindII内切酶片段用EcoRI酶切后进行电泳时，发现F片段消失，而出现了二个较小的片段，此二小片段相加正好与片段F相等。这表明片段F含有EcoRI位点。另一办法是首先用HpaI消化SV40DNA，产生Hpa-A，Hpa-B，Hpa-C三大片段，将此三片段分别从凝胶中分离出来。用Hind-II酶切，然后电泳，从片段的迁移率推出片段的大小。例如Hpa-C片段用HindII酶切后发现Hin-B和Hin-I，这表明Hin-B及Hin-I片段在染色体上紧连在一起。用此方法构建的SV40限制图谱如图2-62所示。将单一的EcoRI位点定为“0”，其它位点于环上的0与1之间。

将限制性图谱转化为功能图谱即基因排列图，最常用的方法

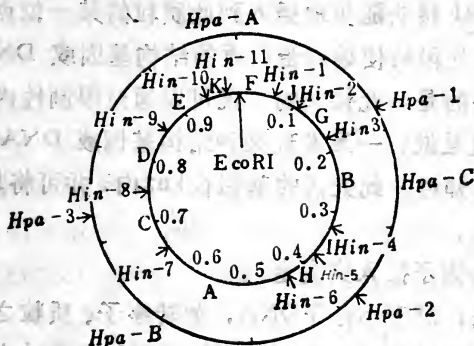


图2-62 SV40基因组的早期限制性图谱。图距由下列计算得出：

$\frac{\text{到EcoRI位点的距离}}{\text{SV40DNA总长度}}$ 。沿F—J—G—B……方向，箭头标明内切酶切

割位点(Hind-1, Hin-2, Hpa-1, ……)字母表示所产生的片段，内圈是11个HindII片段(A—K)的位置，外圈是3个HpaI片段(A—C)

是Southern blot(见基因工程技术)。酶切片段电泳后与特殊基因DNA或其RNA探针杂交,从而将此基因定位于一定的酶切片段上。Southern blot是一种非常有效的定位方法,目前已广泛应用于各种不同生物材料的基因定位。

5. 插入失活定位

插入失活定位的原理是:将额外的DNA插入到染色体或DNA的编码区或控制区,致使出现突变,根据突变的类型鉴定出此失活的基因。进一步利用此插入DNA作为标记物,将失活的基因定位在特异的染色体上。

此定位的方法应用得很广,既可对转座子、质粒、细菌的基因定位,也可对高等动植物的基因定位。

(1) 接头(Linker)插入突变定位

以Tn3转座子的基因定位为例来加以说明。已知Tn3在一质粒上,在合适的条件下用DNaseI处理此质粒,使得此质粒正好在某一随机的位点被切割成线状分子。然后用EcoRI甲基化酶处理此线状DNA分子,以封闭此质粒原来的EcoRI位点,再用DNA合成酶I将线状DNA的两端合成为平头,用连接酶将EcoRI接头与此平末端连接,进一步用EcoRI酶消化,加连接酶使此质粒重新环化,这样便将EcoRI接头随机地插入到此质粒的某一位点。这八个核苷酸的小插入片段将使编码蛋白质的结构基因或DNA识别位点失活。更重要的是,此接头的位置可以通过限制性内切酶降解后电泳得知,就是说,一旦发现某种结构基因或DNA的识别位点失活了,便可知道,此失活的基因在Tn3内,并可将其定位在Tn3的特异区段上。

(2) 转移因子插入突变定位

上述方法,对于小分子DNA,如转座子、质粒之类是很方便的。但对于大分子DNA,特别是高等生物的染色体定位则相当困难或根本办不到。

自然界中,有一种DNA片段可以重复插入到基因组的许多位点上,它可以从基因组的一个位点转移到另一位点,从一个复

制子转移到另一个复制子，我们称之为转移因子 (transposable element)。转移因子在低等生物如细菌，在高等生物如果蝇、玉米中均存在。当转移因子转入到新的位点时，会使其插入位点的基因失活，利用此插入因子作为标记物，便可定位此失活的基因。

利用转移因子对细菌、质粒及噬菌体DNA定位时，首先鉴定出转移因子插入后引起了何种基因失活，进一步用此插入因子作探针，通过Southern blot技术便可很快地定位此失活基因。

由于真核生物有多条染色体，所以无法象上述的细菌、质粒及噬菌体DNA定位那样，直接将失活的基因定位在某一特定的位点上。但由于插入因子可作为标记位点，因此可以通过二点、三点测交来对此基因定位(见遗传重组值定位)，而且也可用原位杂交的方法(见下节)加以定位。当然也可用此转移因子作为标记物，克隆此失活的基因，然后用二点、三点测交及原位杂交法来定位此基因。

6. 原位杂交 (insitu hybridisation) 定位

原位杂交可以将基因直接定位在染色体上，它是随着染色体分辨技术及分子杂交技术的产生而出现的。开始时原位杂交主要用于人的基因定位，后来才逐渐用于动物及植物的基因定位。

首先用秋水仙素处理组织培养的细胞，使其停止在细胞分裂的中期，然后将这些细胞固定。由于细胞核中的染色体会有RNA，所以用RNase去掉所有的可能干扰杂交反应的内源RNA。

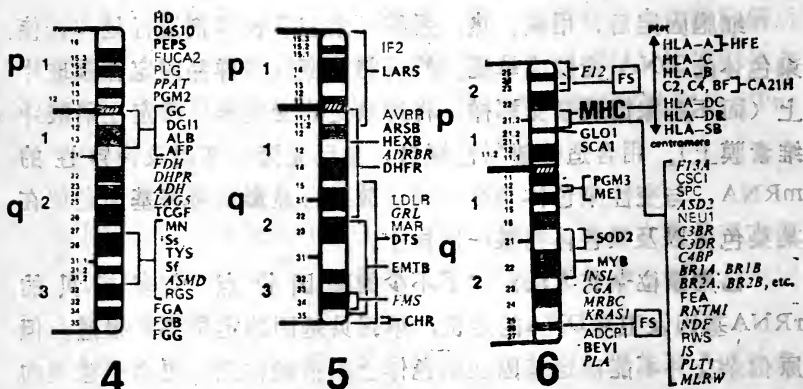
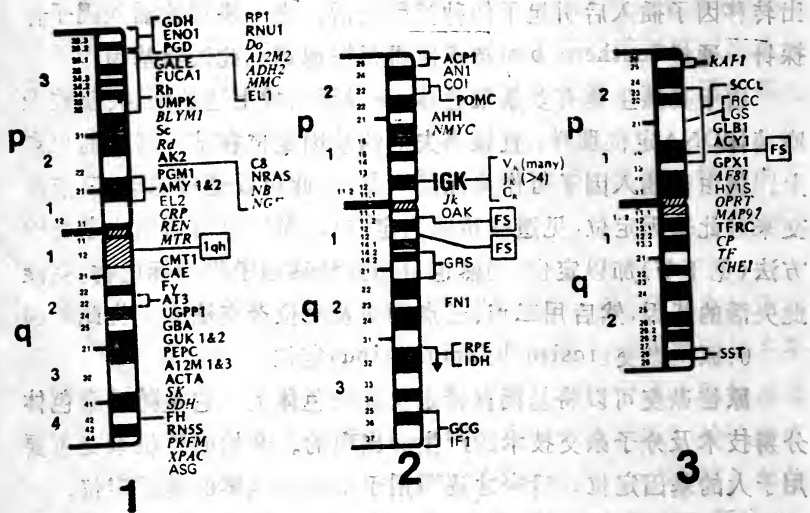
细胞固定后，用碱、热、强酸或某些有机溶剂进行处理，使染色体的DNA变性成单链。然后将此变性的样品固定在载玻片上(而不是象滤膜杂交那样，将待杂交的变性样品固定在硝酸纤维素膜上)。用合适的放射性探针，如已克隆的基因及特异性的mRNA，与变性染色体杂交，通过放射自显影便可将基因定位在某染色体以及染色体的某一区段上。

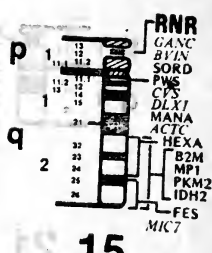
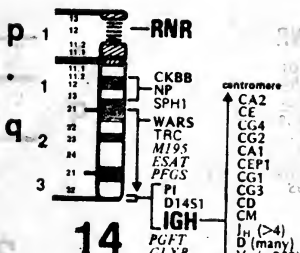
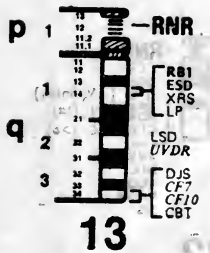
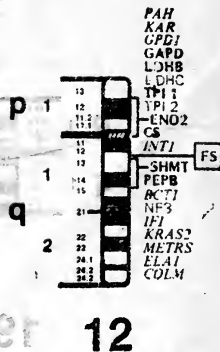
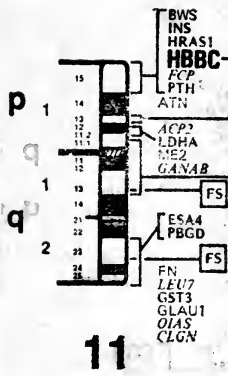
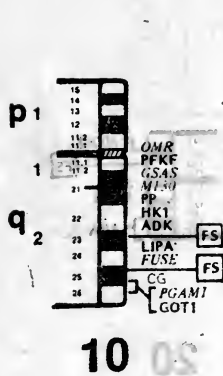
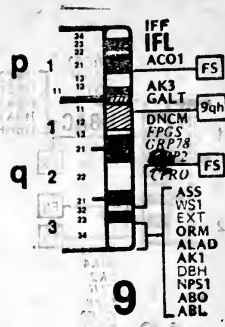
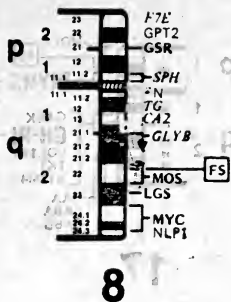
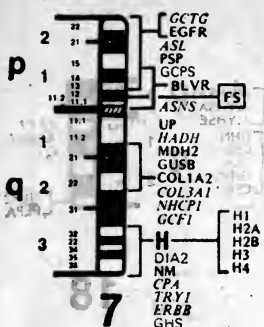
已用原位杂交方法定位了不少的基因位点，如多拷贝的rRNA基因及卫星DNA的定位，单拷贝基因的定位亦有报道。但原位杂交并不能确定基因在染色体上的精确位点，更由于检测的敏感性问题的，对于单拷贝基因的定位尚有不少困难。

(八) 基因图与基因符号

1.—4. 见插页

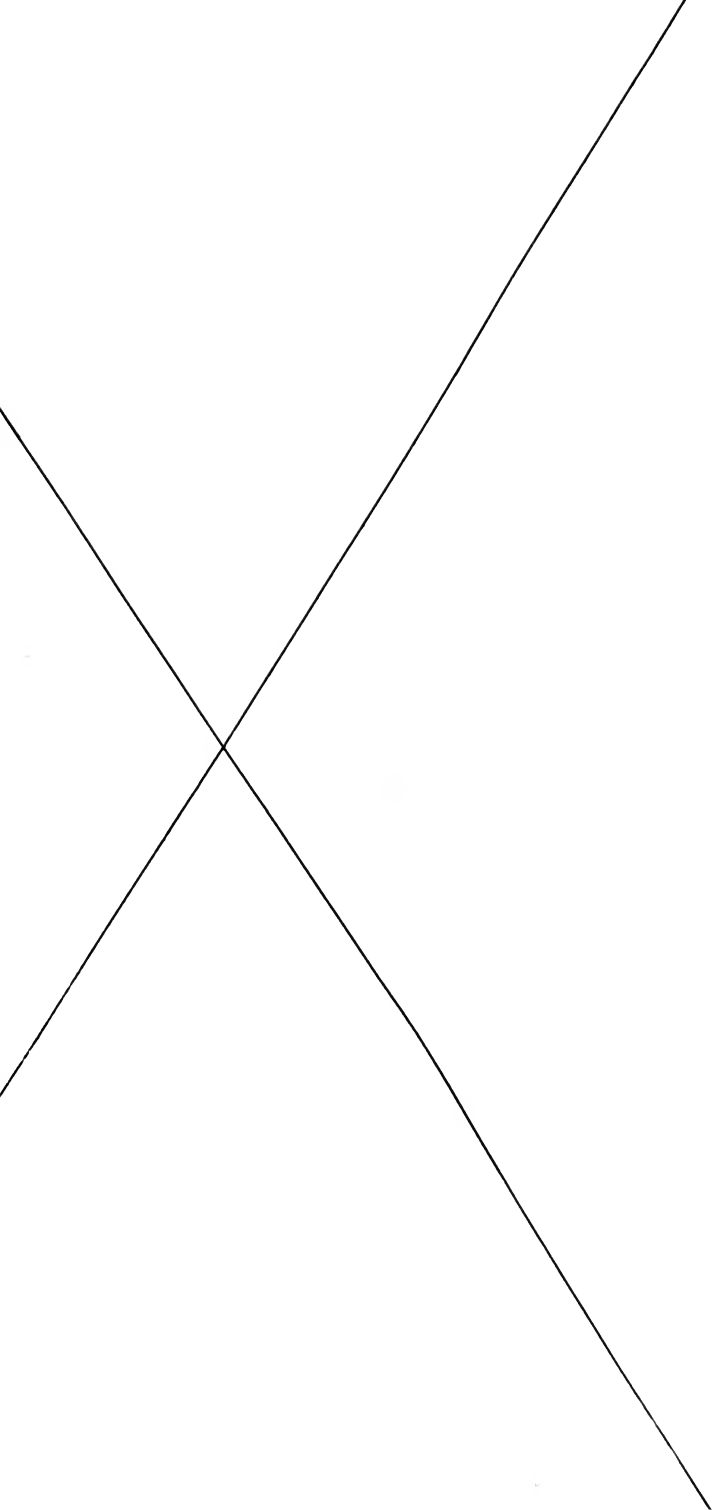
5. 人的基因图



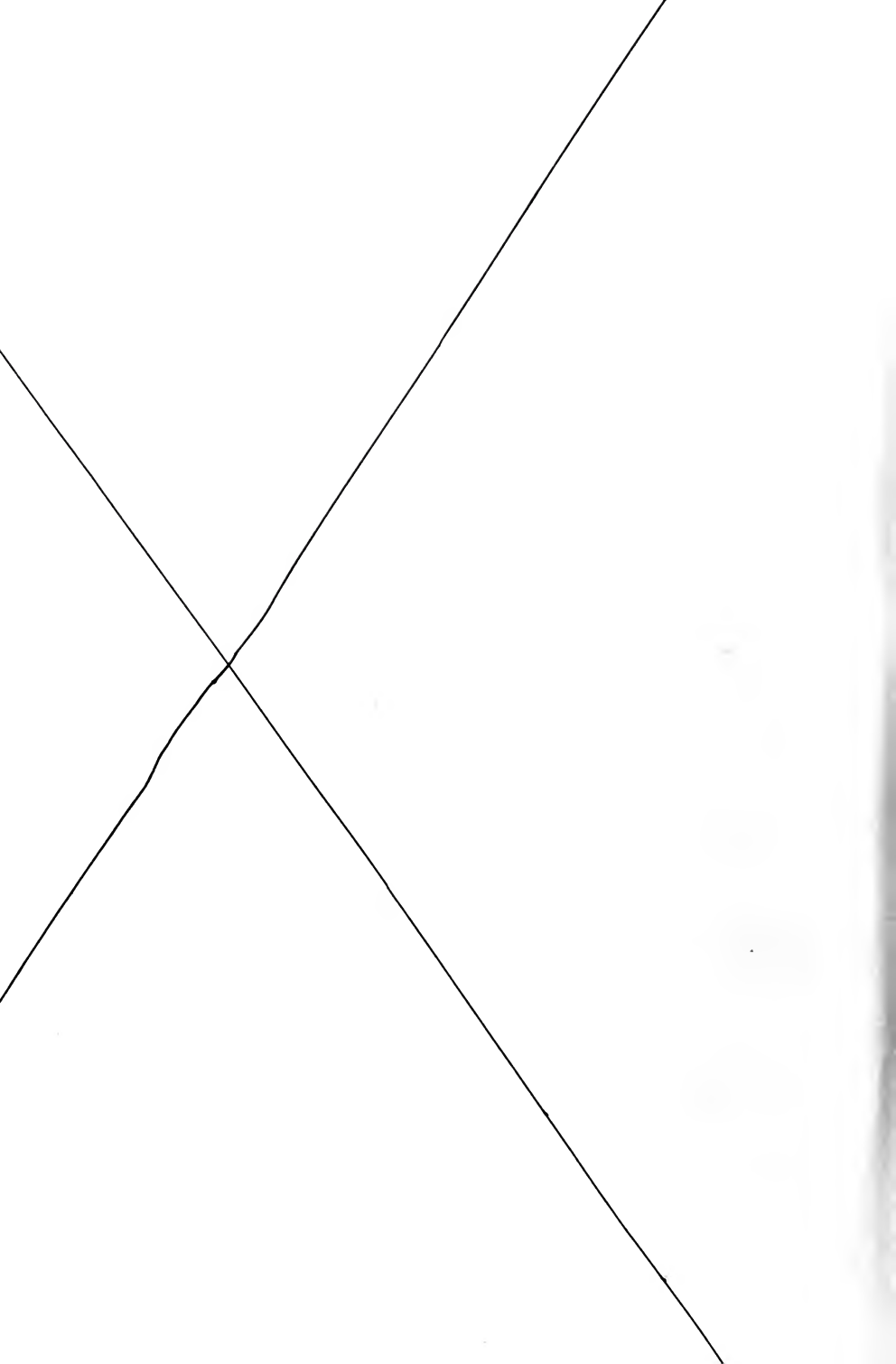


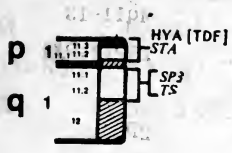
centromere
 CA2
 CE
 CG4
 CG2
 CA1
 CEPT1
 CG1
 CG3
 CD
 CM
 J_H (>4)
 D (many)
 V_H (~250)



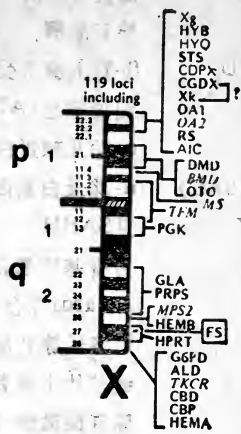








Y



6. 人的基因符号索引

| | | |
|-------|------------------|--------------|
| A12M1 | 腺病毒-12染色体修饰位点-1C | 1q42-43 |
| A12M2 | 腺病毒-12染色体修饰位点-1A | 1P36 |
| A12M3 | 腺病毒-12染色体修饰位点-1B | 1q21 |
| A12M4 | 腺病毒-12染色体修饰位点17 | 17q21-22 |
| AABT | 肾脏运输的β-氨基酸 | ?21 |
| ABL | 致癌基因:鼠白细胞病毒的 | 9q34 |
| | Abelson株 | |
| ABO | ABO血型 | 9q34 |
| ACMA | 心脏肌α肌动蛋白 | 15q11-q端 |
| ACO1 | 可溶性乌头酸酶 | 9P22-13 |
| ACO2 | 线粒体上乌头酸酶 | 22q11-f3 |
| ACP1 | 酸性磷酸酶1 | 2P23 or 2P25 |
| ACP2 | 酸性磷酸酶2 | 11P12-着丝粒 |
| ACTA | 骨骼肌α肌动蛋白 | 1P12-q端 |
| ACY1 | 酰化氨基酸水解酶 | 3P端-q13 |
| ADA | 腺苷脱氢酶 | 20q13-q端 |
| ADCP1 | 腺苷脱氢酶复合蛋白-1 | ?6 |
| ADCP2 | 腺苷脱氢酶复合蛋白-2 | 2P23-q32 |
| ADH | 1类乙醇脱氢酶 | 4 |

| | | |
|-------------|---------------------|---------------|
| ADH2 | 乙醇脱氢酶-2 | 1P端-P23 |
| ADK | 腺苷激酶 | 10q11-24 |
| ADRPD | β -肾上腺素受体 | 5 |
| AF8T | 温度敏感(AFS)组份 | 3 |
| AFP | α -胎儿球蛋白 | 4q11-13 |
| AG(HBAC) | α -珠蛋白基因族 | 16P12-P端 |
| AHCY | 见SAHH | |
| AHH | 芳香基碳氢化合物羟化酶 | 2P |
| AIC | Aicardi综合症 | ?XP22 |
| AK1 | 可溶性腺苷酸激酶 | 9q34 |
| AK2 | 线粒体上腺苷酸激酶 | 1P34 |
| AK3 | 腺苷酸激酶-3 | 9P24-13 |
| ALAD | δ -氨基乙酰丙酸脱氢酶 | 9q34 |
| ALB | 白蛋白 | 4q11-13 |
| ALD | 肾上腺脑白质营养不良 | Xq28 |
| AMY1 | 唾液淀粉酶 | 1P21 |
| AMY2 | 胰液淀粉酶 | 1P21 |
| AN1 | 1型无虹膜 | 2 |
| AN2 | 无虹膜-2 | ?11P13 |
| APOA1 | 脱辅基脂蛋白A-I | 11P13-q13 |
| APOC2 | 脱辅基脂蛋白-CII | ?11P11-q13 |
| APOC3 | 脱辅基脂蛋白 CIII | 11P11-q13 |
| APOC4 | 脱辅基脂蛋白-AIV | 11P11-q13 |
| APOE | 脱辅基脂蛋白E | ?11P11-q13 |
| APRT | 腺嘌呤磷酸核苷酸转移酶 | 16q12-22 |
| ARSA | 芳香基硫酸酯酶A | 22q1331-q端 |
| ARSB | 芳香基硫酸酯酶B | 5 |
| ASD2 | 房隔缺陷 | 6 |
| ASG | 不产生精子因子 | ?1P13 or 1q25 |
| ASL | 精氨酸琥珀酸裂解酶 | 7P21-q22 |
| ASMD | 前段间质产生异常 | 4 |
| ASNRS(NARS) | 天冬氨酰-tRNA合成酶 | 18 |
| ASNS | 天冬酰胺合成酶 | 7P11-q11 |

| | | | |
|-------------|-----------------------|-------------|-----|
| ASS | 精氨酸琥珀酸合成酶 | 9q34 | TAD |
| ASSP2 | 精氨酸琥珀酸合成酶假基因-2 | 6p11 | |
| AT3 | 抗硫酸素III | 1q27.1-23.9 | |
| ATN | 酪氨酸酶缺陷白化病 | 7p11P | |
| ATPM | 见OMR | | |
| AVR(IFR) | 抗病毒状态调节物 | 16 | |
| AVRR | 抗病毒状态阻遏物调节物 | 7p5P | |
| B2M | β -2-小球蛋白 | 15q21-22 | |
| EA2R | BALB/C 3T3 ts2温度敏感补充 | xq13-27 | |
| BAS | 对 β -肾上腺素刺激反应 | 7p21 | |
| BCT1 | 支链氨基酸转移酶-1 | 12p端-q12 | |
| BCT2 | 支链氨基酸转移酶-2 | 19p | |
| BEV1 | Baboon M17病毒感染 | 6 | |
| BF | 备解素因子B | 6p213 | |
| BLVR | 胆绿素还原酶 | 7p14-着丝粒 | |
| BLYM1 | 致癌基因BLYM1:鸡囊淋巴瘤 | 1p32 | |
| BRIA, BRIB | 对特异性合成的多肽的胚变应答 | 6p21.3 | |
| BVIN | N-向性BALB病毒诱导 | 15 | |
| BVIX | 异向性BALB病毒诱导 | 11p | |
| BWS | Beckwith-Wiedemann综合症 | 7p13-15 | |
| C2 | 补体-2 | 6p21.3 | |
| C3 | 补体-3 | 19p端-q13.2 | |
| C3BR | c3b受体 | 6p21.3 | |
| C3Dr | c3d受体 | 6p21.3 | |
| C4BP | 补体-4结合蛋白 | 7q | |
| C4F | 快速补体-4 | 6 | |
| C4S | 慢速补体-4 | 6 | |
| C8 | 补体-8 | 1p | |
| CA2 | 碳酸酐酶II | 8 | |
| CAE | 小带粉状白内障 | 1着丝粒-q21 | |
| CAH1(CA21H) | 先天性肾上腺畸形生长 | 6p21 | |

| | | |
|-----------|-----------------------|-----------------|
| CAT | 过氧化物酶 | 11P13 |
| CB3S | 柯萨奇病毒B3病毒感受性 | 19 |
| CBBM | 蓝单色光色盲 | ?xq23 |
| CBD | 绿色盲 | xq28 |
| CBP | 红色盲 | xq28 |
| CBS | 胱硫醚 β -合成酶 | 21 |
| CBT | 颈动脉瘤 | ?13q34 |
| CC | 先天性白内障 | ?16q |
| CDPX | x-连锁的软骨营养障碍斑点 | ?x122.32 |
| CES | 猫眼综合症 | ?22P端-q11 |
| CG | 绒毛腺促性腺激素(?非结构基因) | ?10 or 18 |
| CGA | α -链绒毛腺促性腺激素 | 6P11-q21(18P11) |
| CGB | β -链绒毛腺促性腺激素 | 19 |
| CGD | 慢性肉芽肿病 | xP22 |
| CHE1 | 拟胆碱酯酶-1 | 3 |
| CHR | 铬酸盐抗性 | 5q35 |
| CKBB | 脑型肌酸激酶 | 14q32-q端 |
| CLGN(CIG) | 胶原酶(隐性营养不良表皮水疱症) | 11 |
| CML | 慢性髓样白血病 | 22q11.3 |
| CMT1 | Charcot-Marie-牙病 | 1q |
| CO | Colton血型 | 2 |
| COI | 虹膜缺失 | ?2P25.1-P端 |
| COL1A1 | 胶原蛋白1 α -1链 | 17q210-220 |
| COL1A2 | 胶原蛋白1 α -2链 | 7q21-22 |
| COL3A1 | 胶原蛋白III α -1链 | 7 |
| COL4A1 | 胶原蛋白IV α -1链 | 17 |
| COLM | 类似 α -1(I)胶原蛋白 | 12 |
| CP | 血球铜蓝蛋白 | 3 |
| CPA | 羧基肽酶A | 7q22-q端 |
| CPRO | 类卟啉原氧化酶 | 9 |
| CPSD | 组织蛋白酶D | 11P端-q12 |
| CRP | c-反应蛋白 | 13 |
| CS | 线粒体上的柠檬酸合成酶 | 12P11-q端 |

| | | |
|-----------------------|-------------------------|------------|
| CSC1 | 皮质酮侧链异构酶 | 17q26P |
| CSA, CSB (CHH1, 2) | 绒毛膜生长催乳激素 | 17q210-220 |
| CSL | 类绒毛膜生长催乳激素 | 17q210-220 |
| CTH | 胱硫醚酶 | 16 |
| CTRB | 凝乳酶原B | 16 |
| CVS | 冠形病毒229E敏感性 | 15q11-q端 |
| D1S3 | 见SK | |
| D4S10 | DNA片段G8 | 4 |
| D14S1 | DNA片段 | 14q32 |
| DBH | 多巴胺β-羟化酶 | 9 |
| DC1 | DC1特异性的免疫反应抗原 | 6P2105-23 |
| DCE | 2,4-脱氢胆固醇→胆固醇酶 | 20 |
| DGI1 | 齿质形成不完全-1 | 4 |
| DGS | DiGeorge综合症 | 22q11 |
| DHFR | 二氢叶酸还原酶 | 5q11-22 |
| DHPR(QDPR) | 醌式二氢嘌呤还原酶 | 4 |
| DHTR | 二氢睾酮受体即TEM | |
| D1A1 | 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 磷酸心肌黄酶 | 22q1331-q端 |
| D1A2 | 心肌黄酶2 | 7 |
| D1A4 | 心肌黄酶4 | 16q12-21 |
| D1P1(VD1) | 缺损性干扰颗粒诱导的控制 | 16 |
| DJS | Dubin-Johnson综合症 | 13 |
| DLX1 | 读字困难-1 | 15 |
| DMD | Duchenne肌肉行为异常 | Xp12-21 |
| DM | 肌强直功能行为异常 | 19 |
| DNCM | 细胞质膜DNA | 9qh |
| DNL | 溶酶体DNA酶 | 19 |
| DO | Dombrock血型群 | 1P |
| DTS | 白喉毒素敏感 | 19 |

| | | |
|-------------|--------------------------|----------|
| E11S | Ecohol敏感性 | 19q |
| EBR1 | 见CLGN | |
| CBS1 | Ogan型胞性表皮松懈 | ?16 |
| EF2 | 延伸因子-2 | 19 |
| EGFR | 表皮生长因子的受体 | 7P13-P22 |
| EL1 | 椭圆红血球病-1 | 1P |
| EL2 | 椭圆红血球病-2 | ?1 |
| ELA1 | 弹性蛋白-1 | 12 |
| EMTB(RPS14) | 吐根碱抗性(核糖体蛋白S14) | 5q31-35 |
| ENO1 | 烯醇酶-1 | 1P36-P端 |
| ENO2 | 烯醇酶-2 | 12P11-12 |
| ERBA | 致癌基因: 鸟红血球母细胞白17 血病病毒 | |
| ERBB | 致癌基因ERBB | 7P端-q22 |
| ERV1 | 内源性逆转录病毒-1 | 18 |
| FSA4 | 酯酶-A4 | 11q13-22 |
| ESAT | 酯酶活性因子 | 14 |
| ESB3 | 酯酶B3 | 16 |
| ESD | 酯酶D | 13q14.1 |
| EXT | 多样性外生骨疣 | ?9q3 |
| F7 | 凝血因子VII | 13q34 |
| F7E | 凝血因子VII表达 | 8 |
| F8C | 促凝剂组份凝固因子VII 即HEMA | |
| F9 | 凝血因子IX即HEMB | |
| F10 | 凝血因子X | 13q34 |
| F12(HAF) | 凝血因子XII(Hogeman因子) | 6P23-P端 |
| F13A | 组份A的因子XIII | 6P |
| FPCP | F-细胞产物 | 11P |
| FDH | 甲醛脱氢酶 | 4P14-q端 |
| FEA | F9胚胎抗原 | ?6P |
| FES | 致癌基因: 猫肉瘤病毒 | 15q25-26 |

| | | |
|---------|---|--|
| FGA | α -链纤维蛋白原 | 4q21-31 |
| FGB | β -链纤维蛋白原 | 4q21-31 |
| FGG | γ -链纤维蛋白原 | 4 |
| FH | 延胡索酸水合酶 | 1q42.1 |
| FHC(HC) | 家族性高胆固醇症 | 19P端-q13 |
| FMC | 致癌基因FMS (McDonough 猫肉瘤病毒) | 5q34 |
| FN1 | 纤维结合素 | 2 |
| FOS | 致癌基因FOS; FBJ骨肉瘤癌 病毒 | ? |
| FS | 有或没有叶酸盐或 BrdU 的培养基中, 在培养细胞 中观察到的脆点。 | 2P11.2; 2q13; 3P14.2 6P23; 6q26; 7P11.2; 8q2q22.3; 9P21.1; 9q31; 10q23.3; 10q25.2; 11q13.3; 11q23.3; 12q13.1; 16P22.3; 16q22.1 16q23; 17q12; 20P11.23; xq26; xq27.3 |
| FTH | 铁蛋白重链 | 19 |
| FTL | 铁蛋白轻链 | 19 |
| FUCA1 | α -L-墨角藻糖苷酶-1 | 1P32-34 |
| FUCA2 | α -L-墨角藻糖苷酶-2 | 7q |
| FUSE | 多核细胞化诱导物 | 10 |
| Fy | Duffy血型 | 1q12-21 |
| GAA | α 葡萄糖酸苷酶 | 17 |
| GALB | α -半乳糖苷酶B | 22q13-q端 |
| GALE | 半乳糖4-差向异构酶 | 1P32-P端 |
| GALK | 半乳糖激酶 | 17q21-22 |
| GALT | 半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 | 9P13-21 |
| GANAB | 中性 α -葡糖苷酶AB | 11q13-q端 |

| | | |
|-------|--------------------|-----------------|
| GANC | 中性 α -葡糖苷酶C | 15 |
| GAPD | 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 | 12P13 |
| GARS | 甘氨酸核苷酸合成酶 | 21 |
| GBA | β -葡糖苷酶 | 1q |
| GC | 组特异性组份 | 4q11-13 |
| GCF1 | 生长速率控制因子-1 | 7 |
| GCF2 | 生产速率控制因子-2 | 16 |
| GCG | 胰高血糖素 | 2P36-37 |
| GCPS | Greig颅与多并指趾畸形综合症 | ?3P21.1 or 7P13 |
| GCTG | γ -谷氨酰环化转移酶 | 7P14-P端 |
| GDH | 葡萄糖脱氢酶 | 1P端-P36.13 |
| GH-PL | 生产激素/胎盘乳糖基因家族 | 17q210-220 |
| GHN | 正常的生长激素 | 17q210-220 |
| GHS | Goldenhar综合症 | ?7P |
| GHV | 变异的生长激素 | 17q210-220 |
| GLA | α -半乳糖苷酶A | xq22-24 |
| GLAT | 半乳糖十活性因子 | 23 |
| GLAU1 | 先天性青光眼-1 | ?11 |
| GLB1 | β -半乳糖苷酶-1 | 3P21-着丝粒 |
| GLB2 | β -半乳糖苷酶-2 | 22q13-q端 |
| GLO1 | 乙二醛酶1 | 6P21.3-21.2 |
| GLYB | 仓鼠互补的甘氨酸自养B | 8q21.1-q端 |
| GOT1 | 可溶性谷草转氨酶 | 10q25.3-26.1 |
| GOT2 | 可溶性线粒体上的谷草转氨酶 | 16P12-Q22 |
| GPD | 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 | xq28 |
| GPD1 | α -磷酸甘油酸脱氢酶 | 12 |
| GPHB | 糖肽激素 β -族 | 19 |
| GP1 | 磷酸葡萄糖差向异构酶 | 19P13-q13 |
| GPT1 | 可溶性红细胞谷丙转氨酶 | ?16P端-P13 |
| GPT2 | 可溶性肝脏谷丙转氨酶 | ?8q13-q端 |

| | | |
|--------|--|--------------|
| | 转氨酶 | |
| GPX1 | 谷胱甘肽过氧化物酶-1 | 3P13-q12 |
| GRL | 淋巴细胞糖皮质激素受体 | 5 |
| GRP78 | GRP78葡萄糖调节蛋白 | 9着丝粒-q端 |
| GRS | Gardner综合症 | 7q14.3-21.3 |
| GSAS | 谷氨酸-γ-半醛合成酶 | 10 |
| GSR | 谷胱甘肽还原酶 | 8P21.1 |
| GST3 | 谷胱甘肽S-转移酶-3 | 11q13-22 |
| GUK1和2 | 鸟苷酸激酶1和2 | 1q32=42 |
| GUSB | β-葡萄糖酸苷酶 | 7着丝粒-q22 |
| GUSM | β-葡萄糖酸苷酶调节物 | 19 |
| H | 组蛋白基因家族(H, H ₂ A, H ₂ B, H ₃ , H ₄) | 7q32=36 |
| HADH | 羟基辅酶2脱氢酶 | 7 |
| HAF | 见F12 | |
| HAGH | 乙醛酶22 (羟基谷胱甘肽水解酶) | 16 |
| HBA | 血红蛋白α-链 | 16P12-P端 |
| HBAC | 见AG | |
| HBB | 血红蛋白β-链 | 11P15 |
| HBBC | 见NAG | |
| HBD | 血红蛋白δ-链 | 11P15 |
| HBG1 | 第136个氨基酸为丙氨酸的血红蛋白γ-链 | 11P15 |
| HBG2 | 第136个氨基酸为甘氨酸的血红蛋白γ-链 | 11P15 |
| HBGR | 血红蛋白γ调节物 | 11P15 |
| HBHR | 血红蛋白H相关的金属迟缓 | 16P |
| HBE | 血红蛋白ε链 | 11P1200-1203 |
| HBZ | 血红蛋白ζ链 | 16P12-P端 |
| HB2P | 血红蛋白假基因 | 16P12-P端 |
| HC | 见FHC | |

| | | |
|--|--------------------|--------------|
| HCVS | 见CVS | |
| HD | Huntington病 | |
| HEMA(F8C) | 典型的血友病 (血友病A) | xq28 |
| HEMB(F9) | B血友病 | xq27 |
| HEXA | 己糖胺酶A | 15q22-25.1 |
| HEXB | 己糖胺酶B | 5q13 |
| HFE | 青铜色糖尿病 | 6 |
| Hh | Bombay表型 | 19 |
| HK1 | 己糖激酶-1 | 10P端-11 |
| HLA-A, B, C | 人白细胞抗原 | 6P21.3 |
| HLA-D/DR | D相关的人白细胞抗原 | 6P21.3 |
| HLA-DC | DC型人白细胞抗原 | 6P21.3 |
| HLA-SB | SB型人白细胞抗原 | 6P21.3 |
| HP | 结合组蛋白 | 16q22 |
| HPA1 | HpaI限制性内切酶多态型 | 11P1205-1208 |
| HPRT | 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 | xq20-27 |
| HRAS ₁ (RASH ₁) | Harvey大鼠肉瘤-1原癌基因 | 11P15.5-15.1 |
| HRAS ₂ (RASH ₂) | Harvey大鼠肉瘤-2原癌基因 | x |
| HTOR | 5-羟色胺氧化酶调节物 | 21 |
| HVIS | 疱疹病毒敏感 | ?3 |
| HYA | 位点AY组织相容性基因 | y |
| HYB | 位点BY组织相容性基因 | x |
| HYC | 位点CY组织相容性基因 | x |
| IDA(IDVA) | α -L-艾杜糖醛酸酶 | 22P端-q11 |
| IDDM | 依赖胰岛素的糖尿病 | ?6 |
| IDH1 | 可溶性的异柠檬酸脱氢酶 | 2P32-q端 |
| IDH2 | 线粒体上的异柠檬酸脱氢酶 | 15q21-q端 |
| IF1 | 干扰素1 | ?2 |
| IF2 | 干扰素2 | ?5 |

| | | |
|----------|-----------------|----------|
| IFF(IFB) | 成纤维细胞干扰素 | 9P24-13 |
| IFI(IFG) | 免疫干扰素 | 12q24.1 |
| IFL(IFA) | 白细胞干扰素基因族 | 9q端-P13 |
| IFR | 见AVR | |
| IFRC | 干扰素受体(抗病毒蛋白) | 21q21-q端 |
| IGAS | 免疫球蛋白重链结合位点 | 2 |
| IGEP | 免疫球蛋白E假基因 | 9 |
| IGH | 免疫球蛋白重链基因 | 14q32.3 |
| IGHA1 | 免疫球蛋白A1重链的恒定区基因 | 14q32 |
| IGHA2 | 免疫球蛋白A2重链的恒定区基因 | 14q32 |
| IGHD | 免疫球蛋白D重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHE | 免疫球蛋白E重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHG1 | 免疫球蛋白G1重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHG2 | 免疫球蛋白G2重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHG3 | 免疫球蛋白G3重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHG4 | 免疫球蛋白G4重链恒定区基因 | 14q32 |
| IGHJ | 重链连接区(多)基因 | 14 |
| IGHM | 免疫球蛋白M重链恒定区基因 | 14 |
| IGHV | 重链可变区的(多)基因 | 14 |
| IGK | 免疫球蛋白K轻链基因组 | 2P |
| IGKC | k-轻链恒定区基因 | 2P |
| IGKJ | k-轻链连接区基因 | 2P |
| IGKV | k-轻链可变区(多)基因 | 2P |
| IGL | 免疫球蛋白N轻链基因族 | 22 |

| | | |
|-----------------|--------------------|--------------|
| IGLC | N轻链不变区基因 | 22 |
| IGLJ | N轻链连接区基因 | 22 |
| IGLV | N轻链可变区(多)基因 | 22 |
| IHG | 对合成多肽的免疫应答 | 6P21.3 |
| | -HGAL | |
| IL2 | 见TcGF | |
| INS | 胰岛素 | 11P15-15.5 |
| INSL | 类胰岛素DNA序列 | 6P23-q12 |
| INTI | 致癌基因INT, 推测的鼠 | 12P端-q14 |
| | 类乳腺癌致癌基因 | |
| IRDN | 胰高血糖素相关的DNA多态性 | 11P13-q15.5 |
| IR | 见BR1A, BR1B | 6P2105-2300 |
| IS | 免疫抑制 | 6P21.3 |
| ITG(BRIA, RBIB) | 对合成多肽的免疫应答 | |
| | -TGAL | 20P |
| ITPP | 次黄嘌呤三磷酸酶 | 2 |
| | | |
| JK | Kidd血型 | 12 |
| | | |
| KAR | 芳族 α -酮酸还原酶 | 12P |
| KRAS1(RASK1) | Kirsten鼠肉瘤原致癌基因-1 | 6P23-q12 |
| KRAS2(RASK2) | Kirsten鼠肉瘤原致癌基因-2 | 12 |
| | | |
| LAG5 | 白细胞5号抗原群 | 4 |
| LAP | 喉收缩肌麻痹 | ?6 |
| LARS(RNTLS) | 亮氨酸-tRNA合成酶 | 5 |
| LCAT | 卵磷脂-胆固醇转酰酶 | 16q22 |
| LCH | 粘晶状体凝集素 | 14 |
| LDHA | 乳酸脱氢酶A | 11P1203-1208 |
| LDHB | 乳酸脱氢酶B | 11P121-122 |

| | | |
|-------------|-------------------------------|-----------|
| LDHC | 乳酸脱氢酶C | 712P |
| Le | Lewis血型 | 19 |
| LEU7 | 中性杀伤白细胞的Leu-7膜抗原 | 11 |
| LGS | Langer-Giedion综合症 | 8Q23.3 |
| LHB | 促黄体生成激素β-亚单位 | 19 |
| LIPA | 溶酶体酸性脂酶A | 10 |
| LIPB | 溶酶体酸性脂酶B | 16 |
| LSD | Letterer-Siwe病 | 13q14-31 |
| Lu | Lutheran血型 | 19 |
| M130 | 外膜蛋白-130 | 10 |
| M195 | 外膜蛋白-195 | 14 |
| M7VS1 | Baboon M7敏感-1 | 19 |
| MANA | 细胞质α-D-甘露糖苷酶 | 15q11-q端 |
| MANB | 溶酶体α-D-甘露糖苷酶 | 19p端-q13 |
| MAP97(MFJ1) | 黑色素瘤相关抗原P97 | 3 |
| MAR | 难治的巨细胞性贫血 | 5q |
| MARS | 见MTRNS | |
| MADH1 | 可溶性的苹果酸脱氢酶 | 2P23 |
| MADH2 | 线粒体上的苹果酸脱氢酶 | 7P22-q22 |
| MD1 | 狂躁抑郁性疾病 | 76 |
| MDLS | Miller-Dicker脑因发育不完全综合症 | 717P13 |
| ME1 | 可溶性苹果酸酶 | 6q12 |
| ME2 | 线粒体上苹果酸酶 | 711 |
| MEN2 | II型多内分泌瘤形成 | 20P12.2 |
| MHC | 主要组织相容性复合物 | 6P2105-23 |
| MIC7 | 由Imperial 癌单克隆检查的并连细胞抗原28-3-7 | 15 |
| MLRW | 弱混合淋巴细胞反应 | 6 |
| MMC | 皮肤恶性黑色素瘤 | 71P |
| MN | MN血型 | 4q28-31 |

| | | |
|-----------------|---------------------------------------|--------------|
| MOS | 致癌基因: 莫洛尼氏鼠类 肉瘤病毒 | 8q22 |
| MPI | 甘露糖磷酸异构酶 | 15q22-q端 |
| MRBC | 猴红细胞的B细胞受体 | 6 |
| MS | Menker综合症 | xP11-21 |
| MTR | 5-甲基四氢叶酸; L-高胱 氨酸s-甲基转移酶 | 1 |
| MTRNS (MARS) | 甲硫氨酰-tRNA合成酶 | 12 |
| MYB | 致癌基因: 马成骨髓母细 胞瘤病毒 | 6P21-22 |
| MYC | 致癌基因: 成骨髓母细胞 瘤病毒 | 8q24 |
| MYHS | 骨骼肌肌纤凝蛋白重链基因族 | 17P11-P端 |
| MYHSA1 | 成年-1骨骼肌肌纤凝蛋白重链 基因族 | 17P11-P端 |
| MYHSA2 | 成年-2骨骼肌肌纤凝蛋白重链 | 17P11-P端 |
| MYHSE1 | 胚性-1骨骼肌肌纤凝蛋白重链 | 17P11-P端 |
| NAG(HBBC) | 非- α 珠蛋白族 (血红蛋白 β -族) | 11P1205-1208 |
| NAGA | N-乙酰基- α -D-氨基半乳 糖苷酶 | 22q13 |
| NARS | 见ASNRS | |
| NB | 成神经细胞瘤 | 1P32-P端 |
| NDF | 嗜中性分化因子 | 6 |
| NEU1 | 神经氨(糖)酸苷酶-1 | 76P2105-2300 |
| NGF | 神经生长因子 | 1P21-P端 |
| NHCP1 | 非组蛋白染色体蛋白质-1 | 7 |
| NHCP2 | 非组蛋白染色体蛋白质-2 | 16 |
| NF1 | 神经纤维瘤 | ?19 |
| NF2 | 神经纤维瘤 | ?4 |
| NF3 | 家族性肠神经纤维瘤 | ?12q21-24.2 |

| | | |
|-----------|-----------------------|-------------------|
| NLP1 | 赘生类淋巴组织增生-1 | 78q24.3 |
| NLP2 | 赘生类淋巴组织增生-2 | 718q24 |
| NM | 嗜中性迁移 | 7q22-q端 |
| NMYC | 成神经细胞瘤MYC致瘤基因 | -2P |
| NP | 核苷磷酸化酶, 腺骨发育不全综合症 | 14q13 |
| NPS1 | 甲-膝盖骨综合症 | 9q3 |
| NRAS | 致瘤基因NRAS | 1P |
| OA1 | 眼白化-1 | xP22 |
| OA2 | 眼白化-2 | xP22 |
| OAK | Kjer型视觉减缩 | 723 |
| OIAS | 2', 5'-异腺苷酸合成酶 | 11 |
| OMPD | 乳清酸核苷单磷酸脱羧酶 见BPRT | |
| OMR(ATPM) | 寡霉素抗性(线粒体ATP酶) | 10 |
| OPRT | 乳清酸磷酸核糖转移酶 -OMP脱羟酶 | -q21 3着丝粒 -q21 |
| ORM | 血清类粘蛋白 | 9q34 |
| OTC | 鸟氨酸转氨甲酰酶 | xP21 |
| PAH(PKU) | 苯丙氨酸羟化酶 | 12 |
| PAIS | 氨基咪唑核苷酸合成酶 | 21 |
| PBGD(UPS) | 胆色素原脱氨基酶 | 11q23-q端 |
| PDB | Pagen骨病 | 76 |
| PDGF | 血小板衍生长因子见SIS | |
| PEPA | 肽酶A | 18q13 |
| PEPB | 肽酶B | 12q21 |
| PEPC | 肽酶C | 1q |
| PEPD | 肽酶D | 19P端-q13 |
| PEPS | 肽酶S | 4P12-q12 |
| PFGS | 磷酸核糖甲酰甘氨酸合成酶 | 14 |

| | | |
|------------|---------------------|--------------|
| PFKL | 肝脏磷酸果糖激酶 | 21q22 |
| PFKM | 肌心磷酸果糖激酶 | 1着丝粒 -q32 |
| PFKP(PFKF) | 血小板磷酸果糖激酶 | 10P端-P11.1 |
| PG | 胃蛋白酶原 | ?6 |
| PGAML | 磷酸甘油酸变位酶A | 10q25.3-26.1 |
| PGD | 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 | 1P36.13-P端 |
| PGFT | 磷酸核糖甘氨酸胺甲酰转移 | 14q22-q端 |
| PGK | 磷酸甘油酸激酶 | xq13 |
| PGM1 | 葡萄糖磷酸变位酶-1 | 1P221 |
| PGM2 | 葡萄糖磷酸变位酶-2 | 4P14-q12 |
| PGM3 | 葡萄糖磷酸变位酶-3 | 6q12 |
| PGP | 磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酶 | 16P13-12 |
| PI | α -1-抗胰蛋白酶 | 14q |
| PKM2 | 丙酮酸激酶-3 | 15q22-q端 |
| PKU | 见PAH | |
| PL | 胎盘催乳激素 (同 CSA, CBB) | 17q210-220 |
| PLA | 血纤维蛋白溶酶原激活物 | 6 |
| PLG | 血纤维蛋白溶酶原 | 4 |
| PLT1 | 原始淋巴细胞实验-1 | 6P2105-23 |
| PP | 无机焦磷酸酶 | 10q11.1-24 |
| PPAT | 磷酸核糖焦磷酸氨基转移酶 | 4P端-q21 |
| PRGS | 磷酸核糖甘氨酸胺合成酶 | 21q22 |
| PRL | 催乳素 | 6P23-q12 |
| PRPS | 磷酸丝氨酸磷酸酶 | x |
| PSP | 磷酸丝氨酸磷酸酶 | 7q端-q22 |
| PTH | 甲状旁腺激素 | 11q端-P11 |
| PVS | 小儿麻痹病毒敏感性 | 19q |
| PWS | Prader-Willi综合症 | 15q11-12 |
| 1qh | 长臂中央异染色质片段 | 13 |
| 9qh | 长臂中央异染色质片段 | 9 |

| | | | |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------|--|
| QDPR | 见DHPR | | |
| RACH | 乙酰胆碱酯酶调节物 | 12q23 | |
| RAF1 | 致癌基因RAF1 | 3p25 | |
| RAF2 | 致癌基因RAF2 | 4q12 | |
| RB1 | 成视网膜细胞瘤-1 | 13q14.1 | |
| RCC | 肾细胞癌 | 7p21 | |
| Rd | Radia血型 | 1p32-34 | |
| REN | 血管紧张肽原酶 | 1p21-q端 | |
| Rh | Rh血型 | 1p32-36.11 | |
| RGS | Riegler综合症 | 7q23-27 | |
| RN5S | 5SRNA基因 | 1q42-43 | |
| RNTM1 (TRM1, 2) | 起始甲硫tRNA | 6p23-q12 | |
| RNR | 核糖体RNA | 13P12; 14P12, 15P12, 21P12; 22P12 | |
| RNU1 | U1小分子核RNA | 1P36 | |
| RP1 | 色素性视网膜炎 | 7q11 | |
| RPE | 核酮糖5-磷酸-3-差向异构酶 | 2q32-q端 | |
| RPS14 | 核糖体蛋白S14即EMTB | | |
| RS | 视网膜先天性裂 | xP22 | |
| RWS | Ragweed敏感性 | 6 | |
| S7 | 表面抗原7, 见EGFR | | |
| SAHH(AHCY) | S-腺苷半胱氨酸水解酶 | 20着丝粒-q13.1 | |
| SC | Scianna血型 | 1P32-34 | |
| SCA1 | 脊髓与小脑的共济失调-1 | 6 | |
| SCCL | 肺小细胞癌 | 3P14-23 | |
| SDH | 琥珀酸脱氢酶 | 1P221-q端 | |
| Se | 分泌腺 | 19 | |
| Sf | Stoltzfus血型 | 4q | |
| SGP75 | 糖蛋白7500表面抗原 | 11 | |

| | | | |
|-----------|-------------------------|------------|--|
| SHMT | 丝氨酸羟甲基转移酶 | 12q12-14 | |
| SIS(PDGF) | 致癌基因: 猿肉瘤病毒 | 22 | |
| SK(D1S3) | 致癌基因: Sloan-Kettering病毒 | 1q12-q端 | |
| SOD1 | 可溶性过氧化物歧化酶 | 21q211 | |
| SOD2 | 线粒体上过氧化物歧化酶 | 6P21 | |
| SORD | 山梨醇脱氢酶 | 15P端-q21 | |
| SP3 | 精子发生因子-3 | ?Yq11 | |
| SA2, SPA5 | 无名的表面多肽 | 分别在2与5 | |
| SPC | 唾液蛋白复合物 | ?6P | |
| SPH | 球形红细胞[贫血]症 | 8P11, ?14q | |
| SRC | 致癌基因SRC(劳氏肉瘤) | 20 | |
| Ss | Ss血型 | 4q28-31 | |
| SST | 生长激素释放抑制因子 | 3q27-28 | |
| STA | 身高 | y | |
| STS | 类固醇硫酸酯酶 | xP23 | |
| TCN2 | 反式维生素B ₁₂ | ?16 or 17 | |
| TCGF(IL2) | F-细胞生产因子(间白 细胞-2) | 4 | |
| TDS | 睾丸决定因子 | y | |
| TF | 转移蛋白 | 3 | |
| TFM(DHTR) | 睾丸雌性化综合症(二氢 睾丸酮受体) | xq11-13 | |
| TFR | 转移蛋白受体 | 3 | |
| TG | 甲状腺球蛋白 | 8 | |
| THC | 初级血小板增多 | 21 | |
| TK1 | 可溶性胸腺嘧啶激酶 | 17q21-22 | |
| TK2 | 线粒体上胸腺嘧啶激酶 | 16 | |
| TKCR | Goeminne TKCR综合症 | ?xq28 | |
| TPI1和2 | 磷酸丙酮酸异构酶-1 | 12q28 | |
| TPR1 | 胰蛋白-1 | 7q22-q端 | |
| TS | 牙齿大小 | ?xq11 | |

| | | |
|------|---------------------|---------|
| TYS | 硬胼胝 | 4q |
| UGP1 | 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化1-酶 | 1q21-23 |
| UGP2 | 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化2-酶 | 2 |
| UMPR | 尿苷单磷酸激酶 | 1P32 |
| UP | 尿苷磷酸酶 | 7 |
| UPS | 尿卟啉原1合成酶即PBGD | |
| UVDR | 紫外损伤修复 | 13 |
| VDI | 见DIPI | |
| VMDI | 非典型的卵黄状斑点营养不良 | ?16P |
| WAGR | Wilms瘤/无虹膜/性腺真性瘤/迟钝 | 11P13 |
| WARS | 色氨酰-tRNA合成酶 | 4q21-q端 |
| WS1 | Warardenburg综合症-1 | ?9q34 |
| Xg | xg血型 | xP22.3 |
| Xk | kell血型前体 | xP22.3 |
| XPA | 着色性干皮病A互补 | 1q |
| XRS | x-射线敏感 | ?13q14 |

(陈炬)

注: p与q分别表示染色体上的短臂与长臂, 前面的数字表示几号染色体后面数字表示臂上的位置

第三章

遗传学教学实验

实验1 果蝇的培养与观察

果蝇属于昆虫纲、双翅目，与家蝇是不同的种。它的生活史与一般的昆虫一样：卵→幼虫→蛹→成虫。果蝇具有生活史短，繁殖率高，饲养简便及突变性状多等特点，是研究遗传学的经典材料。

一、实验目的

掌握实验果蝇的饲养管理，了解果蝇的生活史，识别雌雄蝇及几种常用的突变类型。

二、实验材料

野生型和几种常见的突变型果蝇。

乙醚 酒精 琼脂 玉米粉 红糖 酵母粉 镊子 放大镜
解剖镜 毛笔 白瓷板 石棉网 酒精灯 麻醉瓶 广口瓶 灭
菌指管 培养皿 消毒滤纸等

三、实验步骤

(一) 果蝇培养

常用的玉米饲料配方如下：蔗糖13g 玉米粉17g 琼脂1.5g

—2g 酵母粉1.4g 丙酸或乙酸1ml 水150g

饲料配制步骤：(1) 琼脂和蔗糖中加入80ml水，烧开至琼脂溶化。(2) 玉米粉和酵母粉中加入80ml水，烧开调匀；(3) 将(1)与(2)混合后，加入1ml丙酸，分装到灭菌的饲料瓶或指管中，用纱布包裹的棉花球作瓶塞。饲料冷却后插入经灭菌的滤纸，作幼虫化蛹时的干燥场所。

果蝇一般培养在恒温箱内，最适温度为20—25℃。30℃以上能使果蝇不育和死亡，低温则使它的生活周期延长，生活力降低。在25℃时，从卵到成虫约需10天，成虫存活约15天。培养瓶上应贴上标签，写明名称和培养日期。

(二) 果蝇的观察：

1. 果蝇的麻醉：将果蝇倒入麻醉瓶中进行麻醉。注意掌握麻醉的时间，一定程度时把果蝇倒在白瓷板上。当果蝇翅膀外展45°角时，表示已经死亡。

2. 果蝇外部形态的观察：果蝇分头、胸、腹三部。头部有一对大的复眼、三个单眼和一对触角；胸部有三对足、一对翅，在最后一对足和翅之间有一对平衡棒；腹部背面有黑色条纹，腹面有腹片；外生殖器在腹部末端。

3. 雌雄性的鉴别：

| | 体型 | 腹部末端 | 背部条纹 | 外生殖器 | 性梳 |
|---|----|-------|------|-------------|--------|
| ♀ | 大 | 无色、端尖 | 可见5条 | 阴道板、肛上板等 | 无 |
| ♂ | 小 | 黑色钝圆 | 可见3条 | 生殖弧、肛上板、阴茎等 | 在前足跗节上 |

4. 几种突变类型的观察：观察野生型和黑檀体、黄体、残翅、白眼、棒眼、焦刚毛等几种突变型的体色、眼色、眼形、翅形及刚毛，将观察结果列表填写。

实验2 果蝇单因子杂交实验

一、实验目的

验证分离定律。

二、实验材料

野生型果蝇，残翅果蝇。

双筒解剖镜 牛奶瓶 麻醉瓶 白瓷板 海绵板 解剖针
毛笔 镊子 琼脂 蔗糖 玉米粉 酵母粉 丙酸

三、实验步骤

1. 选残翅果蝇(vg/vg)和野生型果蝇($+/+$)为亲本，进行杂交(正交或反交)。但母体一定要选用处女蝇，培养两瓶，每瓶5—6对。贴上标签，记上“P”(亲本)、交配日期和实验者姓名。

2. 7~8天后移去亲本果蝇。

3. 待 F_1 成虫出来后，观察子代(F_1)翅膀。

4. 在一个新鲜培养瓶内，放5或6对 F_1 果蝇，这里雌蝇无须处女蝇。贴上标签，记上“ F_1 ”。

5. 7~8天后移去 F_1 。

6. 在第二代(F_2)果蝇出现后，鉴定有多少是野生型，有多少是残翅。连续统计7~8天，被统计过的果蝇立即放到死蝇盛器中。

四、实验记录

按下列格式记录所得的结果：

试验编号 _____ 开始日期 _____

P 残翅(vg/vg) × 野生型($+/+$)

F₁

| 统计日期 | 野生型果蝇 (+) 的数目 |
|------|---------------|
| | |

F₂

| 统计日期 | 果 蝇 数 目 | |
|-------|---------|----|
| | + | vg |
| | | |
| 总 数 | | |
| 百 分 数 | | |

χ^2 测验:

| | 野生型(+) | 残翅(vg) | 合 计 |
|-------------------------------------|--------|--------|-----|
| 实验观察数(O) | | | |
| 理论数(3:1)(c) | | | |
| 偏差(O-c) | | | |
| $\frac{(O-c)^2}{c}$ | | | |
| $\chi^2 = \sum \frac{(O-c)^2}{c} =$ | | | |
| $P =$ | | | |

实验3 果蝇二对因子杂交实验

一、实验目的

验证自由组合定律。

二、实验原理

正常翅和残翅是一对相对性状，由第二染色体上的一对等位基因 $+ / vg$ 所控制，正常翅为显性。灰体和黑檀体是另一对相对性状，由第三染色体上的一对等位基因 $+ / e$ 所控制，灰体为显性。所以将黑檀体（正常翅）果蝇与残翅（灰体）果蝇杂交， F_1 代全部是正常翅灰体。 F_1 代雌雄蝇互交， F_2 代产生性状分离，出现四种表型：正常翅灰体，正常翅黑体，残翅灰体，残翅黑体，其比例应为9:3:3:1。实验证明“不同染色体上的基因在形成配子时是自由组合的。”

三、实验材料

黑檀体果蝇与残翅果蝇；其余用品与实验2相同。

四、实验步骤

除亲本材料和观察统计的表型外，其余均与实验二相同。

五、实验记录与数据处理

试验编号 _____ 开始日期 _____

P 黑檀体($++ee$) × 残翅($vgvg++$)

F_1 的表现型:

F_2 的表型统计:

| 类 型 统计日期 | F ₂ 果 蝇 数 目 | | | |
|-------------|------------------------|------|------|------|
| | 常翅灰体 | 常翅黑体 | 残翅灰体 | 残翅黑体 |
| | | | | |
| 总 数 | | | | |
| 比 例 | | | | |

用 χ^2 (卡平方)法测定统计 F_2 所得结果:

$$\chi^2_{(n)} = \sum \frac{(O - c)^2}{c} =$$

$$P =$$

式中 O 为观察个体数, c 为理论个体数, Σ 示各项之和, n 为自由度(即分离类型数减1)。求得 χ^2 值后, 根据自由度(n)查 χ^2 表, 得概率 P 。 $P > 0.05$ 时, 实验结果符合理论比例; $P \leq 0.05$ 时, 实验结果不符合理论比例。

实验4 果蝇的伴性遗传

一、实验目的

了解伴性遗传的规律及伴性基因在正反交中的差异。

二、实验原理

性染色体上的基因随性染色体而传递, 所以它们所决定的性状与性别相联系, 这种遗传方式称为伴性遗传。

果蝇红眼与白眼是一对相对性状, 分别由X染色体上的基因

X^+ 和 X^w 决定, X^+ 对 X^w 是显性。因为雌蝇的性染色体组成是 XX , 而雄蝇是 XY , Y 染色体上没有相对应的基因。所以红眼果蝇与白眼果蝇杂交时, 正交与反交的结果不同。

| | 正 交 | 反 交 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|----------------------|-----|-------|-----|-------|----------|--------|--|--|----|----|--|--|---|---|-------|-----|-------|----------|--------|--|--|----|----|--|
| P | $X^+X^+ \times X^wY$ | $X^wY^w \times X^+Y$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ↓ | ↓ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F ₁ | <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">♀</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">♂</td> <td style="padding: 5px;">X^w</td> <td style="padding: 5px;">Y</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px;">X^+</td> <td style="padding: 5px;">X^+X^w</td> <td style="padding: 5px;">X^+Y</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px;"></td> <td style="padding: 5px;">♀红</td> <td style="padding: 5px;">♂红</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> </table> | ♀ | ♂ | X^w | Y | X^+ | X^+X^w | X^+Y | | | ♀红 | ♂红 | | <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">♀</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">♂</td> <td style="padding: 5px;">X^+</td> <td style="padding: 5px;">Y</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px;">X^w</td> <td style="padding: 5px;">X^+X^w</td> <td style="padding: 5px;">X^wY</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px;"></td> <td style="padding: 5px;">♀红</td> <td style="padding: 5px;">♂白</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> </table> | ♀ | ♂ | X^+ | Y | X^w | X^+X^w | X^wY | | | ♀红 | ♂白 | |
| ♀ | ♂ | X^w | Y | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X^+ | X^+X^w | X^+Y | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ♀红 | ♂红 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ♀ | ♂ | X^+ | Y | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X^w | X^+X^w | X^wY | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ♀红 | ♂白 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

由上图可见, 正交子一代的雌雄蝇都是红眼, 而反交子一代的雌蝇是红眼, 雄蝇是白眼。当 F_1 代雌雄个体互交时, F_2 的分离比也随之而异。

三、实验材料

野生型果蝇和白眼果蝇, 其余同实验2。

四、实验步骤

1. 选取红眼(野生型)和白眼处女蝇, 分别做正反交, 各二瓶。
2. 每瓶放果蝇3—5对, 正交红眼♀×白眼♂, 反交白眼♀×红眼♂, 培养在23℃的恒温箱中。
3. 一周后倒去亲本。
4. 观察 F_1 代眼色, 记载正反交结果(总数和百分数)。
5. 从各瓶中选取雌、雄果蝇若干对, 移入新鲜培养基进行杂交, 置23℃温箱培养。
6. 一周后倒去 F_1 代果蝇。
7. 观察 F_2 代果蝇, 鉴别雌雄蝇。

五、实验报告

1. 列表统计记载 F_1 代正反交与 F_2 代正反交的各类果蝇数目。

2. 对实验观察数据进行 χ^2 检验, 验证是否与理论比值相符。
3. 解释所得到的结果。

实验5 果蝇的三点测交

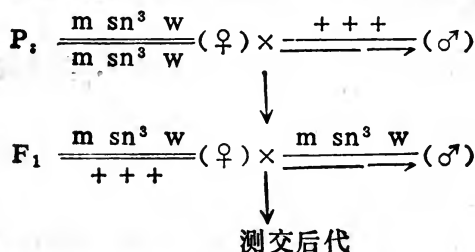
一、实验目的

掌握用“三点测交”进行基因定位的方法。

二、实验原理

位于不同染色体上的两对基因, 它们所决定的两对相对性状在 F_2 代是自由组合的。而同一条染色体上的基因则是连锁的, 但同源染色体的基因之间可以发生交换, 交换的百分率即为重组值。重组值去掉百分符号后就是基因在染色体上的相对距离, 即基因间的图距。三点测交就是通过三对连锁基因的交换行为, 确定三对基因在染色体上的相对位置。

已知白眼(w), 短翅(m)和焦刚毛(sn^3)都是X染色体上的隐性突变。先将三隐性体作为母本, 与野生型雄蝇杂交:



F_1 代如图所示得到三杂合体雌蝇($wmsn^3/+++$)和三隐性体的雄蝇($wmsn^3/Y$)。将三杂合体雌蝇与三隐性体的雄蝇测交, 观察测交后代的表型, 将数据按下表格式填写, 并计算重组值, 作连锁图。

长。然后仔细观察四类中的个体，将焦刚毛与直刚毛分开，连续观察记数5—7天。

5. 按示例方法计算重组值，绘制连锁图。

实验6 果蝇的唾腺染色体

果蝇幼虫期唾腺的细胞核非常大，唾腺染色体比其他细胞染色体大200多倍。它们是通过核内有丝分裂形成的多线染色体，一条染色体内含有染色线多达千条以上，故也称巨大染色体。在唾腺染色体上也可看到重复、倒位、易位、缺失等染色体畸变，是研究畸变的好材料。

一、实验目的

观察果蝇的唾腺染色体，练习果蝇幼虫唾腺分离技术及唾腺染色体的制片方法。

二、实验材料

果蝇三龄幼虫

解剖镜 显微镜 镊子 解剖针 载玻片 盖玻片 吸水纸
石蜡

醋酸洋红 冰醋酸 生理盐水(0.7%的氯化钠) 1N HCl
蒸馏水

三、实验步骤

1. 幼虫的解剖：将载玻片置于解剖镜下，滴上一滴生理盐水。将幼虫置于生理盐水中，一手持解剖针按住幼虫末端的1/3处，以固定幼虫。另一手持针揪住幼虫头部正中，用力向前拉，把头部

从身体拉开，腺体即随之而出。腺体半透明，呈棍棒状，位于食道两侧，中间夹有神经球。尽可能把腺体边上的脂肪剔除。

2. 染色前处理：清除残体，使载片上只留下唾腺，然后滴一滴1N HCl，解离2—3分钟，用吸水纸吸干HCl，再用蒸馏水洗二次，用吸水纸吸净四周水份。

3. 染色：滴上一滴醋酸洋红，1—2分钟后吸干。再滴一滴新染液，染色20分钟以上。也可用其它染液如卡宝品红、龙胆紫。

4. 压片：在载片上加一滴醋酸，加盖玻片，盖片上覆盖一吸水纸，加压后可用蜡将盖玻片四周封住，以防干燥。

5. 显微镜下观察，好的片子，可做永久片。

四、永久片的制作法

1. 用冰醋酸脱去盖片。

2. 在无水酒精中浸1分钟，用吸水纸吸干余液。

3. 再在无水酒精中浸1分钟。

4. 二甲苯5分钟。

5. 二甲苯5分钟。

6. 中性树脂胶封片。

五、作业

绘制果蝇唾腺染色体图。

实验7 粗糙链孢霉的分离和交换

一、实验目的

通过对链孢霉杂交所产生的子囊孢子的观察，了解分离和交换现象，进而计算出基因与着丝粒之间的距离，作为其遗传图距。

二、实验原理

链孢霉又称红色面包霉，是一种子囊菌，已知有4-5种。它的营养体是单倍的 ($n=7$)，由多核菌丝构成。生殖方式有有性和无性两种。菌丝经有丝分裂直接发育成菌丝体，称无性生殖；而两种不同接合型结合产生有性孢子的过程称有性生殖。有性生殖可通过两种方式进行：分生孢子落在另一接合型的原子囊果的受精丝上，可形成合子；不同接合型菌丝中的核融合成合子，产生子囊果。

二倍体的合子经过二次减数分裂成四合子，每个核又进行一次有丝分裂，发育成以一定顺序排列的八个子囊孢子。若两个亲代菌株有某一遗传性状的差异，那么杂交形成的每一子囊必有四个子囊孢子属于一种类型，其他四个子囊孢子属于另一类型。成熟的子囊孢子在适当的条件下可发育成菌丝，形成新一代。子囊孢子的性状分离是严格的1:1，而且有一定顺序。因此可以直接观察分离现象和交换现象。

三、实验材料

野生型(lys^+)和赖氨酸缺陷型(lys^-)

普通显微镜 钟表 镊子 解剖针 接种针 载玻片 试管
三角烧瓶等

培养基的各种试剂；5%的次氯酸钠；5%石碳酸。

四、实验步骤

(一)培养基的配制

1. 基本培养基(野生型可生长,缺陷型不长):蔗糖10g, $CaCl_2$ 0.1g, $NaCl$ 0.1g, NH_4NO_3 1g, 酒石酸铵5g, 生物素4 μ g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, KH_2PO_4 1g, 微量元素溶液 ($NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$ 88mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 393mg, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$ 910mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8807mg, 蒸馏水1000ml) 1ml。将这些成份溶于1000ml蒸馏水中, $pH=5.5 \sim 6.5$ 。固体培养基则另加2%琼脂。

2. 补充培养基：每100ml的基本培养基中加入泛酸钙0.2mg 叶酸0.2mg 吡哆醇0.05mg 硫胺素0.1mg 氯化胆碱0.2mg 肌醇0.4mg 对氨基苯酸0.05mg 核黄素0.05mg

3. 玉米琼脂培养基（供杂交实验用）：将玉米粒在水中浸泡后，晾干，每试管放2—3粒，加入2%琼脂，再放入一小片经多次折迭的滤纸（长度3—4cm），加上棉塞，8磅压力下消毒30分钟。

(二) 菌种的活化

为使菌种生长得好，先要进行菌种活化。把野生型和赖氨酸缺陷型菌种从冰箱中取出，分别接种在基本培养基和补充培养基上，在25℃恒温箱中培养3—4天。

(三) 杂交

长好的菌株在菌丝的上部有红粉状孢子，将两个菌种 (lys^+ × lys^-) 接种在同一玉米培养基上，贴上标签，培养在25℃恒温箱中1~3周，直至有棕黑色的子囊果出现为止。并非所有的子囊果都有用，因为未受精的分生孢子也能形成空的子囊壳（原子囊果）。

(四) 观察

1. 在长有黑色子囊果的试管中，加少量无菌水，摇动片刻，倒在空三角瓶中，加热煮沸，以防分生孢子飞扬。

2. 在载片上滴一滴5%次氯酸钠溶液，用接种针挑出几个子囊果放在次氯酸钠中5分钟。

3. 取另一载片，把一个子囊果压碎，在10×15倍的显微镜下，

| | 子囊类型 | 观察数 |
|------|--|-----|
| 非交换型 | ++++ ---- ---- +++++ | |
| 交换型 | ++--++-- --++--++ ++----++ --++++-- | |
| | 合 计 | |

从散开的子囊中观察子囊孢子的不同排列顺序，了解分离和交换情况。

(五) 计算交换值

观察若干子囊果，记录每个完整的子囊型。

按下列公式计算交换值：

$$\text{交换值} = \frac{\text{交换型子囊数}}{\text{观察到的子囊总数}} \times \frac{1}{2} \times 100\%$$

五、实验注意事项

1. 实验用过的接种针要过火灭菌。
2. 镊子放入次氯酸钠中浸泡5分钟后洗净。
3. 三角瓶中的液体要煮沸5分钟后，才能倒掉(不要把未煮沸的菌液倒入水槽中)，洗净瓶子。
4. 用过的载玻片随即放入石炭酸缸中浸泡，以杀死子囊孢子。

六、思考题

1. 链孢霉杂交后，减数分裂过程如何？
2. 链孢霉的分离现象与高等动、植物是否不同？
3. 结合课堂内容，说明什么是交换？
4. 计算交换值时，为什么要除以2？

实验8 酵母菌的杂交实验

一、实验原理

酵母菌是单细胞的真菌，一般以出芽方式繁殖。许多酵母菌还能形成有性孢子，是减数分裂的产物。对于能产生孢子的酵母，还可用杂交的方法进行遗传分析或选育。用两种不同的接合型酵

母(各具有不同的营养缺陷型标志)进行杂交。它们自身在基本培养基上都不能形成菌落,只有当这两种缺陷型杂交后,细胞中的遗传物质发生重组,产生的杂种细胞才能在基本培养基上生长。

二、实验材料

1. 酵母菌单倍体的腺嘌呤缺陷型和赖氨酸缺陷型。
2. 生理盐水:0.85gNaCl溶于100ml蒸馏水,15磅灭菌15分钟。
3. 完全培养基:蛋白胨2%,酵母浸出汁1%葡萄糖2%水100ml pH6.0固体培养基则另加2g琼脂15磅灭菌15分钟
4. 基本培养基:葡萄糖10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000mg, K_2HPO_4 125mg, KH_2PO_4 875mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100mg, NaCl100mg, KI0.1mg, 微量元素母液(每100ml含 H_3PO_4 1mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mg) 1ml, 维生素母液(每100ml含烟酸40mg、硫胺素40mg、肌醇200mg、核黄素20mg、对-氨基苯甲酸20mg、盐酸吡哆醇40mg、泛酸40mg、生物素0.2mg) 1ml, 水1000ml pH5.3固体培养基另加2%琼脂。8磅灭菌。15分钟
5. 产孢子培养基: 无水醋酸钠 0.82%, $(\text{CH}_3\text{COONa})\text{KCl}$ 0.186%, 吡哆醇0.2mg/l, 泛酸0.2mg/l, 生物素0.02mg/l, 琼脂2%。

三、实验步骤

1. 两菌种各接种二支完全培养基斜面, 30℃恒温箱中培养24小时。
2. 用5ml生理盐水将斜面洗下, 制成 10^8 /ml的菌液。
3. 将两亲本菌液各0.5ml, 分别放入5ml液体的完全培养基中, 30℃静止培养2小时。
4. 3000rpm离心3分钟, 30℃静止培养半小时。
5. 倒去上清液, 打匀管底菌块, 再加入6ml新鲜的液体完全培养基, 30℃培养8小时。
6. 离心, 倒去上清液。再加6ml液体完全培养基, 洗一次,

离心，倒去上清液。

7. 将两个离心管中的沉淀物，接种于同一产孢子培养基斜面上，30℃培养7—10天。在显微镜下观察杂交形成的子囊孢子，计算子囊孢子的百分数。

四、测定杂交种

1. 在长有子囊孢子的斜面上，加基本培养液2ml，用接种环将子囊孢子刮下来，倒入无菌离心管中。

2. 在60℃的恒温水浴中加热15分钟，杀死酵母菌的营养体。离心，倒去上清液，加生理盐水到原体积。

3. 孢子悬液经纤维素酶或蜗牛酶处理，除去子囊壳，或者用石英砂振荡，使其中的孢子散开。

4. 取孢子悬液涂在完全培养基的平板上，30℃培养48小时。

5. 影印培养，以上面的平板为母板，依次影印在以下的平板培养基上：基本培养基；基本培养基加腺嘌呤；基本培养基加赖氨酸；完全培养基。30℃培养48小时。

6. 分析杂交种的基因型。

| 基本培养基 | 基本培养基 加腺嘌呤 | 基本培养基 加赖氨酸 | 完全培养基 | 单倍体的 基因型 |
|-------|---------------|---------------|-------|-------------|
| - | - | - | + | |
| - | + | - | + | |
| - | - | + | + | |
| + | + | + | + | |

7. 从母平板挑取各个已经初步鉴定的菌落，分别接种在完全培养基斜面上及盛有完全培养液的离心管中，30℃中培养48小时，以作生长谱鉴定。

实验9 大肠杆菌的杂交实验

一、实验原理

大肠杆菌中存在着致育因子F，有F因子的大肠杆菌为F⁺，没有F因子的为F⁻。而F因子又有两种状态存在，游离状态和整合状态（F因子插在染色体一定的位置上），前者称F⁺细胞，后者称Hfr细胞。Hfr的重组频率一般为10⁻³，比F⁺高1000倍，称高频重组。大肠杆菌的接合，实质上是F因子的转移，所以F⁺和Hfr被称为供体细菌，而F⁻为受体菌。将供体菌与受体菌混合后培养，由于F因子转移而发生遗传重组，产生了杂种细胞。

二、实验材料

1. 大肠杆菌 (E. Coli): K₁₂pro⁻(λ)F⁺, W₁₄₈₅his⁻ilv⁻F⁺, W₁₁₇₇thr⁻leu⁻thi⁻xyl⁻gal⁻ara⁻mtl⁻mal⁻lac⁻str^r⁻(λ)F⁻, HfrC met⁻try⁻。

2. 用具: 培养皿 (直径9cm) 三角瓶(150ml) 吸管(1ml、5ml 及10ml) 离心管灭菌空试管

3. 基本培养基: MgSO₄·7H₂O 20mg 柠檬酸 200mg NaNH₄HPO₄·4H₂O 350mg, K₂HPO₄·2H₂O 1288mg, 葡萄糖2g, 琼脂2g, 加蒸馏水至100ml, pH7.0, 高压灭菌8磅30分钟

4. 肉汤培养基: 羊肉膏0.5g, 蛋白胨1g, NaCl 0.5g, 水 100 ml, pH7.2 半固体培养基另加1%琼脂, 固体培养基则加2%琼脂, 高压灭菌15磅15分钟

5. 生理盐水: 0.85% NaCl, 高压灭菌15磅15分钟

三、实验步骤

(一) 菌液制备:

1. 从保存于冰箱中的斜面菌种上, 挑一环菌接种在5ml 液体

肉汤培养基的三角瓶中，每个菌株接一瓶，置37℃培养过夜。

2. 每一瓶中各加入5ml新鲜的肉汤培养液，充分摇匀后，等量分成两瓶，37℃下继续培养3~5小时。

3. 3000rpm离心10分钟。

4. 倒去上清液，打匀沉淀，离心洗涤二次，再加无菌水到原体积。

(二) 杂交——混合培养

1. 取12支灭菌试管，各加入3ml融化的半固体培养基，保温在45℃。

2. 三个杂交组合为： $W_{1177} \times K_{12}pro^-$ 、 $W_{1177} \times W_{1485}$ 、 $W_{1177} \times HfrC$ 。每个组合四支试管，其中二支作对照。

3. 除对照组试管吸 F^+ 供体菌液1ml外，其余各杂交组合则分别吸供体和受体菌液0.5ml，充分混匀。

4. 将菌液倒在基本培养基的平板上，摇匀待凝，37℃培养，48小时后观察。

四、实验记录

| 组合 皿号 | $W_{1177} \times$ $K_{12}pro^-$ | $W_{1177} \times$ W_{1485} | $W_{1177} \times$ $HfrC$ | 对 照 | | |
|----------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------|------------|--------|
| | | | | $K_{12}pro^-$ | W_{1485} | $HfrC$ |
| I | | | | | | |
| II | | | | | | |

实验10 大肠杆菌的基因顺序分析

一、实验原理

在大肠杆菌的Hfr与 F^- 接合过程中，供体Hfr细菌的遗传物质

转移到受体菌中。用影印培养法测定重组子出现的比例，根据重组百分数就可以确定基因在染色体上的顺序。

为抑制供体亲本细菌的生长，供体要用不同于受体(F⁻)的营养缺陷型菌株，或对某种抗菌素敏感的菌株，作为反选择的性状。

杂交在液体培养基中进行，常以 4×10^8 /ml 的 F⁻ 细菌和 2×10^7 /ml 的 Hfr 混合，接触 90 分钟以后进行培养。

二、实验材料

1. 大肠杆菌(E. coli): W₁₁₇₇ thr⁻ leu⁻ thi⁻ xyl⁻ gal⁻ ara⁻ mtl⁻ mal⁻ lac⁻ str^r (λ) F⁻ HfrCmet⁻ try⁻。

2. 用具: 与实验9相同。

3. 肉汤培养基: 与实验9相同。

4. 平板用基本培养基: 同实验9。

5. EMB培养基:

每 100 毫升培养基中含糖*1g 蛋白胨0.8g NaCl0.5g
K₂HPO₄0.2g 伊红0.04g 美蓝0.0065g 琼脂2g pH7.2 8磅
灭菌20分钟

6. NaN₃培养基:

牛肉膏0.5% 蛋白胨1% NaCl0.5% NaN₃0.002M 琼脂2% 蒸馏水100ml pH7.2 灭菌15磅15分钟

7. 半固体培养基:

琼脂1g 水100ml 高压灭菌15磅15分钟

8. 生理盐水: 0.85%NaCl

三、实验步骤

(一) 菌液制备

1. 挑出保存的菌种一环，接种于盛有5ml肉汤培养基的瓶中，

*此处糖分别为木糖(xyl)、半乳糖(gal)、阿拉伯糖(ara)、甘露醇(mtl)、麦芽糖(mal)、乳糖(lac)，配成六种不同的EMB培养基。

37℃培养过夜。

2. 第二天添加5ml新鲜的肉汤培养基，充分摇匀，等量分成两瓶，继续培养3—5小时。

3. 分别倒入灭菌的离心管，3000rpm离心10分钟。

4. 倒去上清液，打匀沉淀，各加入新鲜的肉汤培养基至原体积。

5. 从W₁₁₇₇与HfrC中分别吸取4.5ml和0.5ml菌液，放入一个灭菌的经37℃予热的三角瓶中，充分摇匀。

(二)液体培养

1. 实验前，将水浴温度调节到37℃。

2. 将盛有混合菌液的三角瓶置于水浴中保温90分钟。

3. 融化半固体培养基，取4支灭菌空试管，每支吸入2ml半固体培养基，45℃保温。

4. 吸取1ml保温后的混合菌液，放入装有半固体培养基的试管中，共接种2管，摇匀，分别倒在2只基本培养基平板上，摇匀，凝固后37℃培养48小时，观察出现的重组子。

5. 取HfrC菌离心沉淀，倒去上清液，再离心洗涤二次，打匀，加入灭菌生理盐水到原体积，用1ml吸管吸取1mlHfrC菌液，放入半固体培养基中，以下做法同4，观察是否长菌落，作为对照。

(三)影印培养操作

1. 倒二只基本培养基平板，待凝后，用接种针挑取重组子菌落，依次接种到基本培养基平板上（每皿80个菌落），37℃培养24小时，作影印培养的母平板。

2. 融化6种糖原的EMB培养基和NaN₃培养基，每种培养基倒二只培养皿，共14个平板，再倒二只基本培养基平板，以备作影印培养用。

3. 取灭菌的丝绒一块，固定在圆柱形木块上，将母平板倒置覆盖在丝绒上，用铅笔轻敲皿底，然后拿下来，将（三）2中的平板，倒置于覆盖的丝绒上。一次复制二只相同培养基的平板。影印不同的培养基平板时，应另换灭菌的丝绒。重复操作，直至全

部影印完毕。影印后的平板，放在37℃下培养24小时，观察各种性状出现的比例。

(四)重组子的遗传分析

| | | |
|----|-----------------------------------|-----|
| | $w_{1177} \times \text{HfrC}$ 菌落数 | 对 照 |
| I | | |
| II | | |

| 皿号 | EMB 培养基 | | lac | | gal | | xyl | | ara | | mtl | | mal | | Na ₂ S ₂ O ₃ |
|-------|---------|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|--|---|
| | 发酵 | 不 | 发酵 | 不 | 发酵 | 不 | 发酵 | 不 | 发酵 | 不 | 发酵 | 不 | | | |
| I | | | | | | | | | | | | | | | |
| II | | | | | | | | | | | | | | | |
| 重组百分数 | | | | | | | | | | | | | | | |

根据重组百分数写出这些基因在染色体上的顺序。

实验11 物理因素诱发营养缺陷型菌株

一、实验原理

用某些物理或化学因素处理细菌，使其基因发生突变，丧失合成某一物质（如氨基酸，维生素，核苷酸等）的能力，因而它们在基本培养基上不能生长，必须补充某些物质才能生长。这样从野生型经诱变得到的菌株，称为营养缺陷型。筛选营养缺陷型菌株必须经过以下几个步骤：诱变处理、营养缺陷型的检出、划线复证、生长谱鉴定、缺陷型菌株纯化。

本实验用紫外线来诱发突变，并用青霉素法淘汰野生型，最

后经生长谱法鉴定细菌的营养缺陷型。

二、实验材料

1. 大肠杆菌: $K_{12}SF^+$ 。
2. 用具: 与实验9相同。
3. 肉汤液体培养基: 与实验6相同。
4. 加倍肉汤培养液: 除加水50ml外, 其余与肉汤液体培养基相同。
5. 基本液体培养基: 除无琼脂外, 与实验9的基本培养基相同。

6. 基本固体培养基: 同实验9基本培养基。

7. 无N基本液体培养基: K_2HPO_4 0.7g KH_2PO_4 0.3g 柠檬酸钠 $3H_2O$ 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g 葡萄糖2g 水100ml pH7.0 高压灭菌3磅20~30分钟

8. 2N基本液体培养基: 100ml无N基本液体培养基中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 0.2g。

9. 混合氨基酸和混合维生素的配制: 氨基酸分为七组, 除脯氨酸易潮解单列为一组外, 其余六组各有六种氨基酸, 每种氨基酸等量研细充分混合, DL型的氨基酸用量加倍。

I 赖氨酸 精 —① 甲硫— 半胱— 胱— 嘌呤

II 组— 精— 苏— 谷— 天冬— 嘧啶

III 丙— 甲硫— 苏— 羟脯— 甘— 丝—

IV 亮— 半胱— 谷— 羟脯— 异亮— 缬—

V 苯丙— 胱— 天门冬— 甘— 异亮— 酪—

VI 色— 嘌呤 嘧啶 丝— 缬— 酪—

VIII 脯—

把维生素 B_1 、 B_2 、 B_6 、泛酸, 对氨基苯甲酸 (BAPA), 烟酸及生物素等量研细, 充分混合, 配成混合维生素。

①省略号“—”都代表“氨酸”。

三、实验步骤

(一)菌液制备:

第1, 2, 3步与实验10相同。

4, 倒去上清液, 打匀沉淀。其中一管吸入5ml生理盐水, 然后倒入另一离心管, 两管并一管。

(二)诱变处理^①

1. 吸上述菌液3ml于培养皿内, 将培养皿放在15瓦的紫外光灯下, 距离28.5cm。

2. 处理前先开紫外光灯稳定10分钟以上, 放入培养皿后, 连盖一起在灯下灭菌1分钟, 然后开盖处理1分钟。照射后先盖皿盖, 再关紫外灯。

3. 吸3ml加倍肉汤培养液到上述处理后的培养皿中。在37℃的温箱内避光培养12小时以上。

(三)用青霉素法淘汰野生型

1. 吸5ml处理过的菌液于灭菌离心管中, 3500rpm离心10分钟。

2. 倒去上清液, 打匀沉淀, 加入生理盐水, 离心洗涤三次, 吸入生理盐水到原体积。

3. 吸取0.1ml洗涤过的菌液到5ml无N基本培养液中, 37℃下培养12小时。

4. 培养12小时后, 按1:1加入2N基本培养液5ml, 称取青霉素钠盐, 使青霉素在菌液中的最终浓度为500单位/ml, 再放入37℃温箱中培养。

5. 从培养12, 16, 24小时的菌液中, 各吸取0.1ml到无菌培养皿中, 再分别倒入经融化并冷却到40~50℃的基本和完全培养基, 摇匀放平, 待凝后, 放入37℃温箱中培养(培养皿上注明培养时间)。

^①诱变处理时间是根据70%的杀菌率而定的。

(四)缺陷型的检出:

1. 以上平板培养36—48小时后, 进行菌落计数。选用完全培养基上长出的菌落数大大超过基本培养基的那一组, 用接种针挑取完全培养基上长出的菌落80个, 分别点种于基本和完全培养基平板上(先基本后完全), 依次点种, 放37℃温箱培养。
2. 培养12小时后, 选出在基本培养基上不生长, 而在完全培养基上生长的菌落, 在基本培养基的平板上划线, 37℃温箱培养, 24小时后不生长的可能是营养缺陷型。

(五)生长谱鉴定:

1. 将可能是缺陷型的菌落接种于盛有5ml 肉汤培养液的离心管中, 37℃培养14—16小时。
2. 培养16小时后, 以3500rpm 离心10分钟, 倒去上清液, 打匀沉淀, 然后离心洗涤三次, 最后加生理盐水到原体积。
3. 吸取1ml离心洗涤过的菌液于一灭菌的培养皿中, 然后倒入融化后冷至40—50℃的基本培养基, 摇匀放平待凝, 共两皿。
4. 将两只培养皿的皿底, 各等分八格, 依次放入混合氨基酸, 混合维生素和脯氨酸。在37℃温箱培养24—28小时, 观察生长图, 从而确定是哪种营养缺陷型。

实验12 化学因素诱发营养缺陷型菌株

一、实验原理

同实验11, 但本实验是用化学因素亚硝基胍(NTG)处理酵母菌。

二、实验材料

1. 酵母菌单倍体26—4或143—2。

2. 用具：同实验9。

3. 基本培养基：除KI改为1mg、维生素母液中泛酸改为20mg、生物素改为3mg外，其余与实验8的基本培养基完全相同。

4. 完全培养基：同实验8的完全培养基。

5. 生理盐水。

6. 磷酸缓冲液：pH6.0(0.2MNa₂HPO₄12.3ml, 0.2MNaH₂PO₄87.7ml)

7. 诱变剂：NTG (亚硝基胍) (nitrosguanidine)。

三、实验步骤

(一) 准备菌液

1. 将酵母菌单倍体菌株26—4 (或143—2)从保存斜面上用接种环挑一些菌，接种到盛有5毫升基本液体培养基的离心管中，28—30℃中培养16—18小时，共接2支。

2. 将培养过的菌液倒入盛有玻璃珠的灭菌三角瓶中，震荡10分钟，使酵母菌均匀分散。

3. 将上述菌液倒入离心管中离心 (3000rpm)10分钟，倒去上清液，将管底菌块打匀，加无菌水到原体积，并存放在30℃水浴中备用。

(二) 对照处理

1. 将上述菌液4ml加1ml生理盐水。

2. 吸取菌液(来自1)1ml，用生理盐水稀释到 10^{-4} — 10^{-5} 。

3. 从 10^{-4} 或 10^{-5} 稀释菌液中吸取0.1及0.5ml于培养皿中，各做二只，共四只培养皿。

4. 将融化的完全培养基10—12ml加入培养皿，摇匀，放平待凝，30℃培养两天后计数。

(三) 诱变处理

1. 称取NTG1.5mg于灭菌的离心管中，加入1mlpH6.0的磷酸缓冲液，使完全溶解，并保存在30℃水浴箱中。

2. 取存放在30℃水浴中备用的菌液4ml，放入上述有NTG诱

变剂的离心管中（此时NTG最后浓度300 μ g/ml），充分混匀，立刻放入30℃水浴箱中，同时计算时间，30分钟后取出，立即离心（3000rpm），将上面废液倒入NaOH中。打匀管底菌块，加入生理盐水，再离心洗涤一次，加水到原体积。

3. 将融化而不烫手的完全培养基倒入灭菌的培养皿中，每皿倒12—15ml，共倒20皿。

4. 将经NTG处理的菌液，稀释成 10^{-3} 取样0.1ml及0.05ml倒入上述培养皿中。希望每只培养皿中长50个左右的菌落，所以稀释度可视具体情况作适当调整。

5. 用灭菌的玻璃涂棒将菌液涂匀，30℃培养3—4天。

6. 计算对照组和诱变组的培养皿中的菌落数，算出杀菌率及存活率。

| 处 理 | 皿 号 | 稀 释 | 取样(ml) | 菌数/皿 | 菌数/ml | 杀菌率 |
|-------|-----|-----------|--------|------|-------|-----|
| 对 照 | 1 | 10^{-5} | 0.5 | | | |
| | 2 | | | | | |
| | 3 | 10^{-4} | 0.1 | | | |
| | 4 | | | | | |
| NTG处理 | 1 | 10^{-8} | 0.1 | | | |
| | ⋮ | | | | | |
| | 10 | | 0.05 | | | |
| | 20 | | | | | |

(四) 平板影印

1. 影印用丝绒布经高压灭菌后，在干燥箱内烘干备用。

2. 在诱变组中选出不污染，菌落分布均匀，菌数适中的培养皿。根据选到的母平板数量准备基本培养基和完全培养基平板。以一个母平板、一个基本平板、一个完全平板作为一组，编上号，并在每个平板的底上作上箭头标记。

3. 影印：将灭菌的丝绒布放在木柱上，用橡皮筋扣住，先取母平板倒覆在绒面上，皿上用铅笔轻而均匀地敲几下，取下母平板（母平板保存起来），立即把基本培养基平板（MM）按相同的

标记方向复印，同样敲几下，随后再把完全培养基平板(CM)在上复印，印毕，30℃培养2—3天。

4. 将每组复印的完全平板，基本平板与保存的母平板按同一个标记方向进行比较。找出CM平板上生长的而在MM平板上不长的菌落，用红笔作上标记，并编上号，以便进一步复证。

(五) 点种复证

1. 准备MM及CM平板，平板数量根据菌落多少而定，一个皿可划36个左右。

2. 已编号的菌落分别在MM平板和CM平板的相应位置上接种，30℃培养2—3天。

3. 只能在CM上生长而不能在MM上生长的可能是缺陷型菌落。再从CM平板上挑取这样的菌落接种于CM斜面上，30℃培养2天后，供生长谱鉴定用。

(六) 生长谱鉴定 同实验11

实验13 枯草杆菌噬菌体普遍性转导

以噬菌体为媒介，将供体细胞的遗传物质传递给受体细胞，从而改变受体细胞的基因型和表型的过程称为转导 (transduction) 当前转导已成为分子遗传学研究的一种常规方法，用来转移异源基因及研究基因的分子结构。转导又可分为两大类：普遍性转导和局限性转导。

一、实验原理

枯草杆菌PBS1噬菌体能转导染色体上任何一个基因，所以是普遍性转导。PBS1噬菌体从溶源菌SB19中裂解出来，偶而包裹了染色体的 try^+thy^+ 基因，当噬菌体感染营养缺陷型受体菌168(thy

rp), 就能在基本培养基平板上长出稳定转导子。PBS1噬菌体转导只能在游动的受体细胞中进行, 它转导的DNA片断可达 1.7×10^8 , 转导频率只有 $10^{-5} - 10^{-6}$ /感染细胞。PBS1的自发裂解频率较高, 感染了敏感菌SB19之后, 不需要紫外线诱导裂解。

二、实验材料

1. 枯草杆菌: 受体菌*B. subtilis* 168 try⁻thy⁻str⁻, 溶源菌*B. subtilis*, SB19(PBS1)。
2. 用具: 与实验9相同。
3. 噬菌体培养液: 牛肉膏 8g 酵母膏2g, NaCl4g, MgSO₄·7H₂O 0.2g KH₂PO₄ 1.5g Na₂HPO₄·7H₂O 5.7g 蒸馏水加至1000ml 氢氧化钠调pH至7.5。
4. 噬菌体稀释液: NaCl 20g K₂SO₄ 25g KH₂PO₄ 7.5g Na₂HPO₄·12H₂O 18.8g MgSO₄·7H₂O 0.6g, 蒸馏水加至1000ml 使用时加入1% CaCl₂ 50ml 和0.5% FeCl₃ (过滤灭菌) 10ml。
5. 肉汤培养基: 胰蛋白胨10g 酵母提出物5g NaCl 10g 葡萄糖1g 蒸馏水1000ml 用氢氧化钠调至pH7.2 8磅下灭菌20分钟。
6. 肉汤固体培养基: 另加2%琼脂。
7. 肉汤半固体培养基: 另加0.8%琼脂。
8. 肉汤软琼脂培养基: 另加0.3%琼脂。
9. 胸腺嘧啶、色氨酸的10×最低盐溶液: 在蒸馏水中依次溶解下述成份: K₂HPO₄ 14g KH₂PO₄ 6g (NH₄)₂SO₄ 2g Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (柠檬酸钠) 1g MgSO₄·7H₂O 0.2g, 然后继续, 加蒸馏水至 100ml 葡萄糖0.25g 胸腺嘧啶1mg L-色氨酸

2.5mg, 固体培养基另加2%琼脂。

三、实验步骤

(一) PBS1噬菌体裂解液的制备

1. 将溶源菌SB19接种于盛有7ml新鲜噬菌体培养液的150ml

三角瓶内，37℃振荡培养3小时，然后在37℃下静止16小时。

2. 将培养后的菌液经3000rpm离心10分钟，弃沉淀，上清液用孔径0.45μm的滤膜过滤。滤液就是PBS1裂解液，在裂解液中加入几滴氯仿，置4℃保存。

(二) PBS1噬菌体裂解液的效价测定

由于在转导时要求噬菌体与细菌感染指数之比（即 MOI）大约为1，所以在转导实验之前需对噬菌体进行效价测定。

1. 接一环敏感菌 SB19 于3ml 肉汤液体培养基的三角瓶内，37℃振荡培养16小时。

2. 取培养后的SB19菌液0.15ml加到3ml新鲜的噬菌体培养液中，37℃振荡培养5小时。

3. 将培养后的菌液倒入离心管中，3000rpm离心10分钟，弃上清液，将沉淀的菌块悬浮在7.5ml噬菌体稀释液中。

4. 将PBS1裂解液用噬菌体稀释液作10倍递增稀释至 10^{-9} 。

5. 取若干支试管，各加入已融化的0.8%肉汤半固体培养基3ml，然后放在50℃恒温水浴中保温待用。

6. 取SB19菌液0.5ml和PBS1裂解液（ 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} ）1ml，分别加在4个肉汤固体培养基平板上，随之立刻倒入0.8%肉汤半固体培养基3ml（45℃），迅速摇匀，铺平。另取2个肉汤培养基平板，只加菌液0.5ml，不加噬菌体裂解液，作为对照组。以上平板待半固体琼脂培养基凝固后，置28℃下培养16小时。

7. 统计不同浓度噬菌体裂解液的噬菌斑数，计算PBS1噬菌体的效价。

(三) 筛选游动性受体菌

培养基：LB + 1% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂

| 培养皿数 | 裂解液浓度 | | | | 对照 |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|
| | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |

1. 用灭菌滴管吸0.3%肉汤软琼脂一滴，滴在肉汤培养基平板的不同位置上。用接种针挑几个受体菌菌落，直刺各滴软琼脂中。置37℃培养48小时。

2. 在软琼脂中筛选游离距离最远的菌作为转导的受体菌。

(四) 转导

1. 接一环游动性受体菌株168于盛有3ml肉汤培养液的三角瓶内，置37℃下培养16小时。

2. 取培养后的菌液0.15ml，加入到3ml新鲜的肉汤培养液中，继续振荡培养5小时，细菌达到对数生长期。

3. 取若干支试管，各加入以上菌液0.9ml和PBS1裂解液(10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}) 0.1ml，混合后置37℃下振荡培养30分钟。

4. 振荡培养后的混合液分别倒入4支离心管中，3000rpm离心10分钟，弃上清液，将沉淀菌块再悬浮于1ml含胸腺嘧啶、色氨酸的 $10\times$ 最低盐溶液中。

5. 各取0.1ml混合液，分别涂布在4个含胸腺嘧啶、色氨酸的 $10\times$ 最低盐溶液固体培养基平板上。另取2个平板作对照，一个平板加受体菌168菌液0.1ml，另一个平板加噬菌体裂解液(10^0)0.1ml。以上平板全部置37℃培养24小时。

6. 观察和统计每个平板的转导子，计算转导频率。

| 转导子数 平板数 | 组别 | | | | 受体菌对照 | 裂解液对照 |
|-------------|--------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|
| | 裂解液 | 液长 | 液长 | 液长 | | |
| | 10^0 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | |
| | | | | | | |

$$\text{转导频率} = \frac{\text{转导子数}}{\text{噬菌体裂解液的效价}} \times 100\%$$

实验14 大肠杆菌 λ 噬菌体局限性转导

一、实验原理

大肠杆菌 λ 噬菌体的原噬菌体附着在寄主染色体的半乳糖和生物素基因之间，当溶源菌中的原噬菌体 λ 被紫外线诱导出来时，大约 10^6 个 λ 噬菌体中会有一个携带半乳糖或生物素基因而脱离寄主染色体，这种 λ 噬菌体被称为缺陷型半乳糖转导噬菌体(λ dg)。由 λ dg噬菌体转导是一种局限性转导，转导子大部份是不稳定的杂基因子。

二、实验材料

1. 大肠杆菌菌株：溶源菌 $K_{12}(\lambda)gal^+$ ；受体菌 $K_{12}Sgal^-$ 。
2. 用具：与实验9相同。
3. 培养基：肉汤培养基见实验9。加倍肉汤培养基见实验11。半乳糖EMB培养基见实验10。
4. 半固体琼脂：1%琼脂，用蒸馏水配制。
5. 磷酸缓冲液： KH_2PO_4 2g K_2HPO_4 7g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g 蒸馏水1000ml
6. 氯仿

三、实验步骤

(一)噬菌体的诱导和裂解液的制备

1. 取一环供体菌接种于肉汤培养液， $37^\circ C$ 下培养16小时。吸取0.5ml菌液，接种于盛有4.5ml肉汤培养液的三角瓶中，继续在 $37^\circ C$ 下培养4—6小时。
2. 将培养后的菌液倒入离心管，以3500rpm离心10分钟。除

去上清液，加4ml磷酸缓冲液，制备成悬浮菌液。

3.取悬浮菌液3ml于灭菌培养皿中，经紫外线处理(15W，距离40cm)，诱导10秒钟。

4.处理后加入3ml加倍肉汤培养基，37℃避光培养2—3小时。

5.移入离心管中，以3500rpm离心10分钟，将上清液移入另一个灭菌的离心管中，再加入0.2ml氯仿(4—5滴)，剧烈振荡半分钟。静止5分钟。小心地把上清液用无菌滴管移到另一灭菌试管，这就是噬菌体(λ)的裂解液。

(二) λ 噬菌体裂解液的效价测定

1.取一环 K_{12} Sgal⁻菌接种于盛有5ml肉汤培养液的三角瓶内，37℃培养16小时。

2.吸取0.5ml菌液，放入盛有4.5ml肉汤培养液的三角瓶内(剩余的菌液在转导试验中用)，37℃继续培养4小时。

3.取4支试管，各加入已融化的半固体琼脂3ml，将试管放在50℃恒温水浴中保温。

4.取噬菌体裂解液0.5ml，放入盛有4.5ml肉汤培养液，依次稀释到 10^{-7} 。

5.吸取2.中在37℃下继续培养4小时后的菌液0.5ml和裂解液(10^{-6} 、 10^{-7})0.5ml，加在肉汤固体培养基平板上(每个稀释度2个平板)，随之立刻倾倒半固体琼脂3ml，迅速摇匀，铺平，凝固后置37℃培养24小时。

6.观察出现的噬菌斑数，并计算噬菌体裂解液的效价。

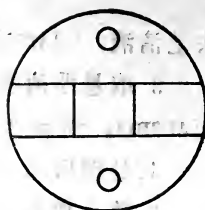
| 噬菌斑数 平板数 | 裂解液 浓度 | 10^{-6} (0.5ml) | 10^{-7} (0.5ml) |
|-------------|-----------|----------------------|----------------------|
| | 1 | | |
| 2 | | | |

(三)转导

1.点滴法

(1) 取2个半乳糖EMB培养基平板, 用玻璃蜡笔按右图所示在培养皿底部做上标记。

(2) 取一环培养过夜的受体菌 $K_{12}Sgal^-$ 菌液, 在EMB平板上涂一条菌带, 置37℃培养1小时。



(3) 待菌液渗干后, 用接种环先在小圆圈内滴一滴噬菌体裂解液, 然后在涂有菌带的方格处滴加裂解液, 待裂解液渗干后, 置37℃培养48小时。

2. 涂布法

取6个半乳糖EMB培养基平板, 其中2个只加0.1ml裂解液, 作为噬菌体对照。另2个只加受体菌菌液0.1ml, 作为受体菌的对照。剩余2个平板加噬菌体裂解液和受体菌液各0.05ml。6个EMB培养基平板涂布后, 置37℃培养48小时。

(四) 结果观察

| 转导子数 转导方法 | | 组别 | | 混合液 | | 受体菌对照 | | 裂解液对照 | |
|--------------|---|----|---|-----|---|-------|---|-------|--|
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | | |
| 点 | 滴 | | | | | | | | |
| 涂 | 布 | | | | | | | | |

$$\text{转导频率} = \frac{\text{转导子数}}{\text{噬菌体裂解液的效价}} \times 100\%$$

实验15 化学诱变剂的细菌检测法 (Ames 法)

一、实验原理

Ames等人用鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的

组氨酸营养缺陷型突变株建立了化学诱变剂的检测系统。

组氨酸营养缺陷突变菌株在不含组氨酸和生物素的基本培养基中是不能生存的。当待测的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时，才在基本培养基平板上长出菌落。当诱发回复突变的菌落数超过自发回复突变菌落数一倍以上时为阳性反应，即该化学物质是一种化学诱变剂。

许多化学物质在体外检测时是阴性反应，但经过体内肝脏某些酶的作用可以转变为诱变剂。所以在检测过程中，加入大鼠肝脏提取液(S-9)，就能大大提高检测的准确性。这种鼠伤寒沙门氏菌-微粒体系统已成为国际上公认的化学诱变检测常规方法，简称Ames法。

二、实验材料

1. 鼠伤寒沙门氏菌：

TA98：移码突变(*rfa* Δ UVrB *his* D3052AP')

TA100：碱基置换(*rfa* Δ UVrB *his* G46AP')

2. 用具：同实验9。

3. 平板用基本培养基：同实验9。

4. 半固体培养基：琼脂0.75g，水90ml，15磅高压灭菌15分钟。

5. 上层半固体培养基：生物素 1.2mg，组氨酸0.24mg，水10ml，15磅高压灭菌15分钟。配制后加入上述半固体培养基。

6. 液体及固体完全培养基：同实验9。

7. 生理盐水：同实验9。

8. 其他试剂：

亚硝基胍(NTG)1mg/ml(用无菌水配制)。

结晶紫1mg/ml(用无菌水配制)。

氯霉素8mg/ml(用无菌的0.02N NaOH配制)。

9. 大鼠肝脏酶系提取液(S-9提取液)：成年雄性大白鼠三只，按每公斤体重2.5ml的剂量腹腔注射五氯联苯油溶液(200mg/ml，

用玉米油配制)。注射后第五天杀鼠取肝(杀前禁食24小时)。从肝门静脉处注入冰冷的0.15M KCl溶液洗涤肝脏三次,称重后剪碎。每克肝(湿重)加冰冷的0.15M KCl溶液3ml,制成匀浆。匀浆经 $9,000 \times g$ (相对离心力)离心10分钟,取上清液,分装小管,每管1—2ml, -20°C 低温保存。以上操作均在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的无菌条件下进行。

10. 大鼠肝脏提取液(S-9)混合液的制备:

(1) 盐溶液: MgCl_2 3.8g, KCl 12.37g, 蒸馏水加至100ml, 高压灭菌15磅15分钟。

(2) 0.2M pH7.4磷酸缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7.16g, KH_2PO_4 2.72g, 加水至100ml, 高压灭菌。

(3) 0.025M辅酶II(NADP): 133mg国产辅酶II(氧化型), 用无菌水稀释至5ml(进口的辅酶II用93mg)。

(4) 0.05M葡萄糖-6-磷酸(G-6-P): 165mgG-6-P, 用无菌水稀释至5ml。

(5) S-9混合液配制: S-9提取液10ml, 盐溶液2ml, 0.2M磷酸缓冲液(pH7.4)50ml, 0.025M辅酶II(NADP)16ml, 0.05MG-6-P 10ml, 无菌水加至100ml。混合液用时现配, 置冰浴中, 实验后将多余溶液弃去。

11. 10mM组氨酸: 称取L-组氨酸20mg, 加蒸馏水溶解, 定容至10ml, 高压灭菌8磅20分钟。

三、实验步骤

(一) 菌株的生物学性状鉴定

1. 组氨酸营养缺陷的鉴定

(1) 用接种环分别接种TA98与TA100菌株于盛有5ml肉汤培养液的三角瓶中, 37°C 培养14—16小时, 浓度达 $10^7-10^8/\text{ml}$ 。

(2) 3500rpm离心10分钟, 弃上清液, 用无菌生理盐水离心洗涤三次, 最后加5ml 灭菌生理盐水, 制成悬浮的菌液。

(3) 取8支试管, 各加5ml上层半固体培养基(45°C)。其中4支

另加0.2ml 10mM组氨酸。

(4) 取8个基本培养基平板，分别加上0.1ml TA98和TA100的菌液(各4个平板)，随之将以上8支试管内的上层半固体培养基倾倒在上面，迅速摇匀，待凝后置37℃培养24小时。次日观察各个平板上菌落的生长情况，计算对照组平板(未加组氨酸溶液)上自发回复菌落数。

2. 脂多糖屏障缺陷(rfa)的鉴定:

(1) 取2个肉汤培养基平板，各加0.1ml测试菌液，随之各倒入5ml上层半固体培养基(45℃)，迅速摇匀，待凝固。

(2) 灭菌的圆滤纸片(直径4mm)上滴一滴结晶紫(1mg/ml)或脱氧胆酸钠盐(2mg/ml)，置于平板的中央。37℃培养12小时后，在滤纸片周围出现一个透亮的抑菌圈，表明菌株存在rfa突变，这种突变允许象结晶紫这样的大分子进入细菌并抑制其生长。

3. 抗性转移因子(R因子)鉴定:

(1) 在肉汤培养基平板上，用接种环取一环氨苄青霉素溶液平行涂两条直线。

(2) 待溶液干后，在每条直线上垂直地接种两条测试菌液，37℃培养24小时。

(3) 第二天观察在氨苄青霉素带的周围有没有生长抑制区，有R因子的菌株就没有生长抑制区。

4. 紫外线修复缺陷鉴定:

用接种环取测试菌液，平行地涂二条于肉汤培养基平板上。平板一半用黑纸遮盖，另一半置于紫外灯下，距离33cm，照射8—10秒。在37℃培养24小时后观察生长情况。对紫外线敏感的菌株仅在没有照射过的半边平板上生长。

(二) 诱变剂测试

1. 点试法:

(1) 取一环测试菌，加在5ml肉汤培养液内，37℃培养14—16小时。

(2) 取0.1ml上述的菌液，接种在基本培养基平板上，随之

将5ml 上层半固体培养基(45℃)倾于平板上，迅速摇匀待凝。

(3) 取数张直径为4毫米的灭菌圆滤纸片，放在平板内。

(4) 吸亚硝基胍 (NTG) 待测物，生理盐水各 10μl，分别滴在圆形滤纸片上。待滤纸片稍稍吸收样品后，置 37℃ 培养 48 小时，观察各滤纸片周围的回复菌落数。

2. 掺入法(平板法):

(1) 测定S-9混合物的酶活性:

取4个基本培养基平板，各加0.1ml测试菌液和亚硝基胍，其中2个平板另加0.2ml S-9混合液。随之在各平板上倾倒5ml上层半固体培养基(45℃)，迅速摇匀。凝固后37℃培养48小时。如果加S-9混合液的回复突变菌落数比对照高两倍以上，则表明S-9提取液有酶的活性。

(2) 待测样品浓度的配制:

将样品配成不同浓度后，各取0.1ml加在基本培养基平板上，再分别加入0.1ml 测试菌液，最后铺上层半固体培养基，置37℃培养48小时。第三天在显微镜下观察各个平板的背景，使测试菌株的背景消失的浓度为待测物的最高浓度。根据最高浓度的范围将待测物配制成五种不同的浓度。

(3) 待测样品诱变性的检测:

取若干基本培养基平板，每个平板上加0.1ml测试菌液、0.1 ml不同浓度的待测物和0.2 ml S-9混合液，然后再铺上层半固体培养基，37℃培养48小时。

每次实验均需作亚硝基胍和空白对照，还要比较加S-9混合液和不加S-9混合液的回复突变菌落数。第三天统计各平板回复菌

| 组 别 | 平板数 | 加S-9混合物 | | | | 不加S-9混合物 | | | |
|---------|-----|---------|---|---|---|----------|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 待 测 物 | | | | | | | | | |
| 亚 硝 基 胍 | | | | | | | | | |
| 空 白 对 照 | | | | | | | | | |

落数。

根据实验结果判定待测物的诱变性，并绘制出待测物诱变效应的曲线图。

实验16 枯草杆菌感受态细胞的转化

一个细菌品系由于吸收了另一个细菌品系的DNA(称为转化因子)而发生遗传性状的改变，这个过程称为转化。通过转化获得的转化细胞称为转化子。

转化过程在细菌中有几种形式？(1)染色体DNA转化感受态细胞，例如肺炎双球菌、枯草杆菌、嗜血流感菌等称为经典转化。(2)质粒DNA转化感受态细胞，如大肠杆菌转化。(3)原生质球转化。

一、实验原理

枯草杆菌的一些菌株(主要是168的衍生菌株)在特殊的培养条件下能出现感受态。来自其他菌株的染色体DNA可进入感受态细胞并整合到宿主的染色体上。所含的基因可在宿主细胞内表达，使宿主细胞获得新的性状。

二、实验材料

1. 枯草杆菌：供体菌SB19 受体菌BR151try met lys
2. 用品：除实验九的用品外，72型分光光度计，紫外分光光度计，pH计。
3. $10\times$ 最低盐溶液： K_2HPO_4 14.0g, KH_2PO_4 6.4g, $(NH_4)_2SO_4$ 20g, 柠檬酸钠10g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g, 在蒸馏水中依次溶解上述成分，然后加水至1000ml。

4. $1 \times$ 最低盐溶液。

5. 1.8% 基本固体培养基: $1 \times$ 最低盐溶液 1000ml, 琼脂 18g, 50% 葡萄糖 10ml, 高压灭菌 8磅 20分钟。

6. 2mg/ml L-色氨酸溶液, 贮于棕色瓶内, 用黑纸包裹。

7. 10mg/ml L-赖氨酸溶液。

8. 10mg/ml L-甲硫氨酸溶液。

以上氨基酸溶液均在 8磅下压菌。

9. 5% 水解酪蛋白或水解乳蛋白。

10. 生长培养基 (GM): $1 \times$ 最低盐溶液 100ml, $1M$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5ml, 50% 葡萄糖 1ml, 5% 水解乳蛋白 0.4ml, 10% 酵母提取物 1ml, 受体菌所需氨基酸 $50\mu g/ml$ 。

11. 转化培养基 (TM): $1 \times$ 最低盐溶液 100ml, $1M$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5ml, 50% 葡萄糖 1ml, 5% 水解乳蛋白 0.2ml, 氨基酸 $5\mu g/ml$ 。

12. BY 培养基: 牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, $NaCl$ 5g, 国产酵母膏 5g, 葡萄糖 5g, 蒸馏水 1000ml, 用 $NaOH$ 将 pH 调至 7.5。

国产酵母膏需净化处理: 称 5g, 溶于少量水中, 煮沸, 冷却后 3000 rpm 离心 5分钟, 上清液再煮沸离心一次。

固体培养基另加琼脂 20g。

三、实验步骤

(一) 受体菌营养缺陷型的鉴定

枯草杆菌 BR151 有三重营养缺陷: 色氨酸 (trp)、甲硫氨酸 (met) 和赖氨酸 (lys)。鉴定营养缺陷型可确定其纯度。取 8 个基本培养基平板, 在一个平板上同时加上三种氨基酸溶液: 色氨酸 (0.1ml)、赖氨酸 (0.02ml) 和甲硫氨酸 (0.02ml)。其余平板则分别加一种或二种氨基酸溶液, 留一空白平板。用玻璃棒涂匀后接种受体菌 BR151, $37^\circ C$ 培养 48 小时。真正的 BR151 只在加了三种氨基酸溶液的平板上生长。

(二) 受体菌感受态细胞的培养与转化

1. 将受体菌接种于BY培养液中, 37℃振荡培养到对数生长早中期, 在620nm处的O. D. 值为0.4左右(培养4—5小时)。

2. 离心, 去上清液, 用GM液洗一次, 重新悬浮于等体积的GM液中, 测O. D. 值。37℃继续振荡培养到对数生长后期, 620nm处的O. D. 值为0.6~0.9(3—5小时)。

3. 取0.2ml菌液加入到1.8ml TM液中, 在试管中37℃振荡培养90分钟。

4. 加入供体DNA, 至最终浓度1μg/ml, 并设受体菌对照组(不加DNA)和DNA对照组(不加菌液)。分别置试管中, 37℃振荡培养30分钟。

5. 稀释并涂布固体培养基, 检出转化子。因为BR151具有三重缺陷型, 所以测定某氨基酸基因的转化率, 需在基本培养基上加上另两种氨基酸各30μg/ml, 作为转化子检出培养基。测定两个基因的共转化率, 则在培养基上添加另一种氨基酸30μg/ml。测定三个基因的共转化率, 则用基本培养基作检出培养基。

上述转化组用TM液稀释, 稀释度为 10^2 — 10^3 。受体菌对照组和DNA对照组不稀释。各取0.1ml接种于检出培养基上, 37℃培养48小时后观察转化子数目。

另取0.2ml菌液, 10倍递增稀释至 10^{-6} 。取0.02ml 10^{-4} , 0.02和0.05ml 10^{-5} , 0.1ml 10^{-6} 稀释液, 接种于基本培养基+trp+met+lys的平板上。各接两个平板, 37℃培养48小时后作活菌计数。

6. 计算转化率: 有两种表示方法。

$$(1) \text{ 转化率} = \frac{\text{转化子总数}}{\text{DNA}} = \text{转化子}/\mu\text{g DNA}$$

$$(2) \text{ 转化率} = \frac{\text{转化子数}}{\text{活菌总数}} \times 100\%, \text{ 此为细菌转化的百分数。}$$

实验17 大肠杆菌转化

由于基因工程中许多载体质粒来自大肠杆菌，而且大肠杆菌又是基因工程中最常用的受体细胞，因此了解大肠杆菌的转化过程是十分有用的。本实验是用大肠杆菌质粒DNA转化大肠杆菌细胞。

一、实验原理

大肠杆菌细胞在对数生长的早中期，用一定浓度的 CaCl_2 处理，并辅以短时间的高温处理，就出现一种特殊的生理状态，称为感受态。外源DNA可以进入感受态细胞，并在宿主细胞中复制与表达。质粒pBR322带有氨苄西林和四环素的抗性基因，因此在培养基中加氨苄西林和四环素就可以检出转化子。

二、实验材料

1. 大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株：供体菌，SF8 (pBR322)。受体菌：RRI F⁻ pro leu⁻ thi lac Y str^R R⁻ M⁻。

2. 器材用具：同实验16。

3. 肉汤培养基：同实验9。

4. 加抗生素肉汤固体培养基：其中氨苄西林 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，四环素 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

5. Z-肉汤培养基：蛋白胨20g，牛肉膏6g，葡萄糖2g，蒸馏水1000ml，用NaOH调pH至7.5。

6. 0.3M及0.03M CaCl_2 ，0.01M NaCl。

三、实验步骤

(一) 受体菌株生长曲线的测定

1. 把受体菌划线接种在肉汤培养基平板上, 37℃培养过夜。再重复划线培养一次。

2. 在平板上选取20—30个菌落, 悬浮于1.5ml肉汤培养液中。另取12个100ml三角瓶, 各加5ml肉汤培养液, 再加入上述菌液0.1ml, 37℃振荡培养, 每小时取一瓶, 测O. D. 值。

3. 在620nm处O. D. 值为0.6、0.7、0.8时, 分别取菌液稀释至 10^{-6} , 取稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的菌液各0.1ml, 涂在肉汤培养基平板上, 每个稀释度接种两个平板。

4. 37℃培养24小时后计算活菌数。为做转化实验, 5×10^7 /ml为合适的生长时期。

(二) 大肠杆菌的转化

1. 从经过两次过夜培养的肉汤培养基平板上, 挑取1—2个大菌落, 接种于11ml肉汤培养液中, 37℃振荡培养至对数生长早期(约 5×10^7 /ml)。

2. 进行下面实验的同时, 测定活菌数。方法同实验16, 稀释液用肉汤培养液, 平板用肉汤固体培养基。

3. 已培养好的细菌需迅速冷却, 取10ml悬浮菌液于0℃下4000rpm离心10分钟, 弃去培养液。

4. 用5ml0.01M NaCl洗菌体一次, 离心。将菌体悬浮于5ml0.03M CaCl₂中, 置冰水中20分钟。离心, 把菌体再悬浮于1ml冷的0.03M CaCl₂中, 此为感受态细菌的悬液。

5. 用预冷的移液管, 取0.2ml感受态细菌悬液, 加预冷的DNA样品及0.3M CaCl₂, 使DNA的浓度为1—3μg/ml, CaCl₂的终浓度为0.03M。

同时设对照1: 受体细菌悬液0.2ml, 对照2: DNA + CaCl₂液0.2ml。

6. 把这些样品置于0℃(冰水中)60分钟, 42℃处理样品2分钟迅速将其冷却。

7. 用Z-肉汤培养液以1:10稀释, 37℃静置培养90分钟。

8. 按下表用肉汤培养液稀释并涂布于肉汤培养基平板上。

| 稀释倍数 组别 | 平 板 | 肉汤固体培养基 | |
|------------|-----|-----------------------|--------------------|
| | | 不含抗生素 | 含抗生素 |
| 转 化 组 | | 10^{-5} — 10^{-7} | 10^0 — 10^{-8} |
| 受 体 菌 对 照 | | 10^{-5} — 10^{-7} | 不稀释 |
| 质 粒 对 照 | | 不稀释 | 不稀释 |

每个平板接种0.1ml, 37℃培养24小时(不含抗菌素平板)和48小时(含抗生素平板)后统计菌落数, 并选取转化子。

9. 转化频率的计算方法同实验16。转化子总数等于转化菌落数×稀释倍数×转化反应液体积。

实验18 切片制作法

一、实验目的

了解石蜡切片的基本过程, 掌握石蜡切片的制作方法。

二、实验材料

- 蚕豆根尖或洋葱根尖等。
- 用具: 小标本瓶 指管 眼科镊子 蜡杯 蜡铲 刀片 毛笔 载玻片 10ml量筒 漏斗 滴管 酒精灯 熔蜡箱 小木块 解剖针 吸水纸 切片机 展片台 需要强调的是载玻片必须事先擦洗得很干净。
- 70%、85%、95%、100%酒精及二甲苯、石蜡。
- 固定液: 将冰醋酸与纯酒精以1:3混合, 现配现用。
- 甘油蛋白: 取鸡蛋的蛋白加入等量的甘油, 搅拌均匀, 按1%量加入麝香酚小块, 放入冰箱备用。

三、实验步骤

1.取材固定：发芽的蚕豆，当根尖长到一粒米大小时，用刀片切下来，立即投入盛有固定液的标本瓶中，贴上标签，固定4—12小时。

2.洗涤保存：倒出固定液，加入70%酒精，隔数小时再换1—2次酒精，放冰箱保存。

3.脱水与透明：将材料从70%酒精中取出，依次转入85%酒精、95%酒精、100%酒精、100%酒精、二甲苯与纯酒精1:4混合液、2:1混合液、4:1混合液、二甲苯。每步间隔10分钟，在二甲苯中停留到组织块透明。注意每次换液需用吸水纸把余液吸干。

4.透蜡：将石蜡熔化，分装在三个编号的蜡杯内，另准备一杯石蜡供包埋用。蜡杯都放在55—60℃的熔蜡箱内。

从二甲苯中取出透明的根尖，依次放入蜡杯(1)，(2)，(3)各半小时。

5.包埋：用温热的吸管吸取热石蜡，注入预制的纸盒内，用温镊子夹取组织块放入纸盒的中央位置。用冷水冷却纸盒的底部，待石蜡表面凝成一层膜后，迅速将纸盒全部浸入冷水中，待石蜡全部凝结变硬后取出。

6.修切蜡块：去掉纸盒，用刀片将蜡块修成长方形，注意蜡块两边必须修成平行的直线。

7.固定蜡块：取小木块，用蜡铲加上热石蜡，再熔化蜡块底面，粘于小木板上，冷却后装在切片机上。

8.切片：按20—30度倾斜角装上切片刀，调整刻度指针到5—8微米处。一手均匀地摇切片机转轮，一手持毛笔托住蜡带，平放在平板上。切片时要注意刀口清洁，室温适宜。

9.展片、贴片：用玻棒尖端稍稍蘸取一滴甘油蛋白，滴于载玻片上(不宜太多)。用洗净的手指涂布，涂布面取决于要贴附的蜡片面积。再滴上二滴蒸馏水。用刀片将蜡带切成适当长度的片段，以小镊子夹取蜡带，铺在玻片的水面上，摆正位置后置于预

热到48℃左右的展片台上。待蜡片完全展平后，用吸水纸吸去多余的水份，清除切片与载玻片之间的气泡。然后平放在载片架上，待其干燥后即可染色。

实验19 孚尔根(Feulgen)染色法

一、实验原理

这是 Feulgen 于1924年提出的一种鉴别细胞中 DNA 的组织化学方法。细胞中的DNA 在60℃下用1N HCl酸解，使去氧核糖与嘌呤碱之间的糖苷键破坏，嘌呤碱脱掉，从而使脱氧核糖中潜在的醛基游离。游离的醛基与Schiff 试剂结合，形成一种紫色的复合物。

酸解的条件很重要。若温度低、酸度不够，醛基暴露不充分，染色会过浅；相反，若酸解过分，会造成DNA 完全解聚，从而使水解液中Schiff反应增强，而染色体的染色反应减弱。而RNA在酸的作用下比DNA稳定，醛基难以被游离，所以不能被着色。这就是孚尔根反应对DNA有特异性染色反应的原因。

二、实验材料

1. 上次实验制成的石蜡切片。
2. 用具：立式染色缸一套 镊子 盖玻片 小漏斗 铁架毛边纸 玻璃棒 显微镜 恒温水浴锅 温度计 烧杯 棕色瓶 黑纸
3. 各种浓度的乙醇(见实验18)、二甲苯、加拿大中性树胶。
4. 1N HCl
5. Schiff 试剂：0.5g碱性品红，加到已煮沸的 100ml 蒸馏水中，再煮沸3~4分钟，待冷却到50℃时过滤，继续冷却到25℃

以下时再加10ml 1N HCl和1.5g偏重亚硫酸钠，装入棕色瓶，盖紧，裹上黑纸，保存暗处。偏重亚硫酸钠与1N HCl反应，放出SO₂，SO₂与碱性品红反应，生成碱性品红-亚硫酸溶液，无色。

6. 漂染液：10ml10%亚硫酸钠溶液加200ml蒸馏水，再加10ml1NHCl。必须现配现用。

三、实验步骤

1. 脱蜡：石蜡切片经下列步骤脱蜡。纯二甲苯(1) $\xrightarrow{10\text{分钟}}$ 纯二甲苯(2) $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 100%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 95%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 85%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 70%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 50%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 30%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 蒸馏水(1) $\xrightarrow{1\text{分钟}}$ 蒸馏水(2)

2. 水解：1NHCl $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 60℃1NHCl $\xrightarrow{8-10\text{分钟}}$ 染色。

3. 染色：在Schiff试剂的染色缸中染色3小时以上。最好在10℃左右的黑暗条件下进行。

4. 漂洗镜检：漂染液(1) $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 漂染液(2) $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 蒸馏水(1) $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 蒸馏水(2) $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 显微镜下检查。

5. 透明：50%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 70%乙醇 $\xrightarrow{2\text{分钟}}$ 85%乙醇 $\xrightarrow{3\text{分钟}}$ 95%乙醇 $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 100%乙醇(1) $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 100%乙醇(2) $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 二甲苯(1) $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 二甲苯(2) $\xrightarrow{5\text{分钟}}$ 封片。

6. 封片：从二甲苯中取出载玻片，用毛边纸吸干余液。用玻璃棒蘸取树胶滴于载玻片上。然后镊取盖玻片，先将一边落于载玻片上，徐徐放下，使树胶布满盖玻片与载玻片之间，赶除气泡，让其自然干燥。

实验20 花粉母细胞的制片技术

一、实验目的 学习植物花粉母细胞的制片技术，了解减数分裂的过程。

二、实验材料

1. 蚕豆、玉米与小麦现蕾孕穗植株
2. 用具：显微镜 镊子 解剖针 盖玻片 载玻片 吸水纸 培养皿 酒精灯
3. Carnoy 固定液：无水乙醇3份，冰醋酸1份，现配现用。
4. 醋酸洋红：45%醋酸100ml加胭脂红粉(Carmine)1g，煮沸，冷却后再加1~2%的铁明矾水溶液5~10滴，过滤后贮存于棕色瓶中。

三、实验步骤

1. 取材与固定：

(1) 蚕豆：在蚕豆刚现蕾时，取茎顶幼小花束，去掉周围小叶，将长约1mm左右的花苞，在固定液中固定3小时后，换入70%的酒精中。取材时间以下午2点为宜。

(2) 玉米：在玉米孕穗初期，即雄穗露尖前7~10天，植株中部略现膨软。先用手从喇叭口往下捏叶鞘，感觉松软的部位用刀片划开。取出4~6mm长的幼穗，固定在固定液内，冰箱内保存，或24小时后转入70%酒精中保存。取材时间以上午7~9点为宜。

(3) 小麦：植株开始挑旗，花药长1.5~2mm，呈黄绿色时取材最合适，取材时间以上午10时至下午1点为宜。固定保存方法同上。

2. 制片染色：取出固定好的花穗，剥开花蕾，取出花药，放在载玻片上。滴一滴醋酸洋红在花药上。用解剖针横断花药，轻轻压挤，使花粉母细胞散出。用镊子仔细地将所有的药壁残渣清除干净以后，加盖玻片在低倍镜下作初步检查。若材料可用，则将载片移置酒精灯上微微加热，注意切勿使染液沸腾，不可烧干。把片子放在毛边纸下，用拇指匀力下压，使材料分开，并把周围的染色液吸干。若染色太浅，在盖片边上稍加染色液再烘、再压。若染色过深，可用冰醋酸退色。

3. 永久性封片：将片子浸入1:1的95%酒精冰醋酸溶液中，并加几滴正丁醇。轻轻揭开盖片，浸5~6分钟。转入95%酒精与正丁醇1:1的溶液中1~2分钟。再转入纯正丁醇透明1~2分钟。用滤纸吸去多余溶液，打开盖片，加1~2滴树胶封片，赶除气泡后，保存在较低的温度下。

四、作业

1. 了解植物花粉形成中的减数分裂过程。
2. 绘制观察到的分裂图，注明是什么时期。

实验21 植物染色体组型分析

核型是指染色体组在有丝分裂中期的表型，包括染色体数目、大小、形态特征的总和。核型分析是在对染色体进行测量计算的基础上，进行分组、排队、配对并进行形态分析的过程。由于染色体是遗传物质单位——基因的载体，核型代表了种属的特征。所以组型分析对于探讨人类遗传病的机制、动植物起源、物种间亲缘关系、鉴定远缘杂种等方面都具有重要的意义。

一、实验目的：掌握染色体组型的分析方法。

二、实验材料

1. 大麦种籽及大麦染色体示范图片。

2. 显微镜 冰箱 温箱 显微摄影设备 测微尺 剪刀
镊子 培养皿 小烧杯 玻棒 载玻片 盖玻片 酒精灯 滤纸
等

3. 饱和的对二氯苯溶液 0.075MKCl 溶液 2%国产纤维素酶 醋酸甲醇(1:2) 固定液 pH 7.2的磷酸缓冲液 二甲苯 加拿大树胶。

4. Giemsa 母液配制：取 0.5g Giemsa，加几滴甘油，充分研磨，至无颗粒时，加入33ml甘油，放在56℃水浴中90分钟。再加入33ml 甲醇，热过滤，倒入棕色瓶中，置4℃冰箱中存放半个月后使用。用时用磷酸缓冲液以1:10稀释。

三、实验步骤

(一)大麦染色体标本制作

1. 材料培养：种籽在25℃下发芽至根长1cm左右，洗净。

2. 预处理：剪下 2mm左右的根尖，室温下用对二氯苯饱和液处理3小时左右，洗净。

3. 前低渗：室温下用0.075M 氯化钾溶液处理 30分钟，洗净。

4. 酶解：25℃下酶液处理3小时左右。

5. 后低渗：水洗2~3次后，在蒸馏水中停留30分钟。

6. 固定：固定液处理30分钟左右。

7. 制备细胞悬液：倒去大部分固定液，用玻棒将根尖捣碎，再加适量固定液，制成悬液。

8. 制片：吸取少许悬液，滴于冰冻的载玻片上，轻轻吹气后在酒精灯上加热干燥。

9. 染色：用磷酸缓冲液稀释的 Giemsa 染液染色 5分钟，

洗净。

10. 封片：显微镜下检查，将染色体分散好、清晰的片子用二甲苯透明后，用加拿大胶封固。

(二) 大麦染色体组型分析

1. 染色体计数：选取一百个以上染色体分散好的细胞，进行染色体计数，得出大麦的染色体数目。

2. 染色体测量和计算：在染色体标本中选取5~10个染色体平直、收缩适度、着丝点清楚的细胞，进行拍照放大，并按下表进行测量和计算。

| 编号 | 长臂 | 短臂 | 随体 | 全长 | 臂比 = $\frac{\text{长臂}}{\text{短臂}}$ | 相对长度 = $\frac{\text{染色体长度}}{\text{染色体组总长度}} \times 100$ |
|----|----|----|----|----|------------------------------------|---|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| ⋮ | | | | | | |
| ⋮ | | | | | | |
| 14 | | | | | | |

3. 染色体配对和排队

(1) 根据染色体的相对长度、臂比和形态特征，将同源染色体相配成对。

(2) 按由长至短的顺序将各对染色体依次排队。长度相同的染色体则将短臂长的染色体排在前面，随体染色体排在最后。

4. 求臂比和相对长度的平均值，并根据臂比值将染色体分类：

臂比1.0~1.7为中部着丝点染色体(M)；

臂比1.7~3.0为近中部着丝点染色体(SM)；

臂比3.0~7.0为近端部着丝点染色体(ST)；

臂比7.0以上为端部着丝点染色体(T)。

5. 染色体组型标准图像的制备：选择最理想的放大照片，根据染色体的分类排队情况进行剪贴。剪贴后再进行翻拍，并绘

制大麦染色体组型模式图。

实验22 物化因素对染色体的影响

一、实验目的

了解诱发植物多倍体细胞的方法，观察物化因素引起的染色体变异及产生的微核，检验诱变剂量与诱变效应的相关性。

二、实验原理

物化因素可以对染色体发生影响，从而使生物体的性状产生变异。它们可以引起染色体在数量与结构上发生变化，还可导致微核的产生。所产生的变异频率与物化因素的剂量相关，因而在致癌畸变物质的检测方面，可以运用染色体畸变分析法和微核测定法。

染色体畸变分析法，是在一定数目的有丝分裂中、后期细胞中，统计染色体桥和断片的方法。染色体在物化因素作用下断裂，同一染色体或不同染色体的两条单体重重新愈合，从而形成双着丝点的染色体，在后期就会出现染色体桥和断片。这是较为准确的检测方法。微核则是在物化因素作用下细胞质内形成的一种小核，它可能是染色体断片，或因纺锤丝受损后个别落后的染色体形成的，也有人认为是主核出芽的结果。由于微核可以在细胞周期的各个时期内被观察到，而不必考虑材料中分裂相的多少，所以微核测定法已是一种被广泛接受的简便敏感的检测方法。

秋水仙碱的作用在于直接或间接地破坏了纺锤丝的形成，而对染色体的结构与复制无显著影响，从而造成细胞中的染色体加倍。

三、实验材料

1. 大麦种籽、蚕豆及洋葱等。
2. 显微镜、镊子、解剖针、刀片、载玻片、盖玻片、吸水纸、酒精灯。
3. 醋酸洋红、秋水仙素、 1NHCl 。

四、实验步骤

(一)材料处理

1. 物理因素处理大麦种籽。物理因素采用电子束(提高了一定能量,并经聚焦的 β -射线),辐射剂量用 1.8×10^4 、 2.5×10^4 与 $3.9 \times 10^4 \text{rad}$ (拉德),照射后的种籽按常规方法发芽、剪根和固定。

2. 化学因素(秋水仙碱)处理蚕豆、洋葱根尖。

(1) 先剪去洋葱的老根,然后置于盛满水的广口瓶上,等长出新根后,再移到盛有 $0.01 \sim 0.1\%$ 秋水仙素的器皿中,直到根尖膨大为止。

(2) 蚕豆种籽在沙盘中发芽,当根长 1cm 左右时,取出洗净,将水吸干,用 0.1% 秋水仙素处理,以药液浸没根部为准。在 25°C 下培养,直到根尖膨大为止。

(二)染色、制片

1. 将根尖放在 1NHCl 解离液中,置 30°C 水浴锅中解离10分钟左右,用水洗净。

2. 将根尖置于载玻片上,滴上一二滴醋酸洋红,5分钟后压片。

3. 用解剖针捣碎组织,盖上盖片,边敲击,边在酒精灯上微微加热。最后用拇指用力一压,注意勿使盖片移动。

(三)观察统计

1. 观察秋水仙素处理的根尖压片,寻找理想的中期相,观察染色体数目的加倍情况,并与对照比较。

2. 观察电子束处理的根尖压片中,染色体桥和断片的情况。调查20条主根, 每条根检查25个有丝分裂中、后期细胞, 统计这500个细胞中桥和断片的频率。

3. 观察秋水仙素和电子束处理后的根尖压片中微核的情况。调查20条主根, 每条根尖观察200~250个细胞, 统计这4000~5000个细胞中微核出现的频率。

染色体畸变及微核检测表

| 根 | 桥 | 断片 | 桥 + 断片 | 正常的中、后期细胞数 | 微核率/根 |
|----|---|----|--------|------------|-------|
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| ⋮ | | | | | |
| 20 | | | | | |
| 总计 | | | | | |

实验23 植物的有性杂交

一、实验目的

初步掌握一些作物的杂交方法, 了解杂交后代的一般遗传现象和它们的规律。

二、实验原理

两个具有不同基因型的品种或类型, 通过雌雄细胞的结合, 产生新类型, 称为杂交。

在有性杂交中把接受花粉的植株叫做母本, 用符号“♀”表

示；供给花粉的植株称父本，用“♂”表示。父母本统称亲本，用“P”表示，杂交符号用“×”表示，自交符号用“⊗”表示，杂种一代用“F₁”表示，杂种二代用“F₂”表示，依此类推。

三、实验材料

1. 不同品种的小麦和水稻。
2. 剪刀 小镊子 酒精棉花 纸牌 透明纸袋 曲别针 铅笔 小热水瓶 温度计

四、实验步骤

(一)小麦

1. 选穗、整穗：选择生长壮健的植株主穗作母本，一般用抽出剑叶半寸左右的穗子。用镊子将上部和基部的小穗去掉，留下中部10个小穗(两边各5个)，每个小穗只留基部两朵花，母本有芒时，把芒剪去。

2. 去雄：用手指轻压小花，用镊子从内、外颖中间取出花药，注意不要夹破花药，也不要碰伤柱头。若夹破了花药，则应去掉这朵小花。每次去雄后的镊子要用酒精棉擦洗。

去雄要有顺序，最好一侧一侧、自上而下地进行。去雄后将每朵小花的颖壳剪去 $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$ 。

去雄后要立即套袋，把袋口折叠好，用曲别针别住，并挂上纸牌。纸牌上用铅笔注明母本名称，去雄日期。

3. 采集花粉：选取即将开花或中部已开1~2朵花的父本穗子，将它们剪下，用手上下抹几次，以刺激开花。然后把小穗剪成八形，稍等片刻，花药就会陆续伸出颖壳。

4. 授粉：一般在去雄第二天，当去雄花朵的柱头呈羽毛状并带有光泽时，是授粉的最好机会。授粉后，再套上纸袋，用铅笔在纸牌上标记父本名称及授粉日期。

5. 收获：杂交种籽成熟后，按穗收获，同一组合的穗子混

合脱粒后，按组合装入纸袋，并注明组合名称、种籽粒数。

(二)水稻

1. 选株选穗：确定杂交组合后，应选择形态特征典型的、生长健壮无病虫害的植株，一般用主穗或第一分穗。选穗的具体标准因品种而有所不同。早中籼稻品种以穗部的 $\frac{3}{4}$ 左右已抽出叶鞘到全穗刚抽出为好；早中粳品种则以全穗抽出叶鞘为佳；晚稻则以穗抽出后，穗颈已露出的，去雄效果好。

2. 去雄：去雄的方法有剪颖去雄法、套袋机械去雄法和温汤去雄法。剪颖去雄法是将颖壳剪去 $\frac{1}{3}\sim\frac{1}{4}$ ，用镊子除去雄蕊，这种方法易伤花器，结实率低。套袋机械去雄法，是在开花前一小时，用黑色纸袋套在穗上，促使提早开花而花药未裂开，便于去雄，但套袋时间不易掌握。所以目前一般用温汤去雄法。

利用花粉不耐高温而雌蕊耐高温较强的特点，在开花前半小时至1小时左右，将选好的稻穗插进热水瓶。一般籼稻在 43°C 温水中浸5分钟左右，粳稻在 45°C 温水中浸5分钟左右。经温汤处理后，这种已经开放或稍等片刻就开放的颖花花粉被温汤杀死。剪去没有开花的全部颖花，套上纸袋，挂上纸牌。

3. 授粉：在每天的开花盛期，采集发育完全且刚刚破裂的花药作授粉用。用镊子夹取花药2个，轻轻塞进已去雄的小穗内，套上纸袋，挂牌。

4. 以后检查结实情况。

实验24 植物花药培养

一、实验目的

学会鉴定花粉发育时期，初步掌握作物花药培养的基本操作。

二、实验材料

1. 小麦

2. 试管 烧杯 量筒 吸量管 剪刀 镊子 棉花纱布
精密试纸 酒精灯 培养皿 接种针 试管架等

3. 显微镜 天平 培养箱 灭菌锅

4. MS培养基成份(见下表) 漂白粉 酒精等

MS培养基*

| 大量元素 | mg/l | 微量元素 | mg/l | 有机成分 | mg/l |
|---|-------|---|-------|-------|-------|
| NH_4NO_3 | 1650 | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22.3 | 甘氨酸 | 2 |
| KNO_3 | 1900 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8.6 | 盐酸硫胺素 | 0.4 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440 | H_3BO_3 | 6.2 | 盐酸吡哆素 | 0.5 |
| KH_2PO_4 | 170 | KI | 0.83 | 烟酸 | 0.5 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 肌醇 | 100 |
| 铁盐母液** | 5ml/l | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 蔗糖 | 90000 |
| | | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 琼脂 | 8000 |

• pH为5.8

• • 铁盐母液配制: 称7.47g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于500ml双蒸水中, 称5.57g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于500ml双蒸水中。然后将它们混合, 再放在沸水浴中煮半小时以上。

三、实验步骤

(一) 配制培养基

1. 配制培养基的母液: 培养基中用量极少的微量元素、生长素类物质及维生素需先配成母液。

(1) 微量元素按培养基配方100倍的浓度配成混合母液。

(2) 维生素按培养基配方100倍的浓度配成混合母液。

(3) 生长素类物质单独配成母液。2,4-D, 萘乙酸、吲哚乙酸配制母液时先用少量95%酒精溶解; 激动素、6-苄基腺嘌呤需先用1NHCl或KOH溶解。

(4) 铁盐母液需单独配制, 见表注。

2. 配制培养基

按培养基配方的量称取大量元素，逐项溶解于700ml 双蒸水中，然后分别吸取铁盐、微量元素、生长素母液、加入蔗糖后定容到1000ml，用1N KOH溶液调节pH至5.8，再加入琼脂。

3. 培养基的灭菌与分装

培养基容器盖上棉花塞，用防潮纸包扎后放入灭菌锅中，15磅下灭菌20分钟，然后分装在灭菌的试管中，一般培养基占试管容积的1/5~1/4为宜。

(二)花药培养

1. 花粉发育时期的镜检：花粉发育的时期是花药培养的重要因素。在小麦和水稻，一般用花粉处于单核中、晚期的花药进行培养。先将花药取出，置于载玻片上，轻轻压碎。滴一滴醋酸洋红，盖上盖玻片，在显微镜下观察。

小麦花粉的单核期开始时，细胞核位于中央，为单核早期。细胞核偏离中央，逐步出现小液泡，为单核中期。细胞中央形成大液泡，细胞核被挤到萌发孔对面，则为单核晚期。花粉处于单核中、晚期的小麦，剑叶叶鞘上半部明显膨大，但叶鞘未张开，看不到幼穗。

根据植株的外部形态取材，再根据镜检结果，淘汰较老或较嫩的小穗，留下的准备接种。

2. 花药接种：将选出的小穗放在饱和漂白粉的上清液中浸泡10~15分钟，再用无菌水冲洗2~3次。用灭过菌的剪子把花药上端的颖壳剪去，并用镊子将花药剔在无菌纸上，然后倒入装有培养基的试管内，每管20~30个花药。接种后放在26~28℃的条件下培养。

3. 愈伤组织的诱导

从小麦花药诱导愈伤组织的培养基可用MS培养基(见实验材料附表)，附加2mg/12,4-D, 0.5mg/l激动素，以及水解乳蛋白500mg/l。小麦花药在培养基上由黄绿色变为黄白色，半个月后陆续长出愈伤组织。当愈伤组织长到2~3mm时，转移到诱导分化

的培养基上。

4. 苗的分化与移栽

苗分化培养基与诱导愈伤组织的培养基略有不同。不加2,4-D, 而用吲哚乙酸 $0.2 \sim 1.0 \text{mg/l}$, Kinetin $0.5 \sim 1.0 \text{mg/l}$, 蔗糖浓度为 $5 \sim 8\%$ 。此时需要用日光灯照明, 两周后可看到愈伤组织会分化出芽或根。当植株长到 $2 \sim 3$ 寸时即可移栽。移栽前先将根部的培养基洗去, 然后栽在土中, 用烧杯罩住幼苗, 防止水分蒸发而造成死苗。

四、作业

统计愈伤组织的诱导频率及苗的分化频率, 写出实验报告。

实验25 遗传力的估算

一、实验目的

通过实验, 初步掌握遗传力的估算方法。

二、实验原理

数量性状受多基因的支配, 多基因的作用有累加性, 因而 F_1 往往表现为两个亲本的中间类型, F_2 代的分离表现为接近常态分布的连续变异。根据数量性状的研究方法, 遗传性状变异的量值用方差表示, 并在方差分解的基础上定义了遗传力。

遗传力是指亲本传递某一性状的能力, 有广义遗传力和狭义遗传力之分。广义遗传力 (h_B) 是指遗传方差 (V_G) 在总的表型方差 (V_P) 中所占的比例。狭义遗传力 (h_N) 是指遗传方差中基因加性效应方差 (V_A) 对表型方差的比值。

由于基因型一致的世代 (P_1 、 P_2 、 F_1) 不提供基因方差, 所以

将它们的表现型方差作为环境方差来估算遗传力，即：

$$h_B^2 = \frac{V_{F_1} - \left(\frac{1}{4}V_{P_1} + \frac{1}{2}V_{F_1} + \frac{1}{4}V_{P_2} \right)}{V_{F_2}} \times 100\%$$

(广义遗传力)

$$h_N^2 = \frac{2V_{F_2} - (V_{B_1} + V_{B_2})}{V_{F_1}} \times 100\% \text{ (狭义遗传力)}$$

式中 $B_1(F_1 \times P_1)$ 与 $B_2(F_1 \times P_2)$ 是 F_1 回交后代， $F_2(F_1 \otimes)$ 为 F_1 自交后代。

三、实验步骤

1. 准备材料

小麦品种及各种杂种后代： P_1 、 P_2 、 F_1 、 $F_2(F_1 \otimes)$ 、 $B_1(F_1 \times P_1)$ 、 $B_2(F_1 \times P_2)$ 。

2. 田间设计

不分离世代 P_1 、 P_2 、 F_1 各种1单行(5米行长)小区，回交世代各种5个小区，分离世代 F_2 种15个小区。

3. 抽样考种调查

抽穗前随机取样。 P_1 、 P_2 、 F_1 各20株； B_1 、 B_2 各50株； F_2 100株，分别挂牌编号，然后对所测的性状进行调查。

4. 资料处理

(1) 整理数据

将调查结果登记在下页表中，并计算整理。

(2) 计算二亲本及各杂种的表现型方差：

$$V = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$$

(3) 估算遗传力：

代入公式求 h_B^2 和 h_N^2

四、作业

1. 以小组为单位取一组数据。

| 世代 | | 性状 数据 | 例(株高) | 整理 |
|-------|-----------------------------|----------|-------|---|
| P_1 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |
| P_2 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |
| F_1 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |
| B_1 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |
| B_2 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |
| F_2 | 观察值x x^2 Σx | | | $n =$ $\Sigma x^2 =$ $(\Sigma x)^2 =$ |

2. 每个同学在整理数据的基础上, 求出该性状的广义和狭义遗传力。

实验26 人的外周血淋巴细胞培养及染色体标本制作

一、实验目的:

初步掌握人外周血白细胞的悬浮培养法, 以及染色体标本制

备的技术，学会正常人染色体的组型分析。

二、实验材料

1. 显微镜 载玻片(预冻保存) 培养瓶 滴管 离心管
离心机 针筒(10ml, 5ml与1ml) pH试纸 酒精灯 温箱
2. M199培养基 水解乳蛋白 肝素 小牛血清 青霉素
链霉素 植物性血球凝集素(PHA) 3.5%NaHCO₃ 0.1NHCl
秋水仙素 低渗用蒸馏水 固定液(甲醇:冰醋酸为3:1) 染色液
(Giemsa 原液15滴, 加入10ml pH7.4~7.6的磷酸缓冲液) 加拿
大树胶 酒精棉

三、实验步骤

1. 分装培养液: 无菌条件下将培养液及附加成分装入培养瓶: 培养液M199 4ml, 小牛血清1ml, 青霉素(5000单位/ml) 与链霉素(5000单位/ml)各0.1ml, PHA 0.2ml, 肝素1小滴, 用3.5% NaHCO₃调pH至7.0~7.4。

2. 采血培养: 取灭菌的10ml针筒, 用肝素湿润。用碘酒和酒精消毒皮肤, 抽取静脉血1ml, 立即接种于培养瓶内, 每瓶约0.3ml, 轻轻摇动几下后置37℃温箱内培养66~72小时。

3. 秋水仙素处理: 取6μg/ml的秋水仙素溶液0.05~0.1ml, 加入培养瓶, 置37℃温箱中处理2~4小时。

4. 低渗处理: 小心地从温箱取出培养瓶, 用滴管吸弃上清液, 加入5ml温育的低渗溶液后, 用滴管轻轻冲打成细胞悬液, 移入离心管中置37℃温箱处理20分钟, 使红细胞破碎, 白细胞膨胀。

5. 离心固定: 1000rpm离心5分钟后弃去上清液。加入固定液2~4ml, 片刻后用滴管轻轻冲打成细胞悬液, 室温下固定15分钟后再离心, 吸去上清液。再加入固定液2ml, 用吸管轻轻打散, 室温下继续固定15分钟以上(可过夜)。

6. 制片: 离心去上清液后加入固定液 0.5ml, 用滴管小心冲打成悬液。从冰箱的冰格中取出载玻片, 每片滴加悬液1~3滴,

用嘴轻轻吹散，用电风吹干，或在酒精灯上微火烤干。

7. 染色 Giemsa 染液染色30分钟后倒去多余染液，并用蒸馏水轻轻冲洗。

8. 镜检封片 待稍干后，在显微镜下检查。经二甲苯透明5分钟后用加拿大树胶封片。

9. 组型分析 显微摄影、冲洗、放大后，参照实验21的方法进行组型分析。人类体细胞有46条染色体，即22对常染色体和一对性染色体，男子是XY，女子是XX。

实验27 骨髓细胞染色体制片技术

一、实验目的

骨髓细胞具有高度分裂活动能力，是研究哺乳动物染色体的良好材料。通过实验，初步掌握制片及染色技术。

二、实验材料

1. 大白鼠($2n = 42$)或小白鼠($2n = 40$)
2. 显微镜 离心机 离心管 载玻片(预冻保存) 5ml 针筒 吸管 天平 试管架 量筒 温度计 温箱 恒温水浴锅 冰箱 解剖刀 解剖剪 眼科镊子 培养皿 烧杯 酒精灯
3. 秋水仙素溶液(0.1%) 柠檬酸钠溶液(2.2%)或0.75M KCl溶液 甲醇 冰醋酸 蒸馏水 pH7.2~7.4的磷酸缓冲液 Giemsa 染液 生理盐水

三、实验步骤

1. 秋水仙素处理 取材前2~3小时，在大白鼠腹腔内注射0.1%的秋水仙素溶液，注射剂量为每公斤动物体重4mg。

2. 取骨髓细胞 用断颈法处死动物,立即剪取后肢,去除肌肉,剥出后肢股骨。用75%酒精擦去残余肌肉碎渣,剪开股骨一端。用注射器吸取5ml37℃预温的0.075M KCl,插入剪开的小孔中,反复将骨髓细胞冲出,1200rpm离心10分钟。

3. 低渗处理 去上清液,加5ml0.075 MKCl,轻轻打成细胞悬液,放在37℃温箱中低渗处理30分钟。

4. 预固定 加5滴新配的甲醇-冰醋酸固定液(3:1),立即混匀。1200rpm离心10分钟,弃上清液。

5. 固定: 加入新配甲醇-冰醋酸固定液 4ml,立即用吸管打成细胞悬液,固定20分钟。离心去上清液后再用4ml 固定液固定20分钟。离心去上清液后,在0.1~0.3ml的沉淀物中再加 0.2~0.5ml固定液,用吸管打匀备用。

6. 滴片 取预先冰冻的干净载片,甩掉冰水后迅速滴上2~3滴细胞悬液,立即用嘴在载片上吹气,使悬浮细胞均匀分散。将载片掠过酒精灯几次,以助染色体分散和展开,室温下干燥。

7. 染色 用1:10Giemsa 稀释液染色30分钟,自来水冲洗,空气干燥。

8. 镜检封片 将分裂相多而图象清晰的涂片在二甲苯中透明后,用加拿大树胶封片。

实验28 人类X-染色体的标本制作与观察

一、实验目的

初步掌握X-染色体标本的制作方法,熟悉人体细胞X-染色体的形态特征及所在位置。

二、实验原理

X-染色质是异染色质化的失活的X-染色体。正常男性的细胞中没有X-染色质。正常女性的细胞中有两个X-染色体，其中一个异染色质化，成为X-染色质。因而通过X-染色质的检查可鉴别胎儿性别，并为诊断性染色体异常引起的遗传病提供参考资料。

三、实验材料

1. 口腔颊部粘膜细胞。(羊水、皮肤、结缔组织、宫颈、尿道等组织细胞的间期细胞核均可检查)

2. 显微镜 离心机。

3. 85%生理盐水，固定液(2甲醇:1冰醋酸)，95%酒精。

4. 0.2%甲苯胺蓝染色液 取甲苯胺蓝0.2g，加入少量丙酮，溶解后加入双蒸水至100ml。

5. 硫堇染色液

(1) 硫堇饱和液。称20g硫堇溶于500ml50%的酒精中，在与缓冲液混合前先过滤。

(2) 缓冲液 醋酸钠 9.714g，巴比妥钠 14.714g，双蒸水 500ml。

(3) 染色液的配制 缓冲液28ml，0.1NHCl 32ml，硫堇饱和溶液40ml，将pH调到5.7，放冰箱保存备用。

四、实验步骤

(一)取材与固定

方法I

1. 取10ml离心管，吸入0.85%生理盐水5ml。

2. 用水漱口后，以牙签刮取口腔颊部粘膜，将其洗入生理盐水中(注意将第一次刮取物弃去)，轻轻摇散细胞，1000rpm离心10分钟，弃去上清液。

3. 加入新配的甲醇-冰醋酸固定液 4ml，用吸管轻轻将细胞

打匀，固定10分钟。

4. 1000rpm离心10分钟，去上清液。
5. 加固定液至0.3~0.5ml，制成细胞悬液。
6. 将载片倾斜40°左右，滴上二滴细胞悬液，空气干燥。

方法II

1. 用消毒牙签刮取口腔粘膜，直接涂于载玻片上。
2. 立即滴加95%酒精，固定30—60分钟，放置空气干燥。

(二)染色

1. 将制片放入蒸馏水冲洗数分钟。
2. 用5NHCl在室温下水解10分钟。
3. 自来水冲洗数分钟，再用蒸馏水冲洗。
4. 硫堇染色液染色30分钟，或0.2%甲苯胺蓝染色1~1.5分钟。

5. 水冲洗后，用吹风机吹干(或晾干)即可进行镜检。

(三)观察

用油镜头进行观察。细胞的胞质着色浅，胞核着色深。X-染色质很小，约1~1.5 μm ，位于核膜内侧边缘，浓染而轮廓清楚，呈圆形、平凸形、扁平形或三角形。

观察计数时要注意：(1) 为避免与核内其它物质混淆，凡位于核中间的浓染小体都不计数。(2) 计数细胞的细胞核必须完整无缺、无皱褶，核染色均匀。

正常人口腔粘膜细胞X-染色质出现率一般男性平均为1.5%，女性平均为28.5%。

实验29 二倍体细胞株的培养 及染色体制片技术

一、实验目的

细胞株培养是一种应用广泛的基础性实验技术。通过实验初

步掌握培养技术及染色体制片技术。

二、实验材料

1. 培养瓶(30~100ml) 移液管(1,5,10ml) 滴管 培养皿 容量瓶 小指管 大套管 载玻片 盖玻片 针筒 烧杯 量筒 量杯 直柄虹膜剪 虹膜镊(直、弯) 解剖镊(尖端内面有齿) 白内障刀 分离针 动脉钳 试管架

2. 0.85%NaCl 5%NaHCO₃ 0.5%水解乳蛋白

3. 0.1M磷酸缓冲液:

pH7.4—7.6 Na₂HPO₄·12H₂O 28.8g

KH₂PO₄ 2.67g

溶解于1000ml双蒸水中。

pH6.8 Na₂HPO₄ 6.97g

NaH₂PO₄·H₂O 6.73g

溶解于1000ml双蒸水中。

4. 1%酚红: 称酚红1g置于研钵内, 量取0.1N NaOH28ml, 逐滴加入研钵, 尽量磨细, 溶解后再全部加入。再加双蒸水至100ml, 4℃保存。

5. Hank's 母液(10倍)

甲液: Na₂HPO₄·2H₂O 0.6g KH₂PO₄ 0.6g

KCl 4.0g MgSO₄·7H₂O 2.0g

NaCl 80g 葡萄糖 10.0g

溶于900ml双蒸水中。

乙液: CaCl₂·6H₂O 1.4g

溶于100ml双蒸水中。

待甲、乙二液都溶解后, 将其混在一起, 成为母液。用时稀释, 取100ml母液加900ml双蒸水, 加2ml 1%酚红。高压消毒, 8磅20分钟。

6. D-Hank's 液10倍母液 (即无Ca²⁺无Mg²⁺的Hank's液)

NaCl 80g Na₂HPO₄·12H₂O 0.12g

KCl 4.0g KH₂PO₄ 0.6g

葡萄糖 10.0g

以上药品溶于1000ml双蒸水中，使用时同Hank's液。

7. 0.25%胰酶

D-Hank's 1000ml; 胰酶2.5g; 1%酚红，用5%NaHCO₃调节pH到7.4~7.6，过滤灭菌。

8. 台盼蓝染液

称取台盼蓝2g置研钵中加入几滴双蒸水，研细，溶于100ml双蒸水中。活细胞染色后是白色透明的，死细胞呈深蓝色。

9. Giemsa 染液 见实验21。

10. 秋水仙素 称取6mg，溶解于100ml 0.85%NaCl中。用时最终浓度为0.2—2μg/ml。

11. 低渗液

(1) 1份Hank's液 + 3份蒸馏水。

(2) 0.075MKCl。

12. Eagle's 液

甲液：L-精氨酸 174.2mg L-盐酸组氨酸 78mg

L-异亮氨酸 262.0mg L-亮氨酸 262.0mg

L-赖氨酸 292.3mg L-苯丙氨酸 165.2mg

L-苏氨酸 238.0mg L-色氨酸 40.8mg

L-缬氨酸 234.0mg

溶于100ml双蒸水中。

乙液：L-胱氨酸 11.0mg L-酪氨酸 18.1mg

L-蛋氨酸 7.5mg

溶于100ml双蒸水中。

丙液：L-谷酰胺 2.93g 溶于100ml双蒸水中。

丁液：盐酸硫胺素 3.4mg 核黄素 0.38mg

泛酸钙 4.8mg 维生素B₆ 1.9mg

烟酰胺 1.2mg 氯化胆碱 1.4mg

生物素 2.4mg 环己六醇 5.4mg

叶 酸 4.4mg

溶于100ml双蒸水中。

取甲液100ml, 乙液1000ml, 丁液100ml加双蒸水3700ml, 然后再加2×Hank's 溶液5000ml, 120℃下高压灭菌15分钟。待冷却后加入无菌丙液100ml, 使总量为10000ml。用无菌的5%NaHCO₃调节pH至7.0左右。

注意除丙液需要过滤灭菌外, 其余溶液均可高压灭菌, 冷却后分别贮藏在-20℃的冰箱中。

13. RPMI 1640

(1) 称取1640粉剂10.5g, 溶解于1000ml双蒸水中。

(2) 补加1%酚红1ml,

(3) 通入CO₂, 使呈桔红色, 使各种药品完全溶解。

(4) 用细菌漏斗过滤。

14. 大鼠的肝和肺细胞, 及流产胎鼠的组织。

三、实验步骤

(一) 原代培养

1. 用铁棒敲击大白鼠的头致死, 四肢钉在蜡板上。

2. 用酒精擦遍腹部, 然后用一薄层浸透70%酒精的棉花覆盖在腹部。

3. 剪开腹部表皮; 打开胸腔。

4. 剪开内皮, 取出胚胎, 去外膜, 把胚胎放在培养皿中。

5. 在无菌室用Hank's液洗胎鼠数次, 剖开胎鼠胸腹腔, 剪取肝、肺、皮肤等组织。

6. 所取的组织用Hank's液洗几次, 再用培养液洗二次。

7. 将组织剪成1~2mm大小的碎块, 再用培养液洗二次。

8. 用弯头吸管将组织块吸入小方瓶中, 并贴在瓶壁上, 组织块密度大些为宜。吸去多余的液体, 立直放在37℃温箱1~2小时, 然后加入培养液, 轻轻地使组织块浸入培养液。放37℃温箱中培养。

9. 3天后, 皮肤组织展现出细胞, 长成单层。过一周, 肝组

织伸展出细胞，长成单层。过二周，肺组织伸展出细胞，长成单层。

(二) 传代培养

1. 待原代培养的细胞贴瓶48小时后，换一次新鲜培养液。到第4天，细胞清晰，呈单层状，而且都已长满时，就可传代。

2. 倒去培养液，加入0.25%胰酶(pH7.6)，在室温中让细胞浸在酶液中3~4分钟。把瓶子竖起来，若细胞呈白色一片，而且细胞间出现针孔状时，可倒去酶液，停止消化。

3. 加入少量Hank's液，轻轻晃一下，倒去。

4. 加入5ml培养液，轻轻吹打，使细胞从瓶壁上脱下，呈均匀的单细胞。

5. 再补加培养液，一瓶传二瓶。

(三) 细胞冻存 离体细胞有一定的世代，一般繁殖到50~60代，就老化衰亡。为减轻工作量，防止细胞变异，可将细胞冻存起来。

1. 冻存细胞的培养方法与传代培养一样。待细胞长成单层，略密些，加入胰酶，待细胞间出现针孔状时，去掉胰酶，加入Hank's液进行吹打。然后收集细胞悬液，在离心管中1500rpm离心5分钟。

2. 冻液配制 Eagle's液 + 15%小牛血清 + 1%浓度为5%的碳酸氢钠，再加1%双抗液(1ml Hank液中含青霉素1万单位和链霉素1万 μ g)及10%二甲基亚砷(DMSO), pH7.0。

3. 细胞离心后去掉上清液，然后加少量冻液制成细胞悬液。计数细胞并用冻液稀释，使细胞浓度成为300~400万个/ml。

4. 用针筒将细胞悬液注入安瓿瓶，每瓶1—2ml，火焰上封口，编号。在4℃的冰箱内过夜。

5. 第二天将安瓿瓶先在液氮上面5~6cm处停留10~20分钟，然后迅速放入液氮中。

6. 复苏时将安瓿瓶自液氮中取出，立刻放在40℃的温水中，使其在1分钟内溶解。然后在无菌室打开安瓿瓶，吸取细胞悬液到培养瓶中，加入培养液培养。

(四)染色体制片

1. 传代后20小时进行细胞观察，如细胞之间有空隙，呈现为许多球状透亮的圆细胞，这时相当于生长对数期。

2. 加秋水仙素，浓度为 $0.2\sim 2\mu\text{g}/\text{ml}$ ，处理4小时。

3. 倒去培养液，加入 0.25% 胰酶($\text{pH}7.8$)，放在 37°C 温箱中消化细胞，看到细胞间有针孔状出现时倒去胰酶，用Hank液洗一次。

4. 加入低渗液(1份Hank液和3份蒸馏水)，用滴管吹打细胞，使其分散，置 37°C 温箱中低渗处理30分钟。

5. 细胞悬液中加入 $0.5\sim 1\text{ml}$ 的固定液(1份冰醋酸和3份甲醇)，吹打一下，立即 1000rpm 离心5分钟。

6. 去上清液，加入 $3\sim 4\text{ml}$ 固定液，打散细胞，固定15分钟。如此重复，固定三次。注意固定液要新鲜配制，否则影响效果。

7. 第三次固定后，离心，去上清液，加入 $0.3\sim 0.5\text{ml}$ 新鲜固定液，制成细胞悬液。

8. 制片 同实验27。

9. 用 $1:4$ Giemsa染液染色10分钟(Giemsa染液用 $\text{pH}6.8$ 磷酸缓冲液稀释)。

10. 显微镜下观察分裂相，挑选分散度好，染色清晰的图像照相，进行核型分析。

(五)G分带染色法

1. 制片后一周，将片子放在 $60\sim 65^\circ\text{C}$ 温箱中处理15分钟，若片子超过一周，要适当延长处理时间。

2. 用D Hank溶液配制 0.3% 胰酶，配好后放置 37°C 水浴中1小时， $\text{pH}7.4$ 左右。

3. 将保温过的片子放置胰酶中处理，一般组织培养细胞用 $15\sim 30$ 秒，淋巴细胞用 $60\sim 90$ 秒。

4. 取出片子，放入蒸馏水中冲洗。

5. 用 $1:4$ Giemsa液染色。

6. 镜检后，将片子放在二甲苯中透明5分钟，然后用加拿大树胶封片。

注意：染色显带与气温有很大关系。气温高，用0.15%胰酶处理，可在5秒内显带；气温低，则用0.3%胰酶在37℃水浴中处理，才可在30秒内显带。

实验30 人群中P.T.C.味盲基因频率的分析

一、实验目的

通过对人体遗传性状的分析及基因频率的计算，了解选择对改变基因频率的作用。

二、实验原理

人体对苯硫脲(PTC)尝味的能力是由一对等位基因(Tt)所决定的遗传性状，其中T对t为不完全显性。正常尝味者的基因型为TT，能尝出1/750,000~1/6,000,000的PTC溶液的苦味；具有基因Tt的人尝味能力较低，只能尝出1/480,000~1/380,000的PTC溶液的苦味；而基因型为tt的人只能尝出>1/24,000的PTC溶液的苦味，甚至对PTC的结晶物也尝不出苦味来，在遗传学上被称为味盲。

有人曾测定我国黑龙江省1050人的PTC尝味能力，其中味盲共99人，占9.43%，在所测定的人群中tt的基因频率为：

$$q^2 = \frac{99}{1050} \doteq 0.0943$$

t基因频率为

$$q = \sqrt{q^2} = \sqrt{0.0943} = 0.3070 \doteq 0.31$$

因此，T基因频率为

$$p = 1 - q = 1 - 0.31 = 0.69$$

根据群体遗传学的哈代-温伯格氏定律，如果没有其他因素

的干扰，人群中基因t的频率也将会世代相传而不发生变化。

如果我们假定，某种选择作用对隐性纯合子tt不利，使其适应值=0时(即100%被淘汰)，则基因t频率将会发生改变，如下表所示：

| 基因型 | TT | Tt | tt | 合计 |
|-------|---------------------------------|-----------------------------------|---------|-------------------|
| 初始频率 | p_0^2 | $2P_0q_0$ | q_0^2 | 1 |
| 适应值 | 1 | 1 | 0 | |
| 选择后频率 | P_0^2 | $2P_0q_0$ | 0 | $P_0^2 + 2P_0q_0$ |
| 相对频率 | $\frac{P_0^2}{P_0^2 + 2P_0q_0}$ | $\frac{2P_0q_0}{P_0^2 + 2P_0q_0}$ | 0 | 1 |

选择后基因t的频率为：

$$q_1 = \frac{1/2 \times 2P_0q_0}{P_0^2 + 2P_0q_0} = \frac{P_0q_0}{P_0(P_0 + 2q_0)} = \frac{q_0}{1 + q_0} \quad \dots\dots (1)$$

选择后基因t频率的改变量为：

$$\Delta q = q_1 - q_0 = \frac{q_0}{1 + q_0} - q_0 = \frac{-q_0^2}{1 + q_0} \quad \dots\dots (2)$$

根据(1)式可以预计，若基因型tt的个体的适应值=0，下一代群体中基因t的频率降为：

$$q_1 = q_0 / (1 + q_0) = 0.31 / (1 + 0.31) = 0.2366 \approx 0.24$$

根据(2)可计算基因t频率的改变量：

$$\Delta q = \frac{-q_0^2}{1 + q_0} = \frac{-(0.31)^2}{1 + 0.31} = -0.07$$

以上分析表明，选择的强有力的作用，它使群体的基因频率的平衡受到破坏，生物体便会产生某种方式的进化。

三、实验材料

1. PTC溶液的配制

原液：取PTC结晶1.3g，加蒸馏水1000ml，时时摇晃，在室

温(20℃左右)下1~2日即完全溶解。原液的PTC浓度约为1/750,原液稀释1倍为2号液,2号液稀释1倍为3号液,以此类推,直至配成14号液,浓度为1/6,000,000。将配好的14种PTC溶液分别置于消毒好的滴瓶中。

2.若干毫升蒸馏水及洁净滴管。

四、实验步骤

1.让受试者坐于椅子上,仰头张嘴。用滴管滴5~10滴14号液于受试者舌根部,让受试者徐徐下咽品味,然后用蒸馏水作同样的试验。

2.询问受试者能否鉴别此两种溶液的味道,若不能鉴别或鉴别不准确,则依次用13号,12号……溶液重复试验,直至能明确鉴别出PTC的苦味为止。

3.当受试者鉴别出某一号溶液时,应当再用此号溶液重复尝味三次,三次结果相同时,才是可靠的。

4.测定时应将PTC溶液与蒸馏水反复交替给受试者,以免由于受试者的猜想及其他心理作用而影响结果的准确性。

5.tt基因型的阈值范围为1~6号液,Tt基因型的阈值范围为7~10号液,TT基因型的阈值范围为11~14号液。根据测试结果,记录并统计所调查人群中的基因型。

实验报告

- 1.根据实验结果,算出味盲者tt基因型的频率。
- 2.求出基因t与基因T的频率。
- 3.假定tt基因型的适应值=0,求出选择后基因t的频率(q_1),及改变量 Δq 的值。

(孙勇如)

第四章

遗传学研究常用实验技术

第一节 常用生化技术

(一) 离心技术

1. 原理

离心分离技术是根据颗粒(如各种细胞器、蛋白质和DNA大分子等)在一个离心场中的行为发展起来的。它们被悬浮于特殊的介质中,然后装入离心管中在离心机上离心。

不同密度、大小或形状的颗粒以不同的速度在离心场中沉降。沉降的速度还决定于所使用的离心场。而离心场又决定于转头的角速度和颗粒离旋转轴的直线距离。离心场一般以重力常数 g (980厘米/秒)的倍数来表示,如下面公式所示:

$$RCF = 1.11 \times 10^{-5} (\text{转数/分})^2 r$$

RCF为相对离心场

r 为离心半径

实际应用时,可根据计算离心力的列线图而得到所需的数据。(列线图见附表)

当然,一个球心颗粒的沉降速度不仅取决于所提供的离心场,它还取决于颗粒的半径和密度,以及悬浮这些颗粒所用介质的粘度。它们之间的关系可从下面的公式看出:

$$t = \frac{9\eta}{2\omega^2 r_p^2 (\rho_p - \rho)} \ln \frac{r_b}{r_i}$$

t = 沉降所需时间(秒)

η = 悬浮介质的粘度

r_p = 颗粒的半径

ρ_p = 颗粒的密度

ρ = 介质的密度

r_i = 从旋转轴心到液体弯月面的距离

r_b = 从旋转轴到管底的距离

ω = 转子的角速度

从以上的方程式可以看出，在一定的转速下，沉降一组均匀的球形颗粒所需要的时间是与这些颗粒的半径平方 (r_p^2) 以及它们的密度与悬浮介质的密度之差成反比，而与介质的粘度成正比的。所以，我们可以利用这些性质把一个非均一的球形颗粒混合物通过离心的方法，根据它们在一个固定的离心场中完全沉降的时间，或根据它们在一个固定的离心场中经过一段时间的沉降的程度把它们分离开。

但上述公式不适用于非球形颗粒，因为质量相同但形状不同的颗粒，沉降速度是不同的。

通常，我们利用离心的方法，从组织匀浆中分离细胞器。它们的沉降顺序一般是：细胞和细胞碎片、核、叶绿体、线粒体、溶酶体、微粒体、核蛋白体等。

离心技术又可分为制备性离心和分析性离心。制备性离心是比较常用的，因此，我们将主要介绍几种制备性离心的技术及其应用实例。

2. 几种离心技术

(1) 差级离心

这种离心技术是建立在不同大小和密度的颗粒在沉降速度方面存在着差异的基础上的。应用差级离心从组织匀浆中分离细胞器是一种最常用的方法。在分离那些在大小和密度上有显著差别

的细胞器时，这种方法最为简便和适用。样品（如组织匀浆）通过一个逐渐增加（或者分步）的离心场就可以分成很多组分。每一步的离心场应选择能使某一种特殊类型的物质在预定的离心时间内沉降，这样我们就能得到一个沉淀。将这种沉淀反复悬浮和离心2至3次就可以得到一个相当纯的组分。

(2) 分级区带离心(密度梯度离心)

使用差级离心时，分离得的组分并不是绝对均一的。为了获得更加纯一的组分可利用连续的或不连续的液体密度梯度来代替均匀的悬浮介质。这种分离方法利用了细胞器在密度上的差别，因而效果更好。这种方法的关键是要将离心的时间掌握在足以使各种颗粒在梯度中移动并形成不连续的区带，但颗粒又尚未完全沉降之前。密度梯度技术可防止区带因对流而造成混合，因而分离效果更佳。本方法可用于RNA—DNA混合物、核蛋白亚单位和其它细胞成份的分离。

(3) 等密度离心

等密度分离既可用密度梯度，也可以不用密度梯度。不用密度梯度时，先可用较重颗粒的沉降速度离心分离并除去样品中的较重颗粒。再把样品中的所需颗粒悬浮在与被分离的部分有相等密度的介质中，离心至所需物质沉降为止，而密度低于所需物质的颗粒则漂浮于弯月面处。如采用密度梯度，则此梯度需包括所要分离颗粒的密度范围。离心时，把样品铺放在密度梯度顶部，离心到颗粒的漂浮密度与梯度的密度相等时，颗粒才会出现沉降并排列成带。这种沉降只取决于能使颗粒浮起的密度，而与颗粒的大小与形状无关。使用这种技术时，线粒体、溶酶体和微粒体分别排列于42%、47%、27%的蔗糖梯度中。

(4) 平衡等密度离心

这种技术一般使用重金属盐（如氯化铯）来制备梯度，但也可以用蔗糖。把样品（如DNA）和氯化铯的浓溶液均匀混合。将此浓溶液离心就可产生氯化铯的连续密度梯度，其中DNA分子进行重分配，在离心力的作用下它们迁移到一定的区域中，在此

区域中，溶液的密度等于DNA分子本身的漂浮密度。在纯化叶绿体和线粒体DNA时，常用此法。

(5) 梯度的制备

制备液体密度梯度最常用的介质是蔗糖溶液，它可用缓冲液或非缓冲液配制。需要高密度和低渗透压的梯度时，可以用Ficoll代替蔗糖，它的优点是不会渗入细胞膜。

梯度可分为连续的和连续的。不连续梯度的制备法为先配制各种不同浓度的介质溶液(如蔗糖溶液)，用移液管把溶液一层覆盖一层铺到离心管中。连续梯度的制备则通常利用梯度仪。梯度仪是由二个具有相同半径的圆柱腔组成，通常用有机玻璃制作。它们的底部通过一有控制阀的玻璃管而内部连接。将有较高密度溶液的圆柱腔称之为混合腔，内有一个搅拌器，并有一个出口可通向离心管。另一圆柱腔盛有密度较低的溶液。开始时，将二个腔的溶液高度调节到具有相等的静力压，打开混合腔的出口使其流入离心管，同时打开控制阀，这时较低密度的溶液就不停地补充到混合腔。混合腔中的溶液由于不停地搅拌而保持均匀，密度也随之下降。从而在离心管中形成一个连续的线性梯度。

(6) 从离心管中取出梯度溶液

常用的方法是把离心管底部用一根细的空心针刺穿。梯度溶液不断地从针管滴出，用部分收集器收集并作进一步的分析。

另一种方法是用带有长针头的注射器，小心地把所需梯度溶液吸出再做进一步分析。

此外，还有一种取代法，即把一种很稠密的介质，如60—70%的蔗糖溶液慢慢地注入离心管的底部。梯度溶液就从上面被取代出来，然后用一个注射器或移液管逐个移出各部分而分析之。

3. 应用实例

(1) 水稻线粒体(mt)DNA的提取和纯化

生物的线粒体是细胞的一种重要细胞器。它具有自身的DNA，编码着一些蛋白质，因而影响生物的某些代谢活动。近年来有关植物雄性不育的研究表明，不育基因可能在mtDNA上，因

此，详细地介绍mtDNA的提取和纯化是十分有意义的。

①材料准备

100g水稻种子，用1%升汞表面灭菌15分钟后，流水冲洗4小时。在暗处，28℃下发芽，10—15天后剪取黄化苗100g，蒸馏水洗二次，无菌水洗二次，用干净纱布包好，放入液氮中过夜。

②试剂配制

A液：0.5M蔗糖 50mMTris—HCl缓冲液
5mMEDTA 3mM巯基乙醇 pH7.5

B液：0.3M蔗糖 50mMTris—HCl缓冲液 pH7.5

C液：B液 + 60mMMgCl₂ 50μg/ml DNaseI

D液：0.6M蔗糖 20mMEDTA 10mMTris—HCl pH7.5

裂解液：10mMTris—HCl pH7.8 5mMEDTA

饱和酚：用Tris使重蒸酚饱和，加入0.1%8-羟基喹啉。

TAE液：40mMTris-醋酸，2mMEDTA，pH7.5

③试验步骤

a. 从液氮中取出材料，待液氮蒸发后，加入300mlA液，在组织捣碎机中匀浆，低速5秒，高速5秒，再重复一次。匀浆液用六层纱布过滤。滤渣再加100—150mlA液悬浮后，再次高速5秒匀浆，过滤后将两次滤液混合。

b. 滤液用1500g离心10分钟，去沉淀，上清液用10,000g，离心20分钟。用25mlB液悬浮沉淀（即成线粒体悬浮液）。

c. 悬浮液用1,000g，离心10分钟，去沉淀。上清液加入5mlC液在4℃下保温1小时以去掉mt外的核DNA污染。

d. 洗去DNA酶：先在离心管中加入6mlD液，然后再加入酶处理后的悬浮液，12,000g，离心20分钟。沉淀用30mlD液悬浮，15000g，离心15分钟，再一次洗去DNA酶。

e. 裂解：将上述沉淀（mt），加入2—3倍体积的含蛋白酶1mg/ml的裂解液，在37℃下保温1—2小时。加入SDS使终浓度达到0.5%，在37℃下再保温3小时以上。

f. 抽提（去蛋白）：加入等体积的饱和酚，小心摇动，使其乳

化, 7000g, 离心5分钟。

将上清液再加入等体积的饱和酚:氯仿(1:1)乳化5分钟, 7000g, 离心5分钟。

将所得上清液加入等体积的饱和酚:异戊醇(24:1), 乳化5分钟, 7000g, 离心5分钟。

最后, 将上清液加入等体积的水饱和乙醚, 乳化5分钟, 7000g, 离心5分钟。如此重复二次。吸去上部的乙醚, 将下部液体, 放置在65℃下, 蒸发10分钟以除掉乙醚。

g. 酒精沉淀: 加入 $\frac{1}{10}$ 体积的3M 乙酸钠, 再加入2倍体积的-25℃ 95%乙醇, 置于-25℃冰箱中过夜以沉淀DNA。

h. 离心收集DNA: 8000g, 离心10分钟收集沉淀。再加入70%乙醇, 置于4℃15分钟, 然后离心收集DNA, 8,000g, 10分钟。即可在冰冻干燥器内干燥几分钟后, 溶于TE, SSC或水中, 以便进行下一步工作。用上述方法可从1g材料中获得1μgmtDNA。

(2) 氯化铯密度梯度离心纯化植物DNA

植物来源的DNA制品, 虽经苯酚、氯仿抽提, 常还残留一些RNA、蛋白质和色素, 这些杂质的存在会影响以后的内切酶消化。利用氯化铯密度梯度离心, 可以使DNA粗制品进一步纯化。在离心过程中, 由于离心力场的作用, 氯化铯溶液形成一种密度梯度, 当沉降平衡时, 所欲分离的DNA即分布在与其等密度的区带内。

氯化铯密度梯度超速离心分离核酸时, 溶液中要加入EB(溴化乙锭)。EB能专一地与双链核酸结合, 但它与不同构型核酸的结合数却不相同。与共价闭合环状DNA的结合数为0.11—0.13, 与线形DNA的结合数是0.2。在高浓度氯化铯溶液中, 当EB过量的情况下, EB-DNA混合物的浮力密度有所改变, 改变的大小与EB结合量成反比。因此, 用氯化铯密度梯度超速离心法, 即可分离双链DNA与单链RNA, 又可分离共价闭合环状DNA与带缺口的环状DNA。另外, EB-DNA络合物在紫外光下能产生荧光, 便于

检测。具体操作如下：

①将植物DNA的粗制品溶解于10mlTE缓冲液中（即10mM Tris-HClpH8.0, 1mMEDTA）。

②每毫升上述的DNA溶液中加入1g固体的CsCl，最终的密度为1.55g/ml。用蜡膜封口，小心倒转离心管使CsCl溶解。

③加0.8mlEB(10mg/ml)到离心管中，混合均匀。

④用液体石蜡油灌满离心管。

⑤细心平衡，封口。

⑥用超速离心机，40,000g离心44小时。

⑦取出离心管，在紫外灯下即可观察到明显的DNA区带。

⑧用注射器将DNA带收集转移到小试管中，加等体积正丁醇，振荡2分钟，吸去上层有色液。再加入等体积正丁醇，如此反复三次以去掉EB。

⑨将去掉EB的DNA溶液置于透析袋中，在TE溶液（10mM Tris-HClpH8.0, 1mMEDTA）中透析24小时，每隔6—8小时更换一次透析液。

通过以上的步骤即可得到纯化的植物DNA。

（二）电泳技术

1. 原理

带电的颗粒在电场中，向着与其电荷相反的电极移动，称为电泳(electrophoresis)。很多生物学上有重要意义的分子，如氨基酸、多肽、蛋白质和核酸，因具有可电离的基团，因此，在溶液中能够形成带电荷的阴离子(-)或阳离子(+)。而具有相同电荷的分子，由于它们在分子量上的区别而有不同的荷质比。这些差异的存在，足以使得溶液中的离子在电场中有不同的迁移率，这就是电泳的原理。

带电化合物在电场中的泳动速度大小，用迁移率(或泳动度)来表示。迁移率的定义为带电质点在单位电场强度下的泳动速度。

$$m = \frac{v}{E} = \frac{d/t}{V/l} = \frac{dl}{Vt} \quad (\text{厘米}^2/\text{伏特} \cdot \text{秒})$$

m 为迁移率(厘米²/伏特·秒); v 为颗粒的泳动速度(厘米/秒); E 为电场强度(伏特/厘米); d 为颗粒泳动距离(厘米); l 为支持介质的有效长度(厘米); V 为实际电压; t 为通常时间。

迁移率首先取决于带电质点(颗粒)的性质,即质点所带净电荷的量,质点的大小和质点的形状。一般来说,质点所带净电荷越多,直径越小,越近于球形,它在电场中的泳动速度就越快,反之则越慢。

除了带电质点本身的固有特性以外,迁移率还受电场强度、溶液的pH值、溶液的离子强度和电渗现象所左右。

电场强度是指每1厘米的电压降,它对泳动速度起着十分重要的作用。显而易见,电场强度越高,带电质点移动速度越快。根据电场强度的大小,可将电泳分为常压(100—500伏)和高压(500—1000伏)电泳。常压电泳的电场强度一般为2—10伏特/厘米,电泳分离所需的时间较长(需要几小时到几天);高压电泳的电场强度为20—200伏/厘米,电泳分离的时间比较短,有时仅需几分钟就能完成。常压电泳多用于分离蛋白质等大分子物质,而高压电泳则常用于分离小肽、氨基酸、核苷酸等小分子物质。

溶液的pH值决定着带电质点解离的程度,也决定它们所带净电荷的多少。对于蛋白质、氨基酸等两性电解质而言,pH值距其等电点越远时,它们所带的净电荷就越多,泳动的速度也越快,反之,则越慢。为使溶液的pH值保持恒定,应使用缓冲溶液。

溶液的离子强度

离子强度系指溶液中所有类型的离子所产生的静电力,也就是全部的离子效应,它取决于离子电荷的总数。溶液的离子强度越高,带电质点的泳动速度越慢;离子强度越低,质点泳动的速度越快。一般最适合的离子强度在0.02—0.2之间。

电渗现象

电渗现象系指液体在电场中对固体支持物的相对移动。如在

纸电泳时，由于纸上带有负电荷，而与纸接触的水溶液因静电感应带有正电荷，在电场的作用下溶液便连带着质点同时都向负极移动，因而对迁移率有一定影响。所以，电泳时应尽量避免使用具有高电渗作用的支持物。

2. 几种常用的电泳技术

(1) 纸电泳

纸电泳是最简单的，也是最广泛使用的一种电泳技术。它以滤纸作为支持物。整个装置包括两部分：电泳仪和电泳槽。电泳仪能输出稳定电压和稳定电流的直流电。低压电泳仪的电压为100—500伏特，电流为0—150毫安。高压电泳仪的电压为500—10,000伏特，电流为50—400毫安。电泳槽则包括电极、缓冲液槽、介质（滤纸）的支持物和防蒸发的透明罩子。电泳前先用缓冲液把滤纸饱和，然后小心地把样品点在滤纸的恰当位置，接通电源开始电泳。一般分离蛋白质用低压电泳时，1—2小时可结束，高压电泳则在1小时内结束。

(2) 醋酸纤维素电泳

由于滤纸有一定的吸附作用和电渗现象，所以分辨力不够理想。高纯度的醋酸纤维素可以制成薄而均匀的纸带并用作电泳的支持介质。它对样品的吸附非常小。因此，对于小量的样品，甚至对于大分子都能得到很高的分辨率。同时，由于醋酸纤维素的亲水性比纸小，它所容纳的缓冲液也较少，因而电流的大部分由样品传导，所以分离很快。但使用时要注意防止由于蒸发而使纸条干涸。

(3) 薄层电泳

以硅胶、硅藻土、氧化铝或纤维素为原料在玻璃板上制成薄层，以其为支持介质进行电泳时，称之为薄层电泳。薄层电泳很迅速，并且有很好的分辨率和很高的灵敏度。它还可以进行双向分离，先在一个方向上进行电泳，然后在另一个方向上进行层析。这样就为分析核苷酸和氨基酸提供了一个很有价值的手段。

薄层的厚度一般为 $250\mu\text{m}$ (0.25mm)。

(4) 琼脂糖(agarose)凝胶电泳

以凝胶为支持物,首先广泛地用于电泳的是琼脂电泳。琼脂(agar)的主要成份是琼脂糖和琼脂胶,因为琼脂胶是一种含有硫酸根和羟基的多糖,这些基团带有电荷,能产生较强的电渗现象,因而会影响电泳分离的效果。此外,硫酸根又能与某些蛋白质相互作用,使电泳速度受到较大影响。因此,目前已应用琼脂糖代替琼脂作为电泳的支持介质。

琼脂糖凝胶电泳的操作方法简便,电泳速度快,分析的样品可不必事先经过处理。琼脂糖凝胶结构均匀,液体含量大(占98—99%),在这种凝胶中电泳,近似自由界面电泳,但样品扩散又比自由界面电泳小。它对蛋白质吸附极微,电泳图谱清晰,分辨率高,重复性好。琼脂糖透明而不吸附紫外光,因此,可以直接利用紫外光吸收法做定量测定。电泳所得的区带易染色,样品也易洗脱,又可制成干板长期保存。它与免疫化学反应相结合而发展成的免疫电泳技术,能用于鉴别其它方法所不能鉴别的复杂体系。琼脂糖凝胶电泳一般采用平板式。

(5) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体(简称为ACr)与交联剂N、N'-甲叉双丙烯酰胺(BiS)在催化剂的作用下聚合成含有酰胺基侧链的脂肪族长链。相邻的两个链通过甲叉桥交联起来形成了三维网状结构。聚丙烯酰胺凝胶电泳具有电泳和分子筛的双重作用。它可根据被分离物质所带的电荷多少、分子大小和形状的不同,在电场下产生不同移动速度而把它们分离开。

(6) 等电点聚焦电泳

在自由溶液中,离子和溶液之间的摩擦力最小,故离子能迅速地迁移。由于相同分子的电荷特性十分相似,因此,它们移动时紧密地形成一条带,与电泳迁移率不同的物质之间形成了界面。这种技术称作自由界面电泳。等电聚焦电泳就是建立在自由界面电泳基础上的一种区别于区带电泳的技术。

在制备聚丙烯酰胺凝胶时,加入一定pH范围的两性电解质,

在电场作用下，就形成了一个pH的连续梯度。两性物质（如氨基酸和多肽）在这样一个有pH和电泳梯度的垂直柱或水平板中进行分离时，每一种化合物移向与其等电点相一致的pH位置，并在那里不再移动。

等电聚焦对于进一步分离、纯化，和鉴别蛋白质是十分有用的，它能得到很高的分辨率。因为在等电点只要有0.02pH单位的差别就足够被分离开。本方法尤其适用于蛋白质的微量分析，分离时间也短，一般只需1—3小时即可完成。

还有一些与上述电泳技术有关或与其它生化技术相结合的电泳技术，如SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳，免疫电泳、双向电泳等，这里就不一一介绍了。

电泳结束后，还要经过一系列的处理才能鉴别被分离物质。如蛋白质要用考马斯亮蓝染色；各种不同的同工酶有各自不同的染色液；而核酸则要用溴化乙锭处理后，在紫外灯的照射下才能检测，这些方法将在电泳技术实例中作简单介绍。

电泳技术不仅可用来分析、鉴定一些物质，而且还可以分离较大量的物质，并在分离后进行回收，这种电泳又可称之为制备电泳。如制备一些比较纯的线粒体DNA等。这种电泳在基因工程的研究中也很重要，经过限制性内切酶处理的DNA片段要用电泳方法把它们分离开。回收这些片段后，进一步做成分子克隆并构建基因文库。为基因重组做准备。因此，在遗传学的研究中，它是一种很重要的技术。

3. 电泳技术应用实例

(1) 血清蛋白质的纸上电泳

① 样品和试剂的准备

血清：按常规方法制备血清样品；

缓冲液：硼酸缓冲液（离子强度0.05，pH9.0）：称取7.63g四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)和0.62g硼酸，用水溶解后，定容至1000ml；

溴酚蓝染色液：将33g氯化高汞溶于95%乙醇中，稀释到100

ml, 再把1g溴酚蓝溶于上述用氯化高汞饱和的95%乙醇中。

②滤纸的准备

用锋利的刀片将Whatman No. 1号滤纸或新华滤纸, 裁成28cm长, 3cm宽的滤纸条, 在滤纸的两端用铅笔写成正负标记。

③点样

位置和形状, 对于未知样品, 点样的位置应选在滤纸条的中央, 以观察区带向两极泳动的情况, 进而选出合适的点样位置。如实验样品为血清, 则将样品点在负极一侧距中线3cm处。

样品可点成长条形, 这样分离的效果较好。样品量少时, 可点成圆点, 这样由于样品集中, 便于显色。

点样量一般以5 μ l为宜。可用湿点法或干点法。湿点法就是点样前先把滤纸用缓冲液湿润, 再用点样管点样。干点法则是先点样, 可以点几次, 每一次要待前一次的样品晾干或用吹风机(切记要用冷风)吹干后再点, 点完样后, 再用缓冲液湿润滤纸准备电泳。

④电泳

将滤纸放入电泳槽, 标有正号的一端放在正极槽内, 另一端则放在负极槽内。滤纸要拉平, 整个滤纸条要平展。把玻璃盖盖好, 打开电源开关, 调整电压到250V, 4—5小时电泳结束。

⑤烘干与染色

电泳结束后, 记下实际电泳的滤纸长度(以滤纸与缓冲液的交界处测量)。把滤纸放在105 $^{\circ}$ C烘箱中15分钟, 烘干滤纸。然后, 把滤纸浸入氯化高汞饱和的1%溴酚蓝乙醇溶液中染色10分钟。

⑥洗涤和分析

将染色后的滤纸用0.5%乙酸洗涤三次, 每次用200ml, 浸泡10分钟, 以洗去吸附在滤纸上的颜色。有蛋白存在的部分即出现有蓝绿色的区带, 根据颜色的深浅可判断蛋白含量的多少。精确的含量则可将各区带的蛋白洗脱下来。再用比色法测定, 或用自动扫描光密度仪来直接测定。各种蛋白的迁移率可以根据滤纸的长度, 电流的电压, 时间和各种蛋白泳动的距离分别计算出来。

(2) DNA的琼脂糖凝胶电泳

DNA分子在碱性环境中带负电荷，在电场作用下向正极移动。不同的DNA片段由于其电荷，分子量和构型各异，迁移率也各不相同，从而可以区分出不同的区带。当它们用溴化乙锭染色后，在紫外光下DNA显红色。

①样品与试剂准备

样品：mtDNA

试剂：Tris—硼酸缓冲液 89mMTris, 89mM硼酸, 2.5mMEDTA, pH8.3。

溴化乙锭(EB)染色液：用蒸馏水配制成 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液(先配成母液 $1\text{mg}/\text{ml}$ ，在 4°C 保存，使用时稀释1,000倍)。

溴酚蓝液(0.05%溴酚蓝——50%甘油溶液)；先配制0.1%溴酚蓝水溶液，然后加等体积的甘油即可。

②琼脂糖凝胶板的制作：

采用卧式电泳槽，水平板。先把凹形有机玻璃板的两边用胶布封住，置于水平面。配0.8%浓度的琼脂糖胶液(取0.8g琼脂糖，加入100ml电泳缓冲液，煮沸，使琼脂糖全部融化)。倒入凹形有机玻璃槽，使其成2mm左右的凝胶板。在其未凝固前将样品槽模板迅速垂直插入胶板的负极一侧，待全部凝固后，取出样品槽模板，并去掉两边的胶布，将琼脂板与凹形板一起放入卧式电泳槽中，将有样品槽的一边置于负极一侧，两边槽内倒入电泳液(即缓冲液)，使琼脂糖能完全接触电泳液，电泳液以没过琼脂板为好。

③加样：把样品与溴酚蓝液按4:1的比例混合，用微量注射器把样品加到样品槽中，点样量为5—10 μl 。

④电泳：电泳开始时，可用较高的电压，如100伏特。这样可使样品很快进入胶内，而减少样品的扩散。待样品进入胶内，即可保持在每厘米5伏特左右的电压降情况下电泳。

当溴酚蓝的区带移至距凝胶底部1—2cm时，断电并停止电泳。当胶板为10—15cm的长度时，电泳时间一般为2小时左右。

⑤染色和观察：电泳结束后，将凝胶浸入溴化乙锭溶液中染

色，半小时后取出凝胶，并用水洗去胶面的溴化乙锭溶液，于254 nm波长的紫外灯下观察。有DNA存在的地方呈现橙红色的荧光条带。记录电泳图谱可采用照相方法，照相机可加上近摄镜片和橙红色滤色镜头拍摄。

注意事项：溴化乙锭是一种DNA诱变剂，配制和使用时要戴上手套，勿使溴化乙锭沾上皮肤。

(3) SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量

SDS是阴离子去污剂十二烷基硫酸钠的简称。SDS和巯基乙醇加入到蛋白质溶液后，巯基乙醇能使蛋白质分子中的二硫键还原；SDS则能使蛋白质的氢键、疏水键打开，并结合到蛋白质分子上，形成蛋白质-SDS复合物。在一定条件下，SDS与大多数蛋白质的结合比为1.4克SDS/1克蛋白质。由于十二烷基硫酸根带负电，使各种蛋白质的SDS复合物都带上相同密度的负电荷，它的量大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，因而掩盖了不同种类蛋白质原有的电荷差别。

蛋白质与SDS结合后，还引起了蛋白质构象的改变。它们在水溶液中的形状，近似于雪茄烟形的长椭圆棒，不同蛋白质的SDS复合物的短轴长度都一样，约为18 Å，而长轴则随蛋白质的分子量成正比的变化。在这种情况下，蛋白质的电泳迁移率主要取决于它的分子量，而与所带电荷和形状无关。在一定条件下，蛋白质的分子量与电泳迁移率的关系，可用下列公式表示：

$$MW = K(10^{-bm})$$

$$\lg MW = \lg K - bm = K_1 - bm$$

MW为分子量；K， K_1 为常数；b为斜率；m为迁移率。

因此，要测定某个蛋白质的分子量，只需将它和一系列已知分子量的蛋白质在SDS—凝胶电泳时的迁移率进行比较就可以了。一般以同一次电泳中，标准蛋白质的相对迁移率（蛋白质的电泳迁移距离除以染料迁移距离）与分子量对数画出标准曲线，根据所测蛋白样品的相对迁移率即可在标准曲线中查出对应的分子量。

① 样品制备

将蛋白质溶解于样品溶解液中（见试剂配制）。在100℃水浴中加热2—5分钟。样品浓度可在0.05~1mg/l之间。样品溶液浓度太稀时要浓缩，含盐量高则要先行透析。

标准蛋白样品的制备：称取细胞色素C、胰凝乳蛋白酶元A、胃蛋白酶、卵清蛋白、牛血清白蛋白各0.2mg左右，混合一起，按每0.5mg蛋白质加1ml样品溶解液的比例，将其溶解于样品溶解液中，然后在沸水中加热3分钟，冷至室温时用。

待测样品的制备：待测样品如为固体，则和标准蛋白质样品作同样处理。如为液体则用2倍浓度的样品溶解液与其等体积混合，在沸水中加热3分钟，冷至室温待用。

② 试剂配制

0.2M pH7.2磷酸盐缓冲液：取280ml 0.2M磷酸二氢钠溶液，加入720ml 0.2M磷酸氢二钠溶液，混匀后调至pH7.2。用此溶液进一步配制凝胶缓冲液，电极缓冲液和样品溶解液。

样品溶解液：0.01M pH7.2磷酸缓冲液，内含1%SDS，1%巯基乙醇，10%甘油及0.02%溴酚蓝。

电极缓冲液即0.1%SDS，0.1M pH7.2磷酸盐缓冲液：取1g SDS，加入500ml 0.2M，pH7.2的磷酸盐缓冲液，用蒸馏水定容至1000ml。

染色液：0.25g考马斯亮蓝R-250，加入454ml50%甲醇水溶液和46ml冰乙酸。

脱色液：75ml冰乙酸，875ml蒸馏水与50ml甲醇混合。

③ 贮液及凝胶的配制

贮液的配制

a. 凝胶贮液 { ArC 30g
 { Bis 0.8g
 { 加蒸馏水至100ml

b. 凝胶缓冲液 { SDS 0.2g
 { 加0.2M pH7.2磷酸盐缓冲液至100ml

c. 1% TEMED { TEMED 1ml
加蒸馏水至100ml

d. 10% 过硫酸铵: 过硫酸铵1g溶于10ml蒸馏水

Arc: 丙烯酰胺

Bis: 甲叉双丙烯酰胺

TEMED: N,N,N',N'-四甲基乙二胺

10% 过硫酸铵必须二周新配一次

以上贮液配制好后, 放置冰箱内备用。

每20ml凝胶溶液的混合比:

| | 5% 凝胶 | 10% 凝胶 |
|-------|---------|---------|
| 贮液(1) | 3.33ml | 6.67ml |
| 贮液(2) | 10.00ml | 10.00ml |
| 贮液(3) | 2.00ml | 2.00ml |
| 蒸馏水 | 4.57ml | 1.23ml |

以上溶液混匀后放入抽滤三角瓶中抽气10分钟, 以防止凝胶中出现气泡而影响电泳。上述溶液抽气后加入0.1ml过硫酸铵, 立即制板或装柱。

④ 本试验采用圆盘电泳, 垂直柱型。操作步骤如下:

将凝胶玻璃管插入电泳槽上槽底部的圆孔中, 使其垂直。玻璃管底部套上小玻璃塞, 套前在小玻璃塞的表面可均匀地涂上一薄层50%甘油。上述准备工作应在凝胶液加过硫酸铵之前完成。将已加过硫酸铵的10%凝胶液用细滴管加入凝胶玻璃管中, 注意使各个管的凝胶高度一致。加完凝胶液以后, 立即用带有细针头的注射器沿管壁缓慢地注入3—4mm高的蒸馏水, 目的在于将凝胶面用水压平。20分钟左右可出现明显的水胶界面, 再过20—30分钟后即可将蒸馏水吸出并加样。

待测的蛋白样品在加样前要进行处理。一般是将蛋白样品溶于1%SDS、1%的巯基乙醇、0.01M的磷酸缓冲液(pH7.2)等中。将蛋白质的最后浓度调整到每毫升含0.05mg至1mg。将样品溶液与2倍浓度的样品溶解液等量混合后在沸水中加热3—5分钟, 冷

却后即可加样。直径为6mm的凝胶柱，每管加10 μ g蛋白即可得到清晰的区条。

为了测定样品蛋白的分子量，以标准蛋白质作对照。将标准蛋白与待测样品进行相同的处理，冷却后加样。

待测样品与标准蛋白质样品制备好了以后，即可将圆盘电泳全部装配好。首先轻轻取下凝胶管底部的小玻璃塞。将玻管垂直装置在电泳槽上，将电极液注入下槽，将上槽轻轻放下，如凝胶管底部有气泡，要用带弯针头管的注射器将气泡吸出，再将电极缓冲液注入上槽并没过管口。

用微量注射器向凝胶管中小心加样。每管一种样品，根据样品浓度来确定加样量，加样体积可由10 μ l至150 μ l。

加样完毕后，打开直流稳压电源（负极接上槽，正极接下槽），将电流强度稳定在每管8毫安，待溴酚蓝迁移到距下口1cm左右处，停止电泳，电泳时间大约为5小时。

小心地取出凝胶，按编号放入试管中，加入染色液，染色4—5小时后，倾出染色液，将凝胶先用蒸馏水洗几次，再用脱色液脱色，几小时换一次脱色液，脱色到背景清晰、区带清楚为止。

最后的步骤是计算分子量，用标准蛋白质分子量的对数对相对迁移率做图，画出标准曲线。根据待测样品的相对迁移率，可从标准曲线图上查出其分子量。

附标准蛋白质及其分子量：

| | |
|----------|--------|
| 细胞色素C | 12,500 |
| 胰凝乳蛋白酶元A | 25,000 |
| 胃蛋白酶 | 35,000 |
| 卵清蛋白 | 43,000 |
| 牛血清白蛋白 | 67,000 |

（三）层析技术

1. 原理

在遗传学的研究中，常常需要从一个混合物中分离和纯化出

一种或几种化合物。要进行这样的分离和纯化，通常可采用层析技术。它是利用混合物中的各种物质在互不相容的两个相中分配的不同而把它们分离开。这两个相中一个是固定不动的称为固定相，另一个是可以移动（流动）的称为移动相。如在固相—液相系统中，固相为固定相，液相为移动相。分配系数的概念是层析法的基本原理。“分配系数”这个术语通常被用来叙述一种化合物在互不相溶的两个相中被分配的状况。当一个化合物在两个特定的溶剂中分配时，可用下列公式表示：

$$\frac{\text{在溶剂 A 中的浓度}}{\text{在溶剂 B 中的浓度}} = \text{常数}$$

这个公式也可以用来描述在两个相中的分配。对于层析来说，分配系数可以定义为移动相中的浓度除以固定相中的浓度。

“有效分配系数”的定义是物质在一个相的总量除以在另一相中的总量。实际上是分配系数乘以两个相的体积比。

由于移动相不停地通过固定相，混合物中的各种物质根据各自的分配系数，一次又一次地在两个相中平衡，从而使其集中于固定相的一定位置上。在这个位置上，又由于各种物质的分配系数各不相同，集中的位置也就各异，因而可以将它们分离开来。

2. 层析的分类

根据各种层析的特点和性质，可以将层析分为以下几种：吸附层析；分配层析；逆流分溶；离子交换层析；气—液层析；通透层析和亲和层析等。一般常用的是吸附层析，分配层析，离子交换层析，通透层析和亲和层析。下面对几种常用层析的特点进行简单介绍。

(1) 吸附层析：

吸附层析固定相的表面具有吸附分子的特性，这种吸附常为特异性的，以致于可以从一个混合物中选择性地吸附某一种溶质。根据混合物中各种成分，被吸附剂所吸附的程度不同以及它们在溶剂中的溶解度差异就可以把它们分离开了。吸附层析又可以分为柱吸附层析和薄层层析，前者适用于较大量的分离，而后者特

别适用于分离很少量的物质。

(2) 分配层析

这种技术的原理是以一种化合物在两种液相中进行分配为基础的。一些分配层析的支持物可以吸附水。这时水被看成是一种溶剂，是固定相。而另一种不含水的溶剂（如有机溶剂）为移动相，待分离的溶质分子将按照它们的分配系数的比率在两个相之间进行分配，溶质在移动相中的溶解度越大，这种物质在支持物上移动的越远。溶解度越小，移动的距离就越小。以纸片做为支持物的称为纸层析。纸层析不但可以进行单方向分离，还可以移动 90° 进行双向分离，这样效果更佳。把支持物如纤维素，硅胶，淀粉装入玻璃柱中，再进行分配层析的称为分配柱层析。

(3) 离子交换层析

很多生物物质，如氨基酸和蛋白质，具有能够离子化的基团。它们可带净正电荷或净负电荷。根据这一特点可将这些化合物的混合物进行分离。

离子的分离是在装有离子交换剂（树脂）的柱中进行的。离子交换剂分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。阳离子交换树脂上有负电荷基团，它们能吸引带正电荷的分子。阴离子交换树脂具有带正电荷的基团，它们只能吸引带负电荷的分子。

树脂装柱后需用碱（阴离子交换剂）或酸（阳离子交换剂）平衡，然后把需分离的化合物铺在柱上，离子化基团将逐步取代树脂上的正或负离子。随着含有离子化化合物的缓冲液不断从柱上流过，这种交换反复地进行。当pH、离子强度、缓冲液过柱的流速以及温度条件等都合适时，这种离子化的化合物就可以以一条很窄的带被结合在树脂上。

为了把这种化合物从柱上洗脱下来，可以改变缓冲液的pH，也可增加离子强度；或pH和离子强度不变，但采用比这种化合物离子交换材料的亲和力更大的离子。

(4) 通透层析

通透层析的原理是利用各种多孔材料的分子筛特性，按照分

子的大小和形状对分子进行分离。最常用的材料是一组聚合的有机化合物，它们具有立体的孔型网状结构，以致它们具有凝胶的特性。多孔的玻璃珠也可用来做通透层析的分子筛。凝胶颗粒或多孔玻璃珠的柱与相应的溶剂处于平衡状态。完全被排阻在孔外的大分子将从颗粒间隙的空间通过，而较小的分子在分子筛的外部 and 内部溶剂中进行分配，因此以一个较慢的速度通过柱。

通透层析常用的材料包括：交联葡聚糖 (Sephadex)，琼脂糖 (Sephacrose)，聚丙烯酰胺，聚苯乙烯、多孔玻璃珠 (Bio-Glas)、多孔硅胶 (Porasil) 等。

各种型号的葡聚糖都有一定的分离范围，(见表13)

表13 Sephadex凝胶的特性

| 型 号 | 分级分离范围 (道尔顿) | 吸 水 值 (克水/克干胶) | 床 体 积 (毫升/克干胶) |
|--------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| G-10 G-15 | 达700 达1500 | 1.0 1.5 | 2 3 |
| G-25 | 100—5000 1,000—5,000 | 2.5 | 5 |
| G-50 | 500—10,000 1,500—30,000 | 5.0 | 10 |
| G-75 | 1,000—50,000 3,000—80,000 | 7.5 | 12—15 |
| G-100 | 1,000—100,000 4,000—150,000 | 1.0 | 15—20 |
| G-150 | 1,000—150,000 5,000—300,000 | 1.5 | 20—30 |
| G-200 | 1,000—200,000 5,000—600,000 | 20 | 30—40 |

注：1. 对任意卷曲的多糖测得的结果。

2. 对多肽和球蛋白测得的结果。

各种型号Sephacrose凝胶的排阻值也不同。Sephacrose凝胶可以用来分离分子量为几百万的分子和颗粒(表14)。

表14

Sephacrose凝胶的特性

| 型 号 | 近似的琼脂糖浓度 (%) | 近似的排阻极限(道尔顿) | |
|---------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | 多 糖 | 蛋 白 质 |
| Sephacrose 2B | 2 | 20×10^6 | 40×10^6 |
| Sephacrose 4B | 4 | 5×10^6 | 20×10^6 |
| Sephacrose 6B | 6 | 1×10^6 | 4×10^6 |

以多孔玻璃珠为层析材料时，它们和凝胶有相同的作用，但还具备如下一些特有的优点：

除了对强碱和氟化氢外，它们对所有的化学物质都是惰性的；它们的排阻极限很窄，因而分辨率和产率都较高；

因不需要膨胀，柱的制备较容易；

不会被压缩，所以溶剂流速可以很高；

溶剂系统和它的离子强度不会影响孔的大小；

易于清洗和消毒等。

通透层析可用于生物大分子如病毒、蛋白质、酶、激素、抗体、核酸和多糖等的纯化，此外还可用于脱盐、溶液的浓缩和分子量的测定等。

(5) 亲和层析：

这种技术主要用于蛋白质的纯化。它利用了生物大分子最独特的特性，即生物学特异性来进行纯化。从理论上讲，它比通透层析、电泳等纯化效果更好。

生物反应中存在着很多的性质各异的酶，它们也是蛋白质，根据它的立体结构，只有很少数的化合物（配位体）能达到它的活性位置和调节位置。这些化合物可能是酶反应的底物或是一种可逆的或不可逆型的效应物。它们能特异地识别活性位置或调节位置，此乃酶亲和层析的基础。这种技术通过一种方式把配位体（通常是一种可逆的竞争抑制剂）共价结合到一种适宜的不溶性基质上，而又不损伤它与酶的结合能力。把未经纯化的酶加在经适当缓冲液浸泡过并经配位体结合过的基质柱上，这种酶被选择性

地留在柱上，而不结合的杂质被洗脱。随后，再用一种不同pH和不同离子强度的洗脱液把酶取代下来。

3. 柱层析法的一般技术

吸附层析、离子交换层析、通透层析以及亲和层析等操作方式均采用柱型。所以柱层析是一种最常用的方法，有必要较详尽地介绍。

(1) 层析柱

层析柱通常是玻璃的。一般来说，长柱的分辨力好，需分析的物质数量较大时则采用较粗的柱。

(2) 层析材料的准备

各种层析材料在使用前都要作预处理。如用凝胶做层析材料时，需要先溶胀，吸附层析的材料要预先加热或酸处理来活化，而离子交换树脂则需要用酸碱处理来得到所需的电离形式。

用溶剂进行平衡时，先使材料沉淀，去掉悬浮的细颗粒，否则由于细颗粒的堵塞，将显著降低溶剂的流速。

(3) 装柱

装柱的好坏将直接影响层析的效果。关键在于要使层析床和支持板下的“死体积”不存有气泡！装柱时首先关闭出口，用溶剂灌至 $1/3$ 体积，并使支持板下的死体积不存有气泡，再慢慢地向溶剂中加浆状层析材料。沿着玻璃棒小心地倾注，不时地轻轻叩柱以便填装均匀和赶走气泡。让悬浮液沉淀，放出过多的溶剂。最好一次装填好，这样可以避免分层。如需分数次装填，那末在第二次装填前应把前次装填的表面用玻璃棒搅动后再装填，下一次再重复这个过程，直装到所需的高度。用溶剂彻底洗涤层析柱后使液面降到略高于层析床表面，覆盖上一张圆形的滤纸或尼龙布，以免加样时扰乱层析床表面。

(4) 加样

样品上柱前，先溶解在溶剂里或用洗脱液透析。样品的溶液浓度应尽可能高些，以减少样品溶液的体积，使区带狭窄。将样品仔细加到层析床的表面，打开旋塞至液面与床面齐，然后与溶

剂池连接，保持一定的液面高度，调节好流速后即可开始洗脱。

(5) 洗脱

用适当的洗脱液把各组分依次从柱上冲洗下来称之为洗脱。洗脱时溶剂与柱的相互作用应比溶质与柱的相互作用强。这样，溶剂流过层析柱时，就逐渐将它们从柱上冲洗下来。各种组分因为吸附力不同而被逐渐分离。在一个组分洗脱下来后，可改换洗脱液，这种方法叫分步洗脱。另外一种方法是逐渐改变溶剂的性质，使其形成一个离子强度，pH或极性递增的梯度，从而使各组分依次被洗脱。这就是梯度洗脱。

(6) 收集

层析柱的流出液可用部分收集器来收集。还可以用紫外监测仪对流出液进行连续监测。因为监测仪有自动记录装置，可以划出洗脱曲线，根据洗脱曲线即可以找出哪些收集管中有所需的分离物。

4. 应用实例

LDH（乳酸脱氢酶）同功酶的亲和层析。

LDH同工酶是由两种不同的亚基组成的四聚体，且受着不同基因的控制。以心肌（ β_4 ）为代表的 β 亚基和以骨骼肌（ α_4 ）为代表的 α 亚基。它们的氨基酸组成和序列都是各不相同的。因此，分离纯化乳酸脱氢酶及其亚基是深入研究该酶的结构和功能的先决条件。

(1) 试剂准备

① 溴化氰（BrCN）

② Sepharose 4B（瑞典LKB公司出品）

③ 2M NaOH

④ 0.1M碳酸盐缓冲液pH9.5—10，并含有100微克分子的还原型辅酶I

⑤ 乙二胺

⑥ 1M KCl

⑦ 草酸钾

A. 在每毫升含有 5—10 微克分子的 aminohexyl 基团的 Sepharose 中, 加进预先溶于 2ml 双蒸水中的 140 毫克草酸钾, 用醋酸缓冲液将 pH 调至 4.7, 逐滴加入事先溶解好的羰二亚胺 (1 毫升双蒸水中加 370 毫克)。室温下搅拌并催化反应 20 小时, 促使 Sepharose 上 aminohexyl 基团的末端氨基与草酸盐通过酰胺键 (amiae) 连接而产生不溶性 oxamate 衍生物。

B. 偶联最终产物的鉴定: 用 3% 三硝基苯磺酸盐的水溶液鉴定尿基的连接情况。室温下胶用染料染 2 小时胶未连接取代基者呈黄色, α -氨基为桔黄色, 芳香族基为桔红色。上述尿基与染料反应时表现为橙黄色, 而对照为黄色, 差异明显, 极易分辨。

C. Sepharose-aminohexyl-cl-不溶性 oxamate 亲和剂的应用:

i 组织处理: 将待分离的组织, 用等体积的 0.02M 磷酸缓冲液 (pH 6—8) 匀浆, 13,000g \times 离心 30 分钟, 上清液用于亲和层析。

ii 亲和柱装置: 将上述交联尿基的 Sepharose 装入一个内径为 0.7 厘米的玻璃柱内。床体积为 4 毫升, 柱用不含氯化钠但含有 NADH 的 0.02M 磷酸缓冲液平衡。上样量为床体积的 1/10, 在 15 $^{\circ}$ C 下层析, 流体静压一般为 76 厘米液压。为了达到较好的分离效果, 洗脱液除含有与平衡缓冲液同样浓度的 NADH 外, 还加入 0.5M NaCl。进行分步洗脱, 以完全排除非特异性离子交换效应的干扰。分步洗脱的条件为: 先用含有 NADH 的磷酸缓冲液洗脱。当用 280 nm 紫外光检测, 其吸收值低于 0.03 时, 换用 0.5M NaCl 的 NADH 磷酸缓冲液洗脱。

(3) 酶活性的测定;

根据 NADH 在 340nm 时的特异吸收值, 以及乳酸脱氢酶酶促反应时, NADH 转化为 NAD^+ 的情况, 酶活性可直接在 340nm 的光吸收值中反应出来, 如果加进反应体系中的 NADH 的光吸收值作为 100% 的话, 那么, 在酶促反应过程中, 340nm 光吸收值下降愈多, 表明酶的活性愈高, 反之则活性低。测定洗脱液中 LDH 同工酶的活性时, 可对酶促反应前后进行比较, 如果 340nm 处的光吸

收值没有发生变化或变化很小，则表明洗脱液中没有酶的活性或者者有极低的LDH同工酶活性。因此，根据 280nm 下紫外吸收的变化及340nm下光吸收的变化，便可以了解该亲和柱对乳酸脱氢酶同工酶的纯化效果。检测步骤如下：在25℃下，取光程为1厘米的石英杯，加入3毫升0.1M磷酸缓冲液（pH7.0），0.25毫克的丙酮酸钠和0.35毫克NADH。然后将亲和柱的洗脱液按收集管的顺序，依次取0.05毫升，并分别加在上述体系中进行反应，以上述反应体系中不加酶的光吸收值为对照。测定340nm波长下的光吸收值，它们的降低值即可表示LDH同工酶的活性。

（四）放射性同位素技术

放射性同位素技术在生物科学研究中应用很广，如在生物化学、分子生物学、分子遗传学等诸方面。在遗传工程研究中尤为重要。

1. 原理

原子由一个带正电荷的核和围绕着核的带负电荷的电子层组成。而核又由带正电荷的质子和不带电的粒子——中子所组成。在原子中，轨道电子的数目必须等于核中的质子数目，这个数称之为原子序数（Z）。而质子数和中子数的总和称为质量数（A）。所以

$$A = Z + N; \quad N = \text{中子数。}$$

在原子核中，由于中子数与原子序数无关，所以它不影响原子的化学性质。在某种元素中，原子不一定含有相同的中子数。具有不同质量的同类元素的各种原子称为同位素。每一种元素的同位素数目是不同的。氢有三个同位素： ^1H ， ^2H ， ^3H 。而碳有七个，从 ^{10}C 到 ^{16}C 。在一些高原子序数的元素中，同位素的数目可多达20个以上。自然界中一种元素只有很少几种同位素是稳定的，称为稳定性同位素。而其它一些同位素是不稳定的，并以一个固有的速度蜕变成稳定性同位素。在蜕变的过程中则发射粒子和电磁辐射，而这些辐射可以使X光片感光并用仪器测量到。鉴于同位素的以上特点，经常使用它们进行遗传学有关分子合成、代谢活动的研究。当然，利用它们的放射性还可以对生物尤其是微生物

物进行诱发突变的研究。

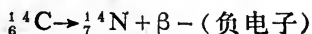
2. 放射性衰变的类型

(1) 发射负电子的衰变

在这种过程中，一个中子发射出一个带负电荷的 β 粒子，并转变为一个质子。负电子即是电子。

中子 \rightarrow 质子+负电子

这样原子核失去一个中子而得到一个质子，原子序数增加了1，质量数不变，如，同位素 ^{14}C 的衰变。

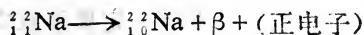


(2) 发射正电子的衰变

在这一类衰变中，同位素通过发射带正电荷的 β 粒子(正电子)而衰变。在这个过程中一个质子转变为一个中子。

质子 \rightarrow 中子+正电子

由于一个质子变成了中子，使原子序数减少1，质量数保持不变。如： ^{22}Na 的衰变。



(3) α 衰变:

高原子序数同位素的衰变是通过发射 α 粒子来表现的。 α 粒子是氦的原子核，由2个质子和二个中子(${}^4_2\text{He}^{+2}$)组成。

(4) γ 衰变

γ 射线不同于 α 和 β 粒子的发射，它是一种电磁辐射，是原子核内转化的结果，经常伴随着 α 和 β 粒子的发射。 γ 发射的本身并不引起原子序数或质量的变化。

3. 放射性衰变率

放射性同位素的放射性是随时间而下降的，这种下降有其自己固有的速度。每种放射性同位素都有衰变常数，常用“半衰期”来表示。它的定义是：放射性从一个值下降为这个值的一半时所需的时间，用 $T_{\frac{1}{2}}$ 表示，某种放射性同位素，经过一个半衰期放射性降为原有活性的50%，经过两个半衰期，活性仅为原有活性的

25%，经过四个半衰期就只有原有活性的6.25%了，所以在应用放射性同位素时特别要注意到这一点。下面介绍一下遗传学研究中常用同位素的半衰期。

| 同位素 | 半衰期 |
|-----------------|---------|
| ^3H | 12.26年 |
| ^{14}C | 5730年 |
| ^{22}N | 2.58年 |
| ^{32}P | 14.30天 |
| ^{35}S | 87.9天 |
| ^{42}K | 12.40小时 |

4. 放射性的单位

放射性的单位是居里，它是一克镭每秒钟的蜕变数，即为 3.7×10^{10} 。由于这个单位太大，生物学中实际应用的单位是微居里(μCi)和毫居里(mCi)。

5. 使用放射性同位素的安全问题

辐射对人体是有害的，使用放射性同位素时一定要注意安全和防护。在放射性同位素的操作中，要防止对环境和人体的污染，要戴乳胶手套，必要时还要穿防护服。禁止用嘴吸吸管，在同位素实验室严禁饮食和吸烟。沾有放射性的材料和弃物不能随便处理，要放入塑料袋内统一处理等等。

6. 放射性的探测和测量

探测和定量放射性有三种主要的方法：一是建立在气体电离基础上的盖革计数器测定；另一种是固体或液体激发基础上的闪烁计数器测定，以上方法都能进行定量测定；第三种是以放射性能使照相乳胶为基础的照相机法，虽然此法不能定量但在分子杂交和离体合成测定时是必不可少的。

7. 放射性同位素在遗传研究中的应用

放射性同位素在生物科学中应用很广泛，如代谢途径的研究，代谢周转期的测定，物质被动植物吸收和转移的机制和速度的研究以及植物、微生物的诱变育种等。分子杂交是放射性同位

素在遗传研究中很重要的应用，这方面的情况将在有关章节详细介绍。在研究离体合成时也必须使用放射性同位素。

8. 放射性同位素的应用实例

(1) 离体线粒体翻译产物的分析

线粒体含有整套的遗传系统，因而离体的线粒体能够独立地合成蛋白质。用同位素标记的氨基酸掺入到离体线粒体合成的多肽中，用凝胶电泳分离及放射自显影方法即可分离鉴定出线粒体基因组编码合成的蛋白质。

① 试剂

提取液：50ml Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5 0.35M 甘露醇
1mMEDTA 5mMKCl 3mM 巯基乙醇 0.1% 牛血清蛋白。

洗涤液：不含巯基乙醇的提取液

蔗糖溶液：用10mM Tris-HCl pH 7.5 1mMEDTA
0.1% 牛血清蛋白的缓冲液配制0.6M 1.2M、
1.45M和1.8M蔗糖溶液。

酶解液：0.35M甘露醇 10mM MgCl₂ 50ug/ml DNase
50mM Tris-HCl pH 7.5

洗酶液：0.35M甘露醇 20mMEDTA 25mM Tris-HCl
pH 7.5

悬浮液：0.35M甘露醇 1mMEDTA 10mM Tris-HCl
pH 7.2

反应液：10mM Tricine pH 7.2 0.26M甘露醇
10mM KCl 20mM MgCl₂ 1mMEDTA 6mMATP
1mMGTP 2mMDTT 8.4mM 磷酸肌酸
0.1mg/ml 磷酸肌酸激酶 0.1mM 19种氨基酸(蛋氨酸除外)，50μCi [³⁵S]蛋氨酸，用前配制。

终止液：0.35M甘露醇 1mMEDTA 12mM 蛋氨酸，
10mM Tricine pH 7.2。

裂解液：10mM Tris-HCl pH 6.8, 1mMEDTA。

②实验程序

按水稻线粒体DNA的提取与纯化方法提取线粒体，得到粗线粒体后，用蔗糖密度梯度离心进行纯化。具体操作如下：

在一个36ml离心管中，制备不连续的蔗糖密度梯度，0.6M蔗糖溶液6ml，1.2M的10ml，1.45M的12ml，1.8M的6ml。

在蔗糖梯度的顶部，加2ml线粒体悬浮液，用水平转头，以40000g离心60分钟。

纯化的线粒体分布在1.2M与1.45M的界面上，用直角弯头的注射器将线粒体取出。用10mM Tris pH7.2，1mMEDTA缓冲液将取出的线粒体悬浮液稀释至0.4M蔗糖浓度（约需稀释3.5倍）。用10000g离心20分钟，沉淀纯化的线粒体，加5ml酶解液，在4℃下保温1小时以除去线粒体外的污染的核DNA。

离心收集线粒体，用洗酶液洗2次。用10000g离心20分钟，收集线粒体。用1ml悬浮线粒体。上述各步骤均需在4℃下进行，所有器皿及溶液均需灭菌。

离体线粒体蛋白质的合成：取50ml线粒体悬浮液（均含1000μg蛋白质），在无菌条件下转入950μl反应液中。在25℃下保温90分钟，轻轻摇动。保温结束后，立即加入2ml终止液，然后用洗涤液洗2—3次（离心收集），除去游离的标记氨基酸。

用1ml裂解液悬浮线粒体。

线粒体翻译产物的分离鉴定：

用IEF-PAGE双向电泳分离线粒体蛋白质。（见电泳技术一节）。

放射自显影

凝胶电泳板干燥后，将x光胶片紧贴电泳凝胶板，放在暗盒中，置-70℃冰箱中，曝光2—3周。凡是曝光的区域就是线粒体离体翻译的产物。

(2) 利用¹³¹I标记5—碘尿嘧啶以研究细菌DNA的复制

5—碘尿嘧啶(5—Iu)是胸腺嘧啶的结构类似物，虽然它不是天然碱基成分，但能部分地为某些细菌利用，与胸腺嘧啶一样，

它参与核酸的合成。由于 I^{131} 放射出的 γ 射线，放射强度高，穿透力强，易于检出，所以用它来研究细菌DNA的复制。

①菌株：大肠杆菌E.coli15T⁻是甲硫氨酸、精氨酸、色氨酸、胸腺嘧啶缺陷变异株。

②基础培养基：1000ml培养基中含 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 17.6g, KH_2PO_4 3g, NaCl0.5g, NH_4Cl 1g, $CaCl_2$ 0.02g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.41g, 葡萄糖4g。pH7.0—7.2。

③掺入培养和同步培养：基础培养基中补加甲硫氨酸、色氨酸各20 μ g/ml, 37 $^{\circ}C$ 摇床培养。生长至对数期(取菌悬液测光密度0.0m μ 读数为0.4—0.6的菌悬液，在3500rpm下离心10分钟以收集菌体。菌体用基础培养基洗一次，然后将菌体悬浮于补加了缺陷氨基酸(甲硫氨酸，色氨酸，精氨酸)的基础培养基中，再加入5— $I^{131}u$ 或5— I^{131} 尿嘧啶脱氧核苷(5— $I^{131}udR$)或 $[H^3]$ —Thy($[H^3]$ —胸腺嘧啶)。一般情况下，加入5— $I^{131}u$ 或5— $I^{131}udR$ 的量为每毫升培养液0.5mCi,加入 $[H^3]$ —Thy的量为7.5 μ Ci/ml, 实验在37 $^{\circ}C$ 水浴中振荡进行。

细菌生长的同步培养采用氨基酸饥饿法，即将菌体悬浮于不补加上述三种缺陷氨基酸，而补加胸腺嘧啶的基础培养基中，然后振荡培养。一般饥饿时间为120分钟。

④样品中放射性掺入计数的测定：测定用样品菌液1ml, 取样后立即用2ml冰冷的15%三氯乙酸(简称TCA, 内含0.02M焦磷酸钠, 5—Iu100 μ g/ml沉淀。在冰浴或冰箱中放置30分钟后离心, 3500rpm, 10分钟。沉淀分别用2ml上述的冰冷15%TCA(含0.02M焦磷酸钠)、2ml5%TCA(含0.02M焦磷酸钠)以及2ml5%TCA各洗一次，最后得到的沉淀用井型 γ 闪烁探头和计数器测定。

⑤TCA沉淀物的碱水解：取上述沉淀，立即用0.5ml0.33N(或1N)KOH溶解，在37 $^{\circ}C$ 水浴中保温水解18小时。水解结束后，先用2N HCl中和，然后加入1ml冰冷的15%TCA(含0.02M焦磷酸钠)即产生沉淀。离心后沉淀用5%TCA洗一次，所得沉淀和上清液都可直接在井型 γ 闪烁探头和计数器测定。

⑥上述的实验可得到如下结果:

a. $5-I^{131}u$ 的掺入和保温时间有正相关关系,即保温时间越多,掺入量越高。

b. $5-I^{131}u$ 仅能掺入大肠杆菌DNA而不掺入RNA。因为当核酸(DNA和RNA)用碱水解时,在一定条件下只有RNA发生水解而DNA不被水解。利用DNA和RNA的这种化学上的差异,可以区分 $5-I^{131}u$ 是掺入DNA还是RNA此外,用DNA酶和RNA酶水解, TCA沉淀的结果也证明 $5-I^{131}u$ 是掺入DNA而不掺入RNA。

c. 应用 $5-I^{131}u$ 的掺入来测定大肠杆菌DNA复制的起步。培养的大肠杆菌E. coli sT-经氨基酸饥饿120分钟后, $5-I^{131}u$ 掺入DNA的过程逐渐停止,这表示DNA复制过程的停止。当饥饿一段时间(80分钟或180分钟)后再给与其缺陷氨基酸时, DNA复制由于又有了新的蛋白质被合成而重新起步。

(赵世民)

第二节 微生物基本操作

微生物包括亚细胞结构的病毒、细胞结构的细菌和多细胞结构的高等真菌等。这些以细胞构造为基础的简单生物,是研究生物构造和生命活动的基本模型。以它们为材料进行遗传学研究以及近代的生化遗传学、分子遗传学和遗传工程的研究。主要是在微生物遗传的研究基础上发展起来的。

为使研究工作顺利进行,能够得到预期的结果,要注意微生物操作技术。

(一) 纯种分离

要将所需的微生物从其它微生物中分离出来,首先要考察它

们所需的环境，选定具备这种环境的分离条件。从分离的方法、培养基的设计、培养条件的控制、添加特殊的抑制剂等措施着手，才能有效地进行分离。要测定并检验株系的基因型，防止染上杂菌及遗传标志的丧失。当一切检验完成，确认是所需的菌株后，进一步进行单菌落分离，准备工作用菌。

1. 单菌分离：

稀释样品：

菌种分离一般在培养皿中进行。用无菌生理盐水、无菌磷酸缓冲液等将样品稀释，使微生物在平皿培养基上形成孤立的菌落。然后从这上面选择所需要的菌落，转接到斜面上。

为了使培养皿上的菌落数目合适，能够使菌落充分分散开，必须选择适宜的稀释度。这应根据不同的菌株，灵活掌握。

划线纯化：

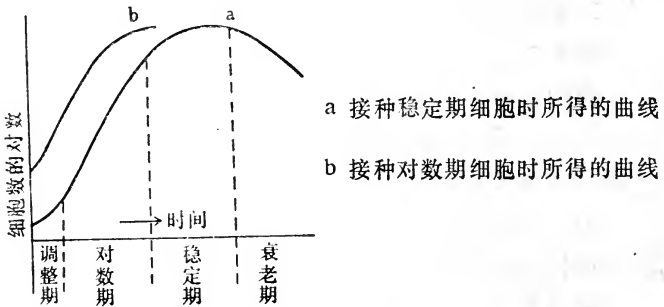
用灭过菌的牙签或接种环在稀释过的菌液中沾一下，涂在表面较干的平板培养基的一角，必须记住，今后所取的菌落，应是所划线上的菌落，离开涂布线的，可能是污染的杂菌。牙签开始涂的地方因菌液较浓，难以划成单菌落。所以另取一支牙签在第一次划线的一端通过一次，划一条曲线；可再在第二次划的线的一端再划线。这样，经适当温度培养，就可在培养皿上看到单个的菌落。

2. 生长与保存

(1) 培养

培养细菌，一般都不直接从琼脂斜面接种到试验培养基中。而是先选择单菌落，转接到液体培养基中，再将培养好的菌液作为接种液，经几次转接，使其能保持在对数期。因为少量的细胞接种到合适的新鲜液体培养基中，在适宜的条件下培养时，其生长过程具有一定的规律性，即调整期、对数期、稳定期和衰老期。将对数期细胞接种到培养液中，细胞几乎不需要经过调整期，就可以对数的速度增殖。因此如要在短时间内获得大量细胞，最好接种对数期细胞。

细胞培养的时间，应根据研究目的不同、细胞的生长速度、通气情况、温度等来决定。一般都是在对数生长初期，或在対数生长期到稳定期之间。如果是形成孢子的一些细菌，它们在对数生长期后期开始形成孢子到稳定期时绝大多数形成了游离孢子。因此，要收集它们的营养细胞，最好是在对数期初期。



要想确切知道某一菌株的生长速度，最常用的检测方法，就是在培养物生长过程中，间隔一定时间取一次样。在600nm波长处测定其光密度(OD)，直到OD值最大，平稳而不再升高。根据所得的数据绘制出生长的标准曲线。在测定光密度的同时，可测定培养物所含的细胞数。即进行活菌计数：通过合适的稀释度在平皿培养基上计算出每毫升中含多少菌。一般 $1\text{OD} \approx 8 \times 10^8$ 细胞/ml。

(2) 菌种的保藏

传代培养保藏是被广泛采用和最基本的保藏方法。但由于是定期传代，菌种的生存期短，频繁转接会通过棉塞而引起污染。除此之外还存在菌种性状不稳定，发生变异和退化的危险性。所以一般采用降低代谢速度的保藏方法。

A. 液体甘油保藏

待保藏的菌种过夜培养，按15%的比例加灭菌甘油，放入带帽的小瓶中，在 -20°C 冰箱中至少可存放一年。每一株菌最好多制备几瓶，以免仅有一支在多次冻溶后会减少活力。

B. 软洋菜穿刺法

在带帽的小瓶中放入含3%琼脂的培养基，不要装得很满，应留一定的空间。用牙签沾一点纯化过的菌体，刺入培养基中，在适当温度下培养过夜。封好瓶口，在室温或冰箱中可存放数年。

C. 冷冻干燥法

此方法是预先将细胞冷冻，使水冻结。然后在真空下通过冰的升华除去大部分水。残留的水通过蒸发也从细胞中除去。

将灭菌的脱脂牛奶(20%浓度)与细菌制成菌悬液，装入灭菌的安瓿瓶中，置冰箱过夜，以预冻。次日放入冰冻干燥机抽干成白色粉末，封好瓶口，放低温中可保藏数年。

(二) 噬菌体噬菌斑的纯化、 λ 噬菌体的制备

噬菌斑是噬菌体存在的明确指标。用双层琼脂法来形成噬菌斑，如果是液体样品，要进行一次离心，除去细菌菌体，上清液则用来测定噬菌体。以溶源菌的溶菌液作为样品时，要考虑到产生噬菌体的可能性。因此，先用紫外线、丝裂霉素或热诱导处理，再进行培养离心，用双层琼脂法使在平皿上形成噬菌斑。

1. 噬菌斑的纯化

用吸管在有噬菌斑的培养皿上抠下一单独噬菌斑，连同琼脂一起抠下，将其吹到1ml液体肉汤培养基中。室温下静止1—2小时，使噬菌体颗粒从琼脂碎片中扩散出来。经过适当稀释，再在双层琼脂平皿上形成噬菌斑。如此反复操作，直至证实纯的噬菌体。

为了制备高效价的噬菌体液，可将纯化过的噬菌体液，进行适当稀释：1ml噬菌体稀释液加0.1ml敏感菌液，加1.5ml 0.7%的琼脂，混合均匀后倒在底层琼脂平皿上，适温培养过夜，直到裂解融合，产生成片的噬菌斑。培养皿中加入肉汤培养基，捣碎上层琼脂，放冰箱中过夜。第二天吸出肉汤，加几滴氯仿，离心，回收上清液，无菌过滤。此噬菌液可贮存在4℃下滴度不变。

2. λ 噬菌体的大量制备

此方法通过细菌连续感染使噬菌体大量产生，最后使培养物

完全裂解。

感染：

(1) 取20ml经过交培养的菌液，加入0.05ml制备好的 λ 噬菌体液。此混合物的浓度大约是 5×10^8 噬菌体液， 2.5×10^{10} 细胞/ml的菌液。这样可以保证每个噬菌体都有感染细菌的机会。当然细菌与噬菌体的比例要根据噬菌体的不同株系和菌株的差异而有所不同，可通过实验寻找出最佳的感染系数。

(2) 32℃下培养5分钟，使噬菌体吸附。

(3) 把混合液转移到预热的液体培养基中，体积为1升，同时加入10mMMgSO₄。

(4) 在38—39℃摇床上强烈振荡。一般5—8小时，就可明显溶菌，最长为10小时。

提纯：

(5) 把溶菌液冷却到室温，加入NaCl使浓度为0.5M，加1ml氯仿，振荡30分钟。

(6) 4,000rpm离心15分钟，去除细胞碎片和氯仿。

(7) 加入固体聚乙二醇6000(PEG)，使重量体积比为10%。溶解后，在室温下处置1小时，使噬菌体颗粒沉淀。

(8) 6000rpm离心10分钟，4℃下回收沉淀。

(9) 把沉淀悬浮在5—10ml(每升溶菌液)TM液中(50mM Tris、10mMMgSO₄)加入等体积的氯仿，混匀后置室温下1分钟。

(10) 4000rpm离心5分钟，吸出水相。

(11) 在硝酸纤维素离心管中制备甘油分布梯度。将3ml含40%甘油的TM缓冲液放在管底小心覆盖上4ml含5%甘油的TM缓冲液，再在甘油悬液上小心地加上噬菌体液，最后以TM缓冲液补满全管。

(12) 4℃下，35000rpm离心60分钟。

(13) 弃去上清液，按每升培养物加1mlTM液的比例，将沉淀物重新悬浮。

(14)分别加入RNase(50 μ g/ml)和DNase(1 μ g/ml)37 $^{\circ}$ C保温30分钟。

DNA的提取:

(15)在提纯的上述溶液中加入五分之一体积的5 \times STEP缓冲液(5 \times STEP=0.5%SDS, 50mMTris, pH7.5 0.4MEDTA, 1mg/ml蛋白酶K, 用时现配)保温30分钟。

(16)加等体积的饱和酚进行抽提, 5000rpm离心5分钟。吸出水相, 再用氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次。

(17)将水相转移到透析袋中, 用TE缓冲液(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)透析过夜。

(王玮)

(三) 酵母的遗传操作

酵母是真核微生物, 结构要比原核生物的大肠杆菌复杂。但酵母又有很多地方与细菌相似, 如: 酵母也是单细胞的, 生长快, 能形成单个菌落, 容易进行平板复制和突变体的分离。同时, 酵母的单倍体和二倍体在遗传上都是稳定的, 具有许多遗传标记, 能进行子囊孢子的分析, 还能进行细胞的DNA转化等, 这些都是用酵母为材料, 进行遗传学和分子生物学研究的有利因素。而且, 酵母单倍体的DNA只比大肠杆菌多三倍半, 培养又很容易, 既简便, 又省钱, 所以, 酵母在各种研究工作中被广泛采用。

下面以啤酒酵母为例, 介绍有关酵母遗传操作的一些基本技术, 其中包括酵母菌种的分离和保藏, 遗传操作方法和酵母分子遗传学常用的载体种类, DNA提取和遗传转化的具体步骤。

1. 酵母的分离与保藏

到1970年为止, 已发现的酵母有39个属共349种。生产上最常用、研究得也最多的是啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。酵母是真菌, 但它是单细胞的, 所以它的生长、分离和保藏可借鉴其它单细胞微生物(如: 细菌)的经验。

(1) 分离程序

酵母可在固体培养基上生长，所以，通过样品的涂布分离，可以从混杂有低浓度细菌或丝状真菌的样品中把酵母分离出来。一般在YPD培养基上即可做到。

如果混杂有很多细菌和丝状真菌，则可在培养基中加入稀盐酸或稀磷酸来降低pH。在pH3.5—4.0的条件下，酵母能生长好，而细菌和丝状真菌的生长则受抑制。也有人提倡使用乳酸和丙酸（0.25%，pH4.0）。

近年来，分离酵母的培养基常加抗菌素来抑制细菌生长。广谱性抗菌素，如：氯霉素、四环素，被广泛应用。抗真菌素也能作用于酵母，故在分离酵母时不能用。

从混杂有丝状真菌的混合物中分离酵母的方法是：把培养基调到pH3.4—4.0，接种后，在25℃下，振荡培养48小时。丝状真菌的菌丝长成大的团块，而酵母则是分散的单细胞，可涂布分离出酵母细胞。

当实验室或工业生产中使用的某种酵母被其它种或菌株的酵母污染时，可根据该酵母的生理学特性和营养标记来分离，如：碳源要求、营养要求和生长温度等等。

(2) 酵母的保藏

实验室保存酵母，多数是把酵母菌种接种在YPD斜面上。0—4℃下，可保存一个月。如果注意瓶口的封闭，使培养基不至于干掉，在冰箱中可保存1—2年。反复的传代容易产生遗传变异，故在保存时要避免频繁转接。

使用液氮在-196℃，10%（v/v）甘油中保存酵母，效果好，存活率高，代谢特征的变异也少。

为长期保存菌种，可以把干酵母和硅胶混合后，保存在冰箱中。如果，在转到硅胶中以前，先把酵母悬在灭菌的牛奶中，效果更佳。

2. 酵母的生长和生活周期

酵母的生长速度很快，在30℃，YPD培养液中通气培养，世

代时间一般为70—90分钟。接种 10^4 — 10^6 细胞/ml,过夜培养后可达 10^6 — 10^7 细胞/ml以上。

(1) 酵母的生长

①培养基

YPD: 是最常用的生长和保存菌种用的培养基。含 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 和2%葡萄糖。

YPG: 用3%甘油代替葡萄糖做碳源。

YPE: 用3%乙醇代替葡萄糖做碳源。

SD合成培养基: 含0.17%酵母基本氮源〔无氨基酸和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 〕, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 和2%葡萄糖。野生型菌株能在此培养基上生长。

SD合成完全培养基: 带营养缺陷记号的菌株,只有在SD培养基中加上所需的某种或某几种氨基酸或维生素时才能生长。此培养基可用于测定营养缺陷记号。一般补充的氨基酸达10—20mg/l,就可以了。但有些种类要加得更多一些,如:

tyr, leu, ile, lys要加30mg/l; phen要加50mg/l; val要加100mg/l。

以上各种培养基如要做成固体时,可加1.7—2%的琼脂。

生孢子前培养基: 0.8%酵母提取物, 0.3%蛋白胨, 10%葡萄糖, 和2%琼脂。

生孢子培养基: 1%醋酸钾, 0.1%酵母提取物, 0.05%葡萄糖, 和2%琼脂。

②培养条件: 酵母一般要求通气培养,温度为25—30℃,不超过32℃。pH值为3.0—8.0,最适pH为4.5—6.5。

③细胞的收集: 酵母细胞可用离心法收集,一般2000—3000rpm, 5分钟。收集后的细胞,在0℃下,24小时内,不会失去生活力和体内的酶活性。

(2) 酵母的生活史

①酵母的营养生长: 酵母可以出芽繁殖,具体过程是:母细胞长出一个突起,同时,母细胞有丝分裂,一组染色体进入突起,

细胞壁形成分隔。最后,体形较小的子细胞从母细胞上脱落下来,子细胞再长大和出芽繁殖。在最适条件下,这个过程只需要70分钟。一个母细胞一生最多形成20—30个芽孢。不论单倍体或二倍体细胞,在营养丰富时,都不断地以这种方式生长和分裂。

②酵母的交配类型和杂交:啤酒酵母有 α 和 a 两种交配类型,它是由基因遗传控制的。

杂交只在一个 α 型和一个 a 型菌株之间发生。杂交分两步:第一步先聚合,二种交配型细胞聚在一起, α 型细胞能分泌一种“外激素”(13个氨基酸组成的短肽),能促使与 a 型细胞聚合,并防止启动芽殖和DNA合成。 a 型细胞则产生一个 a^- 因子(11个氨基酸的短肽),与 α 型细胞受体结合。第二步,配对的二个细胞的细胞膜融合而形成合子。合子可以芽殖。

③二倍体的形成和分离:把正在生长期的二种交配类型的单倍体细胞等量地混合,放在完全培养基上,4—5小时后,便可形成二倍体的合子。合子是哑铃形的,可用显微操作器,在显微镜下将它分离出来,并在平板上形成单个菌落。

分离二倍体最简便的方法是:当二种单倍体带有不同的营养缺陷记号时,二倍体可在不含这些营养的无机培养基上生长,而二种单倍体各自却是不能生长的。

当二个单倍体都是原养型,要分离它们形成的二倍体时,最常用的方法是:先在无机培养基上划线,注意那些生长快的大菌落。它们如果是可以形成孢子的,就可确认它们是二倍体。

④子囊和子囊孢子的形成:在营养不足时,二倍体细胞经过减数分裂,产生四个单倍体的后代——子囊孢子。这四个子囊孢子包在同一个子囊中,子囊呈四面体,有厚壁。产生孢子的具体做法是:将处于生长期的二种不同交配型的单倍体细胞,在生孢子前培养基上均匀地混合。在30℃下,堆放1—2天后,再转到生孢子培养基上,2—5天。通常有10—20%的细胞形成子囊,有的菌株可高达70%以上。这可用显微镜来检查。子囊孢子通常是四个,也有的只有三个或更少的,这可能是减数分裂使有的孢子不

能成活所造成的。最后，子囊开裂，孢子释放出来，孢子萌发后长成单倍体的酵母。

3. 酵母的遗传分析

(1) 诱发突变和突变体分析

除了碱基类似物外，大多数用于细菌的诱变剂，也可用于酵母，只是处理方法略有不同。对人危害较低的紫外线、亚硝酸、EMS是最常用的，可用于突变和回复突变的研究。诱变处理后，细胞可在完全培养基上作短时间的培养，使突变能够表达。

从酵母中已经分离出很多类型的，与不同性状有关的突变体。其中，很多是基因产物和酶缺失的突变体，并对它们作了遗传连锁图。

(2) 基因的显性和隐性

用单倍体的野生型和单倍体的突变体形成二倍体杂合子，再测定杂合子的表现型，就可以确定该基因是显性的，或是隐性的了。

(3) 减数分裂产物的分析

① 单个子囊的四分体分析：先用蜗牛酶(商品名Glusulase)，适度处理子囊(30—37℃，15—30分钟)。在光学显微镜下，要看到全部子囊壁已经消化，而内含的四个孢子仍结合在一起。要避免酶处理过度和过分振动。另取一块灭菌载玻片，放上一块琼脂片(2%琼脂，大小为 $\sim 13 \times 30 \times 1$ mm)。用小接种环将一环酶处理过的子囊悬液，涂在琼脂片的一侧。把载玻片放在一个玻璃或塑料的□形架上，琼脂面朝下，组成一个小室。用显微操作器(150—300 \times)的解剖针将有四个孢子的子囊移到一定的地方，以二毫米的间距，将孢子一个个地直线排列。这样，一块琼脂片上就可解剖10—12个子囊，解剖完后，用灭菌小刀揭下琼脂片，有孢子的一面朝上，放在YPD平板上培养。待每个孢子都长成一个菌落后，再进一步测定它们的营养记号或其它性状。

根据四分体表现型的分离情况，可以得知杂合子的基因型。

表中列出四种基本情况。后二种情况表明的是一个性状与二

| 四分体的基因型 (+ 表示野生型, - 表示突变型) | 遗传解释 |
|--|---------------------------------------|
| 4 ₊ :0 ₋ | 子代不表现突变性状, 一般认为这种变异是细胞质突变 |
| 2 ₊ :2 ₋ | 一个基因发生突变 |
| 4 ₊ :0 ₋ , 3 ₊ :1 ₋ , 2 ₊ :2 ₋ | 另一个基因突变,影响了该基因表达; 或另一个基因影响了突变基因的表达 |
| 2 ₊ :2 ₋ , 1 ₊ :3 ₋ , 0 ₊ :4 ₋ | |

个基因有关。有时一个性状与多个基因有着复杂的关系,情况更为复杂。

②随机孢子分析:做法基本如上述,但不用显微操作。采用此方法时,要检测大量的孢子,才比较容易检测出相近基因间发生的低频度重组。还要避免因其中混有未形成孢子的二倍体细胞,和因孢子分散不好而造成的误差。要采用物理学和遗传学的手段来避免。

以上二种方法中,由单个孢子长成的菌落的表型测定方法是:先让这些菌落在完全培养基上,做成主平板。用平板复制法,把菌落转到含特定培养基的复制平板上。再根据生长情况,记录它们的表型。

(4) 连锁分析

两个基因的杂种AB/ab的后代能产生以下三种类型的四分体后代:亲代双型(PD型), AB, AB, ab, ab; 非亲代双型(NPD型), Ab, Ab, aB, aB; 四型(T型), AB, Ab, aB, ab。各类子囊出现的频率之比(PD:NPD:T)叫做四分体分布,这是确定基因连锁图的基本根据。如果PD:NPD:T=1:1:4,表示二个基因不存在连锁。如果PD:NPD>1/6, T<4/6,表示AB两个基因属于不同的连锁群,而且与各自的着丝点连锁。如果PD>NPD, T<4/6,表示AB二个基因直线连锁。如果确定了二个基因

是连锁的，那么，AB基因间的距离X为（X的单位是“分摩”，以CM为代号），

$$X = \frac{100 (T + \text{GNPD})}{2 (PD + \text{NPD} + T)}$$

人们使用四分体分析的方法，把新发现的突变基因排列在连锁群（染色体）上，然后根据它与着丝点和同条染色体上其它基因的关系来作图。单倍体酵母共有17条染色体，总长2600cm。目前，已为16条染色体作了图，已作图的基因超过560个，约为大肠杆菌基因数的一半。

(5) 酵母的原生质球融合

原生质球融合是研究植物细胞和包括酵母在内的微生物细胞杂交的方法之一。特别是聚乙二醇的使用，它可有效地引起原生质凝聚和机械结合。

①酵母原生质球的获得和细胞壁再生方法：通常用酶溶解细胞壁，得到原生质球。把酵母的原生质球置于37℃熔化的2%琼脂或<20%的明胶培养基中，再倒在含同样成份的培养基的平板上。这样，细胞壁就会有效地再生，再生率为50—70%。而琼脂浓度小于1%或明胶浓度小于15%时，再生率仅5%。另外，培养基中必须加渗透压稳定剂（1M的山梨醇）。

②原生质球融合：取等量的双亲原生质球，在含有1M山梨醇、10mM CaCl_2 的30%聚乙二醇（4000）中，处理30分钟。原生质球发生凝聚后，去掉聚乙二醇，或用培养基稀释，才能融合。整个过程可通过显微镜来观察。

③原生质球融合的应用：原生质球融合中，杂交并不总是发生在两个细胞之间，也可能得到多倍体的杂种。原生质球融合还可成功地用于没有性过程的酵母的杂交，并为更远缘的酵母进行杂交提供了可能，扩大了酵母的种属杂交范围。但也观察到，越是远缘的种，得到稳定杂种组合的可能性越小。因此，如能得到稳定的杂种，就可认为用于融合的二种酵母之间具有亲缘关系。

4. 酵母的遗传转化

酵母的遗传转化首先是用细菌质粒Co1E1获得成功的。该质粒带有酵母染色体III下的正常等位基因Leu2。实验中依赖亮氨酸的酵母细胞原生质球的转化频率是 2×10^{-8} 。下面简述酵母转化的基本技术。

(1) 酵母转化的载体

啤酒酵母有两种类型的转化：①整合和②自主复制。带在质粒上的一段酵母顺序，能与在染色体上的同源顺序交换，这是因同源重组而发生的整合。整合有二种方式：一是在同源位点上，连同载体整合进基因组；二是质粒上的酵母顺序取代染色体上的同源顺序，载体不整合进去。这两种转化，使用不能自主复制的环状分子，转化频率都很低（ $\sim 1-10$ 个转化体/ $\mu\text{gDNA}/10^7$ 细胞）。高频转化（ $\sim 10^3-10^4$ 个转化体/ $\mu\text{gDNA}/10^7$ 细胞）发生在当质粒带有染色体的ars (autonomously replicating segment) 顺序，或部分 $2\mu\text{m}$ 环状DNA时，这些质粒能自主复制和高频转化。带有染色体的ars的质粒是不稳定的，在非选择条件下培养10代时，含质粒的细胞少于5%。带有部份 $2\mu\text{m}$ 环状DNA的质粒要相对稳定些，在非选择条件下培养10代后，60—95%的细胞带有质粒。这二种情况下，细胞中的质粒都是高拷贝数的(20—50拷贝/细胞)。 $2\mu\text{m}$ 环中，能增加酵母质粒稳定性所必需的最小长度是：rep3区域和一段反向重复的599个碱基对的DNA顺序。

把酵母着丝点加到带染色体ars的质粒上，能增加质粒的稳定性，培养10代后，90%的细胞带质粒，但质粒拷贝数下降为单拷贝。把着丝点加到带 $2\mu\text{m}$ 环顺序的质粒中时，其稳定性的增加不如前者。

最近，有人把端粒顺序克隆到质粒中，得到了能自主复制的线状分子。这种质粒稳定性不如环状带着丝点的质粒，10代后，约40%的细胞带有质粒，有20—40个拷贝。使线性分子进一步稳定的办法是加上酵母的着丝点顺序，这使质粒增大，得到单拷贝的小染色体。它是各种质粒中最稳定的，但仍比天然染色体的稳定性低二个数量级。

有的载体能让蛋白质基因在酵母中表达和/或分泌。用于表达的质粒有的带有很强的组成型启动子,有的启动子是调节型的。有的载体上带有编码交配外激素 α 因子的信号肽的部分基因,用来分泌杂种蛋白。

表15列举了多种酵母载体,并简述了它们各自的组成和性质。

(2) 酵母DNA的分离:

首先使脱壁形成原生质球,再从中提取酵母DNA。具体步骤如下:

- ① 酵母培养在40ml YPD培养液中,至对数后期。
- ② 离心收集细胞(5'000rpm, 5分钟)。用TE (10mM Tris-HCl, pH7.4; 1mMEDTA)洗一次。
- ③ 细胞再悬在3.2ml的1M山梨醇, 0.1MEDTA和14mM β -巯基乙醇中, pH为7.4。
- ④ 用0.1ml zymolyase 60,000(15mg/ml)消化细胞壁, 37℃下, 5分钟。如酶的浓度较低(如2mg/ml),就要消化长一点的时间。
- ⑤ 取50 μ l上述处理细胞加200 μ l 1M山梨醇和200 μ l 10%的SDS。在光学显微镜下检查,如果90%以上的细胞已形成原生质球,即可。
- ⑥ 离心沉淀原生质球(5'000rpm, 5分钟)。
- ⑦ 重新悬浮在3.2ml的TE中。加入0.3ml 0.5MEDTA和0.3ml 1M Tris-HCl, pH7.4, 混合均匀。再加0.16ml 10% SDS。
- ⑧ 转动细胞悬液使与SDS混合,置65℃下, 30分钟。
- ⑨ 加1ml的4M醋酸钾,置冰浴中1小时。
- ⑩ 15,000rpm离心25分钟,小心地将上清液倒入干净试管。
- ⑪ 上清液中加入12ml 95%酒精,混合。然后离心(15,000rpm, 15分钟,室温),去掉上清液,将沉淀自然干燥。
- ⑫ 把沉淀重悬于3ml TE中。如果碎片混杂,可将溶液在10,000rpm离心10分钟,去掉碎片。
- ⑬ 把上清液转到容量为14ml的硬塑料离心管内,加150 μ l的胰

表15

酵母载体的组成与性质

| 载体类型 | 代表性载体 | 组 成 | 性 质 |
|---------------------|------------------|---|--|
| 整合型 | YIp5 | pBR322载体 带有一个可选择记号 URA3+ | 这个质粒与染色体上的 URA3等位基因重组 率很低。同源重组发生 在克隆的酵母基因与其 在染色体上的位点之 间 |
| 自主高拷贝 -2 μ m | YEp13 pJDB219 | 分别由pBR322或 pMB1载体组成,含一 个可选择的记号LEU2 +和2 μ m环的自主复 制部份 | 这个载体高频转化, 自主复制。一般用于通 过互补建立基因库,如 果寄主内存在2 μ m环状 DNA,可增加这些载体 的稳定性。 |
| 自主高拷贝 -染色体 | YRp7 YRp17 | pBR322载体,带有 TRP1+基因和相连的 染色体ars顺序 | 这个载体高频转化, 自主复制,多拷贝。转 化体相对不稳定。 YRp7已用于建立酵母 基因库 |
| 自主高拷贝 -端粒 | YLF1 | 线性质粒。在pBR322 上带有四膜虫大分子 rRNA端粒和酵母可 选择记号LEU2 | 高拷贝数质粒。转化 体相对不稳定。可用于 克隆酵母端粒顺序和建 立小染色体 |
| 自主低拷贝 -着丝点 | YCP19 | 环状质粒,带有 pBR322和二个可选择 记号TRP1+和URA3-, 一个染色体ars和染色 体IV的着丝点 | 低拷贝,转化体相对 稳定。用于建立基因库 和克隆每个细胞内多于 一个拷贝就会致死的基 因 |
| 自主低拷贝 -小染色体 | YLP21 | 来自线状质粒YLF1, 外加噬菌体 λ 的顺序和 酵母染色体IV的着丝 点 | 低拷贝,转化体相对 稳定。用于研究某些染 色体功能所需的顺序 |
| 表达-非调节 | pAAH5 | 环状质粒,带有乙 醇脱氢酶的启动子和 适当的克隆位点 | 用于酵母细胞中,一 个基因产物的过量表达。 |

续表

| 载体类型 | 代表性载体 | 组 成 | 性 质 |
|-------|---------------|--|------------------------------------|
| 表达-调节 | YEp51 pYE4 | 受半乳糖和磷酸调节的环状质粒，带有可调节的启动子，可受胞外底物浓度，或受表达所需的遗传位点的调节 | 用于调节一个基因产物的量，以免过量表达对细胞有害，或控制它表达的时间 |
| 表达-分泌 | pAB112 | 一环状质粒，带有编码 α 因子基因(MFa1)的信号顺序 | 控制着与MFa1基因的信号部分融合在一起的小蛋白质的分泌 |

RNase (1mg/ml) , 37℃下, 30分钟。

⑭用酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)提取一次。

⑮取上层, 把盐浓度调到0.3M, 加二倍体积的95%乙醇, 混匀。置-20℃, 2小时以上。

⑯用10,000rpm, 4℃下, 离心30分钟, 以沉淀DNA。

⑰倒掉上清液, 将沉淀空气干燥。再悬在0.5ml的TE中, 待用。

按此方法, 从40ml培养液中, 可提取出10—20 μ g的DNA。也可减少从5ml培养液中提取DNA。如果细胞中已带有质粒, 用此方法制得的DNA可用于质粒的再分离。

(3) 质粒的再分离

从带有自主复制质粒的酵母中分离质粒, 可将用上述方法分离到的DNA, 直接转化细菌, 再从细菌中分离质粒。用100—300ng的总酵母DNA, 能得到10—300个转化体, 其数目依细菌菌株的感受态和质粒的拷贝数而定。

把整合型质粒从酵母中分离出来的方法是: 用适当的限制性内切酶处理酵母DNA (~300ng)。然后, 把反应物稀释到1.0ml, 加上ATP和T4连接酶, 15℃保温过夜。连接后的DNA再去转化感受态的细菌。

(4) 酵母的遗传转化

酵母的转化主要有原生质球转化和锂盐法转化二种方法。

①原生质球转化

这个方法建立较早,使用较普遍。操作的前二步是用 β -葡聚糖酶脱壁, Ca^{2+} 处理原生质球和DNA。最后用聚乙二醇4000处理。处理过的细胞经清洗后,埋在渗透压稳定的再生琼脂中,使细胞壁再生。用自主复制质粒,原生质球转化的频率为100—100,000转化体/ $\mu\text{gDNA}/10^7$ 细胞。原生质球转化的步骤是:

- a. 细胞在50ml YPD培养液中培养到 $1-2 \times 10^7/\text{ml}$ 。
- b. 用10ml 1M的山梨醇把细胞洗二次。
- c. 细胞悬浮在5ml的1M山梨醇中,加 $5\mu\text{l}$ β -巯基乙醇。
- d. 取少量进行稀释涂布(10^{-5} , $100\mu\text{l}$),作活菌计数。
- e. 加 $150\mu\text{l}$ 葡聚糖酶 (glucylase, Endo Laboratories, Inc.), 30°C 保温,缓缓振荡,约30分钟。对每个菌株都应测定在酶中保温的确切时间。一般根据:大约99%形成原生质球;并且10—20%的原生质球能再生。
- f. 取少量进行稀释涂布(10^{-8} , $100\mu\text{l}$),以测定原生质球形成后的存活百分数。
- g. 离心收集沉淀(2500rpm, 7分钟)。轻轻地再悬在2ml的1M山梨醇中,加1M山梨醇至10ml。沉淀细胞。重复一次。
- h. 把细胞再悬在2ml的1M山梨醇中,用1M山梨醇把体积调到9ml。加1ml的0.1M Tris-HCl (pH7.4), 0.1M CaCl_2 。沉淀原生质球,再悬在1.6ml的1M山梨醇, 10mM CaCl_2 中。
- i. 将细胞分装成0.2ml,进行转化。加DNA(1—10 μg),加入DNA的体积要小于 $20\mu\text{l}$ 。
- j. 细胞和DNA一起在室温下放10分钟,充分再悬细胞。加入2ml的50% (w/v) PEG4000, 0.2ml的0.1M Tris-HCl (pH7.4), 0.1M CaCl_2 ,使之混合。
- k. 室温下放10分钟后,离心沉淀原生质球(如步骤7)。把沉淀重悬浮在0.5ml的1M山梨醇, 10mM Tris-HCl (pH7.4), 10mM CaCl_2 中。加10ml的再生琼脂(温度为45— 50°C) (再生琼脂为:

含1M山梨醇的SD培养基，加0.5%的YPD。按菌株或转化体的营养记号，按合成的完全培养基所需的浓度，做适当的营养增补，并加3%琼脂），浇在相应的合成完全培养基做底层的平板上。

② 锂盐法转化

最近，有一转化程序，可不需要脱细胞壁，而是用锂盐处理细胞。可直接在固体琼脂表面选择得到的转化体。但有的菌株不能使用这种方法。当同样使用自主复制质粒来转化时，这种方法的转化频率要比原生质球法低10—100倍。据报道，线性分子的质粒用这种方法来转化效果好。锂盐法转化的具体步骤是：

a. 酵母在100ml的液体YPD中培养至OD₆₀₀为~0.4 (~1—2 × 10⁷细胞/ml)。

b. 2,500rpm离心7分钟，细胞再悬在TE中。重复一次。

c. 细胞重悬在1.5ml的含0.1M氯化锂（或0.3M醋酸锂）的TE中。4℃下，3—8小时。

d. 0.2ml的上述细胞加上DNA。每管使用1—10μg的DNA，加入的DNA体积不能超过总体积的1/10。细胞和DNA的混合物置室温下30分钟。不时轻轻地摇动一下。

e. 把细胞再悬起来，加1.5ml的40%PEG4000，充分混合，置室温下1小时。

f. 热击细胞(42℃，5分钟)。

g. 1500rpm，7分钟。用水把细胞沉淀洗二次。

h. 最后把细胞再悬在0.1ml水中，涂布在适当的、供选择用的、合成的完全培养基平板上。

(5) 克隆DNA的操作

有了适当的载体和酵母DNA，其DNA的克隆和亚克隆是与大肠杆菌一样的。

一个克隆的DNA片段经鉴定后，常常把它放回原基因组中去研究其表达。

(翁曼丽)

第三节 免疫技术

免疫学方法特异性强、灵敏度高。这里仅介绍基本免疫试剂的制备和两种组织相容性抗原的检测方法。

(一) 免疫球蛋白制备

1. 抗原制备

(1) 材料及设备

饱和硫酸铵 将硫酸铵900g溶于预热到50℃的1000ml蒸馏水内。静置过夜，用氢氧化铵将pH调至7.2。

生理盐水：0.85%NaCl溶液，磷酸缓冲盐水(PBS)，0.01M，pH7.3：0.25MNa₂HPO₄ 85ml，0.25M KH₂PO₄ 15ml，NaCl20g，加蒸馏水至250ml。

透析袋：取适当长度的透析袋在蒸馏水中浸洗数次后，置于0.01MEDTA中浸泡10分钟。蒸馏水充分清洗后即可使用。

奈氏试剂：碘化汞115g，碘化钾80g溶于500ml蒸馏水中，过滤。在滤液中加入500ml20%NaOH溶液。在3ml透析液内加一滴奈氏试剂后，如无砖红色出现，说明无氨。

氯化钡试剂 称1gBaCl₂，溶于100毫升蒸馏水中。

紫外分光光度计。

离心机。

烧杯、离心管、搅棒等。

(2) 方法

① 用于固定小鼠，取剪刀剪断其腋下血管放血，将血液收集于离心管内。室温下静置，待血液凝固后，放入冰箱内过夜，次日用解剖针将血块自管壁剥离，3000rpm离心15分钟，收集血清。

②用生理盐水将血清稀释一倍。边搅动溶液边滴加饱和硫酸铵至最终浓度为35% (V/V)。滴毕继续搅拌溶液30分钟，室温静置1小时后，4000rpm离心30分钟。

③弃去上清液，用原血清一半体积的PBS溶解沉淀。滴加饱和硫酸铵至35% (V/V)。静置并离心同上述。

④弃上清液，重复以上过程两次。

⑤白色沉淀用最小体积生理盐水或PBS溶解，即为IgG粗提液。

⑥将IgG粗提物装入透析袋内，用生理盐水或PBS于4℃透析两昼夜，每日换液三次。透析时最好在磁力搅拌器上搅动。

⑦取3ml透析液，用奈氏试剂和氯化钡溶液检查有无 NH_4^+ 或 SO_4^{2-} 。当奈氏试剂滴入透析液而无棕黄色沉淀时，说明无 NH_4^+ 。氯化钡溶液滴入透析液，如无白色沉淀产生，即说明无 SO_4^{2-} 。这时，透析即完成。

⑧IgG含量测定：在 $d = 1\text{cm}$ 比色杯中，于 $A_{280\text{nm}}$ ， $c(\text{mg/ml}) = A_{280}/1.4$ 。

2. 抗血清制备

抗原进入异种动物体内与淋巴细胞接触后发生免疫反应。经过潜伏期，抗体含量逐渐升高；到达高峰后，抗体含量又逐步下降。若同一抗原再次刺激机体，抗体含量迅速上升。出现比第一

注：①上述盐析法制备IgG过程中，加入饱和硫酸铵使其达到所需饱和度，计算方法为：

$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

V 为最终饱和度的硫酸铵体积

V_0 为原溶液体积

S_2 为所需饱和度

S_1 为原溶液饱和度

若不希望溶液体积增大，可用加入固体硫酸铵的方法。加入量为：

$$m = \frac{G(S_2 - S_1)}{1 - AS_2}$$

m 值是将1000ml饱和度为 S_1 的溶液提高到饱和度 S_2 时，所需的硫酸铵克数。

G 和 A 为常数，0℃时， G 为707， A 为0.27；20℃时 G 为756， A 为0.29。

注：②IgG可在硫酸铵糊内保存，使用时对生理盐水透析除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 离子。

次刺激时更高的峰值，延续时间也更长。抗原剂量要适当，剂量过大会造成免疫麻痹，剂量过小则无反应。多次低剂量注射会造成严重的免疫麻痹。免疫用动物可依抗原来源而选择不同种动物，如羊或兔等。本实验使用9—24个月龄2公斤左右健康雄性家兔，免疫途径可选用静脉、肌肉、皮下、淋巴结、脚掌或腹腔内。为加强反应，常使用佐剂。

(1) 材料和设备

兔

小鼠IgG 4mg/ml

完全福氏佐剂 (CFA)：常用8体积无菌液体石蜡、2体积无菌羊毛脂加热混匀后，以1mg/ml比例加入活卡介苗。加入等体积抗原溶液，用研钵或两支注射器相对抽吸使之乳化，直至乳液滴在水面不再扩散为止。CFA会引起慢性炎症，切不可溅入眼内。如在佐剂中不加入分枝杆菌或卡介苗即为不完全佐剂。

注射器、6*、9*针头

紫外分光光度计

饱和硫酸铵，pH7.2

PBS及生理盐水 (0.9%NaCl)

透析袋

(2) 方法

将已透析过的小鼠IgG，经紫外分光光度计测定浓度后，用生理盐水将浓度调整为4mg/ml。

①肌肉内注射免疫 将4mg/ml的小鼠IgG与等量CFA乳化。将2ml乳剂分作4份 (1mg蛋白质/份)，给每只兔子背部的4个部位肌肉注射。一个月后重复注射。第二次注射后3—4周，从免疫兔回收血清样品，测定滴度 (效价)。若已合要求则可放血。若仍不满意，再次免疫3—4周后测试效价。

②静脉注射免疫 每次可注射抗原1mg/ml。第一针自耳尖静脉注射，第二针位置向下移，余类推。注射四次，每次间隔三天。一般一周后即可测效价。无需使用佐剂。

③皮下注射免疫 兔后肢一只脚掌内注入15mg卡介苗，10天后检查腋窝淋巴结，如已肿大，则在淋巴结内注射20 μ g/0.5ml用CFA乳化的抗原。一周后背部皮下多点（2—3点）注射不完全佐剂乳化的抗原，40 μ g/ml。间隔一周后注射60 μ g/ml，此后两周分别注射80 μ g/ml和100 μ g/ml。最后一次免疫注射后3—4日可测试血清效价，若不合要求，用200 μ g/ml加强免疫一次。普通豚鼠

④抗血清的收集 兔（D₃鼠）兔心脏采血，兔仰卧固定。在胸骨左侧自下而上第3—4肋骨间，手感心脏搏动最明显处剪毛，先后用碘酊及75%乙醇消毒皮肤。用9*针头及30ml注射器，沿与表皮成45°角进针，若未见血可抽出再行穿刺，进针后不可左右拨动，每次采血20—30ml时兔仍可存活。

耳静脉放血 在温暖室内将兔固定。在兔耳静脉自下而上选择切口部位。用刀片割破静脉后，血液自然滴落收集。出现凝集时用干棉球拭去。每次放血25ml。四周后加强免疫，又可获高效价抗血清。

颈动脉放血 兔仰卧固定，颈部剪毛消毒，剪开皮肤，暴露颈部肌肉。用手术刀柄分离肌层，找到搏动的颈动脉。分离出动脉5cm长。分离出的动脉远心端用丝线结扎，近心端用动脉钳夹住。两端之间用虹膜剪剪一V形口。从切口处向心方向插入直径1.5mm塑料管，管的另一端放入收集容器。松开动脉钳，血流即流入收集器内。兔流血死亡。可收集血液80—120ml。

收集的血液自然凝固，室温下放置1小时，然后放入4℃冰箱过夜，次日分离收集黄色透明血清（3000rpm，20分钟）。检查血清效价和纯度。抗血清分装并冷冻保存，或用饱和硫酸铵沉淀，4℃保存。

3. 抗血清效价测定

(1) 试管法

①材料及设备

试管架 小试管 滴管 温箱 生理盐水 兔抗鼠IgG抗

血清

鼠IgG溶液 (1mg/ml)

② 方法

试管架上依次排放12—18只小试管。每只管内各放入0.5ml生理盐水。吸取0.5ml抗血清放入第一管，混匀后吸取0.5ml放入第二管，依此法稀释至最后一管时，混匀后弃去0.5ml混合液。沿每支试管管壁加入抗原（鼠IgG）0.5ml。加毕，将试管架放入37℃温箱内过夜，次日观察。不生成抗原抗体沉淀反应的管号，其前一管的稀释度即该抗血清的效价或滴度。用此法测定抗血清的效价应该达到1:1024。

(2) 免疫扩散法

① 材料及设备

巴比妥钠盐酸缓冲液0.1M，pH8.6（巴比妥钠18g，1NHCl 18ml，加蒸馏水至1000ml）。

琼脂糖 NaN_3 ，载玻片 吸管 鼠IgG 免抗鼠IgG抗血清

② 方法

100ml 0.1M，pH8.6的巴比妥盐酸缓冲液内，加入琼脂糖0.8g。加热溶解至透明（加热后若有液量损失则补足容积至100ml），加入百分之二 NaN_3 。趁热将琼脂糖溶液浇到载玻片上，每片约需3ml。冷却后，用吸管在琼脂糖上小心打孔（直径3mm）。一般为梅花型，即中央一个孔，周围6个孔，孔距2mm。中央孔内加入10 μ l抗原（鼠IgG），四周孔内依次加入连续稀释的抗血清各10 μ l（稀释方法参见试管法）。加毕，放入湿盒，在37℃下保温4小时或室温放置过夜。观察时，可根据出现沉淀线的孔而判定抗血清效价。例如，沉淀线出现在第6孔，则该抗血清效价为1:64。用此法测定抗血清效价时，一般要求效价为1:64。

4. 抗血清的纯度鉴定

免疫电泳

① 材料与设备

缓冲液与琼脂糖见前免疫扩散法

载片 (7.5 × 2.5cm) 电泳仪电泳槽 粗滤纸 解剖刀
吸管

②方法

用0.1M, pH8.6巴比妥钠盐酸缓冲液加热融解的琼脂糖浇到清洁载玻片上, 凝固后开槽和打孔, 但槽内琼脂糖在电泳结束前不移去。孔内加样品, 本例中样品为免抗小鼠IgG血清。样品在电场中向负极移动, 因此孔开在偏正极端。电泳槽内加巴比妥钠盐酸缓冲液。载片置于电泳槽凹处, 以缓冲液湿润的粗滤纸为盐桥搭在载片两端。接通电流, 电压120V。室温下, 电泳1小时结束。取下载片, 除去槽中的琼脂糖条, 加入小鼠IgG。载片放在湿盒内, 37℃, 4小时或4℃冰箱内过夜后, 即显现沉淀线。根据沉淀线的条带形状及位置可判定抗血清纯度。在本实验中, 若靠近负极端呈单一弧状沉淀线则表明纯度高。

5. 从抗血清中提取免疫球蛋白

因各种免疫学技术之需, 可从抗血清中提取IgG。方法除前已述及的小鼠IgG饱和硫酸铵提取法外, 还可使用硫酸钠盐析或冷乙醇法。此外, 进一步纯化抗血清还可采用各种层析方法, 例如葡聚糖凝胶层析、凝胶过滤或离子交换纤维素层析等。

(1) 用DEAE-纤维素分离IgG

①材料和设备

DEAE (二乙基氨基乙基) 纤维素, 如DE-52
PBS 0.005M pH7.0—7.3 1N NaOH 1NHCl 布氏漏斗或砂芯漏斗 层析柱 分部收集器 紫外分光光度计

②方法

a. 取适量 (依柱大小而定) DE-52干品放在1N NaOH溶液内 (15ml NaOH溶液/g DE-52), 混匀轻轻搅拌30分钟, 用布氏漏斗抽滤, 反复用NaOH洗至无色。用蒸馏水充分洗滤三次。将滤饼加入1NHCl中搅拌均匀后过滤。用蒸馏水充分洗滤以除去游离酸。再将滤饼悬浮于1N NaOH中搅拌均匀过滤, 并用蒸馏水充分洗滤直至滤液呈中性。将离子交换纤维素悬浮在缓冲液内

(3g/100ml) 静置。若上部液体混浊，则用缓冲液倾洗数次，直至把不下沉的过细颗粒去掉为止。

b. 装柱

柱也可自制。柱直径1—2cm，与高度之比可为10:1。柱的下端放一层尼龙绢，只允许缓冲液通过，而纤维素不能通过。

柱底部接细塑料管，用夹子夹住后，将缓冲液加入柱内。松开夹子，排出气泡后，再夹住塑料管。将离子交换剂混匀加满层析柱。待底部形成约5cm的沉积层（柱床）时，开启夹子，使缓冲液流出，逐步加入纤维素悬浮液。注意柱床要连续，不可形成界面，直至柱床达到要求高度（例如25—30cm）。

c. 加样

加样前，过柱缓冲液的pH值应符合要求。为防止加样时扰乱床面，可加滤纸片或葡聚糖凝胶。加样量与柱床大小有关。一般柱床吸附样品后形成的带不应超过柱床体积的10%，这有利于洗脱过程中的再吸附。盐析法提取的免疫球蛋白25—100mg，一般用1×30cm（干重3—4g）的DE-52即可得到满意的分离效果。若从全血清中分离IgG，每克DEAE-纤维素柱约可分离1ml血清。

样品在上柱之前，需对洗脱用缓冲液作平衡透析。透析需24小时，中间换液数次，以除去样品中的 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} 。

加样前，开启夹子，使柱的液面下降到柱床表面下1—2cm。这时，小心把样品加到柱床表面，待样品进入柱床后开始加小量缓冲液进入柱床。然后用连有细塑料管的橡皮塞加在柱顶。塑料管连接洗脱液瓶，往柱内加适量缓冲液，并开始洗脱。

d. 洗脱 洗脱液流速20ml/小时，可用蠕动泵或霍夫曼夹进行控制。

e. 收集和检测

洗脱液可用自动分部收集器收集。峰值检测可用20%磺基水杨酸或紫外监测仪。洗脱液出现的第一峰即IgG。定量检测可用紫外分光光度计。

f. 第一峰收集完毕后，若无需回收其余蛋白质部分，可用

1N NaCl洗脱，然后再用缓冲液平衡备用。

(2) 凝胶过滤分离IgG

凝胶过滤技术中，最常用的凝胶是不同交联度的葡聚糖凝胶即Sephadex。在分离IgG中可用G-75或G-100。

① 材料和设备

Sephadex G-100

缓冲液等与离子交换纤维素所用相同

② 方法

a. 凝胶准备 称取适量Sephadex G-100放入500ml烧杯中。加入缓冲液（为凝胶量的5—10倍），用玻棒搅拌混悬。在沸水浴中将悬浮液加热近沸5小时，或在冰箱中（4℃）自然溶胀72小时。上柱前反复倾去微细颗粒，直至上部澄清为止。

b. 装柱 可采用1.3×54cm柱。柱垂直装在铁架上，注入1/3柱高的缓冲液。将膨胀好的凝胶沿管壁倒入，使其自然下沉。同时打开柱底塑料管夹使缓冲液流出。凝胶自然沉积至距柱顶10cm处。凝胶表面可放一滤纸以备加样用。开启柱顶部的缓冲液使之通过柱床，使柱床平衡。

c. 加样 小心吸去柱床顶部的缓冲液，然后把经过透析的样品缓缓加入，不可扰乱床面。样品加毕，开启出液口使样品进入柱床，待样品一进入柱床，即开启洗脱缓冲液进口，开始洗脱。

d. 洗脱 可通过紫外监测仪或20%磺基水杨酸对洗脱物作定性检查。分部收集。IgG在第一峰出现。样品洗脱完毕，进行凝胶再生，可重复使用多次。将收集的IgG装入透析袋，用冷风吹或用高纯蔗糖或聚乙二醇使之脱水浓缩保存。

(二) 微量淋巴细胞毒试验

检验细胞表面组织相容性抗原可以用补体介质细胞毒性测验方法。作为常规方法，其灵敏度及重复性均较满意。现介绍一种改良的Terasaki方法，供检测淋巴细胞表面抗原。

(1) 材料和设备

培养液：等量199培养液和PBS液混合，添加5%胎牛血清（PBS： Na_2HPO_4 0.725g， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.180g， NaCl 9.0g溶于蒸馏水中至1升）。

麻醉剂：15g三溴乙醇溶于异戊醇至10ml。用蒸馏水稀释80×，4℃保存。可存放二个月。

抗血清：用于细胞毒性试验的抗H₂血清按NIH目录中的免疫方案制备

补体：从20只兔（2—3周龄）收集血清，检查补体活性。将高效价低本底的血清分装，每份100μl贮于-70℃。一旦解冻不要再冷冻。

固定液：用含20%甘油的蒸馏水，将戊二醛稀释为1%浓度，用作固定液。该液不能贮存。

板型滴度板的制作如下：5mm厚丙烯酸酯板切割成50×40mm。每板的表面刻为48个小方块。0.5mm厚的塑料框粘在塑料板边缘。盖玻板大小与滴度板相同，2mm厚。经充分洗涤可重复使用。

增湿器：电动增湿器通过超声波产生冷雾并覆盖板面，防止升温 and 干燥。

淋巴结细胞悬液制备：给小鼠体内注射三溴乙醇（10—15μg/g体重）进行麻醉。1分钟后，剪开左侧或右侧覆盖在鼠踝部或颈部浅表淋巴结上的皮肤，移出淋巴结，放入盛有199—PBS—5%FCS的器皿内。小鼠经缝合伤口可继续生存。把淋巴结破碎、过滤，使成单细胞悬液。离心洗涤，调节细胞密度为 2×10^5 /ml。用0.8%台盼蓝检查细胞存活率应为85—90%之间。

(2) 方法

① 约含2000个细胞的1μl悬液滴加到滴度板的每个方格内。在滴度板未加覆盖前，全部操作均应在电子增湿器下进行，防止液滴干燥。

② PBS稀释的抗血清加到板上的细胞悬液内。可用1μlPBS代替抗血清作空白对照。加盖后，37℃温育10分钟。

③10分钟后开盖，加入1 μ l补体，覆盖盖板，在37 $^{\circ}$ C下培养60分钟。

④培养后，除去盖板，在每个方格内加入1:1固定液。加盖板并以乙烯基胶带封固边缘。该板可在10 \times 物镜的相差显微镜下检查。

⑤在10 \times 物镜下调整相差。活细胞明亮、死细胞黑暗，容易识别。该板冷藏10天仍可检查。

细胞死亡率计算：每格检查200—300个细胞，计算（死细胞数/全细胞数） \times 100

该法的主要缺点是需用增湿器。若使用国产72孔HLA试验盒则可简化。这种方法是在每孔中加入5 μ l医用石蜡油，然后依次加入1 μ l抗血清，1 μ l淋巴细胞，温育后加入补体5 μ l，再次温育后加入5%伊红（Eosiny）水溶液3 μ l。5—10分钟后，加入中性甲醛8 μ l，静置2小时后读数。可用普通显微镜判定结果，死细胞呈暗灰色，活细胞不染色，有折光能力，为亮点。

（三）植皮

挑选15—20克左右的小鼠，称重，编号，麻醉，剪毛。将小鼠背部朝上，四肢固定于手术板上，选择小鼠躯体背部两侧为手术区，进行皮肤消毒。然后左手用弯镊取一小处皮肤提升成圆锥状，右手用弯头剪剪一圆形或椭圆形1厘米左右大小的皮块，放入经过消毒盛有生理盐水和下铺滤纸的培养皿内，将植片的真皮面朝上，展平，以同法处理另一小鼠的植片。除去植片的筋膜，然后将两块植片交换，分别移植至另一同系小鼠预定手术部位，用凡士林纱布覆盖及石膏绷带固定。于第12天拆去包扎，进行观察。

（白琴华）

第四节 电子显微镜技术

17世纪英国人Hooke (1635—1703) 用显微镜观察到细胞，打开了微观世界的大门。人们借助显微镜能直观的看到肉眼所看不到的微细结构世界。目前光学显微镜的发展已达到十分完善的程度，而且应用也相当普遍，然而要想借光学显微镜观察更微小的物体，比如细胞内的微细结构，光学显微镜就受到限制。后来，德国理论光学家埃贝从理论上证明：照明光波的波长是限制光学显微镜分辨力的根本因素。人们为了进一步提高分辨力，寻求新的光源。1931年德国的Ruska等研制成世界上第一台电子显微镜，当时放大率仅12倍。1940年第一批商品电镜出现，分辨率为25 Å，大大延伸了人们的观察力。到现在虽只有多年，但电子显微镜的发展是相当惊人的。随着电子显微镜的发展和制样技术的不断改进，人们不仅能看到细胞内的结构，还能观察生物大分子和原子结构。电镜已成为生物学和其他学科中不可缺少的有力工具。

(一) 电子显微镜

1. 透射式电镜装置简介

图4-2是电镜的纵剖面示意图，最上端是电子枪，底座是操纵台和抽气机所在的地方。标本放进标本室之后，必须将空气抽掉才能进行工作。显微镜本身呈圆柱形结构。从阴极发射的电子，飞向阳极。在阴极和阳极之间的均匀电场中被加速，这个电场有数万伏特的电压。用作会聚透镜的是一磁场，它使电子流聚成一细窄的束，把发散的射束引到标本室中的样品上，观察的样本铺在用福尔瓦 (Formvar) 制的薄膜上。膜附在没有磁性的铜网上。福尔瓦膜能透电子。电子的射线穿过标本后散射开来，前进到磁力物镜，通过物镜形成初步放大的像。在物镜中放置一个孔

穴光阑，孔穴具有一定的直径，当以一定角度散射的电子处于光阑孔穴之外时，就会被光阑挡住，而不参与造像。样品的初级像再经过投射镜放大若干倍，形成终端像。终端像可在电子显微镜的屏幕上被观察到。同时还可定影在照相底片上。为了获得较大的图像，并自如地调节放大率，通常还在物镜与投射镜之间放置一个中间透镜。整个仪器在真空中进行。湿的及活的样品不能观察。

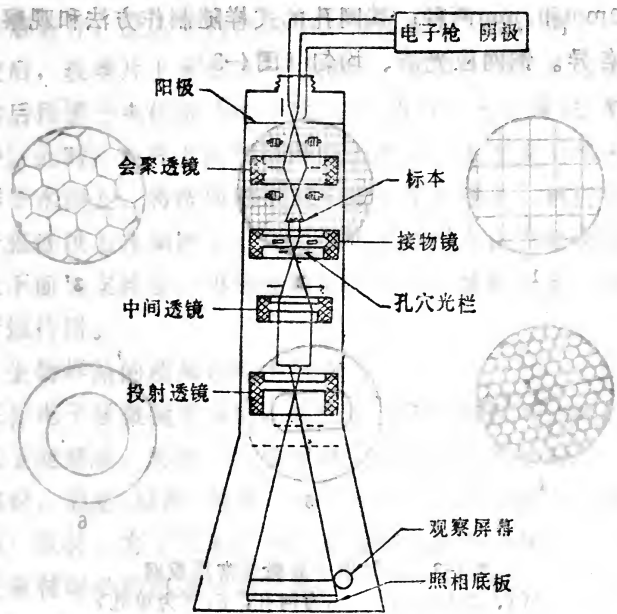


图4-2 电子显微镜成象的模式图

2. 电子显微镜中常用的长度单位

电子显微术中，常用的长度单位是以微米(μm)，毫微米(nm)和埃(\AA)来表示的。它们之间的换算关系如下：

$$1\mu\text{m} = 1000\text{nm} \quad 1\text{nm} = 10^9\text{\AA}$$

所以：

$$1\text{mm} = 1000\mu\text{m} = 1,000,000\text{nm} = 10,000,000\text{\AA}$$

$$\text{即 } 1\text{mm} = 10^3\mu\text{m} = 10^6\text{nm} = 10^7\text{\AA}$$

$$1\text{\AA} = 10^{-1}\text{nm} = 10^{-4}\mu\text{m}$$

3. 电子显微镜研究的技术方法

(1) 样品载片 (金属载网): 在光学显微镜工作中样品是放在载玻片上的。而在电子显微镜中, 超薄切片和细菌、噬菌体、病毒等悬液的样品是放在一种特制的透明薄膜上, 这种薄膜附着在金属网上, 金属网被称为铜网。铜网一般是用很薄的铜片腐蚀而成, 也有用镍、铬、银和白金等稀有金属制作的。常用的铜网分为直径2mm和3mm两种; 其网孔的式样随制作方法和观察样品的不同而各异。铜网应光洁、均匀 (图4-3)。

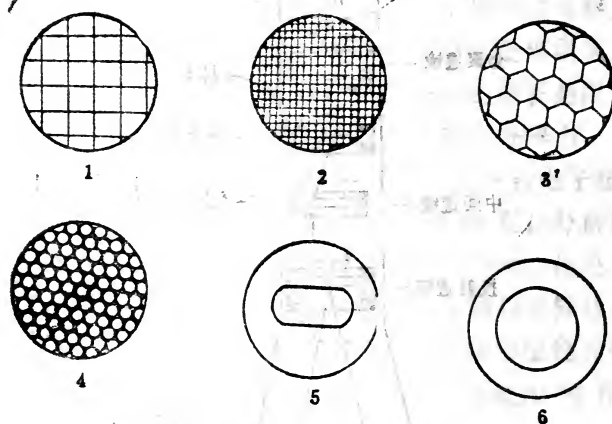


图4-3 透射电子显微镜常用载网
(1、2为方孔, 3、4为网孔, 5、6为单孔)

(2) 铜网的清洗: 电镜所用的铜网需非常清洁, 即使是新铜网也要加以清洗。常用的清洗方法是: 将铜网放在小烧杯内, 放入少许硫酸或硝酸, 用玻棒轻轻搅动, 3分钟左右。使铜网发亮即倾去酸, 用水洗数次, 氨水中中和呈淡蓝色时, 水洗数次, 再用重蒸水洗几次, 从酒精中取出后干燥备用。使用过的铜网先用氯仿或醋酸异戊酯浸泡以去掉支持膜, 再按上述清洗法处理。

(3) 样品支持膜: 电镜的样品是附着在很薄透明支持膜上的, 支持膜则附着在铜网上。支持膜的厚度不得超过 200 \AA ; 因为膜太厚会增加电子的角散射, 使样品图像的反差及其结构的分辨率显

著降低。制作支持膜的材料各异，制作方法也很多，这里仅就最常用的一种方法进行介绍，最常用的是聚乙烯醇缩甲醛，即Formvar，为一种透明塑胶，它制成的膜比较结实。它可被二氯乙烯、二氧六环和氯仿溶解，常用的浓度为0.2—0.5%。

制膜方法：主要有二个步骤，先设法将塑料薄膜浮在清洁的水面上，其次是将水面上的支持膜沾附到金属网上，用一块表面光洁的载玻片，浸入塑料溶剂中，慢慢直立提出，稍待一会，溶剂挥发后，玻璃片上就形成一层薄膜，用刀片沿玻片边缘将膜划痕，然后用镊子夹住玻片的一边，以垂直或与水面呈45°角缓缓压入水中。此时，玻片上的塑料薄膜借助水的表面张力与玻片脱离而漂浮于水面上。将洗净的铜网平放在支持膜上，然后用相应大小的一张滤纸盖在铜网上。此时由于滤纸吸水作用很快吸到全部铜网及下面的支持膜。再迅速将沾有铜网的滤纸提起，放在培养皿内干燥待用。

4. 生物样品的超薄切片的制备

在作电子显微镜观察时，首先需将生物材料制成薄的标本，以便电子能穿透，同时，还要保存生物材料的原有结构。这就要求针对取材、固定、浸酯、包埋、切片等一系列程序提出严格要求。

(1) 取材：为了尽量保持所取材料的生活时状态，从动植物组织上取材时必须迅速准确可靠，争取在几秒钟之内将材料放进固定液中。材料放在0—4°C低温条件下操作，组织块应切成1mm³或更小。

(2) 固定：为了使固定剂尽快到达每个细胞，并及时起到固定作用，除了取材快，组织块小、温度低外，还要求固定剂的穿透速度快。就目前所知，锇酸（四氧化锇）和醛类是比较好的固定剂。锇酸是一种金属盐类，它的水溶液是中性的（pH7.2—7.4），它主要对生物组织起氧化作用，与蛋白质化学结合形成交链而能稳定蛋白质。它与不饱和脂肪酸及脂肪链结合形成复合物。它与细胞膜、线粒体、细胞浆的某些颗粒的亲合力较强，能较完满地保存微细结构。但对碳水化合物的保存较差，对核酸的保护也很

差，而对核蛋白保护很好。四氧化锇几乎能与所有的细胞成分化学结合并使其稳定。因其分子密度高故电子染色作用产生了良好的反差。但由于分子较大，在组织内扩散很慢。常用的固定液是0.5—2%锇酸。锇酸毒性大，对眼睛和呼吸系统有影响，操作时应_在通风橱内进行。

醛类固定剂以戊二醛较好。醛类固定剂穿透力较强，固定速度快。虽然它不与糖元起化学结合作用，但能稳定糖元。戊二醛固定组织时，可保存两周时间。

①两种常用固定剂的配制法

A. 锇酸：用醋酸巴比妥缓冲液配成1%的锇酸固定液是公认较好的配方。巴醋缓冲液配制方法

| | |
|-------------|-------|
| A液：巴比妥钠 | 2.94g |
| 醋酸钠 $3H_2O$ | 1.94g |
| 双蒸水加至 | 100ml |
| B液：氯化钠 | 8.06g |
| 氯化钾 | 0.42g |
| 氯化钙 | 0.18g |
| 双蒸水加至 | 100ml |

巴醋缓冲液配制1%的锇酸固定液的方法如下：

| | |
|--------|-------|
| A液 | 10ml |
| B液 | 3.4ml |
| 0.1N盐酸 | 11ml |
| 双蒸水加至 | 50ml |

调pH至7.2—7.4，0—4°C冰箱保存，用时加2%锇酸25ml。

2%锇酸原液：

| | |
|---------|------|
| OsO_4 | 1g |
| 双蒸水 | 50ml |

B. 戊二醛固定液：

a. 用0.2M二甲砷酸盐缓冲液配戊二醛固定液。先配制0.2M二甲砷酸钠缓冲液 ($NaCH_2AsO_2 \cdot 3H_2O$)：二甲砷酸钠4.28g加

双蒸水100ml, 用0.1N盐酸调pH至7.2—7.4。在0—4°C下保存。

戊二醛的配比如下:

| 戊二醛最终浓度(%) | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| 0.2M二甲砷酸缓冲液(ml) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 25%市售原装戊二醛(ml) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 16 | 20 |
| 双蒸水(ml) | 46 | 44 | 42 | 40 | 38 | 34 | 30 |

固定组织时可用2.5—5%的戊二醛。固定细胞时则可用1—2.5%戊二醛固定液。

b. 用磷酸缓冲液配制戊二醛固定剂

将36ml至40.5ml的0.2M磷酸氢二钠加14至9.5ml的0.2M磷酸二氢钠, 配成0.2M磷酸缓冲液。

磷酸缓冲液配制不同浓度的戊二醛固定液

| 戊二醛最终浓度(%) | 1 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|----|-----|-----|-----|----|----|----|
| 25%戊二醛原装液(ml) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 16 | 20 |
| 0.2M磷酸缓冲液(ml) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 重蒸水(ml) | 46 | 44 | 42 | 40 | 38 | 34 | 30 |

② 固定方法

固定剂和固定方法很多。目前公认戊二醛-锇酸双固定较好, 即缓冲的1—5%的戊二醛固定后, 再经1%缓冲的锇酸固定液做后固定。二者互相取长补短, 使细胞的超微结构得到良好的保存。

固定时用锋利的刀片将材料切成0.5—1mm³左右的小块, 迅速放入戊二醛固定液中, 材料要下沉, 植物材料必须进行抽气。在4°C下固定1—5小时。固定后的材料用缓冲液彻底清洗2小时以上或过夜。然后在锇酸中进行后固定2—3小时。再用缓冲液清洗2—3次或过夜。重蒸水洗一次后, 脱水。脱水试剂一般采用浓度逐渐增加的丙酮或酒精系列。

(3) 渗透与包埋：渗透的方法取决于最后包埋用的树脂，用环氧树脂Epon或Araldite作包埋剂时，最好先用逐渐升级的乙醇脱水，然后再用环氧丙烷和乙醇混合液（1:1）置换乙醇，然后换入环氧丙烷，再用环氧丙烷和环氧树脂（1:1）及（1:2）的混合液渗透。在每种混合液中停留2小时以上，也可过夜，最后转入纯环氧树脂包埋剂过夜，第二天再转换一次。包埋剂浸透的时间，根据所取材料的渗透性能，可以放置1—6天，但要每天换新鲜的包埋剂。下面介绍几种包埋剂的配方。

① 环氧树脂Epon812

A液：Epon812 62ml

DDSA（十二烷基琥珀酸酐软化剂） 10ml

B液：Epon812 10ml

MNA（六甲酸酐固化剂） 8.9ml

将A与B按以下比例混合

硬—————>软

A(ml) 0 3 5 7 10

B(ml) 10 7 5 3 0

加入总体积1—2%的DMP—30加速剂（2,4,6二甲基苯酚）。边加边搅。A液与B液的比例应根据气候不同而变动。A液多则软，B液多则硬。通常冬天使用A:B=1:4，夏天使用A:B=1:9或2:8。以上四种包埋剂，皆忌潮气。配制前，所用器材均需烤干。

包埋前，如是用酒精脱水，得在转入Epon之前经环氧丙烷二次，每次30分钟，然后再换入环氧丙烷和环氧树脂（1:1）的混合液中，停留2小时或过夜，让环氧丙烷慢慢蒸发掉。再用环氧树脂Epon812混合液换2—6次。在37—45℃下聚合12小时，最后在60℃下聚合48小时。

② 环氧树脂Araldity502或cy212的配方

Araldity502 20ml

DDSA 18ml
MNA 2ml

DMP-30 (2%) 0.8ml

用酒精脱水后，逐渐换入环氧丙烷，最后在纯混合树脂中过夜。在80℃下聚合48小时。

③ 618包埋剂

环氧树脂618 5ml
顺丁烯二酸酐(固化剂) 2g
苯二甲酸二丁酯(简称DBP增塑剂) 1.5—2ml
二乙基苯胺(diethyl aniline加速剂) 0.4ml

将618放在30ml的小烧杯内，加热至80℃备用。加入顺丁烯二酸酐，在80℃温箱中继续放5—10分钟，使其溶解并搅拌均匀。冷却到室温，加入DBP，搅拌5分钟备用。用前半小时逐滴加入二乙基苯胺，加完后继续搅拌5—10分钟，即可使用。包埋材料在37℃和45℃下各12小时，最后在60℃下聚合48小时。

④ Spurr氏环氧树脂：是一种低粘度的环氧树脂。化学名称为Vinyl cycloherene dioxide (VCD)

Spurr's环氧树脂配制比例

| 名 称 | 硬度(g或ml) | | |
|---|----------|-----|-----|
| | 标准 | 硬 | 软 |
| VCD(Vinyl cyclohexene dioxide)(单体) | 10 | 10 | 10 |
| DER736(Diglycidyl ether of polypropylene glycol)(增塑剂) | 6 | 4 | 7 |
| NSA(Nonenyl Succinic anhydride(固化剂) | 26 | 26 | 26 |
| DMAE(Dimethyl aminoethanol)(加速剂) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |

酒精脱水之后，逐渐加大Spurr氏混合液的浓度。最后在全脂混合液中停留一夜。在70℃温度下聚合12小时即可。

(二) 生物材料的超薄切片技术

超薄切片技术是电镜技术中应用得最多和最重要的一个环节。它为电子显微镜观察提供极薄的样品切片。厚度一般在500—1000 Å左右。

1. 切片机

主要分热膨胀式和机械推进式两种。前者以LKB型号的超薄切片机为代表，后者以Porter—Blum型号为代表，两种仪器性能都很好，都有一个装样品块的活动臂。臂向下运动时通过刀刃。在每次切削冲程的同时，样品臂对着刀刃作出微小的推进，切片得以从样品块的表面上脱落下来。刀上装有一个含液体的小水槽，切片离开刀刃就漂浮在水槽的液面上。

2. 玻璃刀

玻璃刀是目前使用得最普遍的一种超薄切片刀。近年来使用钻石刀的也不少。虽使用寿命长但价钱较贵。玻璃刀制作价格便宜，可用制刀机做刀。LKB制刀机将玻璃条断成 2.5×2.5 cm的小方块，再制成不同角度的玻璃刀。一把好刀，刀刃必须平直，冲角要小。在聚光灯下用双筒立体显微镜可以检查刀刃的好坏。在高倍镜下，最佳部分的刀刃是一条平直的亮线。而折光粗有锯齿的刀刃部分，不能用来切片。一般选用左侧的刀口，可用刀口占整个刀口的 $\frac{1}{4} - \frac{1}{5}$ 。刀上装上一个不漏水的水槽。它通常用金

属条或胶带制成，再用清洁的石蜡封住金属或胶带与玻璃的结合口，以防漏水。水槽液一般用重蒸馏水。

3. 样品块

在进行超薄切片前，应先将样品块修成适当的形状和大小。修块的目的是除去组织周围多余的包埋介质或不需要的部分。使切片尽可能被所观察的材料所占有。样品块表面的形状可根据包埋材料的形状而定，通常修成梯形，也可修成长方形。梯形的顶边与底边平行，底边应稍长于顶边，这样才易切出连续的切片。

也有利于切片离开刀刃，避免切片粘住刀刃的毛病。

4. 样品块与刀刃的调整

把标本和刀分别安装好，使包埋块面的平行边与刀口平行，向前转动切片机粗调旋钮，慢慢把刀推进标本，再用细调节推进，直至在目解剖镜下观察时，刀和它的反射光之间的黑色间隙消失为止，这时样品与刀的距离已很近了。当样品与刀对准后，就要进行切片，每一冲程切下一片切片。切下来的切片一般应为连续切片带，如不成带，则应重新修整块面，使上下边调平行，切速适当慢些，或换一把锋利的刀。切片的厚度可用仪表调节，但所指的是样品臂的热进尺厚度，并非代表切片的实际厚度。切片厚度一般根据水槽内切片的表面和下表面反射的光所产生的干涉色来判断。银灰色和白色时切片大约是 $500-700 \text{ \AA}$ ，金色及紫色的切片太厚，无法进行观察。一般切片15—20分钟后即可停机进行捞片操作。这时，开动切片机上的冷却扇，使样品臂冷却。约10分钟关电扇，再重新调整样品块的距离，继续切片。捞取切片时，先用睫毛笔将切片带分成小段。用镊子夹住铜网的边缘，直接贴在水槽中的切片上轻轻提走即可。贴有样品的铜网，放在洁净的滤纸上，干后保存或进行染色。

5. 制备优良切片的条件及切片中的问题

(1) 切片的成功与否多数依赖于包埋组织和包埋树脂的硬度搭配，但脱水与浸透也是很重要的。在配制包埋剂时，应确保树脂充分混合，样品浸透完全，以及聚合时均匀一致，软硬度要适中。包埋硬度大，可以切较薄的切片，包埋块比较软，则可以切出较大的切片。(2) 样品块的切削面积大小对切片也有影响，要切薄片时，应把样品块顶端修得细小。(3) 刀的角度也很重要，一般适中的组织块选用 45° 左右的划痕角， $3-5^\circ$ 的间隙角。(4) 水槽中的水面应与刀口在同一平面上，或略低于刀口。(5) 切速慢可得到较大切片，切速快可得到较薄的切片。要切出没有刀痕、空洞及其它疵病的，平整并粘连成直带的切片，是电子显微技术中最难操作的。

在切片过程中会出现颤痕、刀痕、跳片及切片带水等问题。影响切片质量及观察效果，产生有缺陷的切片，几乎总是因为刀、刀角、渗透、聚合有问题或者技术操作不熟练，而几乎可以忽略现代化切片机发生故障而造成切片的缺陷。切片中的故障很难列表分类，因为在切片过程中存在许多相互关联的变量。切片时产生与刀口平行的有规则的厚度不匀的带，这叫颤痕，多是由于切速过高或振动引起的，可减低切速，减小刀角并排除引起振动的因素。如果切片粘在块的上边缘并随着块的下降而消失，这主要是因为用钝刀片修样品块所致，样品块的边缘必须修得像镜子般光滑平整，还有一个可能是块面湿了。也可能切出厚薄交替的切片，原因是刀太钝、样品渗透不好或树脂成分混合不匀引起的不规则聚合。切片时一次切上一次没有切上称为跳片现象。这时切片厚度是预期的两倍。造成此现象的一种可能是预定进刀的量太小，这种情况下切片是灰色的，可以加大进尺，直到切到切片为止。如果交替切片呈紫色或更厚时，可以换一把刀。当样品块过软或修得过陡时，也易产生跳片现象。块软时，可在60℃下烤一夜，使之变硬，太陡的块则应重新修整。由于刀刃上有缺口，在切片上形成一种垂直于刀刃的纹路叫刀痕，纠正的方法是使用刀刃的不同部分。切片时，如果水槽液面太高，样品通过刀刃时会将液体带过刀背，出现这种情况时，可用滤纸小心地将样品块面及刀背上的水吸干。当然在切片过程中还会遇到一些问题，那就要在长期实践中，掌握各种程序的要领，才能排除各种故障，找出补救的办法，切出理想的超薄切片。

6. 染色

目的是增加样品的反差，使超微结构能充分暴露并便于观察。

(1) 组织块染色：在脱水期间进行染色。一般常用的染色剂有0.1—1%磷钨酸(PTA)的70%的酒精溶液，组织块染30分钟，主要染蛋白质。另外最常用的染液是1—2%醋酸双氧铀的75%酒精溶液，组织在染液中停留几小时，也可以过夜。组织块也可在1

—2%醋酸铀的无水酒精中染1—2小时，它除了染蛋白质外还可染核酸。

(2) 超薄切片染色：通常用的染色方法是采用醋酸铀和柠檬酸铅双染色法。这里仅介绍一种染色方法。

① 铀染液配方：醋酸双氧铀2克加50%乙醇10ml充分混合搅拌，用NaOH将pH调至4—5。

② 铅染液：也叫三铅染液。用硝酸铅、醋酸铅、柠檬酸铅各1g加蒸馏水60ml。以上混合液在40℃下搅拌数分钟。加2g柠檬酸钠。搅拌数分钟，然后加4%NaOH16ml，再加蒸馏水使总体积为100ml，用棕色瓶保存。此液在室温下可保存一年。用时将原液用重蒸水稀释（1:7）。

③ 染色方法：用吸管吸取染液，滴数滴至培养皿内的蜡盘或蜡纸上。用镊子取载网漂浮在染液上染色；切片面向下，染3—5分钟后，用重蒸水洗数次；用镊子取载网轻轻接触滤纸，以吸去多余的水，用铀染过的载网放在滴有铅染液的液滴上，切面朝下约10分钟，取出后用重蒸水洗数次，用滤纸吸去多余的水，干后即可观察或保存备用。

(三) 电子显微镜细胞化学技术

电子显微镜细胞化学技术也叫电镜组织化学或超微化学。60年代国际上把电子显微镜技术与组织化学结合起来成为电子显微镜的组织化学技术。电镜细胞化学技术发展很快，应用范围日益扩大，技术方法不断改进和增多。它的目的是将形态结构、化学成分和功能联系起来研究，对在超微结构中的化学物质进行定位研究。

电镜细胞化学显示的方法是从光学显微镜的组织化学演化而来，但与光镜组织化学不同，电镜的组织化学不是以产生颜色反应为依据，而是利用细胞化学产物的电子不透明度来进行识别和定位的。它不用染色也能看得见。所以电镜样品制备的主要特点是利用特异的化学反应，产生不溶性电子致密沉淀物。在显示细

胞内化学物质的定位时要求：①保持组织和细胞良好的形态结构，如果结构失真，则定位困难。②具有高度的特异性，易于鉴别所示物质的属类，才能对实验结果作正确分析。③应有一定的灵敏度，才能显示极微的含量。④生成的反应产物必须在原位沉淀，保证定位的精确性及稳定性。

1. 电镜细胞化学的几个步骤

电镜细胞化学要求保存细胞组织的形态，材料须经固定、脱水、包埋和切片等处理。醛类和四氧化锇可作保存细胞微细结构的固定剂。最常用的醛为戊二醛和多聚甲醛，它们可以保存微细结构及酶活性，有时也可用二者的混合液作固定剂。用中性的二甲砷酸钠缓冲液配制醛溶液。醛的浓度为0.2—2%，浓度太高会破坏酶的活性，损伤细胞的微细结构。固定后样品块要用冷的缓冲液冲洗几次，一般在1小时以上，也可以过夜。以上步骤应在4℃下进行。材料经戊二醛初固定后，要冷冻切成40—100μm的薄片，然后进行孵化反应。用锇酸作后固定。后固定能稳定已被醛保存的微细结构，可经受脱水包埋的处理。用锇酸作后固定是电镜细胞化学必须步骤。

2. 酶的细胞化学

酶的细胞化学方法是研究酶在细胞内的分布。酶活性是靠对底物的作用来显示的。所以对于酶的显示，所用试剂应比较纯，孵育的温度和保温方法要得当。

(1) 5'-核苷酸酶能催化核糖核苷和去氧核糖核苷的5碳位上的磷酸。它可被镁离子和锰离子激活，而为氟化钠(0.1M)、硼酸钠(0.08M)所抑制。中性5'-核苷酸酶的最适pH为7.5。该酶常与膜结合，存在于许多不同类型的细胞上。在植物中，主要存在于核膜、质膜及内质网上，而在动物中则多在浆膜如肝细胞的胆毛细管区域的浆膜，内皮细胞近血窦的浆膜上。它与环腺苷一磷酸(CAMP)系统有关，影响细胞功能的调节及核酸的降解。电镜显示5'-核苷酸酶的方法，是以腺苷一磷酸为底物。在pH7.2的情况下分解出磷酸，磷酸立即与铅结合形成磷酸铅沉淀物。电镜细

胞化学采用Wachstein及Meisel (1957) 提出的方法。操作步骤如下:

①固定: 迅速切下组织, 切成 1mm^3 的小块, 放入 0.1M 二甲砷酸缓冲液配制的 2% 戊二醛中。在 4°C 下, 动物组织固定1小时, 植物组织固定2小时。

②洗涤: 在 4°C 下, 用 0.1M 二甲砷酸缓冲液冲洗组织2小时以上或过夜, 中间换2—3次。 0.1M 砷酸缓冲液中含 5% 蔗糖及 10% 二甲基亚砷。

③在低温下, 将样品块切成 $40-100\mu\text{m}$ 的薄片。在 37°C 下孵育30分钟。

对照则应在孵育前, 将样品加热, 使酶失活, 并应去掉孵育液中的底物5-核苷酸酶。

孵育液的配制方法:

| | |
|----------------------------------|-------|
| 0.2M Tris—maleate pH7.4 | 4ml |
| 5-核苷酸钠 | 5 mg |
| 重蒸水 | 4ml |
| 2% 硝酸铅 | 0.6ml |
| 2.5% 氯化锰 | 1.0ml |

④孵育后, 用 0.1M 二甲砷酸缓冲液冲洗2—3次。

⑤用 0.1M 砷酸缓冲液配成的 1% 锇酸固定2小时。

⑥后固定后用重蒸水冲洗几次。

⑦用各级浓度酒精脱水, 在脱水过程中可用醋酸双氧铀染色。

⑧按常规方法浸酯、包埋。聚合后作超薄切片, 用铀染不用铅染即可进行电镜观察。

(2) 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)

动物体内的肝、肾和肠粘膜细胞中, 均含葡萄糖-6-磷酸酶, 它与微粒体结合, 定位于光面内质网上。它能将糖原分解为葡萄糖, 进入循环而维持血糖, 因此是糖代谢的关键酶, 此酶的缺损可导致一些肝糖原储存的疾病。在植物中, 对该酶还未作过大量

研究。Ha11 (1977年)等人曾在甜菜的细胞质膜和液泡膜上发现有该酶的定位。

葡萄糖-6-磷酸酶在pH6时活性最强，在pH8时最稳定，而在pH5时就会变性。细胞化学反应的最适pH为6.5—6.7。此时葡萄糖-6-磷酸水解并释出磷酸。它与铅结合可生成不透明的颗粒沉淀。操作步骤如下：

①用0.1M二甲砷酸缓冲液配制的2%戊二醛，内含8%蔗糖，在4℃下固定30分钟。

②二甲砷酸缓冲液(0.1M, pH7.2, 含蔗糖8%) 4℃冲洗1小时。

③冷冻切成100μm左右。

④在下述溶液中孵化30分钟，37℃。

| | |
|-----------------------------|--------|
| 葡萄糖-6-磷酸钠(或钾)盐 | 12.5mg |
| 蒸馏水 | 13.5ml |
| 0.2M—Tris—maleate缓冲液(pH6.7) | 10ml |
| 2%硝酸铅 | 1.5ml |
| 蔗糖 | 2g |

⑤用0.1M砷酸缓冲液冲洗2—3次。

⑥用1%银酸二甲砷酸缓冲液固定1—2小时，4℃。

⑦各级浓度酒精脱水，然后浸酯。

⑧环氧树脂包埋。

(3) 腺苷酸环化酶(Acase)

腺苷酸环化酶能使ATP转变为CAMP, CAMP进入细胞质中，使胞质中CAMP浓度增高，而引起各种特异反应。因此，CAMP被称为第二信使。CAMP与激素有关，与分化和细胞分裂也有关。腺苷酸环化酶和哺乳类组织细胞浆膜有关。它存在于动物浆膜上，控制着细胞内酶反应的速率。植物中它定位在质膜核膜和内质网上。它的最适pH为7.4。可被 Mg^{2+} 离子激活，常用Reik(1970)等人的方法进行电镜观察。

①在1%戊二醛(0.5M二甲砷酸—硝酸缓冲液，pH7.4，含

4.5%的葡萄糖)中固定1—2小时。用缓冲液(含4.5%葡萄糖)洗一夜后,切成小块。

②在30℃孵育介质中温育30—60分钟。

温育液的成分如下:

| | |
|-----------------------|-------|
| pH7.4的Tris—maleate缓冲液 | 80mM |
| 茶碱 | 2mM |
| 硫酸镁 | 4mM |
| ATP (或AMP-FNP) | 0.5mM |
| 硝酸铅 | 4.8mM |
| 葡萄糖 | 8% |

③缓冲液洗2—3次。铁酸固定1—2小时。脱水后,树脂包埋。

(4) 酸性磷酸酶 (ACP)

酸性磷酸酶为非特异性酶,广泛分布于动物组织中,如前列腺、脾及肝等,红血球里也有。大部分组织中定位于溶酶体内,在植物组织中则主要分布在细胞壁、液泡和核中。溶酶体的细胞化学研究,对了解疾病的免疫反应和细胞损伤的影响有一定意义。

它的最适pH为4.5—5.5。大多数组织的酸性磷酸酶能被氟化钠所抑制。

①固定:在4℃条件下,用2%戊二醛(0.1M二甲砷酸盐缓冲液配制,pH7.4)固定1—2小时。

②洗涤:用二甲砷酸盐缓冲液冲洗。样品切成50μm的小块。

③孵育:在37℃条件下孵育30分钟,pH5.0—5.3。孵育液的成分如下:

| | |
|------------------------------|--------|
| β-甘油磷酸钠 (用1NHCl调pH至5.0) | 12.5mg |
| 12%硝酸铅 (终浓度3.3mM) | 0.1ml |
| 蒸馏水 | 1.0ml |
| 0.2M Tris—maleate缓冲液 (pH5.0) | 2.0ml |
| 0.2%硝酸铅 (终浓度2.4mM) | 2.0ml |

④缓冲液冲洗后再用重蒸水洗。脱水、包埋等按常规方法进行。

对照组的孵育液，应免去底物 β -甘油磷酸钠，而加入氯化钠(0.01M)。

(四) 扫描电子显微镜

1965年开始生产商品的扫描电子显微镜。这种仪器的最大特点，就是能使物体的图像呈现出明显的三维结构特征，而透射电镜的图像是二维的。近年来，扫描电镜已广泛应用于生物学、医学、古生物学、地质学、物理学以及冶金学、半导体工业、陶瓷工业、化学工业等学科领域及生产部门，从而促进了各有关学科的发展。

1. 扫描电镜的一般结构及原理

扫描电镜一般可分为三个重要的组成部分(图4-4)。

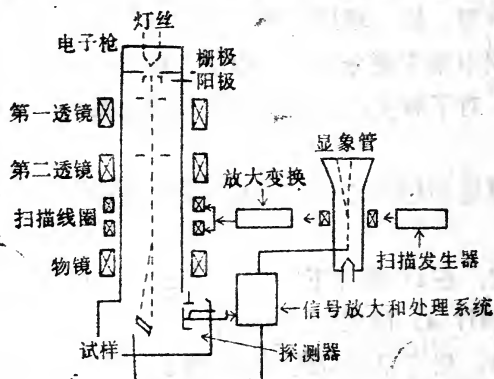


图4-4 扫描电镜的结构原理

(1) 用以产生扫描运动的电子束(即电子探针)系统，共包括三部分：电子枪、电磁透镜和扫描线圈。

电子枪发射出来的电子束，在加速电压的作用下(从2千伏到3千伏之间)，经过三个电磁透镜，会聚成 $30-50 \text{ \AA}$ 的电子束。在位于物镜上部的扫描线圈的作用下，电子束聚焦于样品表面，作光栅状扫描轰击。

(2) 电子束射入样品表面，就可以发生二次电子。二次电子的多少随入射点的凹凸状态而变化。利用这种现象，就可以得到样品表面的各种信息（如图4—5）

在扫描电镜中，用来成像的信号主要是二次电子，其次是背反射电子，这是因为二次电子像的分辨率较高。用作晶体学分析

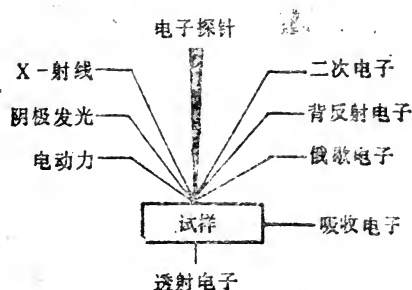


图4-5 电子对样品激发产生的信息

的信号主要是背反射电子和二次电子。因这两种信号能产生电子通道效应。用来分析成份的信号主要是X-射线和俄歇电子。因这两种信号的能量直接表征元素的性质。

(3) 对样品产生的信号的收集、处理和显示，首先决定于信号本身的类型和实验目的，在观察样品形貌的实验中，收集的主要是二次电子及部分背反射电子。扫描电镜的成像系统如图4-6所示。电子束从样品表面所激发出的信号，被检测器所俘获。检测

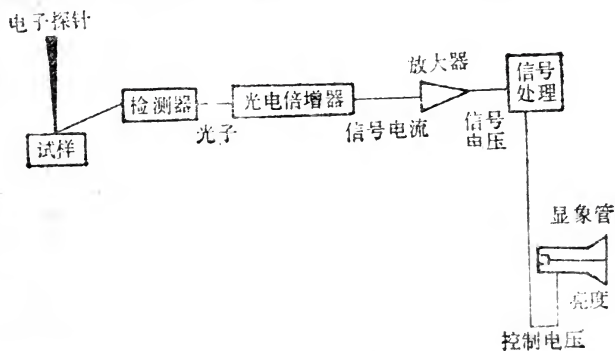


图4-6 成像过程示意图

器包括一个闪烁器和紧接着的光导管。电子信号通过检测器转换成光子，再经过光电倍增系统和放大器转换成电压信号，最后被送到显象管的栅极上。显象管中的电子束在管面上也作光栅状扫描，而且与电子探针在样品表面上的扫描运动同步。加到栅极上的电压信号，可以对显象管面上的光点亮度进行控制。从而就可以获得其衬度与所接收电子信号的强度有对应关系的扫描电子象，直接显示样品的外貌，最终的成像具有突出的三维特征。如果要得到一幅较好的图像，可利用电磁透镜将电子束聚得细些，使电子扫描形成的水平线条多些，照像的曝光时间要长一些。

2. 生物样品的制作方法

生物样品不同于矿物和金属，它具有柔软含水份多的特征。在高真空的电子显微镜中观察样品时，必须进行相应的前处理。样品制作方法按固定、脱水、临界点干燥及喷镀等顺序进行。

(1) 清洗：样品表面的污染物用生理盐水进行清洗。样品切好放入0.2M二甲磷酸缓冲液中放1—2分钟。

(2) 固定：样品放入2%的戊二醛和2%多聚甲醛混合液中(用0.1M二甲磷酸钠缓冲液配)，固定2小时以上或过夜。用缓冲液冲洗2—3次。

用1%锇酸二甲磷酸缓冲液后固定2小时，在4℃下不时摇动。

(3) 冲洗：用冷的二甲磷酸钠缓冲液冲洗3次，再用蒸馏水洗2—3次。

(4) 脱水：用30—100%的上升系列酒精脱水。

(5) 脱水之后进行临界终点干燥。

临界点干燥的原理是，液体在某一温度和压力之下(即在临界点时)，界面就会消失。利用这种现象，将生物样品放在这种液体之中，加热到界面消失的状态时，再慢慢放出气体，使之与外界气压相等，在没有表面张力作用的情况下，使样品干燥。这就是临界点干燥法。一般用作临界点的处理液为CO₂、氟立昂、液氮。临界点干燥的具体方法如下：

①无水酒精脱水之后，把样品在醋酸异戊酯中浸泡30分钟至1小时。

②用滤纸吸去样品上多余的醋酸异戊酯，把它装入样品笼中，笼内事先要放上一层滤纸。为防止样品干燥，最好把滤纸用醋酸异戊酯浸湿。然后把样品笼放入临界点干燥器的样品室中，迅速盖好。

③注入液体 CO_2 ：向样品室中注入液体 CO_2 。事先应将样品室冷却到比室温低 10°C ，这样 CO_2 易进入样品室。有的人在样品笼的上面放三小块如方块糖大小的干冰，使样品室降到 -20°C 左右。然后注入液体 CO_2 。注入液体 CO_2 后的压力比一般60—70大气压略低。但是样品室恢复到室温时，压力就常常升到100个大气压以上。这时，应稍放点气，使气压下降到保险阀不开的程度。

样品室中液体 CO_2 的充盈程度，可从样品室盖上面的玻璃窗查看。

④在室温下静置和液体 CO_2 的更换：打开加热器开关在 20°C 放置15—20分钟。样品中的醋酸异戊酯向液体 CO_2 中扩散。打开放气阀，放出含有醋酸异戊酯的液体 CO_2 ，使得液体 CO_2 的界面达到刚好淹没样品笼的部位。从钢瓶注入新的液体 CO_2 。如果有必要，这一步骤可以反复数次。如果气温过高，这一步则可省略，因为第二次注入液体 CO_2 不易作好。

⑤加温：将样品室加温至临界点温度（ 31.4°C ）以上（例如 40°C ）。这时样品室的液体 CO_2 界面消失，全部变成气体状态。将恒温器的刻度调到 40°C ，样品室就可自动加温。 40°C 时压力表一般应达到110个大气压以上，如果气压低于110，说明注入的液体 CO_2 少了，临界点干燥就会失败。

⑥气体的放出：在样品室加温的状态下，放出 CO_2 气。放出的流量一般是 $1.0—1.5\text{L}/\text{min}$ 。放出全部气体需要40分钟左右。压力表回到零时，打开样品室，取出样品。

⑦金属喷镀：干燥后的生物样品要进行真空喷涂，使生物样品表面具有导电性。金属在真空中加热到某种程度时，就会急剧

蒸发，蒸发的金属在真空中就会落在（附着在）样品表面。样品应放在金属喷度源的对面。

一般的真空喷度仪，是在抽到 10^{-5} — 10^{-6} 托的真空室（钟罩）里，插有几根电极，把加热器连在电极上，将喷镀材料加热。由於扫描电镜样品的表面凹凸不平，真空喷涂时，要将样品进行倾斜旋转，每分钟约自动旋转100转左右。加热器一般用直径为0.5—1mm的钨丝。扫描电镜用的喷涂材料为0.1—0.5mm的金丝或金—钯合金丝（Au + Pd, 6:4）。一般的金属膜厚度为3—30nm。喷涂的速度越快，喷镀膜的颗粒就越细。样品倾斜旋转的时间需要1分钟左右。喷涂后先等几分钟，使喷涂膜稳定，再向真空室（钟罩）内放入空气，恢复大气压。

表面极度凹凸不平而形态微细的样品，在喷涂金属以前最好先喷镀一层碳。喷碳的方法是，把一对前端削成铅笔状的石墨碳棒，用弹簧轻轻地顶着对在一起，先加热到接触点变红，以使污染物飞掉（此时用挡板遮住样品表面），然后很快增大电流，做两三次瞬间喷镀。碳膜的厚度为5—10nm。也有在石墨碳棒的尖端沾上白金丝将碳和白金同时喷镀的方法。

金属喷涂之后，即可进行扫描电镜观察。

(6) 扫描制样失败的原因

①脱水不充分时，醋酸异戊酯和液体 CO_2 就置换不好，干燥也不会完全。

②液体 CO_2 没装满样品室，而样品室加热时， CO_2 液面穿过样品，由于表面张力的作用，就会使微细结构变形。

③垫圈不好，样品室不能密闭，样品室向外漏气，而使实验失败。

3. 生物样品的断裂法

断裂法也叫割断法，是利用扫描电镜观察细胞和组织的内部结构而采用的断裂方法。目前断裂方法很多，这里简单介绍两种。

(1) 环氧树脂断裂法：用环氧树脂Epon812或Araldite Gy-260均可。环氧树脂812必须冷至 -80°C 才能固化，Araldite大约在

-30℃左右固化。

①取新鲜样品切成细长棒状 $1 \times 1 \times 5\text{mm}$ 。

②放入固定液中，冲洗后用各级酒精脱水。

③样品换入环氧丙烷中30分钟。再侵入1:1的环氧丙烷和树脂的混合液内数小时。容器不要盖上，使环氧丙烷慢慢挥发掉。

④包埋：胶囊里装满树脂，将样品插入其中，放置一夜，但不能把聚和剂放入树脂里。样品浸透不一定要很充分。

⑤固化：用低温恒温器和低温冰箱将Araldite冷却到-30℃，环氧树脂812要冷却至-80℃。冷冻剂用乙醚和干冰或液氮。如用液氮，则用TF-1割断器（Eikd厂出）。

⑥断裂：用刀具和小槌将样品断裂。刀具可用单刃的刮脸刀片，刀片夹在两个竹板之间。割断台可用木板，在上面做一个放胶囊的浅槽。

割断时将刀具放在装有样品的胶囊上，用小槌敲击，用力要适当，使样品不发声音就被敲断，其断面似玻璃一样光洁。

⑦除去树脂：将割断的样品投入环氧丙烷中。树脂被溶去后，样品沉入容器底部。用镊子将胶囊取出。2小时后，更换几次环氧丙烷，使样品里浸入的树脂完全除去。如树脂没被完全去掉，样品就得不到良好结构。

⑧临界点干燥：将样品移入醋酸异戊酯中进行临界点干燥。

(2)酒精断裂法：将70%酒精滴在液氮中就会冻结固化，自然出现裂隙。本方法就是利用这一原理。

①将液氮装入苯乙烯泡沫塑料制成的杯子中，上面套一个带孔的铝膜盘。液氮通过盘孔上升，铝膜盘上面放一个铝碟，铝碟里也装满液氮。

②用滴管吸入70%的酒精，同时也吸入已固定好的组织，将它们滴入铝碟里的液氮中。

③滴下的酒精立即冻结，并在液面上来回旋转，2—3秒钟后，就沉入碟底自然断裂。

④将断裂的样品连同铝碟放入冷冻干燥器中干燥。

用这种方法所做出的断裂面是不定向的，断在什么方位，事先无法确定。如果不要求断裂在一定的地方，可使用本方法，样品以小为宜。

有些生物材料如木材、牙齿、毛发、骨骼和指甲等硬的组织，只要去掉表面的尘土和粘液，不要作任何处理即可进行观察。但观察前必须喷上一层导电物质。许多单细胞、培养细胞、游离细胞及血细胞等对固定液的渗透性特别敏感，固定时要特别注意调节缓冲液及固定液的浓度。溶液中可加入蔗糖来增加渗透压。

4. 扫描电镜在生物学上的应用

扫描电镜技术的应用，丰富了生物学科的研究实践，扫描电镜能显示整体生物的整体轮廓。细菌、单细胞、癌细胞及微生物等在扫描电镜下拍成的图片除具有立体感外，还可以看到细致的体形及表面结构，如鞭毛、伪足、纤毛及表面上的花纹图型等。在肿瘤生物学研究中，扫描电镜可以显示正常细胞和肿瘤细胞在整体形态和表面结构等方面的差异，可以找到正常细胞如何变成肿瘤细胞的线索。例如有人发现肿瘤细胞的体积要比正常的大。表面的微突及小泡等数目长短、大小以及其他特征都显示出肿瘤细胞的代谢特别旺盛。植物学中可用扫描电镜观察古代及现代花粉粒的结构。对植物器官建成的研究，可以清晰地了解植物某一器官的形成过程。如对小麦和玉米穗分化的观察，可为农业生产提供有益的参考资料。农业上研究植物的病虫害、良种栽培、植物的生长发育规律等都离不开对它们的花粉、种子、生长锥、根、茎、叶以及它们的细胞变异和形态差异进行观察。这些可通过扫描电镜来取得清晰的图像和丰富的细节。使用扫描电镜除了可以看出整体的细胞或组织的轮廓外，还可以看到冰冻断裂后组织的内部结构及细胞内各种细胞器的立体图象，对了解组织及细胞的性质很有价值。

(五) 核酸分子的电镜技术

利用电子显微镜观察 10^4 埃左右的核酸分子是完全可以的，但

主要的问题是，这类大分子的反差弱，所以要象在溶液中那样，保持完整核酸分子的构型而不断裂，是不容易的。自从kleinschmidt (1962) 提出核酸分子蛋白质单分子膜技术以来，这一方法已得到广泛的应用。其优点在于，应用了蛋白质单分子膜作为核酸分子的基膜，在一定程度上保证了核酸分子的完整性。这种方法又得到了进一步发展，迄今用于电子显微镜观察的已有多种方法，这里介绍最常用的几种核酸样品制备的方法。

核酸分子蛋白质单分子膜技术可分为三种：展开法、扩散法、一步释放法。其原理是：很多球状蛋白质能在水溶液和盐溶液的表面形成不溶性的变性薄膜，在适当条件下这一薄膜可形成单分子层。核酸分子在蛋白质的氨基酸碱性侧链基因的作用下，可吸附在蛋白质单分子层上。然后转移到载网上，利用旋转投影增加反差。最常用的蛋白质是细胞色素C、也可使用胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、核糖核酸酶、溶菌酶等。

1. 铺膜展开法

本方法适用于已提纯的DNA。将提纯的DNA样品与碱性蛋白细胞色素C制成混合液，然后在下相溶液液面上铺成单分子层，再用具有膜的铜网捞出DNA和碱性蛋白的单分子层，干燥后进行转靶喷涂。

(1) 碱性蛋白单分子层铺制法

①展开溶液：0.1毫克/毫升的细胞色素C，0.5—2微克/毫升的DNA溶液。溶剂为0.5—1M的醋酸铵溶液，并含有1mM的乙二胺四乙酸二钠，整个溶液的PH为7.5—8.0。

②下相溶液：为醋酸铵溶液，浓度为0.25M。下相溶液的醋酸铵浓度要比展开溶液低。下相溶液也可使用1%的甲酰胺的盐溶液。

③展开分子层：取直径10厘米的培养皿，洗净烘干后，在其内壁四周涂上石蜡磨光，注满0.25M醋酸铵下相溶液。将洗净的湿载玻片倾斜15°左右浸入培养皿下相溶液中，另一端放在培养皿边缘上。在液液表面上撒上少许滑石粉。用微量注射器吸取10—

20微升的展开液，在离下相溶液表面约1厘米左右的载玻片上滴下，并令其流到下相溶液表面，使之展开铺成DNA及蛋白质的单分子层，此时滑石粉颗粒被推向四周。静置2—3分钟后，用具有膜之载网，膜面向下粘起单分子层。

④染色：单分子层取出后，先后在95%和无水酒精中脱水，约20秒左右。取出后，用滤纸吸去留在表面上的酒精使之干燥。为了增加样品的反差，在捞取单分子膜后，用2%醋酸双氧铀酒精液染色1分钟，然后风干。

⑤旋转投影：将捞有核酸单分子层的载网放入真空镀膜仪中。在真空 10^{-5} 托条件下；载网台以30—60rpm的速度旋转；同时将30—50Å厚的一层金属钽铀合金蒸发到载网上的核酸单分子层上。投影时，蒸发源到样品载网的距离应大于8cm。投影角5—7度喷涂1分钟。投影后的样品即可进行电镜观察。

(2) 甲酰胺技术

用40%的甲酰胺作展开溶液，其中含0.5μg/ml DNA，0.02—0.1mg/ml的细胞色素C及0.1M Tris缓冲液（内含10mM EDTA—Na₂，PH8.5）。溶液在用前1—2小时内配制。

下相溶液：为10mM Tris和1mM EDTA—Na₂（PH8.5）溶在10%的甲酰胺中。制片方法同上。

(3) G-胺盐法

上相溶液：0.2M Tris缓冲液加入20mM EDTA—Na²（pH 8.5）。每ml缓冲液加G-胺盐0.1mg。DNA样品40μl，加100μl G-胺盐溶液。也可按样品：G-胺盐 = 50:100或者100:100的比例配制。

下相溶液为重蒸水。

粘片后用2%的醋酸双氧铀的90%酒精液染2分钟，可不必喷涂。

G-胺盐有二种；即溴代十六烷基三甲胺（C₁₆H₄₂BrN），其特点是展层快；另一种为溴代十八烷基三甲胺，特点是展层慢。一般常用溴代十六烷基三甲胺。

(4) DNA水滴展层法

DNA水滴展层法是把上相溶液在一滴蒸馏水上展开。聚四氟乙烯板上刻有孔径从2mm—1cm，深1mm的大小不等的孔穴。板洗净后，每个孔中放一滴重蒸水或下相溶液，液面呈圆球状。在球状液上，插入0.1cm直径的玻璃棒，用微量注射器吸取10 μ l含有DNA样品的上相溶液，将之顺着清洁的玻璃棒流下，DNA分子蛋白质膜就在水滴表面上展开。然后小心地从水滴侧面把玻璃棒移开，用注射器吸出0.1 μ l的水或下相溶液，以压缩单分子层，再用具膜铜网捞取。然后进行脱水、染色、及干后旋转投影。本方法的优点在于同时可制作几个样品。

(5) 水展层

上相溶液为醋酸铵。醋酸铵的浓度为6M取10 μ l醋酸铵加 5×10^{-2} Mtris-HCl缓冲液和 5×10^{-3} M EDTA pH8.5各10 μ l；DNA 0.2—2 μ g/ml；细胞色素C 2mg/ml 10 μ l；最后加三蒸水使总体积为60 μ l。

下相溶液为2M醋酸铵或蒸馏水

铜网捞取单分子层后用2%的醋酸双氧铀 90%酒精液染10秒钟，酒精脱水二次，滤纸吸干多余水份。用铂铱 (Pt-Pd) 合金在8°角下投影。

2. 扩展法也叫扩散法

先将硷性蛋白在液面铺成单分子层，而后将此单分子层移至核酸溶液的液面，令核酸分子扩散并吸附到蛋白质单分子膜上。采用此法时须有特制的小液槽，槽中的隔板将液槽分成两个部分，一边放槽液，另一边放核酸溶液。先将两条干净的有机玻璃条放于槽液一边。铺蛋白质单分子层后，用这两条有机玻璃将薄膜移至核酸溶液的一边，使核酸分子扩散到单分子层并吸附在上面。扩散法适用于RNA或分子量较小的核酸分子，也即链较短的DNA。单分子层在核酸溶液表面需停较长时间，一般需要10分钟至3个小时以上。

展层时槽液可用0.05M醋酸铵 (pH7)，铺制蛋白质单分子层

用1M醋酸铵。细胞色素C的浓度为100mg/ml,核酸溶液可用0.05 mg/ml的0.05M醋酸铵溶液。核酸吸附后的操作同前法。

3. 一步释放法也叫尿素释放法

利用上相溶液和下相溶液间盐浓度的巨大差异,产生渗透压的变化,在蛋白质单分子膜铺开过程中,同时使核酸直接从病毒、噬菌体、细菌、原生质体,或含有核酸的细胞器中释放出来,从而简化了核酸的分离和提纯工作。具体方法是:取0.5ml 5×10^9 噬菌体T4/ml加到1.5ml的5M尿素溶液中。室温放置25分钟后,加入0.5ml 2M的醋酸铵溶液,再加入20 μ g/ml细胞色素C,混合后成展层溶液。

展层方法与上面的核酸样品展开法同。

有人用苜蓿基二甲基铵氯(BAC)低分子化合物所形成的分子膜来代替蛋白质单分子膜,获得较好结果,方法与前面展开法相同。不同之处在于以BAC代替细胞色素C。

在观察某一核酸分子时,应加入已知形态和长度的核酸分子作为对照。

(贾敬鸾)

第五节 染色体显带方法

染色体显带是细胞遗传学研究的主要方法之一。在Casperson (1971)介绍荧光显带(Q带)方法之前,核型分析主要是根据染色体形态和着丝点位置的差别来进行的。Q带和以后发展的G带、C带、Ag带(NGRs)及Cd带等显带方法,使研究者可以对染色体作出明确的鉴定。

(一) Q带

用喹吖因染料染色的中期染色体,会出现特征性的荧光亮带

和暗带。一般富AT-DNA表现为亮带，富GC-DNA则荧光较暗。当然，染色体蛋白质、染色质状态等其它因素，对明暗带也有影响。Q带显示方法，简单迅速，同一制片还可以再用其它某些方法染色。这种方法对于人类Y染色体长臂远端区的染色是特异性的。该法的缺点是染色后不能保存，必须及时观察和摄影记录。观察时，必须使用荧光显微镜。

1. 芥子嗍吡因(Quinacrine mustard, QM)显示Q带

(1) 试剂

① 柠檬酸磷酸缓冲液

0.1M 柠檬酸溶液70ml与0.2M磷酸氢二钠溶液300ml混合，pH 7.0。

② 用上述缓冲液配制0.05mg/ml QM溶液，在4℃条件下可保存6个月。

(2) 操作步骤

① 空气干燥法制备的染色体标本，依次通过95%、70%和50%乙醇溶液，经蒸馏水后，转入柠檬酸缓冲液。

② 在QM溶液内染色20分钟。

③ 用缓冲液漂洗三次，加盖后在荧光显微镜下检查。根据荧光强弱可延长或缩短在磷酸缓冲液中的漂洗时间。

④ 荧光显微镜检查：HBO 200w/4水银灯垂直照明。用BG12激发滤片和1个510nm屏蔽滤片。

2. 盐酸喹吡因(Quinacrine dihydrochloride)

(1) 空气干燥的染色体制片在0.5%(w/v)盐酸喹吡因水溶液中，pH 5.5—6.0，室温染色6—8分钟。

(2) 自来水冲洗2—3分钟后，用无离子水漂洗，加盖片镜检。若发现过度闪光可取下重盖。

(3) Q带摄影可参考下列条件：KodaK-Sol15胶卷，感光度19°，曝光1分钟左右，显影液D19，显影时间6分钟。放大纸选用Gekko V-3，高反差显影液显影。

(二)G带

用蛋白质水解酶、NaOH、柠檬酸盐或尿素等处理中期染色体制片均可显示G带。这可能和染色体蛋白质的修改或染色体DNA的变性与复性有关。一般来说，G带与Q带带型相符，但也有例外，如Q带显示的人体Y染色体的特异荧光，在G带带型上并不出现。

1. T—G法

(1) 试剂

① NaCl 8g Na₂HPO₄ 1.16g, KH₂PO₄ 0.2g
溶于1000ml蒸馏水中，即为磷酸缓冲盐水(PBS)。

② 用PBS 配制0.25%胰酶溶液。

③ Giemsa染液。

(2) 操作步骤

① 空气干燥的染色体制片，用0.25%或稀释过的胰酶溶液处理，可在室温或4℃条件下进行。根据温度、酶浓度和片龄等事先作试验，寻找最佳处理时间。

② 胰酶处理后在等渗盐溶液中漂洗5分钟，或免去此步骤。

③ 双蒸水漂洗。

④ 用磷酸缓冲液 (pH 6.8)10:1稀释的Giemsa染色10—15分钟。

2. ASG法

(1) 试剂

① 2×SSC溶液：0.3M NaCl和0.03M 柠檬酸钠；

② Giemsa 染液。

(2) 操作步骤

① 新制备的中期染色体制片放入60—65℃ 2×SSC中1—2小时。

② 双蒸水漂洗。

③ Giemsa染色 (pH7.0、稀释50倍)1小时。

3. 尿素法

(1) 试剂 2M NaCl和5M尿素混合液, pH7.0。

(2) 操作步骤

①制片放入上述混合液内, 37°C下1小时。

②双蒸水漂洗。

③ Giemsa染色20分钟(稀释40倍, pH6.8)。

(三) C带

在C显带方法中, Giemsa可将结构异染色质和高重复性DNA的区域染色。在人类染色体上, 这些区域处于着丝点和Y染色体长臂上。

1. Arrighi和Xu的C显带方法

(1) 试剂

①0.2N HCl

②0.07N NaOH

③70%、95%乙醇

④2×SSC (见ASG法)

⑤6×SSC

NaCl 52.58g

柠檬酸钠 26.46g

蒸馏水 1000ml

(2) 操作步骤

①空气干燥法制备的中期染色体标本在室温下, 用0.2N HCl处理15分钟, 蒸馏水冲洗3次。

②NaOH(0.07N)处理标本2分钟, 用75%、95%乙醇涮洗3次, 每次5分钟。若染色体过于肿胀, 可换用0.02N或0.01N NaOH, 或缩短处理时间(1分钟, 30秒或15秒)。

③在玻片上滴加2×或6×SSC, 然后置于湿盒中60—65°C温育16—20小时。

④在2×或6×SSC液中涮洗。

- ⑤在蒸馏水中涮洗。
- ⑥70%、95%乙醇涮洗、气干。
- ⑦Giemsa 染色15分钟。

2. 改良方法

(1) 试剂

- ① $2 \times \text{SSC}$
- ② $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 饱和溶液
- ③磷酸缓冲液, pH6.8

(2) 操作步骤

- ①在 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 饱和溶液中处理3—5分钟。
- ②蒸馏水冲洗。
- ③在 60°C $2 \times \text{SSC}$ 中处理1小时。
- ④蒸馏水冲洗。
- ⑤磷酸缓冲液配制的2%Giemsa 染色液染色10分钟。
- ⑥蒸馏水冲洗。

(四) R 带

R带带型恰与G带的相反。

1. 试剂

0.06M 磷酸缓冲液, pH6.8

GiemSa 染液

2. 操作步骤

- (1)空气干燥法制备染色体片。
- (2)用 $85-100^\circ\text{C}$ 的0.06M 磷酸缓冲液处理制片 5—10分钟。
- (3)再用 65°C 的0.06M 磷酸缓冲液处理10小时以上。
- (4)蒸馏水冲洗, 晾干。
- (5)Giemsa 染色。

(五) Ag带(NORs)

DNA—RNA分子杂交技术证明, 18—28S核糖体DNA(rDNA)基因, 即为rRNA编码的基因, 位于NOR上(核仁形成区)。应用银染技术, 可使NOR特异着色。一般认为, 只有在rRNA基因有转录活性的NOR才能银染着色, 无转录活性的NOR不着色。并认为, 银染的不是核糖体基因自身, 而是和rDNA转录有关的酸性蛋白。可见, 银染显示的是有转录活性的NOR, 故可用于研究rRNA的初态变化。应当指出, 在一些物种中, 银染阳性区不一定是18S+28S rDNA的位置, 其生物学意义还不清楚。该法可和其它显带方法联合使用, 并可用于着丝点、中心粒等研究。

1. Ag—AS 法

(1) 试剂

① 50% AgNO_3 水溶液(w/v)。

② 氨银液(AS): 4g AgNO_3 溶于5ml蒸馏水, 加5ml浓 NH_4OH 。

③ 10% 甲醛: 10ml 甲醛, 2g 无水乙酸钠, 蒸馏水加至100ml, 用甲酸调整pH至5—6。

溶液①和②贮于棕色瓶中, 冰箱内保存不超过一周。

(2) 操作步骤

① 在空气干燥制备的染色体标本上, 滴加 AgNO_3 液4滴, 覆以盖片或擦镜纸片。温室内60℃温育过夜。

② 水洗、干燥, 加4滴AS和4滴10%甲醛。

③ 加盖片, 镜检。当染色体呈淡黄色, 着丝点呈棕色, NOR为黑色时, 立即用水洗并干燥。

2. Ag—I法

(1) 将新配制的50% AgNO_3 溶液滴在玻片上, 加盖玻片, 置于湿盒内。

(2) 37℃, 18小时或50℃, 2—5小时, 进行温育。

(3) 水洗。

(4) Giemsa 染色。

(六) BudR - Giemsa 显示姐妹染色体单体的方法

在细胞培养过程中，加入一定量的 BudR (5-溴脱氧尿嘧啶核苷)后，在DNA复制过程中，BudR会取代胸腺嘧啶核苷而掺入新复制的DNA核苷酸链中。因此，处于第二分裂周期的细胞中，同一染色体的两条姐妹染色单体，一条由双股都含有BudR的DNA链构成。由于双股均含BudR的DNA螺旋化程度较低，故对染色剂亲和力降低。在用Giemsa染色时，双股均含BudR的DNA链组成的单体着色浅，只有单股含BudR的DNA链组成的单体则着色深。利用这种分化着色特点，可以检查姐妹染色单体的交换情况(SCE)。SCE方法比染色体畸变敏感得多。已被用作研究致突变剂和致癌物的细胞遗传学效应的一种分析方法。

操作步骤

(1) 细胞进行培养，以适当细胞浓度传代。培养24小时后于培养液内加入BudR 5—15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，在避光条件下继续培养。

(2) 细胞经过两个生长周期(48小时)，培养终止前3—4小时加入秋水仙素0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (或更低)。

(3) 常规空气干燥法制片。

(4) 70 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中加热2小时。或将制片放置1—2天后，经1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，pH8.0，85 $^{\circ}\text{C}$ 处理10分钟，蒸馏水漂洗、晾干。

(5) Giemsa染色。

(七) 高分辨染色体标本制备

通常使用的染色体中期分裂相显带方法，在单倍体上只能显示大约320条带，较难分析染色体细微结构的异常，1976年Yunis等用氨甲喋呤使培养的细胞同步化后，再用秋水仙胺短暂处理，获得大量前期、前中期和早中期分裂相。这些时相的染色体比正中期染色体长，显带后可得到更多更细的带纹，有助于发现细微

的染色体异常和定位。目前，从早前期或更前的时期得到的染色体标本可显示3000—10,000条可分辨的带型。ISCN(1981)发表了人类高分辨带550—850条带高分辨模式。

操作步骤:

(1)RPMI 1640培养液,添加25%小牛血清,培养外周血72小时。

(2)加入胸腺嘧啶核苷0.3mg/ml, 37℃, 培养17小时后,用RPMI 1640洗去过量的胸腺嘧啶。

(3)用5ml添加25%小牛血清的RPMI 1640, 37℃培养5小时。

(4)加入放线菌素D, 6μg/ml, 60分钟。

(5)加入秋水仙胺0.4mg/ml; 10分钟。

(6)细胞移入10ml离心管, 3000rpm, 10分钟。

去上清液, 加入8ml, 37℃的0.4%KCl与0.4%柠檬酸钠1:1混合液, 在37℃下温育15分钟。

(7)在低渗液中加入3:1甲醇冰醋酸固定液1ml, 轻轻混匀, 3000rpm, 10分钟离心。固定和离心重复两次。

(8)过夜后制片, 在滴片前离心, 去上清液, 加入新固定剂8—10滴, 把细胞团打散成悬液。每片1—2滴, 滴在预冷的载片上, 在酒精灯上过火焰一次(不要燃烧)。

(9)70℃烤箱中保温2—3小时, 自然冷却。

(10)用37℃的生理盐水配制的0.025%胰酶溶液, pH 7.4, 处理1—3分钟。

(11)Giemsa 染色15分钟。

(白琴华)

第五章

细胞工程技术

第一节 植物体细胞遗传操作

植物细胞工程包括植物细胞的离体培养、细胞突变体的筛选、用培养细胞生产次生代谢产物、植物原生质体再生、体细胞杂交及遗传转化等几方面的内容。由于这些技术都以植物离体细胞为材料，所以也统称为植物体细胞遗传操作。该领域的研究在作物改良上有巨大的潜力，又是遗传学基础理论研究的重要方面，因而受到了国内外专家的广泛重视。目前，以该技术为基础的植物体细胞遗传学已成为遗传学研究中发展极为迅速的一门分支学科。

在本书第三章的遗传学教学实验的第24节中，已介绍了花药培养的操作，本节将着重介绍原生质体培养、体细胞杂交与细胞转化。同时也简略地介绍细胞突变体的筛选、用培养细胞生产次生代谢产物等其他几种技术。

(一) 原生质体培养与植株再生

原生质体是除去了细胞壁的裸体细胞，在适宜的培养条件下，

它能再生细胞壁，进行细胞分裂，并最终再生完整的植株。原生质体培养是在有限的容积中集中了很大的群体，通过原生质体培养，选出有益变异的机会也就大大超过天然变异。原生质体由于去掉了细胞壁，可以互相融合，使不能有性杂交的亲本之间可以进行遗传物质重组，同时也便于导入外源基因，在培养成再生植株后，外源基因所控制的性状有可能得到表达。所以原生质体操作技术已成为植物遗传操作的重要组成部分，为作物改良展示了美好的前景。

自从1971年首次从烟草原生质体再生出完整植株以来，已有百余种植物的原生质体再生了植株。但很多重要的经济作物与粮食作物的原生质体再生还有困难，培养的技术还在不断改进。最近，从水稻与玉米的原生质体再生了完整的植株，标志着该项技术的巨大进步。原生质体培养大致可分为以下三个步骤：原生质体的游离、培养及植株再生。

1. 原生质体的游离

(1) 游离原生质体的起始材料

植物的叶片、花瓣、茎髓、子叶、下胚轴、幼根、四分体花粉等各种组织都有可能游离出原生质体。此外，愈伤组织与悬浮培养的细胞也是游离原生质体常用的材料。为了能使原生质体培养获得成功，选择适宜的基因型与起始组织是非常重要的。

基因型是决定培养效果的重要因素。对培养的反应在同一种内的不同品种、品系之间，存在着极显著的差异。所以在尝试一个新种的原生质体培养时，一定要考虑到选取多种不同的亲本来源，增加成功的机会。不同的组织来源对原生质体再生也有显著的影响，最常用而简便的材料是叶片、子叶与下胚轴等。但在单子叶植物用这些材料就难以成功，木本植物也未见从叶片原生质体再生植株的报道。愈伤组织或悬浮培养的细胞则是被广泛地用来游离原生质体。

① 叶片

天然生长植株的幼嫩叶片是游离原生质体的好材料。植株的

生长条件对叶肉原生质体的游离有重大影响。一般来说，有利于植株快速生长的因素可以增加游离活性强的原生质体的机率。光照、温度及水肥等条件明显影响原生质体的游离。此外，选取叶片时还需注意叶片的幼嫩程度与植株的年龄，一般选用旺盛生长株上的幼嫩而完全展开的叶片。

在游离原生质体以前，可用一些特殊的条件对植株或叶片进行前处理。例如将土豆的试管苗先培养在高光照条件下，游离前4—10天转移到低光照条件下，明显提高了原生质体的得率。植株的前处理还包括如15℃的低温，80%的高湿，施铵肥等。也有报道叶片在去下表皮后，用培养基培养36—48小时，促进了原生质体的游离。还有用4℃的盐溶液、20mM的半胱氨酸溶液，以及精氨酸或丁二胺等在游离前处理叶片。

② 无菌苗的子叶与下胚轴

先将种子经70%酒精(几秒钟)与0.1%升汞溶液(5—10分钟)表面消毒，无菌水漂洗之后播种在不含激素的琼脂培养基上。在人工控制的光照与温度条件下培养几天或十几天之后，取其子叶或下胚轴游离原生质体。这种材料的优点是无需再经表面灭菌的处理，从而避免了灭菌剂对材料的伤害。同时，子苗严格地控制在人工的条件下，可以比较培养基成分、光照与温度条件对原生质体游离的影响，得到的实验结果容易重复。由于材料并非取自田间，受季节的影响也降低到最小程度。在用这种材料时，要注意子苗的日龄、子叶的状态对游离的效果有很大的影响。

③ 外植体来源的愈伤组织及悬浮培养细胞

幼穗、茎尖及幼叶的基部是常用的外植体。将它们表面消毒后接种在含2—5mg/L₂, 4-D的MS或N₆培养基(见附录)上，愈伤组织长出以后，每隔4—6周继代一次。一般需要继代若干次后才能达到适合原生质体游离的状态。悬浮细胞培养往往是从愈伤组织材料开始的，组织块放在液体培养基中进行振荡培养，每周继代1—2次。

愈伤组织或悬浮细胞的生长条件对于原生质体的游离与再生

有重大影响。一般来说，对数生长后期的培养物最适宜于游离原生质体。培养基的成分，包括各种氮源、蔗糖与激素的含量都会显著影响原生质体的游离及以后的生长。这方面不同的植物来源会有不同的要求。继代培养的间隔时间也是重要的影响因素，有些悬浮材料超过3天，原生质体的产量就明显下降。

培养细胞游离原生质体的不利因素是染色体数的不稳定性。大多数长期培养的培养物是整倍体与非整倍体的混合物，使植株的再生率显著降低。建立染色体稳定的细胞培养物取决于三个条件：a. 外植体的来源，例如叶组织或幼茎组织来源的培养细胞比髓组织的更稳定。b. 生长调节剂的浓度，例如高激素的含量往往与多倍体相联系。c. 一旦建立了二倍体培养物，保持选择压力是重要的，如缩短继代培养的间隔时间。从稳定的培养细胞游离原生质体将有利于植株再生。

(2) 酶液的组成

细胞壁由三种基本成分组成：纤维素、半纤维素及果胶。这三种成分的百分比随细胞或植物的种类不同而不同。用来降解细胞壁的酶制剂也有三类：纤维素酶、半纤维素酶及果胶酶。常用的酶可见附录，最常用的纤维素酶与果胶酶是 Onozuka R-10 与 Macerozyme R-10，而 Pectolyase Y23 具有高得多的果胶裂解酶及多聚半乳糖醛酸酶的活性。通常在游离原生质体时，将几种酶混合在一起，配成混合酶液使用。

去壁时培养基的渗透压必须与细胞质的渗透压相平衡。通常靠糖或糖醇来保持培养基的渗透压。甘露醇与山梨醇是最常用的糖醇，一般用来游离叶肉原生质体。葡萄糖则是常用作游离培养细胞的等渗剂。酶液或培养基所需要的渗透浓度随原始材料的不同而不同，一般在0.3—0.7M之间。要获得有活力的原生质体，必须首先摸索最适宜的渗透浓度。

酶液中还加入一些无机盐类或其他化合物，如 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、葡聚糖硫酸钾等，提高原生质体的稳定性和活力，降低其破碎程度。酶液的pH值一般在5.6左右。

(3) 游离原生质体的条件

除酶液的组成以外，要获得大量活性高的原生质体，还必须满足游离原生质体的其他条件。首先是原始材料与酶液的比例要恰当，一般像去掉下表皮的叶片或子叶这类易于游离原生质体的材料，所需要的酶液量相对也少，而像愈伤组织、悬浮培养细胞则需要的酶液量相对也要大。游离原生质体一般在黑暗下进行，游离的温度控制在25℃左右，但也有人用低得多的温度，如14℃来游离玉米的原生质体。叶肉原生质体的游离常用静止培育的方法，而在游离培养细胞的原生质体时往往需要轻微的振荡。游离的时间原则上是尽可能短为好。

(4) 原生质体的纯化

通常用过滤、离心与漂洗的程序纯化原生质体。含原生质体的酶液经孔径40—60μm的镍丝网过滤，除去未被酶消化的组织或细胞团。经低速离心收集原生质体，用洗涤液再悬浮，再离心沉淀，反复3—4次，洗去残存的酶液与细胞碎片。洗涤液的成分通常与酶溶液中除酶以外的成分相同。

蔗糖溶液漂洗法能使得到的原生质体更加纯正一致。将镍丝网过滤的酶液与蔗糖溶液混合，使蔗糖的最终浓度达15—20%，100xg离心7—10分钟，完好的原生质体漂浮在溶液表面。用吸管吸出后，再用常规的洗涤液漂洗。Ficoll或Percoll组成的等渗梯度溶液也被用来纯化原生质体。

2. 原生质体培养

(1) 原生质体的营养需要

不同来源的原生质体有不同的营养需要。一般来说，原生质体培养基的基本成分与培养细胞的培养基成分相似。常用的培养基可见本书的附录。

培养基中渗透浓度和钙含量常与酶液相似。不同原生质体对氮源与总氮量的需求变化较大，铵态氮对有些原生质体有利，而对另一些则有害。所以有些培养基中铵态氮含量降低而代之以硝态氮或氨基酸。最常用的碳源是葡萄糖与蔗糖，葡萄糖还常用作

等渗剂，而蔗糖作等渗剂的浓度会对一些原生质体产生毒害。有些培养基中还用了其他碳源，如木糖、纤维二糖及一些有机酸等，促进壁的形成及原生质体生长。培养基中生长调节剂的变化也较大。最常用的生长素有2,4-D、萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)等，激动素、苄基腺嘌呤(BAP)与玉米素是最常用的细胞激素，浓度一般为0.1—2mg/l。

在培养一些难度大的原生质体时，往往在培养基中加入椰子汁、水解乳蛋白等有机物质。在水稻原生质体培养中，还附加了小牛血清、蜂皇浆等，收到了良好的效果。培养基的pH值一般为5.5—5.7，也有特殊的例外。

(2) 培养方法

① 液体培养

液体浅层培养是目前用得最普遍的一种方法。将原生质体以 10^4 — 5×10^6 /ml的密度悬浮在液体培养基中，用吸管将悬液移到平皿中，再用封口膜封住，进行静止培养。要注意的是液层不宜太厚，约一毫米为宜，便于氧的供应。该培养方法便于对原生质体的生长进行观察、照相，同时在培养过程中便于降低培养基渗透浓度等操作。

液体培养的另一种方式是进行液滴或悬滴培养。将悬浮了原生质体的液体培养基滴在平皿的盖上，然后将皿盖翻转扣在皿底上，再用封口膜封住。液滴大小一般为40—100 μ l。如果用的不是平皿，而是盖片与带腔的载片，用矿物油封口，则称为微室培养。如果用特制的带多个编号小穴的平皿进行培养，称为微孔培养，液滴大小在0.25—0.5 μ l。这些培养方法适宜于培养少量的原生质体。要注意的是必须保持培养的湿度，以免培养过程中培养基由于蒸发而使渗透浓度发生急剧变化。

② 固体培养

最常用的固体培养是用琼脂培养基。先将琼脂培养基加热融化，保持在43—45 $^{\circ}$ C，然后与等体积的原生质体悬浮培养液混合均匀。混合后琼脂的最终浓度控制在0.6%以下，以得到松软的固

体培养。

其他的固化剂还有琼脂糖、角叉藻聚糖、藻酸盐、明胶与聚丙烯酰胺等。近来发现琼脂糖的效果明显比琼脂好。琼脂糖与琼脂的主要区别是琼脂有更多的负电荷，琼脂糖对原生质体培养特别适宜，可能与它的中性特性有关。

③ 固体与液体转换的培养方法

固体培养如果用藻酸盐或低融点琼脂糖作凝胶剂。在原生质体发育成细胞团之后，将培养物放在40℃中保温1—2小时，培养基就会液化而不伤害细胞，便于将细胞团转移到新鲜的培养基上。

④ 固体与液体相结合的培养方法

将固体培养的原生质体平板，切成小块，转移到液体培养基中，在振荡器上缓和地振荡培养。这种培养方法的优点是通过换液的办法，满足原生质体不同发育阶段的营养需要，适时地降低渗透浓度，并排除有些原生质体在培养过程中产生的有毒物质。在这种方法中，琼脂糖作凝胶剂也比琼脂好。

这种培养方法还可以变换一种形式，这就是最近发展的琼脂糖珠培养方法。将原生质体悬液与琼脂糖培养基混合之后，逐滴地滴在平皿底面上，待凝固后在其周围加入液体培养基，在振荡器上缓慢地振荡培养。若在液体培养基中加入培养细胞，则是理想的饲养培养方式。

⑤ 饲养培养技术

在常规的培养条件下，原生质体生长需要有一定的接种密度。饲养培养技术则用来培养接种密度很低的原生质体，如融合处理后挑选出来的少量杂种细胞等。作饲养层的细胞或原生质体先用x射线照射，它们在照射后仍然存活，但丧失了分裂能力，与琼脂培养基混合后铺在平皿底面上。待饲养层凝固后，将要培养的原生质体以固体培养或液体培养的方法铺在饲养层上面。在两层之间可以放一层赛璐玢，便于以后的转移。饲养层的作用没有种的特异性，即饲养层细胞与所培养的原生质体可以来自不同的种。上面已提到，琼脂糖珠培养是饲养培养的一种理想方法。

饲养培养的另一用途是减轻原生质体的褐化程度。有些原生质体在发育过程中产生酚类化合物等有毒物质，它们使发育的细胞自身遭受毒害，产生褐化现象，最终导致死亡。液体培养原生质体时，减轻褐化可采用常换培养液或在培养液中直接加入活性炭的方法。用饲养技术减轻褐化可采用X平板法或滤纸盘法。将培养皿十字分隔，在对角的两块注入含活性炭的琼脂培养基，待凝固后在剩余的两块接种含原生质体的琼脂培养基。这种方法就称为X平板法，在临近活性炭培养基的边缘部位，原生质体往往能避免褐化而正常发育。在含活性炭的琼脂培养基上铺上滤纸盘，再在其上面接种薄层含原生质体的培养液，就是所谓的滤纸盘法。这种方法的优点是操作简便，缺点是因滤纸不透明而不易观察、照相。

(3) 培养条件

原生质体的密度与光照、温度等环境因素对原生质体的培养效果有明显的影响。

原生质体在培养时要求有一定的密度。高国楠在培养基中加了多种维生素、氨基酸与有机酸等，低密度培养原生质体取得了成功。这说明密度要求实质上反映了原生质体复杂的营养要求，有些细胞的代谢产物正是细胞本身的发育所必需的。不同来源的原生质体对接种密度的要求也有所不同，常用的密度为 $10^4 - 5 \times 10^5$ /ml。

原生质体在培养的初期对光照条件有严格的要求。所报道的最适光照条件在不同来源的原生质体之间有很大差异。一般来说，强光照对新游离的原生质体是有害的。多数在培养的头几天需要黑暗或微弱的散射光，以后再转移到2000—5000lux的光照下培养，但也有连续全黑暗或强光照的报道。

原生质体的培养温度一般在22—28℃，但在种间有很大差异。有些原生质体需要更高的温度，如白薯原生质体培养的最适温度为28—30℃，其他像西红柿、棉花等的原生质体也都需要较高的培养温度。

3. 植株再生

从原生质体培养再生的细胞与细胞团,有两条途径再生植株,形成不定芽与根,或者形成胚状结构后直接发育成植株。

一般来说,原生质体再生的细胞团先形成极性,然后可见深绿色的芽原基,表面呈扁平或半球状的结构,最后长出绿叶。再生的能力与植物的种类及组织来源都有密切的关系。培养基的成分与培养条件则在分化过程中起着关键的作用。

为了芽的分化,要及时地将细胞团转移到分化培养基上,转移不及时会显著影响芽的分化。几乎没有研究过单独的无机成分与形态发生的关系,通常使用的分化培养基是添加了一些有机附加物的MS或B₅培养基(见附录)。甘氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、水解酪蛋白或椰子汁等有机氮源是常用的添加物。在分化培养基中也往往增加一些维生素的含量。最重要的是激素成分。6-苄基腺嘌呤、玉米素与激动素是最常用的细胞激动素,应用的浓度范围在0.03—10 μ M之间,种间的差异很大。在有些种,芽的分化还需要少量的生长素,常用的有萘乙酸、吲哚乙酸或2,4-D。光照是最重要的环境因素,分化时,由黑暗或低光照变为强光照,有时用日夜交替光照代替连续光照。光可能是诱发极性的必要因素。

由再生芽发根是容易的,一般用无激素培养基,或者用只含少量吲哚乙酸或萘乙酸的培养基。蔗糖浓度降到1%对根的分化有促进作用。在有些情况下,低浓度的细胞激动素或二、三种生长素配合使用能促进根的分化。

形成胚状结构是植株再生的另一途径。已有不少种植物通过胚的发生获得了再生植株。诱导胚发生的最重要因素是在培养原生质体与细胞团时用含有2,4-D的培养基。当2,4-D浓度降低以后导致了胚及小植株的发育。

4. 原生质体培养的操作程序(实例)

(1) 实验材料的准备

① 植物材料:盆栽烟草充分伸展的鲜嫩叶片。

② 器材仪器:

超净工作台, 台式离心机, 倒置显微镜。

灭菌过滤装置及 $0.2-0.45\mu\text{m}$ 的细菌滤膜, 300目镍丝网, 10ml带塞的刻度离心管, 带皮头的玻璃吸管, 培养皿, 镊子与吸水滤纸等, 在实验前高压灭菌。

③ 试剂:

70%酒精, 0.1%升汞, 无菌水。

洗涤液: 甘露醇 0.6M , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5mM ,
 KH_2PO_4 0.7mM , $\text{pH}5.6$ 。

混合酶液: 纤维素酶Onozuka R-10 2%,
果胶酶macerozyme R-10 1%,
溶于洗涤液中, $\text{pH}5.6$ 。

培养基: D_2 培养基(见附录)*。

洗涤液、酶液与培养基在实验前用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤灭菌。

(2) 操作步骤

① 将叶片用肥皂水洗净后, 自来水冲洗。

② 在超净台内(以下步骤同)将叶片浸在70%酒精中2—3秒后, 立即取出用无菌水漂洗2—3次。

③ 将叶片浸泡在0.1%升汞溶液中4分钟, 用镊子小心地赶去叶面上的气泡, 然后用无菌水漂洗3次, 余液用滤纸吸干。

④ 将叶片平放在滤纸上, 叶背朝上, 小心地用镊子除去下表皮。

⑤ 用吸管将4—5ml酶液移到直径6cm的平皿中, 再将去掉下表皮的叶片放在酶液上。去掉下表皮的那面朝下, 使酶液与叶肉细胞充分接触。

⑥ 平皿用封口膜封住, 置 25°C 左右的黑暗条件下酶解。

⑦ 一般在3—4小时后, 在倒置显微镜下观察, 待足量的原生质体游离下来以后即可继续进行下面的操作。

* 培养基的渗透浓度要与洗涤液一致, 或略微降低一些。

⑧ 用皮头吸管将含有原生质体的酶液通过300目镍丝网,过滤到10ml离心管中,除去未被酶消化的叶组织。

⑨ 滤液用台式离心机离心,每分钟500转,约3—2分钟,使完整的原生质体沉淀。

⑩ 用吸管去除酶液,添加洗涤液,小心地将原生质体悬浮起来,待悬液充分混匀之后,再一次离心。这样反复操作2—3次,洗净酶液与残余的细胞碎片。

⑪ 加入适量的原生质体培养基,小心地将原生质体悬浮起来,用血球计数板计数,将原生质体的密度调节到 $10^4-5 \times 10^4/ml$ 。

⑫ 用吸管将上述原生质体悬液移到平皿内,控制液体的厚度在1mm左右。盖好皿盖,用封口膜封住。置黑暗或微光下 $25^{\circ}C$ 恒温培养。

⑬ 培养后10天左右,在倒置显微镜下统计再生细胞的分裂频率。

⑭ 当大部分原生质体再生了细胞壁并有部分发育成小细胞团时(约二周左右),添加渗透浓度降低了的新鲜培养基。

⑮ 当大部分原生质体发育成小细胞团时(培养一个月之后),以1:1的比例加入 $40-45^{\circ}C$ 融化的固体培养基,充分混匀,使琼脂的最终浓度在0.6%以下。

⑯ 当细胞团长到直径1.5—2mm大小时,将其挑出接种在分化芽的培养基上。

⑰ 统计芽分化的频率,并将分化出来的芽从愈伤组织上取下来,转移到分化根的培养基上。

⑱ 统计植株的再生频率。将再生的小植株移到花盆内,为使新移植的小植株不枯萎,需要在花盆上扣上烧杯或塑料罩,保持一定的湿度,让再生植株逐步适应外界条件。

(二) 植物体细胞杂交

植物体细胞杂交就是把植物的原生质体分离下来,在人工控

制的条件下，使不同亲本之间的原生质体像性细胞受精过程那样互相融合，继而把融合的细胞培养成杂种植株。1960年 Cocking 发明用酶液去除植物细胞的细胞壁，为植物细胞杂交奠定了基础。植物细胞融合不仅是研究细胞生物学、植物遗传学的重要工具，而且还可创建遗传构成全新的细胞，获得靠有性过程得不到的远缘杂种，为改良作物提供了新的途径。可以设想，借助于体细胞杂交，可把玉米等高光效作物与小麦、大豆等低光效作物杂交，培育出光合作用能力强、产量高的小麦或大豆新品种，或者把优质高产的作物品种与抗病的野生种杂交，获得抗病的新品种。也有人设想通过体细胞杂交转移豆科植物的固氮能力。正是由于体细胞杂交具有诱人的应用前景，该项遗传操作受到了国内外研究者的广泛重视。至今已有40多种种间与属间原生质体的融合，再生了体细胞杂种植株，建立了多种融合技术、杂种细胞选择及杂种鉴定技术。

植物体细胞杂交包括下列几个环节：选择亲本，游离原生质体，诱导原生质体融合，选择杂种细胞，诱导杂种细胞再生植株，杂种植株的分析鉴定，后代遗传分析等。由于其中有些环节已在“原生质体培养与植株再生”中叙述，这里着重介绍体细胞杂交过程中几项特殊的关键技术。

1. 原生质体融合技术

(1) 无机盐作融合剂

去掉细胞壁的植物原生质体就能像动物细胞一样，在人工控制的条件下互相融合，首先被应用的融合剂是硝酸钠溶液，Carlson在1972年首次用它融合烟草的原生质体，获得了种间杂种植株。但硝酸钠作融合剂所需要的浓度(0.25M)对细胞本身有毒害，而且融合频率比自发融合频率增加不多，所以以后很少再有人继续用硝酸钠作融合剂。

另一个较为成功的无机盐融合剂是高pH值的钙离子溶液。将混合的双亲原生质体低速离心后，培育在含有0.05M CaCl_2 与0.4M甘露醇，pH值为10.5的缓冲液中，在37℃下保温，融合频

率超过了25%。目前这个方法已很少单独使用，而是与融合剂PEG联合应用。

(2) 水溶性聚合物诱导融合

聚乙二醇(PEG)是目前最常用的融合剂。当25~30%的PEG溶液加到混合的原生质体悬液上，就引起原生质体凝集，再用高pH值的钙溶液稀释时，就产生了高频率的融合。PEG的分子量一般选用1540，4000或6000，用PEG6000的人更多一些。

由于商品PEG的纯度不同，一些学者用再沉淀及透析等方法纯化PEG，发现纯化后其融合活性也降低，这可能是由于亲脂的杂质对融合有促进作用，后来证实一些亲脂的添加物能促进融合。最近高国楠用离子交换树脂纯化PEG，消除了对细胞的毒性，取得了良好的效果。因而他认为商品PEG对细胞的毒性是由杂质引起的，而不是PEG本身。

除PEG本身的纯度以外，PEG的浓度，原生质体的密度、纯度，原生质体的生理条件等因素都影响原生质体的融合频率。有人用混合的盐溶液在融合前处理原生质体，提高了融合频率。在PEG溶液中添加某些其他物质，也能促进融合。如伴刀豆球蛋白A(ConA)能加强PEG引起的原生质体粘连，从而提高融合率，添加15%的二甲基亚砷(DMSO)，也可使融合率显著提高。最近有人报道，在融合剂中加入蛋白酶或链霉菌蛋白酶，使烟草原生质体的融合率提高三倍。其他添加的促进剂有胰蛋白酶、精胺、亚精胺等。

除PEG外，用作融合剂的水溶性聚合物还有聚己烯醇(PVA)，它是非离子的表面活化剂。分子量为500的PVA，诱导融合的效果比PVA1400或PVA2000的诱导效果好。通常用15%的PVA溶液，加上0.05M CaCl_2 及等渗剂甘露醇，制成融合液融合植物原生质体。葡聚糖硫酸盐也被用来作融合剂，但由于其本身对植物细胞的毒性，没有被继续采用。

(3) 电融合技术

电融合是近期发展起来的一种融合技术。最早是在1979年，

有人将两个玻璃微电极通以短暂的电流，使与电极接触的原生质体互相融合。目前，电融合技术已逐渐完善，已有几家公司将电融合仪投放市场，国内也有同类产品问世。这种技术的优点在于：它避免了PEG、高pH溶液等强加于原生质体的生理非常条件，同时融合的条件更加数据化，便于控制与相互比较。

电融合通常是在特制的融合板上进行，两个平行电极之间的距离一般为1—2mm。在双电极之间滴加少量原生质体悬液。悬液中除了含有保持渗透浓度的甘露醇外，尚需加入少量的CaCl₂（约0.01M），使溶液保持一定的导电率。

电融合处理一般可分为两步进行。先给两极以交变电流，电压每毫米约2—4伏特，频率为0.5—1M赫兹。这时就产生了电泳效应，使原生质体沿着电场的方向排列成串珠状。这时再给予瞬间的高强度的电脉冲，使原生质体膜局部破损而导致融合。一般用的脉冲强度为500—1000伏特/cm，脉冲期宽为20—50微秒。通常一次融合处理给予几个脉冲，脉冲间隔约1—2秒。

目前电融合技术尚处于不断地改进的阶段，所以文献上报道的处理条件常有显著的差异。现已知道，原生质体的密度对融合的效果有显著的影响，当密度低于 10^4 /ml时，显著降低了融合频率，当密度高于 10^5 /ml时，则使原生质体成团地融合，达不到预期的效果。一般认为 $2-8 \times 10^4$ /ml的原生质体密度是适宜的。悬液中CaCl₂的浓度不仅影响悬液的导电率，也影响原生质体的完整程度，一般认为钙离子对原生质体膜有保护作用。此外，交变电流的强弱、处理的长短、电脉冲的大小等因素对融合的效果都有明显的影响，来源不同的原生质体对融合的条件也会有不同的要求。所以在研究每一个新材料时，对上述诸因素都需要有一个摸索的过程。电融合仪也在逐步改进之中，例如如何使融合过程更便于在无菌条件下进行，如何使一次电融合能处理更多的原生质体等等，都是需要进一步解决的问题。

2. 杂种细胞的选择

融合处理后，原生质体在培养基中再生细胞壁，进行有丝分

裂，产生了由亲本细胞、同源融合细胞及杂种细胞组成的混合群体。尽管为增加原生质体的融合频率作了不少努力，但真正异源双核体(A+B)的比例不会很高。所以将杂种细胞与未融合的及同源融合的亲本细胞分开是很必要的。选择杂种细胞一般是基于遗传标记的表达或生长的生理需要。虽然已经报道了很多选择方法，但迄今尚无一个普遍适用的技术。在新的融合组合面前，必须根据亲本的特点，借鉴已报道过的选择方法，设计新的选择方案。这显然是体细胞杂交技术中的一道难关，所以有必要对以往用之有效的选择方法作一概述。

(1) 叶绿素缺失互补

当非等位隐性基因控制的两个突变体融合后，由于每一亲本贡献一个功能正常的等位基因，纠正了另一亲本的缺陷，使杂种细胞表现正常，这就是互补选择的基本原理。种内叶绿素缺失的互补作用首先是由Melchers(1974)证实的，他用烟草的两个光敏感的叶绿素缺失突变体融合后，选出表型正常的体细胞杂种烟草。这种方法在曼陀罗及其他烟草种间体细胞杂交中也取得了成功。

这种选择方法需要有二个非等位基因的白化突变体。但应该强调，单一的隐性白化突变体也是非常有用的，它可以同形态特征、生化突变体或生长反应结合起来，分离出体细胞杂种植株。例如，我们可以设计一种培养基，可使白化体再生，而另一亲本的绿色种不能再生，这样所得到的全部绿色的愈伤组织或植株都可以认为是体细胞杂种。用这种方法已经选出了几种种间及属间的体细胞杂种。在双亲都能再生的情况下，形态完全类同白化体的绿色再生植株，也可作为体细胞杂种选出来，再进行其他一系列的鉴定。用半显性的白化突变体与另一绿色亲本融合，得到浅绿色的中间型杂种植株，可明显地与白化体及绿色亲本区别开来，用这种方法也已得到几种烟草的种间体细胞杂种。

(2) 营养缺陷型互补

最早用来选择杂种细胞的营养缺陷型是硝酸盐还原酶缺失(NR⁻)的细胞，它缺乏硝酸盐还原酶的活性，因而必需有还原氮

才能成活。它可能是NR脱辅基酶的缺失(nia型)，也可能是钼辅助因子的缺失(cnx型)。这两种类型融合后可以互补，而且同一类型的非等位基因之间也能互补，从而能在硝酸盐为唯一氮源的选择培养基上生长。用这种选择系统已经选出种内、种间及属间的体细胞杂种。同时，融合互补作用也已被用来分析NR-株系的等位性。

近来，其他一系列的营养缺陷型突变体也已用来选择杂种细胞，包括需要组氨酸、色氨酸或烟酰胺的各种株系，都已取得了理想的效果。这种选择体系的局限性在于要得到这些缺陷型突变体并不容易。

(3) 抗性互补选择

对抗生素、除莠剂或其它毒性物质的抗性等显性性状也已用来选择杂种细胞，基本原理与上述隐性性状的互补选择相似。当两个抗性系的原生质体融合时，每个亲本的药物敏感性分别被另一亲本的抗性掩盖，因而单抗的双亲细胞融合后可以产生双抗的融合杂种，很容易用选择培养基选出来。用这个原理，人们将抗5-甲基色氨酸(5MT)与抗S-氨乙基半胱氨酸(AEC)的亲本细胞融合，分别选出了双抗的烟草与胡萝卜的体细胞杂种。这些杂种细胞系的抗性表现非常稳定。近来，人们将抗5MT的胡萝卜与抗AEC的烟草以及相反的组合进行细胞融合，也都选出了双抗的科间体细胞杂种。

对脯氨酸类似物铃兰氨酸(A2C)的抗性，在胡萝卜的种内杂种细胞里表现为半显性。杂种细胞内过量产生的脯氨酸水平居于突变体与正常型的中间。此外，抗卡那霉素、抗链霉素等突变体也都已用来选择杂种细胞。

抗性互补选择可以利用自然存在的抗性差异，还可与其他选择方法结合起来应用。例如1mg/l放线菌素D抑制了矮牵牛的细胞分裂，而不能抑制拟矮牵牛原生质体的分裂。在矮牵牛能再生而拟矮牵牛不能再生的限定培养基上，加1mg/l放线菌素D，就选出了抗放线菌素D的体细胞杂种植株。

一般来说，我们在实际操作中，往往面临无任何选择标记的对象。为解决这个问题，这里特别介绍一个显隐双突变体的例子。Hamill 等人(1983)通过有性杂交，将硝酸盐还原酶缺陷突变与抗链霉素突变综合在一个突变系中，建立了烟草的双突变系。这种双突变体可以与任何无选择标记的其他植物融合，由于对方亲本对链霉素敏感，而双突变体有特殊的营养需要(这里是还原氮)，所以很容易用选择培养基将杂种细胞选出来。应该说，这是一个极为巧妙的设计，对选择杂种细胞技术是一个重要的贡献。

(4) 利用物理特性选择

亲本原生质体的物理性状，如大小、颜色、漂浮密度、电泳迁移率等如有差异，也能用来选择杂种细胞。例如，叶肉细胞与培养细胞的原生质体融合后，产生的异核体是容易与亲本的原生质体区别开的，所以可在融合处理后及时在显微镜下将杂种细胞拣出，单独进行培养。这种方法的缺点是效率低，由于挑出的杂种细胞有限，还必需进行低密度培养。为此，有人发展了用作低密度培养的培养基，也有人应用了看护培养技术。但对于多数植物来说，这仍是难以解决的问题。同类细胞的原生质体难以靠视觉来识别、分离。遇到这种情况，需在融合前用不同的荧光染料分别处理两个亲本的原生质体，双荧光标记的融合产物可在荧光显微镜下识别、分离。近来已有人用荧光活性细胞分类装置(FACS)将双荧光标记的融合产物与亲本原生质体自动分离。这种自动分类装置价格昂贵，但目前国内已有多台，可供使用。

再生愈伤组织形态与颜色的差异也可用来选择杂种细胞。我们将粉蓝烟草与矮牵牛的原生质体融合后培养，再生了三种类型的愈伤组织，一类是白色松软的愈伤组织，与亲本粉蓝烟草一致，另一类是深绿色致密的扁平状愈伤组织，与亲本矮牵牛的一致。此外，还出现了少量与上述二类愈伤组织有显著差异的中间类型。将这中间类型的愈伤组织拣出进行培养，鉴定再生的植株，证明是体细胞杂种。这种选择方法简便易行，但需要对亲本细胞在培养中的特性有清楚的了解。

原生质体浮力密度的差异也已用来选择杂种细胞。不同类型的原生质体，其浮力密度不同，因而在等渗密度梯度中的沉降行为也有差异。将融合后的混合原生质体在含钾、镁、钙离子的蔗糖密度梯度中离心，可以使异核体分离出来。其他还有一些物理性状，如电泳迁移率、粘度梯度或磁性分类等，至今还没有被深入地研究。

(5) 利用生长特性选择

原生质体对培养基成分的要求与反映存在着差异，这种差异被广泛地用来选择杂种细胞。对生长激素需求的差异就是一例。粉蓝烟草与朗氏烟草的原生质体都需要外源激素，但它们间的杂种细胞能产生内源激素，所以用无激素的培养基就能把杂种细胞选出来。当然，这是一个特殊的例子，没有广泛应用的价值。利用同样的原理，有人用烟草瘤细胞作亲本的一方，它是激素自养的白化细胞，当它与其他原生质体融合后，用无激素的培养基选出绿色的愈伤组织即为杂种细胞。

细胞在培养基上的生长反映也是选择的依据。在曼陀罗及烟草的种间体细胞杂交中发现，杂种的愈伤组织比它们亲本的愈伤组织生长更快，只要挑选生长最快、长得最大的愈伤组织进行分化，就得到了体细胞杂种植株。

原生质体再生植株的能力是广泛应用的选择依据。至今还没有人把这种能力归因于某个基因或基因群。但包括种内、种间与属间的所有体细胞杂交实验中，只要一方亲本能再生植株，杂种细胞就能再生植株。所以我们可以把原生质体的再生行为看作是显性性状，这在体细胞杂交中非常有用。首先，无需亲本双方都能再生植株，大大扩大了体细胞杂交的应用范围。其次，再生行为可以作为选择的一个依据，将无再生能力的一方亲本淘汰。只要该方有某个遗传标记，就可根据该遗传标记淘汰有再生能力的另一方亲本。这样就能依次淘汰二个亲本，从而得到体细胞杂种。

细胞在培养基上生长的差异也可人为地创造。用不可逆的生化抑制剂处理亲本细胞，阻塞了它们的代谢机能，从而使它们不

能在培养基上生长，而只有杂种细胞重建了必要的代谢支路，能在培养基上正常生长。有人用碘乙酸盐处理烟草原生质体，已经得到几个种间的体细胞杂种。由于这个方法适用于无遗传标记的原生质体，受到广泛重视。

3. 体细胞杂种的鉴定

杂种鉴定是体细胞杂交的重要一环。尽管可以认为有效的选择程序本身，就为所选材料的杂种性质提供了证据。但一般来说，不管用什么方法选出来的杂种植株都需要经过鉴定。要清楚地证明选出的材料中，融合亲本的双方都贡献了遗传成分。

(1) 形态学鉴定

一旦原生质体的融合产物再生了植株，高等植物广泛的形态学特征上的差异可以用来鉴定杂种。叶片的大小与形状、花的形态与色彩、以及叶柄、花梗与表皮毛状体的长短等等都已被用来描述体细胞杂种。从已有的大量报道来看，在种间的体细胞杂种中，这些特性或多或少居于融合亲本双方的中间。而在属间的体细胞杂种，这些性状的变化就复杂得多，更多的是偏于亲本的一方。

在应用这些特性时需要十分小心，因为它们常常是受多基因控制的。为得到有意义的结论，必须同时观察几个独立的性状。同时还需注意，不要将体细胞杂种的形态变异与非整倍体或培养条件产生的变异相混淆，对于非整倍体杂种变异的解释必须十分谨慎，一般来说，只有整倍体杂种被用来作形态学比较。

(2) 细胞学观察

染色体数量、大小与形态的变化在植物物种形成与进化中起着重要的作用，各种植物的染色体是相对稳定的，因而细胞学观察是证明杂种细胞的简便而又可靠的方法。

细胞学观察提供了细胞的倍性情况。一般用作体细胞杂交的原生质体是二倍体，因而期望体细胞杂种是四倍体。实际上，所报道的种内与种间的体细胞杂种多数是异源四倍体(双二倍体)，但也有倍性更高的或非整倍体。六倍体可能是三个原生质体融合

产生的，非整倍体可能与原生质体来自不规则分裂的培养细胞有关。

由于染色体的差异在远缘种间更大，所以远缘种间杂种比近缘的更易鉴定。标记染色体的存在大大有利于杂种细胞的遗传分析，染色体显带技术被广泛地用来鉴定特异的染色体，研究体细胞杂种中染色体的重排。在远缘的体细胞杂种中，往往亲本一方的染色体部分地消失，例如大豆与粉蓝烟草的组合中，粉蓝烟草中较大的染色体大部分消失，也有双方都有部分染色体消失的例子。

(3) 生化分析

虽然不是双亲的所有基因都能在体细胞杂种里表达，但它们的表达往往给杂种鉴定提供良好的指标。同功酶的电泳图谱常被用作杂种的证据，也可以分析非酶的结构蛋白及次生代谢产物。

① 同功酶

同功酶是同功能酶的多重分子形态。体细胞杂种的同功酶谱往往是双亲酶谱的总和，既表现某方特有的酶带，也表现双方共有的酶带。有时体细胞杂种还表现双方都没有的新的杂种带。杂种的同功酶谱还会随着染色体的逐渐丢失而发生变化。有人用细胞学观察与同功酶分析结合起来研究大豆与粉蓝烟草的杂种细胞，确定天冬氨酸氨基转移酶的合成在某个特异的染色体上，成为用体细胞杂交进行基因定位的先例。

② 部分I蛋白

部分I蛋白是叶绿体中最丰富的可溶性蛋白，它有核酮糖1,5-双磷酸酯羧化酶与加氧酶的双重酶活性，由叶绿体DNA编码的大亚基与核DNA编码的小亚基组成。因而部分I蛋白的亚基多肽构成的分析同时提供了叶绿体与核基因组表达上的信息。

从迄今所报道的许多体细胞杂种的实例来看，部分I蛋白分析的结果是基本一致的。杂种中存在着亲本双方的小亚基多肽，而大亚基多肽只来自亲本的一方。也有个别报道，在杂种里同时存在两类大亚基多肽，这很可能是由嵌合细胞造成的。与同功酶

的情况不同,杂种的部分I蛋白亚基多肽从未出现过不同于亲本的新带或居间的酶带。

③ 次生代谢物

亲本在产生次生代谢物上的差异,像挥发性化合物、生物碱及类胡萝卜素等,也已用来鉴定体细胞杂种。由于这些化合物的合成步骤多而复杂,不受基因直接控制,常常受到生理与发育条件的影响而变化,所以作为鉴定杂种的价值不高。次生代谢物的分析可以为杂种提供旁证,但不能作为排他性的证据证实体细胞杂种。

(4) 分子生物学鉴定

分子生物学技术的进展对于分析体细胞杂种的遗传构成是重大的促进。叶绿体与线粒体DNA的特异内切图谱已用来鉴定体细胞杂种或胞质杂种的质体基因组与线粒体基因组。对杂种叶绿体DNA的分析表明,在叶绿体DNA之间不会发生重组;遗传上不同的叶绿体不能保持在共同的细胞质中,在融合产物中,叶绿体迅速随机地分离,直至只剩下同质的叶绿体。分析还表明,杂种抗链霉素特性是与抗性亲本一方的叶绿体存在有关,胞质雄性不育与叶绿体无关,而与不育亲本的线粒体相关。在体细胞杂种里,线粒体DNA发生广泛的重排,出现新的线粒体DNA内切谱带。它可能发生在两个亲本的线粒体DNA之间,也可能来自亲本线粒体DNA的分子内重排,所以在确定线粒体DNA是否重组时必须谨慎。

新近Saul等发展了另一种技术,用种特异的高重复的核DNA作探针,鉴定了天仙子与烟草属间融合杂种的亲本DNA。在融合前,用强X光消除烟草原生质体的核,发现在融合杂种里仍有适量的烟草DNA。Southern印迹技术与杂种细胞的原位杂交证实,烟草DNA散布在天仙子的基因组上。

(5) 遗传分析

产生可育花的体细胞植株可用常规的遗传方法分析。自交 F_2 代分离的结果与期望值的一致性可为植株的杂种性质提供可靠的

证据。由于非整倍体及高度不平衡的杂种（如带奇数基因组或不亲和的远缘融合组合）都会不育，所以用有性杂交进行遗传分析仅限于同属的种内与种间的体细胞杂种。

花粉活力的高低是衡量杂种基因组亲和性的有力依据。与有性亲和的体细胞杂种相比，有性不亲和、更远缘的融合组合，花粉的活力降低。但在解释这些现象时必须谨慎，因为非整倍体的花粉活力也降低，而大部分这类杂种实际上是非整倍体。

花药培养已作为体细胞杂种遗传鉴定的另一种方法用来鉴定曼陀罗、烟草的体细胞杂种。在花药再生的后代中，核编码标记的分离为花药供体植株的杂种性质提供了明确的证据。同时，花药培养还有利于降低体细胞杂种的倍性，发现并稳定由减数重组产生的新基因组。

4. 原生质体融合的操作程序

(1) 实验材料的准备

① 植物材料：

温室栽培的大麦幼苗叶片；

悬浮培养的大豆细胞，每两天继代一次。

② 器材仪器：

与原生质体培养相同

③ 试剂：

70%酒精、0.1%升汞、无菌水；

酶液I、洗涤液及培养基与原生质体培养的相同。

酶液II：2%纤维素酶Onozuka R—10，0.5%Driselase，1%Pectinase，0.5%半纤维素酶RhozymeHP150，0.1%PectolyaseY23，溶于洗涤液内。

稀释液：0.5M葡萄糖，0.05M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.7mMK H_2PO_4 ，pH10.5。

聚乙二醇(PEG)溶液：1gPEG(1540)溶解到2ml含有0.1M葡萄糖，10.5mM CaCl_2 与0.7mMK H_2PO_4 的溶液中，pH5.8。

(2) 操作程序

① 游离大豆原生质体：取0.5ml 继代后两天的悬浮大豆细胞与4ml酶液II混合，24℃下培育17—20小时，缓慢地在振荡器上摇动。

② 大麦叶片原生质体游离：见原生质体培养的操作顺序。

③ 将两种原生质体混在一起，镍丝网过滤，离心收集，用洗涤液洗一次（见培养操作），重新悬浮在洗涤液中，原生质体密度调到 $10^5 - 2 \times 10^5 / \text{ml}$ 。

④ 将上述混合液滴在平皿底部，6cm 平皿上可滴4—5滴，每滴约150 μl ，静止5分钟。

⑤ 在上述液滴上，用细口吸管缓慢地加入PEG 溶液450 μl ，再静止10—20分钟。

⑥ 慢慢地加入稀释液，在10—15分钟期间，每液滴上加0.5—1ml稀释液。使平皿内液体连成一片。

⑦ 倾斜平皿，吸去上清液，再缓慢地加入3—4ml稀释液，尽量勿使粘在底部的原生质体漂浮起来，再倾斜平皿，吸去上清液。

⑧ 按照上述办法，用培养基洗一次。

⑨ 加入2—3ml培养基，轻轻晃动平皿，让原生质体悬浮在培养液内。

⑩ 平皿用封口膜封住，培养在25℃的低光照条件下。

（三）植物细胞转化

“转化”一词原来指的是一个细菌品系由于吸收了另一个细菌品系的DNA而发生遗传性状改变的现象。这个概念后来也通用于高等生物，表示外源基因整合入受体的基因组并得以表达的现象。尽管赫斯等人早就做了大量的高等植物转化实验，但由于缺乏有效的实验体系及可靠的证据而未获成效。自从发现了农杆菌的Ti质粒以后，高等植物的遗传转化研究得到了迅速发展。Ti质粒能促进外源基因离体转移，并整合入双子叶植物的基因组中得到表达。在Ti质粒的基础上，发展了各种载体系统，有些载体系统已

去除了 T-DNA 的致瘤基因，代之以显性选择标记，便于选择转化体。最近，用这类载体系统转化单子叶植物也获得了成功。

目前高等植物的遗传转化已发展为一整套完整的技术，包括目的基因的分离、载体修饰、转化操作及转化体的鉴定分析。转化操作的方法多种多样，如整株水平上注射、人为创伤上接种、胚胎注射以及根尖用纤维素酶处理后感染等，但最有效的方法还是利用组织培养的技术，在细胞水平上进行转化。植物组织培养，特别是原生质体技术的发展，为高等植物的遗传工程提供了理想的受体系统。目的基因转化的细胞或原生质体可以再生完整植株，不仅为转化体的遗传分析提供了条件，而且为遗传工程直接用于作物改良开辟了新路。本文着重介绍几种行之有效的转化操作技术，遗传转化研究的其他几项内容可以参见本书的遗传工程基本操作技术。

1. 致瘤农杆菌接种无菌苗或外植体而诱发肿瘤

大多数植物诱发肿瘤的最适宜材料是试管繁殖的无菌苗。为避免其他微生物的污染，转化研究中用无菌的植物材料是非常重要的。因为沾染物有可能杀死植物细胞，也会干扰对转化材料的生化或分子生物学分析。温室栽培植株的外植体经严格的灭菌以后也可成功地诱发肿瘤。

(1) 实验材料的准备

① 培养基

MS培养基（见附录）。

MSIC：在融化后保持在45℃的MS培养基中加入过滤灭菌的羧苄青霉素溶液，使其最终浓度为1mg/ml。

② 抗菌素

羧苄青霉素：100mg/ml的蒸馏水溶液，过滤灭菌，4℃或-20℃下贮存。

Cefotaxime：50mg/ml的蒸馏水溶液，过滤灭菌，-20℃下贮存。

卡那霉素：10mg/ml的蒸馏水溶液，过滤灭菌，4℃或-20℃

下贮存。

利福霉素：20mg/ml的甲醇溶液，-20℃下贮存。

四环素：10mg/ml的蒸馏水溶液，过滤灭菌，4℃或-20℃下贮存。

③ 无菌苗

种子用10%(v/v)的次氯酸钠溶液浸泡10—30分钟，用无菌水洗5次，接种在MS固体培养基上发芽，培育在25℃，用中等光照强度(1000lux)。

④ 外植体

从温室栽培植株切取幼嫩枝条，用10%(v/v)次氯酸钠溶液进行表面灭菌20—30分钟。用无菌水洗5次。去掉漂白剂伤害的部位，修去基部大叶，切成4cm长的茎段。基部向下插在MS固体培养基上。

(2) 操作步骤

① 用灭过菌的刀片切去离体繁殖植株或无菌子苗的顶部。

② 在切割表面接上培养过夜的致瘤农杆菌。或者用皮下注射针头沾菌后刺伤植株的茎。

③ 在25℃的低光照(600—1000lux)下培育接种植株3—6周。

④ 当肿瘤长到直径为3—10mm时，取下肿瘤，移植在MSIC培养基上。培养基中加1mg/ml羧苄青霉素，也可用Cefotaxime(500μg/ml)、万古霉素(100μg/ml)、或利福霉素(50μg/ml)加四环素(10μg/ml)取代，以杀死农杆菌。

⑤ 根据肿瘤的生长状态，3—6周后转移到羧苄青霉素含量为0.5mg/ml的MS培养基上，然后在羧苄青霉素为0.25mg/ml的MS培养基上继代保持。如用其他抗生素，则浓度也相应降低。

⑥ 定期地取少量肿瘤，接种在25℃的营养肉汤中振荡培养。当肿瘤组织上不再有存留细菌时，转移到不含抗生素的MS培养基上培养。

2. 烟草叶盘感染农杆菌

外源基因通过农杆菌质粒导入植物需要一个组织培养系统，使转化的组织能再生植株。叶片是最常用的起始材料，对于原生质体再生还有困难的种，叶盘感染转化是最简便而有效的转化方法。

(1) 实验材料的准备

① 农杆菌株系

C58CIRif^r (pGV2260)

C58CIRif^r (pGV2260::pGV1503)

C58CIRif^r (pGV2260::pGV941)

② 植物材料

烟草SR₁ 无菌苗培养在24℃下，用16/8小时光周期中等强度光照。在A₁培养基上6—8周后取叶片。

③ 植物培养基

(i) A₁ (无菌苗培养基)

1/2MS培养基的盐浓度，1%蔗糖，0.8%琼脂。

(ii) A₂ (感染培养基)

B₅培养基加 250mg/l NH₄NO₃，3%蔗糖，0.5g/l MES (pH5.5)。

(iii) A₃ (诱导愈伤组织培养基)

B₅培养基加以：250mg/l NH₄NO₃，2%葡萄糖，0.5g/l MES (pH5.7)，40mg/l 腺嘌呤，0.8%琼脂；1mg/l 6-苄基腺嘌呤(BAP)，0.1mg/l 吲哚乙酸(IAA)，500mg/l Cefotaxime，50—100mg/l 卡那霉素。

(iv) A₄ (诱导苗培养基)

A₃培养基，200mg/l Cefotaxime，去掉IAA。

(v) A₅ (根分化培养基)

1/2MS培养基盐浓度，加3%蔗糖，0.5g/l MES (pH5.7)，0.8%琼脂，100mg/l Cefotaxime

④ 细菌培养基：minA。

60mM K₂HPO₄·3H₂O 33mM KH₂PO₄

7.5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.7mM 柠檬酸钠

1mM MgSO_4 2g/l 葡萄糖

50mg/l 维生素 B_1 。

(2) 操作步骤

① 取叶片，去除中脉，切成 0.25cm^2 左右的小片，叶面朝下放在 A_2 培养基上。9cm平皿盛10ml培养基，大约放12小片。

② 加25 μl 对数生长晚期的农杆菌，低光照下培育2天。

③ 去掉培养基，用含500mg/l Cefotaxime的 A_2 培养基洗一次。

④ 用无菌滤纸将叶盘吸干，移到含适量选择剂的 A_3 培养基上，诱导生苗。

⑤ 每周用新鲜 A_3 培养基继代一次。

⑥ 3—4周后从叶盘分离再生的愈伤组织，将愈伤组织移到加选择剂的 A_4 培养基上。

⑦ 2—3周后，从愈伤组织上切下小苗，转移到生根培养基 A_5 上，根在两周内形成。

⑧ 测定新霉素磷酸转移酶(NPT—II)的活性或将叶片放在含100mg/l卡那霉素的 A_3 培养基上，来鉴定转化植株。

⑨ 将再生的转化植株在 A_1 培养基上作无菌苗培养，或者移植到温室的花盆中。

3. 植物细胞与农杆菌共培养

游离的植物原生质体在适宜的培养条件下形成细胞壁，然后进行细胞分裂。将分裂之前形成了新壁的细胞与农杆菌共培养，就能成功地转化。实验证明，原生质体在形成新壁之前，或经十多天培养之后都不易被农杆菌转化。说明转化与原生质体新壁的成分有关。

共培养转化的优点是一次实验可以处理很多细胞，得到很多转化体。转化频率一般在0.1—1%，高的甚至可达20%。由共培养产生的转化体都源自单个细胞，对于转化体的分子生物学分析极有价值，也便于对T—DNA整合及表达的特性进行分析。当然，

为得到转化的植株，共培养转化的前提是原生质体能再生完整植株。

(1) 实验材料的准备

① 植物材料

烟草SR₁无菌苗，参见②。

② 培养基

K₃培养基，参见附录。

(2) 操作步骤

① 植物原生质体的游离及纯化，参见原生质体培养及植株再生。

② 将含有0.4M蔗糖、0.1mg/l 萘乙酸及0.2mg/l 激动素的K₃培养基重新悬浮纯化的原生质体，使原生质体的最终密度为1—2×10⁵/ml，每9公分的平皿中放入5ml原生质体悬浮液，用封口膜封住平皿。放在低光照（400lux）下培养。

③ 培养3天后，几乎所有的原生质体都再生了细胞壁，呈椭圆形。此时，加入50μl对数生长后期的农杆菌，使最终比例约为1:100（原生质体:农杆菌）。

④ 在室温下共培养32—48小时。

⑤ 移到离心管内离心，去除上清液，用K₃培养基重新悬浮，再离心。这样反复洗3—5次，然后重新悬浮在K₃培养基中培养，加入Cefotaxime，使最终浓度为500μg/ml。细胞密度为3—6×10⁴/ml。

⑥ 10—14天后，加入新鲜的K₃培养基，抗生素含量同上。继续培养10天。

⑦ 离心收集小细胞团，加入选择培养基。对于致瘤农杆菌，可用无激素的培养基作选择培养基；对于非致瘤而含有像抗卡那霉素那样显性选择标记的农杆菌，可在培养基中加100mg/l的卡那霉素来选择转化体。

⑧ 用固体选择培养基制成平板（参见原生质体培养），使小细胞团的密度为200—500/ml。

⑨ 再培养4—6周以后,挑出直径为2mm以上的小愈伤组织,转移到不含抗体的K₃培养基上,或者转移到含2mg/l 苄基腺嘌呤的MS培养基上分化苗。

4. PEG法转化植物原生质体

前面介绍的几种转化方法极为有效,但也有一定的局限性。首先,单子叶植物对农杆菌不敏感,因而不宜用上述转化方法。第二,还有许多像豆科那样的作物,它们的原生质体经不起共培养的处理。第三,农杆菌往往会污染转化组织的抽提物,干扰转化基因的转录与翻译的研究,从而导致人为的结果。因此,新的转化技术还在不断的探索之中。这些技术包括:①化学法促进原生质体摄取裸体DNA;②原生质体摄取含Ti质粒的脂质体;③原生质体与细菌原生质球融合;④微注射法直接将外源DNA导入原生质体。至今最成功的还是用PEG方法将Ti质粒的DNA导入原生质体,脂质体与细菌原生质球的导入技术也基本相同。

(1) 实验材料的准备

① Ti质粒,分离方法见基因工程基本操作技术。使用前24小时,加几滴氯仿灭菌。

② 烟草SR₁的原生质体,游离与纯化方法见原生质体培养与植株再生。

③ K₃培养基,参见3。

④ F培养基: NaCl 140mM; KCl 5mM; Na₂HPO₄ 0.75mM; 葡萄糖 5mM; CaCl₂·2H₂O 125mM。配制时,将CaCl₂溶在40ml双蒸水中,其余成分溶在另一份双蒸水中,两份合并后,调pH到7.0。加双蒸水到100ml,这时出现的沉淀状物质不要去掉。

⑤ FP培养基:将固体的PEG6000溶解在F液内,使PEG的最终浓度达到40%,热压灭菌。

(2) 操作步骤

① 将原生质体悬浮在K₃培养基中,密度为 5×10^5 /ml,取1ml到离心管中。

② 加10 μ g Ti质粒DNA (体积往往是25—50 μ l)。

③ 加50 μ l (1mg/ml) 的小牛胸腺 DNA, 事先加几滴氯仿灭菌。

④ 加0.5ml FP培养基。在26 $^{\circ}$ C光照下培育30分钟。

⑤ 加2ml F培养基, 室温下 (21 $^{\circ}$ C) 5分钟, 如此重复4—5次, 使PEG浓度由原来的13.3%降到1.6%, Ca^{2+} 浓度由原来的40mM上升到115mM。

⑥ 600转/分离心, 去除上清液。

⑦ 将原生质体重新悬浮在含激素与250mg/l 羧苄青霉素的 K_3 培养基 (蔗糖0.4M) 上。经上述转化程序处理后存活的原生质体约为50%。

⑧ 将原生质体悬液移入平皿, 封口后培养在26 $^{\circ}$ C的黑暗条件下24小时。

⑨ 将平皿移到每天12小时光照 (2000lux) 下培养两周。

⑩ 将平皿中悬液分成两皿, 各以1:1加入新鲜的 K_3 培养基。

⑪ 两周后用蔗糖为0.3M, 琼脂为0.3%的 K_3 培养基稀释10倍。培养4周。

⑫ 挑出小愈伤组织, 放在固体培养基上选择并分化苗。

5. 植物原生质体的电激法转化

细胞膜在瞬间的强电场中会形成小孔, 这足以让蛋白质或核酸这样的大分子通过。现在这种电激技术已用来转化动物细胞或植物原生质体。在实验的条件下, 大豆的原生质体大约吸收 2×10^{-8} 升液体, 如果培养基中含50 μ gDNA/ml, 那么一个细胞吸入大约100个DNA分子。绝大多数DNA将最终被降解, 但是, 如果在选择条件下培养细胞, 获得转化的愈伤组织的频率约为 10^{-4} — 10^{-3} 。

(1) 实验材料的准备

① 酶溶液

B_5 培养基的无机盐 (见附录); 0.4M蔗糖; 0.5%纤维素酶

R10; 0.2%果胶酶R-10; pH5.6。

② 洗涤液。

B₅无机盐; 0.4M蔗糖; pH5.6。

③ K₃培养基

B₅无机盐; 0.4M蔗糖; 750mg/l CaCl₂; 250mg/l木糖;
250mg/l NH₄NO₃。

④ EP缓冲液

0.4M蔗糖; 4mM CaCl₂; 10mM HEPES (pH7.2)。

⑤ K₃培养基

K₃培养基; 0.2mg/l 6-苄基腺嘌呤; 0.1mg/l 萘乙酸。

⑥ 抽提缓冲液

50mM Tris (三羟甲基氨基甲烷)

0.12mg/l leupeptin

1% β-EtSH

⑦ 3M NaCl溶液。

⑧ 0.7%琼脂糖。

(2) 操作步骤

① 常规方法游离原生质体。

② 酶液通过50μm孔径的滤网, 室温下每分钟600转离心9分钟。使原生质体漂在液面。

③ 用细管吸去下层液体, 加入K₃培养基, 小心地冲洗管壁, 用手滚动离心管, 使原生质体与液体混合, 再离心, 吸去下层液体。

④ 加EP缓冲液, 同上操作, 尽可能吸净下层液体, 使原生质体密度达 6.25×10^6 /ml。

⑤ 取200μl原生质体悬液, 移到琼脂糖垫底的塑料试管中, 将管放在冰上。

⑥ 加10μgDNA; 11μl NaCl溶液, 使最终浓度为150mM。等10分钟, 在此期间用手指弹试管3—4次, 使原生质体保持悬浮状态。

⑦ 将电极在95%EtOH中洗，再用EP缓冲液洗2—3次，插入试管（试管仍在冰上）。

⑧ 给以400v/cm电场（电压200v，电容200 μ F）50毫秒。移去电极。

⑨ 10分钟后，将原生质体移到平皿中，加K₂培养基，封口后在22—24℃的低光照下培养。

⑩ 原生质体培养及植株再生可参见④。在烟草原生质体转化实验中，可在电激处理后45—55小时测试基因的瞬间表达。

⑪ 将原生质体悬液移到离心管中，600转/分离心5分钟。

⑫ 尽可能地除去清液，留下不多于75—120 μ l，转移到Eppendorf离心管中，放在冰上。

⑬ 加1/3体积的抽提缓冲液，超声处理5—6秒。发声器的针头应恰好放在液面下，功率用12—15 μ ，即中间值。

⑭ 沉淀45—60秒，将上清液移到新管。

⑮ 取10 μ l，移到塑料试管中，加800 μ l水及200 μ l Biorad蛋白质测定剂，摇2次。让反应继续5—60分钟。

⑯ 测定在595nm的吸光率，在丙烯酰胺凝胶上，每个样品加100 μ g左右的蛋白质（4—6个单位）。

⑰ 电泳；测新霉素磷酸转移酶II的活性。

（四）从培养细胞分离突变体

基因结构的改变称为突变，由此产生表型变异的细胞称为突变体细胞。基因在表达上的变化也能产生表型变化，在搞清变化的遗传基础之前，一般通称表型变异体或细胞系。在分离突变体的研究中，分清突变体与变异体两种不同的概念是重要的。确定突变体可通过两种途径：第一，从变异细胞再生可育的植株，再通过有性杂交观察变异特性的传递，如果符合经典的遗传规律，即可肯定是突变体。核突变体以孟德尔方式分离，细胞质突变体则表现为单一的母性遗传。第二，在变异的细胞中证明有一个发生变化的基因产物，例如发现一种酶的氨基酸顺序发生了变化，

就可看作是突变的证据。

从高等植物培养细胞分离突变体是近十几年发展起来的一项生物技术。利用植物组织培养选择突变体有明显的优越性，它可以在有限的时间与空间操作大量的细胞，便于使用生化选择剂，而且培养的细胞有可能再生完整的植株。与愈伤组织及悬浮培养细胞相比，原生质体培养体系更有利于选择突变体，尤其是单倍体的原生质体。由于原生质体不易持久地保持单倍体状态，用单倍体原生质体作选择体系时，需要及时地进行诱变处理，并诱导形态发生。成功地选择突变体不仅需要适宜的培养材料，诱变因素、诱变时机及适宜的选择方法都是重要的因素。

1. 诱变因素及诱变处理

诱变剂已成功地用于微生物、动物细胞及高等植物来提高突变体的频率。但用植物的培养细胞时，诱变剂提高了突变频率的证据还很少。有些实验缺乏自发突变频率的对照，在有些实验中筛选的药剂有诱变剂的作用，选择效应与诱变效应不能区分开，而且已有证明离体条件的本身有时就有诱变的作用，给诱变剂作用的分析增加了困难。尽管如此，应用在其他体系的理化诱变因素也都已用来诱发培养细胞的突变体。至今，诱变剂的选择、诱变剂的剂量以及诱变处理的时机还有很大的随意性。

诱变作用的机制目前还不很清楚。诱变剂最初可能作用于同源染色体的一条DNA链，而另一条保持非突变状态。这种单线突变的假说在真菌的颜色突变中得到了验证，DNA复制前诱变产生 $1/2$ 的扇状突变体，而复制后的细胞中诱变产生 $1/4$ 的扇状突变体。由此推断，在植物原生质体的诱变中， G_1 与 G_2 细胞的比例对诱变效应会有重大的影响。对于显性突变来说，嵌合群落的产生无关紧要，但至今还没有技术分离嵌合群落中的营养缺陷型细胞。纯突变体的产生不仅与诱变时细胞或原生质体的状态有关，还随着诱变剂的种类及诱变剂的剂量不同而发生变化。这里将分别介绍几种主要诱变因素的使用。

(1) 化学诱变剂

① 甲基磺酸乙酯 (EMS)

像EMS这样的烷化剂构成了最大的诱变剂群，它们引起点突变、染色体断裂及染色体突变。点突变主要是鸟嘌呤烷基化引起GC/AT转换的结果。

EMS处理啤酒酵母 *S. cerevisiae* 主要产生镶嵌型克隆，表明是单链突变，靠复制固定。它在中致死剂量时在大麦种子有较高的诱变率，而对其他植物的生长有明显的毒害效应。

EMS在水中比较稳定，半存留期为11.5小时，但挥发很快。在培养细胞实验中一般应用浓度为0.05—0.5%，处理时间为1—1.5小时。虽然EMS已频繁地用作植物培养细胞或原生质体的诱变剂，但还没有明确的证据证明它的诱变效应。

② N-甲基-硝基-亚硝基胍 (MNNG)

MNNG通过错配（引起转换）或错误的修复引起突变。它使 *S. pombe* 产生相等的纯克隆与镶嵌克隆，因而在DNA复制前处理能引起一些双链突变体。它是拟南芥菜的高效诱变剂，但不诱发大麦突变。

MNNG虽在植物中未被广泛使用，却是各种细胞体系中最有潜力的一种诱变剂。它比EMS更不稳定，pH7时的半存留期为7.5小时，最稳定的pH值为4.5—6，在高pH或低pH的溶液中迅速变性，也易被光分解。处理原生质体的使用浓度为5—20mg/l，处理时间为0.5小时。它使天仙子营养缺陷型与温度敏感系的回收率由对照 2×10^{-4} 提高到 1.1×10^{-3} ，还诱发了抗缬氨酸的二倍体烟草及色素变化的曼陀罗细胞系。

MNNG是强有力的致癌剂，使用时必须十分小心。

③ N-乙基-N-亚硝基脒 (NEU)

NEU也是一种烷化剂，在大麦的测试系统中，诱变效率远比MNNG高。它与其甲基类似物一起常被归为超诱变剂。

NEU在水溶液中不稳定，48小时内完全衰变，因而用它处理的细胞不用洗。它的使用浓度一般不高于0.1mM，否则会引起再生株的不育。NEU显著增加了单倍体烟草 *N. plumbaginifolia* 原

生质体抗林肯霉素、链霉素及氯酸盐的突变体回收率。

④ 其他化学物质

在原生质体实验体系中应用的诱变剂仅有上述三种烷化剂。而甲基甲烷磺酸酯与叠氮化钠已成功地应用在其他类型的植物细胞培养体系。另有一些植物与微生物的诱变剂，还有待在培养细胞体系中进行研究。

(2) 辐射

① 紫外线照射

紫外线(UV)是使用最方便的一种诱变因素。它主要是产生错误的斜切与修复，从而引起不连续的基因突变，其精确的生化机制还不清楚。UV处理啤酒酵母 *S. cerevisiae* 主要产生纯突变克隆，表明是DNA复制前的双链突变。所以，UV宜于作非分裂期细胞及新游离的原生质体的诱变剂。在大多数生物中发现，UV引起的DNA损伤有迅速的光致复活作用，所以细胞在UV处理以后，需要在黑暗中培养一些时候。由于UV使用方便而安全，使用后不需要清洗，是原生质体系统的理想诱变剂。

用UV作诱变剂，已在原生质体系统选出了各种抗性突变体及营养缺陷型突变体。通常用UV照射平皿中的原生质体悬液，剂量率为33尔格/mm²·秒，照射剂量约为1000—1500尔格/mm²。实验已证明UV照射显著地提高了突变频率。

② X光照射

通过直接轰击脱水组织的DNA，或含水组织产生的反应基团间接地使DNA碱基发生变化或释放，及主链断裂，电离辐射引起非活性DNA的变化。因而X射线很少引起点突变，而往往是引起单链或双链断裂，通过交换反应的修复，造成染色体突变或缺失。电离辐射后修复所需要的DNA合成能力在不同的植物组织间存在着差异。X射线诱发突变的效率还随氧分压及温度的变化而变化。

X射线穿透力强，更适用于多细胞有机体，由于重复性好、诱变率高而一直受到育种工作者的重视。在单细胞或原生质体培

养体系，X射线诱发点突变还不如UV或化学物质。

在原生质体培养体系中常用刚游离的原生质体作材料，照射剂量从750伦琴到1500伦琴。单倍体的原生质体明显比二倍体原生质体更敏感，这种差异在高剂量时更显著。用X射线已在曼陀罗选出色素变化的突变植株，还分离出矮牵牛硝酸还原酶缺失的细胞系。

③ γ 射线

γ 射线已在植物育种中广泛地用来诱发突变。原生质体的辐射敏感性研究表明，在原生质体游离后不久，恰恰在DNA复制开始之前，细胞处在最敏感的时期。已经在 ^{60}Co 的 γ 射线照射后，选出了各种突变体，实验证明 γ 射线照射提高了突变频率。

原生质体以 $1-5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度悬浮在培养液中，装在带帽塑料管中照射。一般用 $0.04-0.1\text{Gy}/\text{秒}$ 的剂量率。 50Gy 的剂量就能使各种烟草原生质体失活。所以诱发变异的剂量要低于这个剂量。 ^{60}Co 处理后的原生质体按常规程序离心、收集与培养。

2. 选择

(1) 正选择

正选择就是将对细胞有毒害浓度的药剂加入培养基，淘汰未经突变的亲本细胞，将存活的或相对未受影响的细胞后代分离出来，进一步作抗性实验。这是一般抗药突变体的分离方法。用这种方法，已从几种烟草的原生质体及悬浮细胞体系分离出氨基酸类似物、抗生素、激素及除莠剂的抗性细胞系。大多数再生了植株，研究了抗性的遗传特性。

在原生质体培养体系选择突变体也是在原生质体再生了细胞之后，而不是直接选择原生质体本身。大多数情况下利用悬浮培养进行选择，在悬浮培养液中加入选择剂，经多次继代，然后埋在洋菜中进行纯系繁殖。只有抗性细胞能够分裂，形成愈伤组织。例如单倍体烟草原生质体在紫外光照射后1—2天，在培养基中加入 2mM 缬氨酸，选出了抗缬氨酸的突变体。在紫外线照射后1个月，移到含氨基酸的培养基中，选出了抗赖氨酸与苏氨酸混合物

(LT)的突变体,其茎外植体能在含有1mM赖氨酸及1mM苏氨酸的培养基上正常生长。用缬氨酸抗性为标记,发现影响突变体回收的因素包括:细胞密度、加缬氨酸的时间以及季节变化对原生质体亲本植株的影响。

(2) 负选择

条件致死突变体,如营养缺陷型及温度敏感突变体,在其表型表达的条件下死亡或不分裂,所以不能用正选择的方法直接选择。用氯酸盐选择硝酸盐还原酶缺失突变体是一个例外。条件致死突变体通常用克隆测试法分离,即所谓的全数分离。

① 全数分离

来自单倍体培养细胞或叶肉原生质体的克隆,经逐个测试已得到了一些营养缺陷型或温度敏感的细胞系。基本程序包括:将原生质体或细胞培养在许可条件下,直到细胞团达到可用镊子夹出的大小;将克隆转移到固体培养基上,一旦细胞团长得足够大,将其切开,分别培养在许可条件与限制性条件下;将限制性条件下生长受抑制的克隆挑出,作进一步的检验。为简化这个程序,有人直接把克隆培养在限制性条件下,将生长不好的克隆挑出作进一步的检验。这种直接测试法可用9cm的平皿,先铺上限制性固体培养基,然后将小愈伤组织规则地排列在培养基上,为避免可能发生的交叉饲喂现象,可用多穴的平皿。这种方法的缺点是不能发现迅速致死的克隆。用上述程序挑出突变体的性质是不清楚的,还需要进一步实验测试其许可条件。由此可见,这种选择过程时间长、工作量大,所以要挑选最有效的诱变剂,同时要尽早采用再生植株的培养基,以免丧失形态发生的能力。

② 突变体浓缩法

为减少分离突变体的工作量,已广泛采用5-溴脱氧尿嘧啶来提高细胞群体中营养缺陷型的比例。5-溴脱氧尿嘧啶(BudR)能代替胸腺嘧啶掺入DNA,使其失活。而对于不能复制的突变细胞,BudR不能掺入,所以不受其毒害。

浓缩法的基本程序是:在诱变剂处理后,先将原生质体培养

在许可条件下，让突变表达；然后将原生质体再生的细胞转移到限制性条件下；过一段时间，让突变细胞停止生长之后加入BudR，BudR处理的时间至少相当于1.5个细胞周期，以保证所有的分裂细胞都掺入了一些BudR；将BudR洗去之后，将细胞移到许可条件下培养。在理论上，只有突变体细胞能够形成细胞团。但实际上这种方法并不能完全将突变细胞与未突变细胞分开，而且还没有严格的对照实验明确地证明BudR浓缩了突变体细胞。

另一个潜在的浓缩剂是磷酸盐。它的作用非常像磷酸盐的类似物，使底物与氧化磷酸化脱节。在生长的细胞里，它使ATP迅速逆转，引起能量电荷剧烈下降。当能量电荷降到阈值以下时，细胞就不能复原。但不生长的细胞减少了ATP的逆转，以致在磷酸盐处理后有足够的ATP，在条件许可时就能开始生长。用磷酸盐作负选择剂的程序与BudR相同，磷酸盐在负选择过程中一般使用的浓度为1—2mM。

总之，用负选择剂有效地杀害正常生长的细胞，而不伤害缺失突变的细胞，是选择缺失突变细胞的理想途径。但至今这条途径还不成熟，尚需要进一步完善。

(五) 利用组织培养生产有用物质

许多药品、染料及香料等工业用材料来源于植物，植物细胞培养技术的进展，使人们考虑用细胞培养的途径对这些物质进行工业化生产。与常规的农业生产相比，工业化生产有很多优点：①它不受地理区域的限制及季节变化的支配。②它不受气候等环境因素的影响，可以避免自然灾害。③大大地节省土地，同时产品的质量也远比大田植物来源的整齐一致。④对于难以栽培的野生植物材料，工业化生产就更为重要。经多年的研究探索，这方面的技术已取得很大的进展。已经培养过的植物达百种以上，所取得的次生物质有30多类，超过300种成分，特别在药用成分方面更为突出，例如人参皂苷、薯蓣皂苷、奎宁、毛地黄苷和长春新碱等。

但是，目前要达到工业化生产的水平，还有许多问题需要解决。最主要的是次生物质产率低，生产成本低。这里主要介绍该领域研究中的途径与方法。

1. 筛选高产细胞系

近来的研究表明，培养细胞产生有用物质的能力是异质的，产生某一物质的细胞总是与不产生该物质的细胞混合在一起。从实验材料中筛选出高产的细胞系是提高生产率、降低生产成本的重要方面。目前常用的筛选方法有两种：单细胞纯系化选择及细胞团纯系化选择。

(1) 单细胞纯系化选择

从植物材料或培养组织游离原生质体或单细胞，将它们培养成细胞团或愈伤组织，然后分别测定各个单细胞克隆的目的物含量，选出高产的单细胞纯系。在理论上，单细胞克隆在分离高产有用物质的细胞系上是最理想的方法，但实际上许多单细胞克隆的细胞在有用物质的生产能力上仍是异质的，因而这种选择程序需要反复进行多次才能奏效。

(2) 细胞团纯系化选择

高等植物是真核的多细胞生物，特异的次生代谢产物在特异的器官中形成。实践证明，从已建立的细胞系中反复地选择10—100个细胞的小细胞团，能有效地选出稳定高产的细胞系。

以选择高产的花青素单葡萄糖苷细胞系为例，先从产生该物质的铁海棠 (*Euphorbia milli*) 的叶片诱发愈伤组织。它们是杂色的，包括红、白、浅绿等几种颜色。将每个愈伤组织切成许多小片，放在修改的MS培养基上，在28℃光照下培养，10天后将每块组织切成两小块，一半继续培养，一半作色素含量分析。选出最红的细胞团，再切成小块 (10—100个细胞)，进行培养。这种程序反复地进行，当重复到23次时，红色素的平均值提高了7倍，最高增加了12倍，这些细胞系在停止选择后能继续增产。用这种技术还选出了辅酶Q10及生物素的高产细胞系。

上述选择高产细胞系的程序并不复杂，但必须有一个有效而

简便的检测手段。目的物不同，检测手段也不相同。上述带有色素的例子最为简单，用肉眼就能看到。荧光化合物可用荧光显微镜直接选择。有些无色的化合物通过改变 pH 值或添加某种化合物，可以形成有色的化合物，从而得以检测。常用的检测分析技术包括薄层层析法(TLC)、高压液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)与质谱仪分析(MS)等。近年来发展的放射免疫法(RIA)及酶连锁免疫吸收测试法使高产细胞系的选择速度大大加快。

2. 控制培养条件，改进培养方法

(1) 培养基成分与培养条件的影响

二十年来一系列试验表明，培养基的成分以及培养条件的变化，对次生代谢有显著的影响。目前研制培养基，一般是依靠经验。有人发现培养基中蔗糖的浓度比通常高2—3%，合成的次生代谢物就会显著增加。激素被公认为次生产物形成的启动因子，有人测试了近200种生长素型物质对次生物质产生的影响，发现激素的类型对次生产物的形成有巨大的作用。在含0.1mg/l 萘乙酸而不含激动素的培养基上，烟草培养细胞的烟碱浓度最高，当激动素含量增至5mg/l 时，生物碱完全消失。在长春花的细胞培养中，用33种取代模式不同的苯氧乙酸，只有六种化合物比标准生长素引起更高的利血平浓度，而2,4-D 使利血平的含量降低。培养基的其他成分也在不同的程度上影响细胞次生产物的产量。

除化学成分外，光和温度等物理因素也都影响培养细胞的次生代谢产物。例如，长春花细胞培养物的利血平浓度在光照下比黑暗中高，曼陀罗培养细胞在强光下产生的生物碱比弱光下多。

(2) 二步培养法

自然状态下，一般植物生长不活跃的部分，例如老叶、果实与种子中，倾向于积累次生代谢物，而像分生组织那样的快速生长部分，次生物质的含量极低。实验也证明，生长旺盛的培养细胞不是次生产物的良好来源，当培养物接近于衰老时，才趋向积累次生产物。从烟草悬浮培养细胞产生生物碱，茶树愈伤组织产

生咖啡碱，以及可可细胞培养产生巧克力芳香产物等，都证明次生代谢物的产生与细胞分裂速度减缓的对数期末、静止期初紧密相关。细胞生长与次生物质产生对培养基与培养条件的要求是不同的。因而采用二步培养法，使细胞生长与物质生产分开进行。在细胞的指数生长静止前后更换培养基，使之有利于次生物质的积累，从而大大提高了次生物质的产量，莽草宁的二步法生产就是成功的例子。

(3) 控制培养细胞的代谢途径

根据已有的知识，将生物碱的前体饲喂培养细胞就有可能提高生物碱的产量。有人在蔓陀罗的细胞培养中加入鸟氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸与苯丙酮酸钠，提高了生物碱的产量，在这里氨基酸既是形成生物碱的前体，又是诱导物。用马钱子苷饲喂长春花细胞也增加了利血平的产量，但添加其他几种前体，则未见有类似的效果。所以通过饲喂前体来控制代谢途径，增加次生代谢产物的产量，需要对细胞的代谢过程有深入的了解。

另一类控制细胞代谢途径的方法是促进培养细胞的器官分化。有些生物碱、天然胶等次生物质只贮存在特殊的器官中，促进器官的分化能大大提高次生物质的产量。例如，罂粟在乳管中贮存着含有吗啡和可待因的鸦片生物碱，但罂粟的愈伤组织不含吗啡型生物碱。通过调整培养基和光照，从愈伤组织分化芽原基与胚状体，再用低温培养并调整光周期，分化成苗，最后在无激素培养基上长成15厘米高的幼株。测定各个阶段的生物碱含量，只有这种幼株的生物碱含量达到正常水平。同样，大红罂粟组织必须借助于乳管的分化才能生成吗啡碱，朝鲜参愈伤组织必须再分化才能大批量生产皂化苷。

(4) 植物细胞固相化培养与渗透处理

植物固相化培养的优点是可将细胞保护好，提高操作效率，便于工业上应用，同时可保持细胞间的紧密的相互作用，稳定代谢能力，提高次生物质的产量。一般是利用藻酸钙等材料进行平床培养或柱式培养，动物细胞培养中应用的中空纤维培养技术也

在开发之中。固相化培养除了能增加次生物质的积累外，还比液体培养持续更长的生长时间。例如，利用固相培养的罂粟细胞进行可待因酮还原可待因的反应，比游离细胞长期保持更高的转换能力。

用有机溶剂进行细胞的渗透处理，使其成分放出的技术能提高固相化培养细胞的利用率。例如甘草固相培养细胞，在培养后一周用5%的二甲基亚砷处理30分钟，可显著地释放出查耳酮，再培养一周后用10%的二甲基亚砷处理，还能再释放出一些来。而游离细胞经最初的5%二甲基亚砷处理，异黄酮在释放后完全停止生成。

上面介绍的细胞系选择及改进培养条件与方法两个方面的研究进展，目的就是使产量提高、成本降低，从而能实用于商业生产。在工业生产实践中，尚有许多工艺上的问题需要解决。首先是涉及生产规模的问题，由于植物细胞比微生物大30到100倍，所以大规模培养植物细胞就有特异的工艺上的问题。例如培养细胞与营养物充分混合的问题，气体从气相向液相运送的问题等。其次，还有像长期保持无菌状态的问题及多余的营养物及培养细胞的去除等。目前植物细胞大规模培养系统一般用玻璃或不锈钢作材料，大小从2L到20,000L不等。结构上也已发展了多种类型，除常规的搅拌反应罐外，还有人应用起泡塔及各种空气运送装置。总之，工艺上的问题随着研究的进展而不断改进与变化。利用组织培养生产有用物质，尽管还有重重困难，但已经可以预料在不远的将来，这方面的研究将会产生实用的效果。

(孙勇如)

第二节 动物体细胞遗传操作

目前发展了五种系统可在细胞间转移遗传物质，即完整细胞融合、细胞碎片(核质或细胞质)融合、微小细胞中介基因转移、染色体中介基因转移及DNA中介基因转移。

(一)完整细胞融合

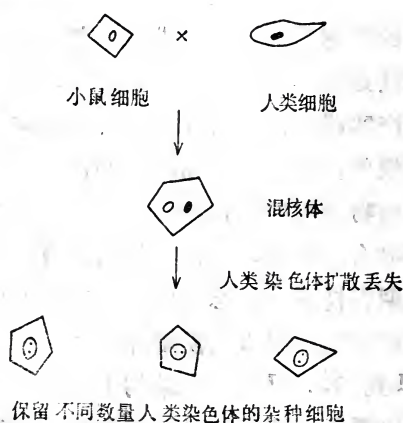


图5-1 完整细胞的融合

完整细胞融合后，可形成包含有两种或多种亲本细胞的完整基因组的混核体或单核体。种间细胞的杂种，有可能保留亲本细胞的完整染色体组，但也有可能选择性排除亲本之一的染色体。利用选择性排除一方亲本染色体的这一特性，可比较杂种细胞表型和染色体组型，确定基因连锁群，进行基因定位并绘制染色体基因图。不同种的、具有某种特性的亲本细胞，构成杂种细胞后，可研究基因结构功能及调控。

1. 仙台病毒中介的细胞融合

(1) 材料

Saline G: 葡萄糖1.1g NaCl 8.0g KCl 0.4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29g KH_2PO_4 0.154g 0.12%酚红1ml MgSO_4 0.154g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016g 重蒸水加至1000ml, 高压灭菌后贮于4℃。

PFBS: ①NaCl 8.0g KCl 0.2g Na_2HPO_4 1.15g KH_2PO_4 0.2g 重蒸水900ml ② $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17g 重蒸水1000ml ③ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g 1000ml ④2M HEPS 2ml ⑤0.12%酚红1ml。①—⑤溶液混合, 用10N NaOH调至pH7.6。

Tris- NH_4Cl : ① NH_4Cl 0.83g 重蒸水100ml ②Tris 2.0594g 重蒸水100ml 用浓盐酸调整pH至7.65。

(2) 融合用细胞及病毒准备

①中国仓鼠成纤维细胞Wg3-h(HGPRT⁻), 培养于含有8-氮鸟嘌呤(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和10%小牛血清的RPMI1640培养液内, 至对数生长期, 用0.25%胰酶消化。取 1×10^6 细胞悬液离心, 弃去上清液, 加5ml Saline G。离心弃上清, 加入0.2ml PFBS, 置冰浴中待用。

②正常人淋巴细胞。取静脉血3ml, 加15ml Tris- NH_4Cl , 置37℃水浴中10分钟。1000rpm离心10分钟。弃上清, 重复温育离心2—3次。加Saline G后计数, 取 1×10^6 细胞悬液离心, 加入0.2ml PFBS, 置冰浴待用。

③病毒制备 将0.1ml 稀释成 10^{-8} 的仙台病毒注入9日龄鸡胚, 34℃下培养48小时后, 鸡胚置于4℃, 24小时。收集尿囊液, 经血凝和无菌试验后, 分装并冻存于-80℃。使用时, 将冻存的仙台病毒融化, 用8W紫外灯(灯距10cm, 预热15分钟)灭活5分钟。在9份 NH_4Cl 溶液中加入1份Tris溶液, 用浓盐酸调整pH至7.2。

(3) 细胞融合和杂种细胞的选择

①两亲本的细胞各0.2ml在指管内混和。加入0.1ml仙台病毒置冰浴内20分钟, 然后移入37℃水浴30分钟。

②以 1×10^5 的浓度将细胞接种于小方瓶(12 cm^2)内。各瓶加入5ml HAT[20%小牛血清的RPMI 1640中含 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 次黄嘌呤(H)、 $4 \times 10^{-3}\text{M}$ 氨基嘌呤(A)、 $1.6 \times 10^{-4}\text{M}$ 胸腺嘧啶核苷(T)、

$1 \times 10^{-5} \text{M}$ 甘氨酸], 置 37°C 培养箱中静置培养。

③培养四周后, 待肉眼可见细胞克隆时, 用长针将长成克隆的细胞分别挑出, 接种于另一瓶中继续用HAT培养液培养。待细胞铺满瓶壁后作常规传代培养, 并继续用HAT选择培养。

(4) 杂种细胞鉴定

①可按细胞形态和生长特性作初步判定。

②Giemsa—11分化染色 常规制备的空气干燥制片(细胞悬液浓度应低于 2×10^2 细胞/微升), 室温下放置2—5日后, 置 60°C 蒸馏水内浸2小时。再用预温到 37°C 的5%Giemsa(0.05 M Na_2HPO_4 , pH1.1配制)染色10—20分钟(37°C)。人类染色体除异染区染为红色外, 其余部分为淡蓝色; 啮齿类染色体均深染为品红色。

③同工酶分析 制备细胞抽提液, 作醋酸纤维膜电泳分析人类蛋白质。鉴定杂种细胞中残留的人类染色体, 与同工酶电泳分析结果相结合就有可能将蛋白质结构基因定位于人类特定的染色体上。

2. 聚乙二醇(PEG)中介的细胞融合

参见第五章第三节有关内容。

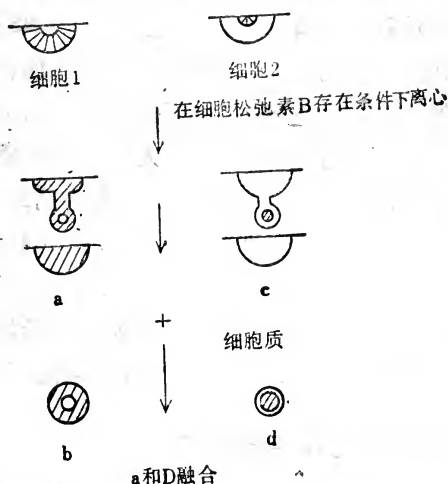
(二) 细胞质与细胞核融合

这种方法已用于线粒体的基因作图和研究在不同细胞质环境中核基因的表达调节。

1. 细胞去核技术

用塑料盖片单层培养细胞群体。盖片可用紫外线照射或70%乙醇浸泡灭菌。细胞数目依盖片大小而定。去核时, 从正常培养液内移出铺满细胞的盖片, 转入含有细胞松弛素B培养液的离心管内。注意将生长有细胞的一面朝向管底。直径22—25mm的盖片可使用容积为40ml的圆底塑料离心管。在预热的转子中, 15000rpm 离心30分钟。若使用L929细胞, 在培养液内添加 $10 \mu\text{g/ml}$ 细胞松弛素B, $35-37^{\circ}\text{C}$ 下, 17600g 离心20分钟。离心后, 用无菌镊

回收盖片,细胞生长面向上放入普通培养液内,10—30分钟后细胞恢复正常形态。为检查去核百分率,可用无水乙醇或无水乙醇-冰乙酸(3:1)溶液固定。在相差显微镜下检查,或经Giemsa染色后观察,求出400个细胞的去核百分率。去核过程受细胞松弛素浓度、离心力、离心时间和温度的影响,并随细胞系种类而不同。



由细胞1的细胞质和细胞2的核形成杂种细胞

图5-2 细胞质和核质融合

2. 核质制备

核质可从细胞松弛素培养液内回收。它们与细胞其它成分一起沉淀在离心管底部。将沉淀物在含有细胞松弛素的培养液内混匀,移入锥形离心管内离心收集沉淀物。沉淀物中混有核质、完整细胞及胞质碎片,需要纯化。完整细胞用“平皿”法清除:在正常生长温度下培养约90分钟,它们便会粘附在基质上。上清液中含核质和胞质碎片。这时,可制备1—6%聚蔗糖梯度,或1—3%血清梯度,在37℃,5%CO₂条件下培养90分钟后出现两条带,上面一条含胞质碎片,下边一条含核质。可用生长培养基离心洗涤并用新鲜培养基制成悬液。

用5%聚蔗糖溶液将活的核质与死的核质分离。将核质制成

1×10^7 /ml悬液，加在5ml分层液顶层，然后再加一层1ml的培养液。试管离心，130g 15分钟。这时，在培养液和分层液之间形成一条带。台盼蓝排除试验表明，98%核质是活的。

3. 细胞质与核质的融合

① 仙台病毒 制备参见完整细胞融合部分。

② 融合过程 用冷Earle平衡盐溶液(EBS)将塑料片上的单层去核细胞质洗涤两次。0.5ml EBS稀释的仙台病毒(约400血凝单位/ml)加入放有上述塑料片的培养皿中。15分钟后，病毒吸附到细胞质上。除去多余的病毒，加入0.25ml核质悬液($1-5 \times 10^7$ /ml)。平皿置于冰盘上15分钟，使核质吸附到细胞质上。其间，可轻摇平皿3—5分钟以帮助吸附，然后移入37℃培养箱使之融合。45分钟后，用EBS洗涤数次，并在相差显微镜下观察，如发现有游离的核质则可增加洗涤次数。最后加入生长培养液。可通过染色估计无核细胞的百分率。杂交细胞可用前述密度梯度方法分离。

(三) 微细胞中介的基因转移

微细胞(或微核质)中介的基因转移方法，可把少量染色体转移给受体细胞。这种染色体有核膜包围，融合时，有少量细胞质和质膜一起转入受体细胞。用有丝分裂抑制剂或其它方法处理细胞，数天后可发生微细胞。可以用控制微细胞大小的办法，调节转移基因物质的量。这一方法可用于基因作图和基因调节的分析。

操作程序：

① 培养瓶内细胞生长密度约 2×10^4 /cm²。

② 加入秋水仙胺，最终浓度0.02—0.2μg/ml(因所用细胞系而异)。

③ 根据细胞倍增时间，37℃条件下培养24—36小时。

④ 用倒置显微镜观察，弃去有丝分裂指数正常的培养瓶。

⑤ 细胞在含秋水仙胺的培养液内培养24—36小时，直至有1/3的细胞形成似在进行有丝分裂的小串细胞碎片。用吸管打散细胞碎片，并把细胞碎片连同完整细胞倒入15ml的离心管内。

⑥ 室温条件下，800g 离心3分钟。沉淀物用不含秋水仙胺的完全培养液洗涤两次。

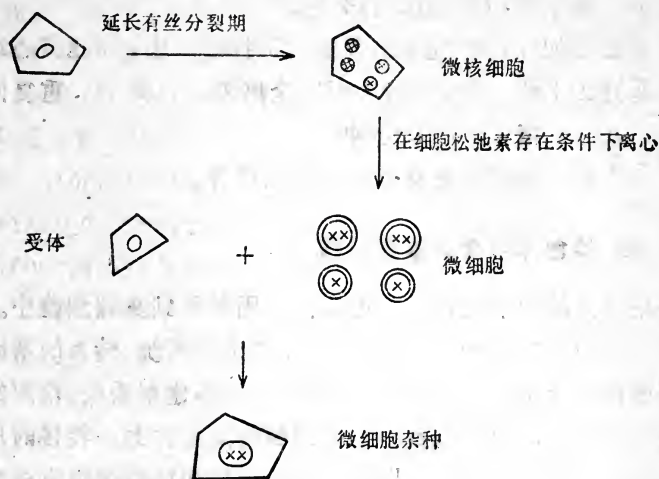


图5-3 微细胞杂种形成示意图

⑦ 用直径47mm，孔径 $3\mu\text{m}$ 的滤膜过滤纯化微核细胞。

⑧ 微细胞放在 $18 \times 18\text{mm}$ 的无菌盖片上，密度为 $1.0 - 1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$

⑨ 37°C 培养12—24小时直至贴壁并伸展。

⑩ 在 $\text{pH}7.4$ 的磷酸缓冲液中涮洗盖片。

⑪ 用 $\text{PBS}(\text{pH}7.4)$ 配制3%的utaraldehyde或其它适当固定液固定细胞。用生理盐水配制的Hoechst 33258($20\mu\text{g}/\text{ml}$)染色5分钟。

⑫ 用湿盖片封固。

⑬ 计算微核细胞百分比的公式：

$$\text{微核细胞}\% = \frac{\text{微核细胞}}{\text{总细胞数}} \times 100 - \text{未经处理的对照组中多核细胞百分数}$$

⑭ 上述纯化的微核细胞，与胰蛋白酶消化下来的受体细胞按10:1大体比例混合。

⑮ 室温下离心混合液，800g，2分钟。

⑯除去培养液,小心加入1ml融合液(用完全培养液配制的5%的400MW聚乙二醇)。

⑰用吸管搅动细胞团块1分钟。

⑱迅速加入10ml完全培养液,不打散团块,800g离心2分钟。

⑲弃去上清,缓慢加入2ml完全培养液,离心。重复同一过程后,在37℃培养30—45分钟。

⑳用吸管轻轻制备悬液并低密度培养。

(四)染色体中介的基因转移

用分离的中期染色体,可以把基因转移到真核细胞中。因转移频率仅约 10^{-5} 到 10^{-7} ,故需有敏感的选择系统。转入的基因需要依赖选择系统维持,否则每代会以2—10%速率丢失。稳定的基因转移频率极低,但可整合到受体细胞的染色体上。转移的片断可用细胞学方法检出,还可以用遗传学方法和核酸杂交方法来估计转移片断的大小。片断大小的范围在单倍体基因组为0.1%到1%,相当于3000到30000Kb的DNA。这项技术包括中期染色体分离、染色体转移条件、转移受体的分离选择及分析方法。

1. 在pH 3 条件下分离染色体

(1) HAG (10^{-6} M 氨甲喋呤、 10^{-4} M 次黄嘌呤、 10^{-4} M 甘氨酸)在S相和 G_1 -S临界期阻抑细胞,使每代间隔相等,减少S相的持续时间。

(2) 加入TdR(5×10^{-6} M TdR + 0.2 μ ci/ml [3 H]TdR)同时用秋水仙胺处理细胞。

(3) 在与S相和 G_2 的持续时间同样时间后收获细胞。500g离心。用冷PBS洗涤细胞。测定细胞密度、有丝分裂指数及cpm/细胞。

(4) 用0.075M KCl,在室温处理细胞($2-4 \times 10^6$ /ml) 10—20分钟。用相差显微镜监视细胞膨胀。以下步骤于5℃操作。

(5) 220g离心5分钟。

(6) 移出沉淀物 (10^{-7} 细胞/ml),在缓冲液 (0.05M NaCl, 0.05M 乙酸,0.1M 蔗糖,1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, pH3.0)内混

匀。

(7) 用电动匀浆器匀浆15秒，直至细胞破碎，可用相差显微镜监视。

(8) 将匀浆放入聚丙烯试管，1000g离心30分钟。

(9) 在pH3的缓冲液内分散沉淀物。加75ml 85%蔗糖(98.6g) — pH3缓冲液，混匀。

(10) 100000g离心2小时，除去碎片。

(11) 在0.02M Tris-HCl(pH7.0) — 3mM CaCl₂中，把沉淀物混匀，1000g离心30分钟除去蔗糖。

(12) 在50ml 0.02M Tris-HCl(pH7.0) — 3mM CaCl₂中悬浮沉淀物(相当于 2×10^6 细胞/ml)。

(13) 在密度梯度中分离染色体(蔗糖密度梯度，含0.02M Tris-HCl (pH7) — 2mM CaCl₂ — 0.05% Triton x — 100)4—6小时。

(14) 分部收集，闪烁计数。

(15) 1000g离心悬液30分钟。收集沉淀并洗涤，从每分钟的计数来估计染色体浓度。

2. 在pH7条件下分离染色体

(1) 细胞用[³H]TdR标记。

(2) 用秋水仙素处理细胞。收集细胞后用冷PBS洗涤。测定有丝分裂指数，细胞浓度及cpm/细胞。

(3) 在0.02M Tris-HCl (pH7.0) — 3mM CaCl₂中调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^7$ 。膨胀细胞20—30分钟(0—5℃)。加入1% Triton x — 100，用匀浆器破碎细胞并在相显微镜下检查。

(4) 匀浆及涮洗液一起离心，1000g，30分钟。

(5) 密度梯度分离染色体，在无Triton x — 100的分离缓冲液中回收。

3. 中期染色体的导入

(1) 导入悬浮细胞

① 将受体细胞离心，220g，5分钟。弃去上清液。

② 在完全MEM培养液(10%胎牛血清)内，悬浮纯化的染色

体，1000g离心30分钟，弃上清液。用原体积50—75%的完全培养液悬浮沉淀物，打匀。

③染色体悬液移入含有受体细胞的管内。

④加十分之一容积的110 μ g/ml聚-L-鸟氨酸（分子量70000）到试管内。用吸管混匀细胞，5%CO₂平衡，37℃保温90—120分钟。转动试管，保持悬浮状态。

⑤培养的混合物内含有6 \times 10⁶受体细胞/ml。

⑥用完全培养液稀释后，把悬液转入塑料培养皿。待细胞生长三代后，使用选择培养基。

(2) 磷酸钙沉淀染色体的导入

①导入前，在10cm培养皿中培养2 \times 10⁶受体细胞，使用前除去培养液。

②在HEPES缓冲液(2mM HEPES pH7.1、137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 28mM蔗糖)内悬浮染色体，其浓度相当于2.5 \times 10⁶细胞/ml。加入1/16容积的2M CaCl₂，形成染色体与磷酸钙的共同沉淀物。

③培养10分钟后，每个单细胞层（约5 \times 10⁶细胞）加入2ml染色体悬液，室温培养30分钟。

④每一培养皿内加入20ml完全培养液(MEM，含10%胎牛血清)。CO₂培养箱内培养4小时，37℃。

⑤加5ml 50%DMSO或10ml 30%DMSO(用培养液稀释)，室温下培养30分钟。

⑥倾去培养液，加10ml新鲜培养液，培养皿转入培养箱培养18小时。

⑦倾去培养液，用胰酶处理细胞并转入选择培养液。据报道，该方法比前一方法的转移率提高10倍。

(3) 染色体导入受体细胞后的分析

①使用HAT培养基选择特殊遗传标记

②表面抗原

③对药物抗性

④核酸杂交或同功酶分析

⑤细胞遗传学方法

(五)DNA中介的基因转移

1. 载体DNA的分离

将50mgDNA悬浮于100ml含50mM Tris, 250mM NaCl, 5mM EDTA, pH8.3的无菌溶液内。水平摇床, 37℃下缓慢摇动过夜。溶解后, 将加热到90℃(10分钟)的RNaseA50μg/ml, 加入到溶解的DNA内, 37℃培养1小时。其后, 分别加入半消化的链霉菌蛋白酶和SDS至500μg/ml和0.2%(w/v), 在37℃培养2小时。此时, 加入等体积重蒸酚, 内含0.1%羟基喹啉并以10mM Tris缓冲, pH 8.1, 1mM EDTA, 缓慢搅拌直至形成乳浊液后, 再继续搅拌10分钟。离心, 使含有DNA的水相与有机溶剂分离, 并用吸管吸出。水相以酚:氯仿:异戊醇(50:48:2)抽提。再以氯仿:异戊醇(24:1)抽提。最后移出水相, 并浓缩DNA, 添加二倍容积的乙醇。高分子量DNA在添加乙醇后沉淀, 用无菌塑料管移入无菌聚丙烯试管中。加入蒸馏水, 37℃摇床过夜, 使DNA溶解。测定DNA浓度, 并可在4℃下无菌储存DNA, 直至鉴定。

2. 细胞DNA的制备

收获培养细胞, 以等渗(10mM Tris, 140mM NaCl, pH8.0)溶液洗涤。沉淀物悬浮于DNA抽提缓冲液内, 细胞浓度不超过 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。加入SDS至0.2%, 然后如前节所述加入500μg/ml半消化链霉菌蛋白酶, 经酚和氯仿抽提后, 用DNA抽提缓冲液透析过夜。用热处理过的RNase A 50μg/ml在37℃下消化1小时。加入链霉菌蛋白酶至250μg/ml, SDS至0.2%(w/v), 再培养2小时。如前述对DNA进行抽提, 乙醇沉淀, 并悬浮于蒸馏水中。按这一程序分离的DNA, 通常大于100kb。可参照0.3%的琼脂糖凝胶电泳中, 噬菌体λ(50kb)和HSV-1(160kb)DNA的迁移率来判断。这种DNA在转移实验中作为供体DNA的来源是合适的。DNA的浓度可调节至500μg/ml。

3. 磷酸钙DNA沉淀和转移缓冲液的制备

制备高转移活性的磷酸钙 DNA 沉淀需用仔细调节过的 HEPES 缓冲。常规制备 $2 \times$ HEPES 缓冲的磷酸盐批量溶液, 用玻璃电极调节 pH 至 7.10 ± 0.05 (一些标准电极往往不能精确测定 HEPES 缓冲液 (HBS) 的 pH 值)。制备 $2 \times$ HBS (含 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM 磷酸钠)。溶液经孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤。 -20°C 下储存在聚丙烯管内。 $2 \times$ HBS 用时解冻, 对 pH 值进行核对调节到所需之值, 一次性使用。

典型的 CaPO_4 -DNA 沉淀, 是加 $10 \mu\text{l}$ 供体真核细胞 DNA 到 $230 \mu\text{l}$ 无菌水中, 颠倒试管使 DNA 缓慢混合, 然后加入等容积的 250mM CaCl_2 , 使之混合。将一支无菌的 1ml 塑料吸管插入到含 $2 \times$ HBS 的管内, 将 DNA- CaCl_2 混合溶液滴加到含等容积的 $2 \times$ HBS 的管内, 滴加同时用塑料吸管缓慢吹泡。在室温中放置 30—45 分钟后, 即形成磷酸钙 DNA 沉淀物。

4. 受体细胞的制备和转移

受体细胞是在无选择压力下培养的 2 日龄细胞, 例如, 要使 LTK^- , APRT^- 细胞接受并转为阳性表现型时, 是把正常维持在 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 氨基喋呤的细胞转入没有添加药剂的培养基内培养。在转移的前一天, 将 5×10^5 细胞/ml 接种到含 10% 小牛血清的 10ml Dulbecco 氏改良的 Eagle 培养液 (DME) 内。次日晨, 把 1ml 磷酸钙—DNA 沉淀物直接加入 10ml 生长培养液内, 覆盖住受体细胞, 轻轻摇动平皿后, 放入 36°C , 6% CO_2 培养箱内, 4—12 小时。更换培养液后, 再培养 21 小时。此后, 施加选择压力, 使转化体表达。

5. 选择系统

对于受体细胞群体中罕见的转化体来说, 生化选择是有力工具。各种选择培养基和适当的 DNA 源, 对表达供体基因细胞的鉴定提供了条件。如, APRT , HPRT 或 TK 基因均可用适当的选择培养基进行选择。 APRT^+ 细胞可在含 $50 \mu\text{M}$ 氨基氨基酸和 $100 \mu\text{M}$ 腺嘌呤的培养基中成活。 HPRT^+ 细胞则可在 HAT 培养基上生长 (HAT: 次黄嘌呤 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$, 氨基喋呤 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 胸苷 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$)。当将突变

dhfr基因转移到对MTX（氨甲喋呤）敏感的小鼠L细胞中时，最初可在0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨甲喋呤中选择，继之在大量成活的克隆中再增加剂量水平。

原位杂交和基因探针方法是检出外源DNA序列更加敏感的方法。

（六）细胞或胚胎内微量注射外源物质

向细胞内导入外源物质的技术，除融合和化学方法外，显微注射技术作为一种物理方法已成为有力工具。现以哺乳类受精卵为例进行介绍。

1. 显微操作器

Leitz显微操作器包括左右手各一操作单元并配置有显微镜。其中，一个单元控制持卵器，另一单元控制注射器。

（1）持卵器

持卵器或称持卵管是一支吸管，外径70—100 μm ，尖部内径为10—15 μm 。可用直径为1mm的玻璃毛细管手工控制，再用电炉丝加热顶端而形成所需内径。持卵管连接塑料管，管内充以矿物油，系统中不得有气泡。持卵器固定在显微操作单元上。为了能够接触培养皿底部，持卵管距尖端2—3mm处应呈15—20°角。持卵管经干热灭菌后无菌保存。

（2）注射管

注射管用薄壁玻璃毛细管控制。通过对加热温度的控制，制成尖端为0.5 μm 的注射管。在毛细管内壁附有细丝，这有助于迅速吸入液体。灭菌和保存条件均与持卵管同，但最好当日拉制。

注射时有两种方法可供选用。一种是连续液流系统。注射液充满注射管后，注射管与压缩空气钢瓶连接，将压力调节至合理流动最低限度，并用卵进行试验得出压力上限。这种方法可避免注射系统出现负压，但不易掌握。另一方法是正压注射，共有三种方式。一是用大注射器（例如50ml），用塑料管连接注射管和注射器。注射器活塞放在回程一半处，注射管内充以注射液体，对活

塞加压后，液流速率取决于注射管的孔径大小。当放松压力后，活塞迅速回弹到原来位置，防止了系统中产生负压。另一种方法是使用连续液流装置，但在细调节器的位置上放一个T形管，将它的一个分枝开放，用手堵住这个开放的口时，气流压力使注射管内液体排出。封闭开口的大小和时间决定了液体的排出量。第三种装置与控制持卵管机械装置的原理相同，用微动尺或100 μ l微量进样器提供正压，系统中充以硅油或有机硅溶液。注射液则从注射管端部缓缓吸入。

(3) 注射小室

稍加硅化的凹形载片的凹穴内放一滴卵培养液（用25mM HEPES, pH7.5, 代替碳酸根离子，保证在室温下pH值稳定），在液滴上铺盖矿物油。硅化有助于液滴保持圆形。另一种小室是塑料培养皿盖，它不适用于Nomarski DIC透镜。

2. 操作步骤

(1) 小鼠卵的回收

从自然交配或经促性腺激素超排后交配的雌鼠中回收单细胞受精卵。先用磷酸缓冲液从输卵管中冲出卵。再用透明质酸酶（300IU/ml）除去附着在卵上的卵丘细胞。将卵回收并用新鲜培养液洗涤，放在5%CO₂，37℃培养箱内。

(2) DNA溶液的制备

用于显微注射的DNA溶液应是无菌、无颗粒的，并应彻底除去酚、乙醇和氯仿。超螺旋质粒DNA应在溴化乙锭/氯化铯的梯度上分带两次，以内切酶消化的线性片段应以酚/氯仿抽提，并进一步以凝胶纯化并作透析。

纯化后的DNA沉淀物，溶于注射缓冲液内。各研究者使用的缓冲液包括从蒸馏水到等离子强度的磷酸缓冲液或盐水，尚没有证据能说明哪种更好些。但是发现0.1—0.3mM的EDTA能促进整合率。注射用缓冲液可参考两种配方：(a)10mM Tris-HCl/0.25mM EDTA, pH7.5；(b)5mM NaCl/5mM Tris-HCl, pH7.4, 0.1mM EDTA。加入DNA样品内所有的溶液均应过滤除菌并且最后离心

15—30分钟除去所有颗粒物质。

(3) 原核注射

将注射小室放在显微镜上，低倍物镜聚焦到培养液滴的边缘。持卵器低位进入液滴，使其端部刚好接触小室底部。在高倍镜下检查卵的原核。若卵可供注射，就将充有DNA液的注射管在低倍镜下伸进液滴，其尖端处于卵的焦点位置。用注射管把卵移至持卵管的端部。换高倍镜头，定位雌性和雄性原核，雄性原核较大故易于注射。用注射管把卵定位，使雄性原核处于注射位置，持卵管缓缓抽吸，将卵吸附固定在持卵器上。若位置不合适，可释放卵后，再次定位吸附。注射管的尖端以正确方位接近卵，用操纵杆把注射器推入透明带和质膜并进入原核。原核和注射器尖端应保持在焦点位置上。注射管尖端应避免接触核仁，否则它们会牢固地粘附于尖端。若采用连续液流方法，注射管尖端在原核内时就能观察到原核迅速膨胀。当原核容积增加30—50%时，应向反方向推动操纵杆，以尽快抽出注射管。使用其它注射系统时，也可用同样的标准掌握。注射时原核若不膨胀则有两种可能：一是注射管堵塞，因而没有液流，需更换另一支充以DNA的注射管，二是注射管未能刺穿质膜，只是把高度韧性的质膜压入卵内，这种情况的出现可根据注射管端加压点上的质膜会形成两个90°角和注射管尖端会出现DNA溶液泡来判断。原核膨胀乃是DNA注入成功的最终指标。

卵的细胞质颗粒如在注射管抽出时外流，卵将解体死亡。注射过与未注射过的卵应彼此分开。注射过的卵原核较大。全部操作完毕后，小室移入37℃, 5%CO₂培养箱内培养，再开始另一批卵的操作。最后，在解剖镜下对全部注射过的卵进行检查，剔除解体者。一般60—80%经过注射的卵可供移植到同步的受体输卵管内。

(4) 小鼠品系的选择

F₁代的杂种作为供体时，往往回收更多的卵子，这些卵的成活力和体外操作耐受性较好，整合外源DNA的效率也较高。可用

SJL、CBA、C3H品系与C57BL/6杂交而提供F₁杂种小鼠。若希望遗传背景单纯，只有C57BL/6曾用于这类实验。

(5) 移植小鼠的鉴定

从小鼠尾部分离的高分子量DNA作斑点转移并与导入的基因顺序的特异探针杂交。含有这些顺序的小鼠能提供正结果。另一方法是将基因组DNA经内切酶消化，通过Southernblot筛选目的基因。为考察基因是否已稳定地整合到受体动物的基因组内，可对这些动物的后代作同样的杂交试验筛选。

(白琴华)

第三节 单克隆抗体技术

单克隆抗体是本世纪七十年代中期以后发展起来的一项生物工程新技术。1975年，Köhler和Milstein用聚乙二醇(PEG)成功地将小鼠骨髓瘤细胞与绵羊红细胞免疫的小鼠脾淋巴细胞融合，经过筛选和分离纯系，得到了既能产生和分泌抗体、又能在体外培养条件下无限生长、长期传代的细胞系，称之为“杂交瘤”。由杂交瘤细胞系分泌的针对预定免疫原的抗体，称为“单克隆抗体”。

与传统的多克隆抗血清相比，单克隆抗体有下述优点：

单克隆抗体是针对单一抗原决定簇的，专一性很强。应用经过严格筛选的、仅与预定抗原决定簇结合的单克隆抗体，可以检测出类似抗原间的微小差异而很少发生交叉反应，这是常规抗血清所办不到的。

用常规抗血清方法制备的抗体，其质与量往往随动物、甚至随同一动物的不同放血期而异，很难标准化。运用杂交瘤技术制得的单克隆抗体，不仅纯度高，特异性强，作为标准化试剂便于

不同地区的实验室相互比较，而且可在体外大量生产，不易污染。

(一) 单克隆抗体的产生与纯化

正常脾细胞在人工培养条件下一般存活期不超过两周，骨髓瘤细胞则可长期培养。而融合用的骨髓瘤细胞通常为缺失次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 或胸腺嘧啶核苷激酶 (TK) 的突变系，因而不能利用外源性次黄嘌呤或胸腺嘧啶核苷。在补加了次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷的选择培养基中培养时，由于氨基嘌呤封闭了DNA的正常合成途径，骨髓瘤细胞也将无法增殖。通过选择培养基的选择，只有骨髓瘤细胞与脾细胞融合后产生的杂交瘤细胞得以生存下来，这是因为杂交瘤自骨髓瘤细胞获得了在组织培养中无限生长的能力，而脾细胞则提供了克服氨基嘌呤阻断DNA合成所必需的 HGPRT。杂交瘤细胞同时表达两种亲代细胞的某些基因型及表型特征。

产生鼠类杂交瘤单克隆抗体的常规步骤如图 5-4 所示。所必需的主要仪器设备如表16所列。

1. 动物和细胞系的选择

动物的选择取决于融合所用的细胞系。迄今用得最普遍的是

表16 生产杂交瘤所需主要仪器设备

| | | |
|-----------|-------------------------|---------------------------------------|
| 主要设备 | 37℃—CO ₂ 培养箱 | |
| | 高压灭菌锅 | |
| | 带紫外光的超净工作台 | |
| | 低温冰箱 | -20℃, -70℃ |
| | 液氮贮存罐 | |
| | 离心机 | |
| | 倒置相差显微镜 | |
| | 实验动物饲养设备 | |
| | 恒温水浴 | |
| | 微量吸管 | 1-20μl, 50-200μl |
| 小件玻璃或塑料器皿 | 微量滴定板 | 24孔, 96孔 |
| | 组织培养瓶 | 25cm ² , 80cm ² |

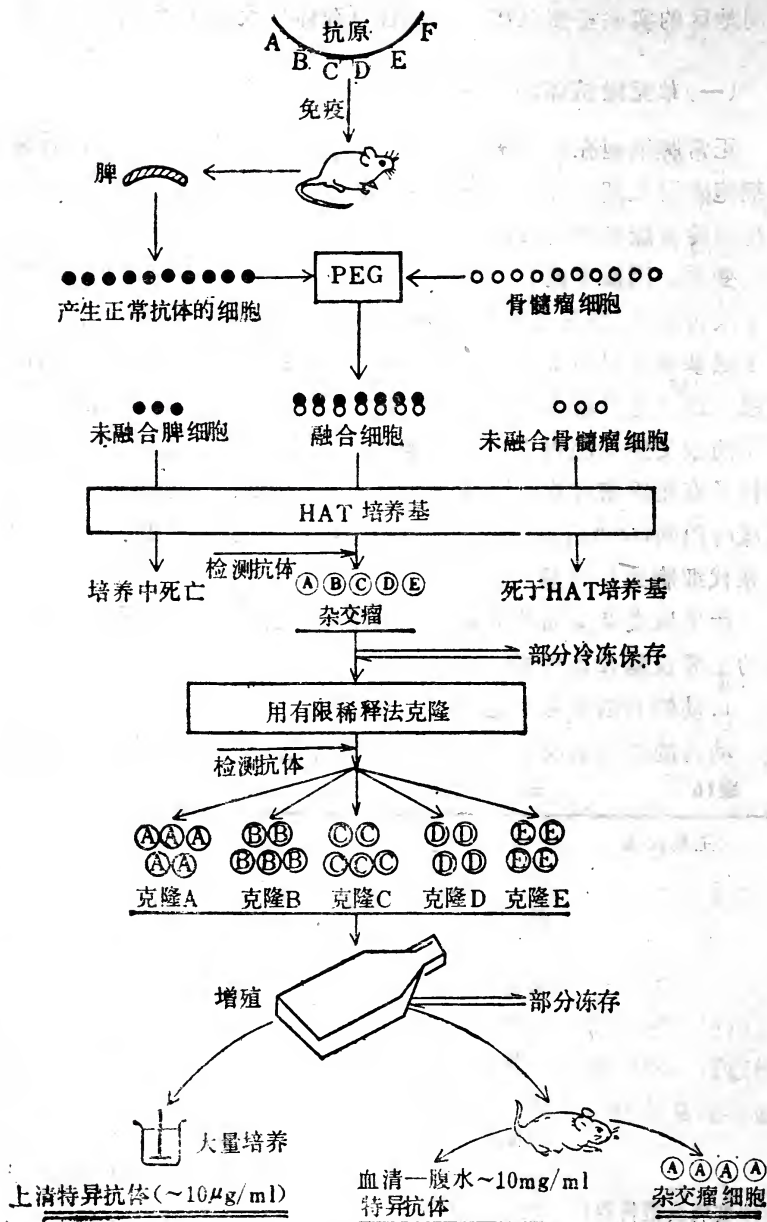


图5-4 产生鼠类单克隆抗体的常规方案

BALB/c 小鼠，因为所有小鼠骨髓瘤细胞系均来自这一品系。大鼠由于个体大、产腹水比小鼠多等优点，也经常被选作免疫对象主要是Lou大鼠。

现有的啮齿类骨髓瘤细胞系见表17。

表17 融合用的啮齿类骨髓瘤细胞系

| 细胞系 | 染色体数 | 表达的免疫球蛋白 | 来源 |
|-------------------------|------|---------------------|--------------------------|
| 小鼠细胞系 | | | |
| P ₈ -X63/Ag8 | 65 | γ ₁ , κ | MOPC-21 |
| NSI/1, Ag4.1 | 65 | 细胞内κ | MOPC-21 |
| X63-Ag8.653 | 53 | 无 | X63-Ag8 |
| SP2/0-Ag14 | 72 | 无 | (X63-Ag8 × BALB/C) |
| FO | 72 | 无 | SP2/0-Ag14的克隆 |
| MPC11-45.6TG1.7 | 62 | γ _{2b} , κ | BALB/C |
| S194/5XXOBU.1 | 无 | 无 | BALB/C |
| 大鼠细胞系 | | | |
| Y ₈ -Ag1.2.3 | 39 | κ | Lou |
| YB2/3Ag20 | | 无 | (Lou × AO)F ₁ |
| IR983F | | 无 | Lou |

2. 免疫

免疫方案往往随经验及实验室的习惯而异。下面根据抗原种类列出两种方案。

(1) 可溶性抗原、细菌及病毒的免疫方案

① 给6—12周龄小鼠或大鼠注射1—10μg纯糖类抗原，10—50μg纯蛋白质抗原或大量的不纯抗原（通常不超过1mg）。抗原需与弗氏完全佐剂充分混合、乳化，通过皮下或皮内多点注射。

② 2—3周后，腹腔注射同样剂量或较前剂量稍高的抗原（一般用弗氏不完全佐剂乳化）。4—6天后采血测定抗体滴度。

③ 融合前3—4天，给抗血清滴度高的动物静脉注射剂量较大的抗原盐水溶液（不加佐剂）。

(2) 细胞作抗原时的免疫方案

①用PBS（磷酸盐缓冲液）洗涤细胞3次，给4—12周龄的小鼠或大鼠静脉或腹腔注射 $1-5 \times 10^7$ 个细胞，不加佐剂。

②3周后，重复上述步骤。再过4—6天，采血测滴度。

③给滴度较高的动物静脉注射2倍于前述剂量的细胞PBS悬液。3—4天后融合。

3. 培养液和细胞悬液的制备

(1) HAT培养基贮存液的制备

① $100 \times$ HT (10mM次黄嘌呤—16mM胸腺嘧啶核苷) 贮存液：
称取136.1mg次黄嘌呤和38.8mg胸腺嘧啶核苷，溶于100ml 50—60℃的双蒸水中；微孔滤膜过滤后按需要量分装，-20℃贮存。

② $100 \times$ A (4×10^{-5} M氨基喋呤) 贮存液：

称1.76mg氨基喋呤，加入约90ml双蒸水，向其中滴加1N NaOH至氨基喋呤溶解。然后用1N HCl调pH至7.5；用双蒸水定容至100ml；过滤灭菌；分装并避光保存于-20℃。

(2) 培养液的制备

①完全培养基：

DMEM（改良的Eagle's培养基）或

RPMI—1640培养基

450ml

100mM丙酮酸钠

5ml

青—链霉素溶液（青霉素5000IU/ml，链霉素5mg/ml）5ml

200mM L-谷氨酰胺

5ml

灭活的胎牛血清

50ml

4℃保存。

②HT培养基：

每100ml完全培养基中，加入1ml $100 \times$ HT贮存液即成。

③HAT培养基：

每100ml完全培养基中各加入1ml HT贮存液和1ml A贮存液（均为 $100 \times$ ）即成。

(3) 50% (W/V) PEG的配制

将固体PEG（MW1500或4000）高压灭菌，PEG即融化，冷却

至50℃（在此温度下仍为液体）。加入等体积无血清的DMEM或RPMI-1640培养基。-20℃贮存。

（4）细胞悬液的制备

①小鼠脾细胞

用颈椎脱位法处死小鼠。70%酒精消毒皮肤后，用无菌手术器械剪开皮肤和腹膜，取出脾脏，移到盛有5ml无血清DMEM或RPMI-1640的培养皿中。刮梳或剪碎脾脏，将脾细胞挤压至培养基中。将细胞吸至一无菌管中，静置使组织块沉降。将无团块的脾细胞悬液吸入另一试管，500g离心5分钟。用无血清培养基洗涤脾细胞2次，再悬浮于5ml培养基中。用3%乙酸作稀释液，除去红血球。计算每ml悬液中的有核细胞数。一般每只小鼠的脾脏可得 10^8 细胞。每只大鼠的脾脏可得 2×10^8 细胞，约为小鼠的2倍。

②小鼠腹腔巨噬细胞

处死小鼠，消毒皮肤。向腹腔内注入2—3ml培养基，轻压腹部使细胞混悬。打开腹壁皮肤，暴露腹膜，提起腹膜中心，插入注射器针头，吸出全部细胞悬液。保持低温，防止巨噬细胞成团和粘连。500g离心5分钟，用PBS洗涤2次，再离心而后计数。一只小鼠约可获得 3×10^6 个细胞。用加有10%胎牛血清和抗生素的培养基制成 10^5 /ml的细胞悬液。

4. 融合程序

（1）将融合用器材全部灭菌。将胎牛血清、HT和A贮存液化冻，连同其它培养基成分和PEG溶液置于37℃水浴中预热。

（2）收获处于对数生长期的骨髓瘤细胞。计数（密度范围应在 10^8 /ml），检查活力（应高于95%）后，悬浮于RPMI或DMEM培养基中。

（3）将洗涤过的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞按5:1的比例混合。通常约用 10^8 脾细胞和 2×10^7 骨髓瘤细胞。

（4）500g离心5分钟，吸出上清液。

（5）轻弹离心管使细胞沉淀松散。半分钟内边摇荡边逐滴加入1.5ml 50%的PEG溶液。用吸管将细胞悬液小心地打匀，随后

静置半分钟。

(6) 在2分钟内，边轻摇试管边滴加5ml无血清培养基。接着再加5ml。

(7) 静置约3分钟，500g离心5分钟。

(8) 分装于24孔培养板。用50ml加有 $2\times$ HAT的完全培养基制备融合细胞悬液，每孔加入0.5ml（约 10^6 细胞）。板内每孔已于先装有经过温育的 5×10^4 个腹腔巨噬细胞（作饲养层）。如果不铺饲养层，就在细胞沉淀中加100ml含 $1\times$ HAT的完全培养基制成悬液，于每孔中加入1ml。收获 10^8 细胞的1只脾，约需4—5块培养板。每块板的最后一行最好设对照。

(9) 对照用的脾细胞和骨髓瘤细胞应不少于 5×10^6 个。500g离心5分钟，同样用培养基制成细胞悬液。24孔板上每孔加 10^6 细胞，最好每块板上都有两种细胞的对照孔。

设对照除有助于监测两种亲代细胞系的死亡情况外，脾细胞对照还可监测分泌功能何时丧失，骨髓瘤对照则可检查氨基喋呤的效力。对照孔还有利于分析和查明试验中出现的问题以便及时采取补救措施。

(10) 将培养板置于 37°C 、一定湿度和 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱内培养。

(11) 4—5天后检查细胞。此时大量细胞死亡，试验孔中可能有一些活细胞，但对照孔则全无，此时不要加培养基。如果对照骨髓瘤仍正常，就应加含有新鲜氨基喋呤的HAT+完全培养基。

(12) 7—10天后加HT+完全培养基，每孔加入1ml。如果对照细胞没有完全死亡，则也要加氨基喋呤。

(13) 在8—14天间，就可以看到杂交细胞的克隆。当克隆长到1mm直径左右时，即可检查孔中培养基的抗体含量。从培养孔取出1ml测定抗体，同时再补充1ml完全培养基+HT。如果到第14天时还看不到克隆，就应更换新鲜培养基。

(14) 将选出的阳性孔中的细胞扩大培养，冷冻保存一部分，另一部分予以克隆化。

大鼠的细胞融合方法与小鼠相似。只是脾细胞与骨髓瘤细胞的比例以2:1为宜。因出现的克隆容易扩散，故较难检测。

5. 杂交瘤克隆化

(1) 有限稀释法

①于克隆前1天或当天，向96孔培养板中加入巨噬细胞饲养层，每孔加入0.1ml。在CO₂培养箱中温育。

②从阳性培养孔中吸取欲克隆的细胞，计数，一次克隆化约需1000个细胞。多余的细胞可小心地放回24孔板中。

③用完全培养基稀释细胞成30个/ml，加入两块96孔板中，每孔加0.1ml（孔内已预加饲养层）。

④将剩下的细胞再度稀释成10个/ml，然后再取两块铺了饲养层的96孔板，每孔中加入0.1ml。

⑤再制备3个/ml的细胞悬液，加到另外两块板上。

⑥将培养板置CO₂培养箱中（37℃）培育，2—3周可出现可见集落。

⑦检测上清液的抗体活性，选出阳性孔，进行扩大培养和再克隆。

⑧冻存1—5×10⁶细胞。

(2) 在软琼脂中克隆化

此种方法与有限稀释法相比，存在较多的技术困难，故从略。

6. 杂交瘤细胞的冻存

在细胞克隆化前后，都应冻存少量（1—5×10⁶）细胞，以防不测。

冷冻保存液：在含20%胎牛血清的基础培养液中，逐滴加入二甲基亚砜，边加边搅拌，使终浓度为10%。4℃保存。

待冷冻的细胞在4℃下以300g离心沉淀，吸去上清液，约5×10⁶细胞团中加1ml予冷的冷冻保存液。分装于灭菌安瓶中，火焰封口，放在塑料盒中置于-70℃冰箱中过夜，次日转到液氮罐中。

复苏细胞时，从液氮中取出细胞，在37℃水浴中迅速化冻，一呈液状立即将细胞吸入10ml不含小牛血清的培养液中，离心洗

涂2次，弃去上清，用完全培养基制成细胞悬液，以备培养。

7. 杂交瘤的扩大培养

(1) 离体扩大培养

当培养孔底部长满细胞时，应及时转移至25cm²培养瓶中扩大培养。根据细胞的生长情况，以后可逐渐移至80cm²、175cm²的培养瓶中培养，使细胞密度保持在10⁵—10⁶/ml之间。扩大培养初始时，加饲养细胞是有益的，以后可不加饲养层，胎牛血清的浓度亦可逐渐降至5%。

(2) 体内扩大培养

当需要大量抗体时，通常用的还是制备动物腹水的方法。杂交瘤细胞以腹水形式在BALB/C小鼠或Lou大鼠等组织相容性动物体内生长时，产生的抗体浓度约为培养细胞的1000倍。先给动物腹腔内注射0.5ml降植烷或液体石蜡使动物致敏，8—10天后给动物腹腔内接种10⁶—10⁷杂交瘤细胞。随后注意观察动物腹部胀大情况，一般在2—4周内可见腹部明显胀大。用70%酒精消毒腹部皮肤，插入针头抽取腹水。如动物健壮，可多次反复采集，也可杀死后一次抽取。一只小鼠有可能产生10ml腹水，而大鼠则得50ml或更多量。将抽取的腹水离心，去除细胞及其碎片后，加0.02%的叠氮钠，4℃或-20℃冰箱保存。

8. 抗体的纯化

(1) 硫酸铵沉淀与阴离子交换层析法

①腹水在40℃下，20000g离心20分钟，以去除脂肪和沉淀物。

②向腹水中缓慢加入饱和(NH₄)₂SO₄，边加边搅拌，至终浓度达40%，搅拌30分钟。

③2000—10000g离心5分钟，弃去上清。

④将沉淀悬浮于原体积的40%(NH₄)₂SO₄中，再次离心。

⑤重复步骤4。

⑥将沉淀悬浮于磷酸缓冲液中。

⑦在4℃下，用1升10mM Tris—HCl (pH8)透析过夜，其间

更换透析液1—2次。

⑧取100ul透析过的蛋白，用磷酸缓冲液稀释10倍。在280nm测定光密度，1mg/ml溶液的光密度约为1.4。计算出蛋白总量。

⑨制备DEAE—Sephacel离子交换柱，每100mg蛋白用10ml纤维素。DEAE—Sephacel预先用10mM Tris—HCl (pH8)平衡。

⑩加样。用10mM Tris—HCl (pH8.0)缓冲液洗柱，直至流出液的 $A_{280} < 0.01$ 。

⑪用上述Tris缓冲液的0—300mM NaCl直线梯度，收集最早出现的第一个峰。每ml腹水或血清的免疫球蛋白(Ig)G收率约为3—10mg，纯度在95%以上。

(2) 蛋白A—Sephacel亲和层析法

①取1g蛋白A—Sephacel CL—4B，悬浮于200ml磷酸缓冲液(pH8.0)中，至少吸胀30分钟。

②装柱(约4ml)。先后用100ml磷酸缓冲液(pH8)和100ml 0.1M柠檬酸钠(pH3)洗柱，然后用前一种缓冲液重新平衡。

③腹水或培养上清液对pH8的磷酸缓冲液透析(如先用 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后再透析效果更好)平衡。

④上柱(每ml胶可与20—25mg IgG结合)，流速为0.5—1ml/分。

⑤用5ml 10mM磷酸缓冲液(pH8)洗柱。监测流出液的 A_{280} nm，按0.5ml级分收集流出液。开始几管应该是没有蛋白的，如果是强阳性，抗体就没有与蛋白A结合；如果是弱阳性，可能是上样过多了。

⑥再用上述缓冲液(不少于5ml)洗柱，大多数IgA、IgM和IgG₃将在这一级分内。

⑦用5ml 0.1M柠檬酸钠(pH6)洗脱IgG₁抗体。

⑧用5ml 0.1M柠檬酸钠缓冲液(pH4.5)洗脱IgG_{2a}。

⑨用pH3.5的同类缓冲液洗脱IgG_{2b}。

⑩将步骤⑦、⑧、⑨收集的级分，分别用1M $NaHCO_3$ 调pH至7.4。测定蛋白浓度。浓缩后，保存。

⑪用50mM柠檬酸清洗用过的柱子。再用pH8.0的磷酸缓冲液

平衡，4℃保存，以备再用。

(3) IgM单克隆抗体的纯化

在低离子强度下沉淀IgM是最方便的纯化方法。用2mM磷酸缓冲液(pH6)透析，即可得到沉淀。离心后，用上述缓冲液洗涤，再悬浮于10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl(pH7.2)。为防止IgG混杂，可进一步上Sepharose 6B柱层析，洗脱液的第1峰中便含IgM (IgG在其后洗脱)。

另一种方法是用硫酸铵沉淀后，离心，将沉淀溶于磷酸缓冲液中。使液体通过Sephadex G-200柱。收集第1峰，对5mM Tris-HCl(pH7.5)进行充分透析。取沉淀，用冷透析液洗涤，离心。再将沉淀溶于0.1M Tris-HCl(pH8.6)中，对磷酸缓冲液透析，取其沉淀。

9. 单克隆抗体的保存

首先应鉴定免疫球蛋白的种类。大多数单克隆抗体和血清一样是不宜反复冻融的。有很多IgM抗体反复冻融后，会失去与抗原结合的能力(但也有很多IgM与之相反)。无论何种形式的单抗，最好以小包装冻存。

(1) 腹水与血清：-70℃或-20℃下冻存。血清可加入等体积硫酸铵，4℃保存。

(2) 培养的上清液：-70℃冻存，或加0.1%叠氮钠4℃保存。

(3) 纯化的IgG和IgM：pH中性，盐浓度100—200mM，蛋白浓度1—10mg/ml下，加0.1%叠氮钠4℃保存，或-70℃冻存。

(4) 与生物素或荧光素等物偶合的抗体：4℃保存或加入50%甘油后-20℃保存。

(二) 抗体的测定

抗体检测是制备杂交瘤的重要一环。融合开始后，在显微镜下一经发现杂交细胞集落生长或pH指示剂变黄，就应立即作上清液的抗体活性初筛。一旦测出某一孔中有抗体活性，就应尽早将此细胞克隆化，并再次检测。在产生杂交瘤的全过程中，筛选工

作可能要持续几周。

选择检测方法时要考虑的重要因素有：试验的灵敏性、精确性、速度、费用、人力与安全性等。同时也要考虑所需抗体的类型与相应抗原的性质，以及融合过程不同阶段的实际需要。初筛时，要从上百个样品中选出阳性杂交瘤并予以克隆化，因此应选用快速、灵敏、简便的检测方法。后阶段的筛选，因与抗体的实际应用有关，故测定的条件和方法也应与抗原抗体实际反应的要求尽量一致，或使之尽量相似。

细胞试验是使用最早的测定手段。近几年来，固相测定系统已成为最常用的方法。此外经常使用的还有液相测定法，如放射免疫测定。生物学测定法用得较少。

实验室应在融合工作开始前，先建立标准化的抗体检测方法，可以用免疫动物的血清作为抗体来源。

1. 固相试验

固相试验系统几乎适用于任何抗原与任何抗体。这些方法，尤其是酶联免疫吸附试验(ELISA)，由于具有灵敏、快速、经济、易行以及适于测试大量样品等优点，已成为使用最普遍的检测手段。

有两类固相试验。一类是ELISA或放射结合试验。其原理是将已知抗原结合于固相载体上，然后加入含有待测单克隆抗体的样品，一起温育后，在固相载体表面形成抗原抗体复合物。再加入与酶或同位素偶联的第二抗体，与上述抗原抗体复合物相结合。最后通过放射测定或用酶催化底物后测定光密度的方法来检测第一抗体。另一类是夹心法或免疫放射测定试验(IRMA)。其原理是将单克隆或不是单克隆的抗体结合到固相支持物上，再加入抗原，温育使形成复合物。然后加入用酶或放射性标记的、针对抗原的不同抗原决定部位的第二抗体，以检测被结合的抗原。前一类通常用于筛选抗体并对其定量，后者则用以定量抗原。

最常用的固相载体是以聚苯乙烯或聚氯乙烯为材料的96孔微量滴定板。大多数可溶性蛋白和核酸抗原都能吸附在这种板上。

可溶性蛋白抗原通常用 $100\mu\text{l}$ 的 $1-10\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液包被。当抗原是染色体、病毒、细菌、寄生虫或者完整细胞时，一般用 $10-50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多聚L-赖氨酸在室温下予包被1小时，然后加 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液($5\times 10^4-5\times 10^5/\text{ml}$)温育45—60分钟，再用0.1—0.25%戊二醛固定3—5分钟。如不马上使用，包被过抗原的板可在 4°C 保存数周，不会失去免疫活性。

常用的第二抗体是绵羊(山羊)抗鼠或家兔抗鼠免疫球蛋白。用来标记第二抗体的酶常为辣根过氧化物酶，其相应的底物则常用邻苯二胺。

(1) 测定最佳试验条件的ELISA

这是在正式筛选前，用免疫的动物血清和免疫原所做的预备试验。用以测定抗原包被的最佳条件、血清效价，并检验阴性对照系统。

对可溶性抗原用如下方法：

①用抗原免疫大鼠或小鼠，加强注射后4—7天采血(不要处死动物) $0.1-0.2\text{ml}$ ，离心取血清待用。用同品系同月龄未免疫动物的血清作阴性对照。

②用磷酸缓冲液(PBS)制备 2.4ml 浓度约为 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗原溶液。用倍量稀释法做6个稀释度，每管 1.2ml 。最后1管的浓度为第1管的 $1/64$ 。

③在96孔微量滴定板第1排的12个孔中，分别加入 $100\mu\text{l}$ 最浓的抗原；第2排各孔中加入 $100\mu\text{l}$ 稀释2倍的抗原；依此类推，直至第7排12孔中加稀释64倍的抗原。第8排中加入PBS。 4°C 过夜。

④用含 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白(BSA)的PBS，配制 $1/100$ 稀释度的鼠血清 1.6ml ，用倍量稀释法再作10个稀释度，最后1管应为 $1:10000$ ，每管 0.8ml 。用PBS配制稀释100倍的阴性对照血清 0.8ml 。

⑤甩去滴定板中的抗原液，用包被缓冲液洗板一次，甩去孔中液体，控干。

⑥ 每孔加入100 μ l含BSA(10mg/ml)或牛血清(1%)的包被缓冲液, 室温下温育1小时。用含0.05%吐温20的PBS洗3次, 甩干。

⑦ 在从左数第1行的各孔中加入100 μ l稀释100倍的抗血清; 第2行中加稀释200倍的, 以此类推直至第11行。第12行加稀释100倍的阴性血清。室温下温育1—2小时。用PBS洗涤液(含吐温20)洗3次, 甩干。

⑧ 每孔加入100 μ l稀释200—500倍的辣根过氧化物酶抗小鼠(或大鼠)免疫球蛋白结合物(可用PBS+0.05%吐温20作稀释液)。室温下温育2小时。用PBS洗涤液洗3次, 甩干。

⑨ 加入100 μ l新鲜配制的0.04mg/ml邻苯二胺溶液(溶于0.05M柠檬酸钠—0.15M磷酸钠—0.01% H_2O_2 液中, pH6)。室温下温育1小时。然后加50 μ l 4N硫酸以终止反应。用酶标分光光度计测读492nm波长下的光吸收率。如用肉眼观察, 作为对照的底排(未加抗原)各孔和右边第一行(加阴性血清)各孔应近乎无色。颜色最深的孔应在左上角, 沿右下角方向颜色渐弱。与对照孔相比, 开始出现颜色的血清的最高稀释度, 即为血清的效价。与此相对应的最低抗原浓度可供筛选时选用。

对细胞抗原可按下述步骤进行:

① 同前法①。

② 用PBS配制10 μ g/ml浓度的多聚L-赖氨酸。每孔加100 μ l, 室温下作用2小时。甩去孔中液体, 用PBS洗两次。

③ 配制2.4ml密度为 5×10^6 细胞/ml的抗原液。镜检应无细胞碎块。用小塑料离心管作6个倍量稀释, 最后一管的细胞密度为 7.5×10^4 细胞/ml。

④ 第1排各孔中加第1管(未经稀释的)细胞悬浮液, 每孔加100 μ l; 第2排加第2管(稀释2倍)抗原液; 依次类推; 第8排的每孔加100 μ l PBS作对照。室温下静置45分钟。

⑤ 用PBS洗板。在0.25%戊二醛中浸5分钟。用PBS洗3次, 甩干。加100 μ l含BSA(10mg/ml)或牛血清(1%)的PBS(加有

0.02%叠氮钠和100mM甘氨酸), 4℃过夜。

⑥同前法④。

⑦用加有0.05%吐温20的PBS洗3次, 甩干。

⑧同前法⑦。

⑨同前法⑧。

⑩同前法⑨。

(2) 筛选用ELISA

可溶性抗原的实验步骤:

①于96孔微量滴定板的每个孔中加入100 μ l适当浓度的抗原溶液(可用0.02M PBS + 0.15M NaCl, pH7.2配制), 4℃过夜或37℃1—2小时。包被过的板如暂时不用,可在4℃下短期保存(加0.1%NaN₃)。

②轻甩滴定板, 控干孔中液体, 用包被缓冲液洗1次。

③孔中加入包被缓冲液配制的100 μ lBSA (10mg/ml), 室温下0.5—1小时。

④用洗涤液(PBS + 0.05%吐温20)洗三次。

⑤孔中加50—100 μ l融合细胞的培养液上清, 37℃或室温下1—2小时。同时设对照, 阳性对照最好加适当稀释的小鼠(或大鼠)特异性抗血清, 阴性对照则用PBS、无关抗体或培养液及未免疫小鼠的血清。

⑥同④。

⑦孔中加100 μ l用洗涤液稀释200倍到500倍(最好事先测出适当稀释度)的酶标抗小鼠(或大鼠)Ig溶液。37℃1小时。

⑧同④。

⑨每孔加入100 μ l新配的底物溶液, 37℃下温育0.5—1小时。加入50 μ l 4N H₂SO₄, 测量A_{492nm}。

细胞性抗原的测定程序如下:

①每孔加100 μ l多聚L-赖氨酸(10 μ g/ml), 室温下预包被2小时后, 用PBS洗两次。

②孔中加入100 μ l适当密度的细胞悬液, 室温下静置1—1.5小

时。新鲜细胞可在4℃下离心5分钟(200—400g)。

③甩去孔中液体。将滴定板浸入用PBS新配制的0.25%戊二醛中5—7分钟,注意操作过程中不要产生气泡。

④甩去板上液体,用PBS洗三次。加PBS配制的BSA(10mg/ml)+0.02% NaN₃+100mM甘氨酸,4℃过夜。

⑤以下步骤与可溶性抗原检测法的⑤—⑨相同。

实验(3) 小点免疫结合试验

选择最佳试验条件时的方案:

①用抗原免疫大鼠或小鼠。加强注射4—7天后采血,分离出0.1—0.2ml的阳性血清和未免疫小鼠的正常(阴性)血清。

②在一张硝酸纤维素膜上划出9mm见方的6×6小格。用蒸馏水洗膜,室温下晾干(不少于1小时)。按下述浓度制备抗原倍量稀释液:1mg/ml,0.5mg/ml,0.25 mg/ml,0.125 mg/ml和0.063mg/ml。最后一行不加抗原作对照。

③在第一行每一小方格的中心加1μl 1mg/ml的抗原液成一小点;第二行加0.5mg/ml的抗原;依次类推。多数抗原可在干膜上保存相当长时间。

④将膜置于96孔板盖上,加10mg/ml BSA或1%牛血清孵育15分钟。晾干。

⑤制备1/50、1/100、1/200、1/500、1/1000的抗血清溶液和1/50的阴性血清。在硝酸纤维素膜第一排的每个抗原小点上加1—2μl 1/50抗血清;第二排加1/100浓度;余类推。第六排加阴性血清。孵育3—5分钟。

⑥用PBS洗膜五次。

⑦用含0.5mg/ml BSA的PBS将辣根过氧化物酶标抗小鼠(或大鼠)IgG稀释100倍,与膜一起孵育。

⑧重复⑥。

⑨加显色液,显色液的配法为:取1份4-氯-1-萘酚贮存液(3mg/ml,溶于甲醇中,暗处保存),与5倍体积的PBS(加0.01% H₂O₂)混合而成。5—15分钟后,结合了抗体的复合物将显示蓝色。

像ELISA一样，膜的左上方色最深，右下角无色。

用上述方法测定抗血清，既灵敏又简便，亦适于大量筛选。用它来测定单克隆抗体杂交瘤上清时，效果不如血清。筛选时如果用 $1\mu\text{l}$ 抗原而浓度偏低时，可加几次稀释液，每次加后都让膜干燥一次。

2. 液相系统

筛选杂交瘤最常用的液相系统是放射免疫测定，也即前述用放射性标记第二抗体而进行的放射结合试验。其优点是简单、灵敏、准确、本底低，缺点则是需要大量同位素标记抗原。

(1) 可溶性抗原的放射免疫测定(RIA)

①向96孔软质型聚氯乙烯微量滴定板的各孔中加入 $50\mu\text{l}$ 抗原($10-50\mu\text{g}/\text{ml}$ ，用 $\text{pH}7.4$ 的PBS溶解)，室温或 37°C 2小时。去上清(可重复使用数次)。

②每孔加 $100\mu\text{l}$ PBS- 0.5% BSA，室温下30分钟。然后用PBS- 0.1% BSA洗三次。

③向孔中加入 $50\mu\text{l}$ 培养上清液，室温或 37°C 孵育2小时。去上清。

④用PBS- 0.1% BSA洗三次。

⑤加 10000cpm ^{125}I 标记的第二抗体($10\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)或 ^{125}I 标记的蛋白A($40\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)，室温或 37°C 2小时。将孔中的放射性溶液吸出。

⑥重复④。

⑦剪下各孔，用r计数器计数。抗原纯净时，典型的阳性孔可达 $3,000\text{cpm}$ ，而阴性孔应低于 100cpm 。即使抗原不纯，本底也不会显著增高，但阳性孔数值将降低。在本底值低而且可重复的情况下，2—3倍于本底的孔可视为阳性孔。

(2) 适用于细胞表面抗原和病毒的RIA

①每孔加 $100\mu\text{l}$ 多聚L-赖氨酸($10\mu\text{g}/\text{ml}$)，室温下预包被2小时。用PBS洗二次。

②加入 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液(用PBS- 0.1% BSA， $\text{pH}7.4$ 配成 $1-$

2×10^6 细胞/ml) 静置1小时, 或在 4°C 下, 400g离心5分钟。轻轻弃去上清。

③将滴定板浸入新配制的0.25%戊二醛—PBS液中5分钟。

④用PBS—0.1% BSA洗三次。

⑤每孔加50 μl 培养液上清, 4°C 孵育1小时。

⑥同④。

⑦各孔加50 μl 含10000cpm的 ^{125}I 标记的第二抗体或蛋白A, 4°C 下1小时。吸去未被结合的放射性抗体。

⑧重复④。

⑨剪下各孔, 用 γ 计数器计数。阴性孔一般低于200cpm, 阳性孔约为500—3000cpm。

3. 细胞试验

与细胞表面抗原结合的抗体, 通常可以通过固相试验选择。但对某些单克隆抗体, 我们不仅需要测定它与细胞结合的能力, 而且需检测其有无某些特殊功能。例如测定抗体有无细胞毒性, 对不同血型的细胞有无特异性等, 这便需要通过细胞试验进行。由于这类筛选系统一般不太敏感, 因此通常先用固相试验将感兴趣的抗体粗分出来, 再用少量抗体作细胞试验。

(1) 玫瑰花试验

能与红细胞偶联的抗原, 可选用此法。

①制备绵羊红细胞(SREC), 用盐水(0.9%NaCl)悬浮后, 在500g下离心洗涤3次。去上清。

②抗原(1mg/ml, 溶于盐水中)与SRBC沉淀以等体积混合(抗原预先透析过, 不含磷酸根离子)。

③用乙酸缓冲液(0.9%NaCl, 0.01M乙酸钠, pH5.5)新鲜配制浓度为1mg/ml的 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 取与抗原等体积的量加入上述混合物中。室温下轻摇5分钟。

④加入大量冷盐水中止反应。400g离心10分钟, 将SRBC沉淀洗两次。与抗原偶合的SREC在含3%胎牛血清的盐水中, 于 4°C 下可贮存数周。

⑤取杂交瘤细胞，悬浮于玫瑰花培养基（Eagle's培养基，补加5%胎牛血清、0.01M HEPES，pH7.3）中，使细胞浓度约为 5×10^4 /ml。在96孔U形板的孔中加入50 μ l细胞悬液。

⑥用玫瑰花培养基稀释抗原包被过的SRBC，使每ml含 4×10^7 细胞，每孔中加50 μ l。

⑦400g离心15分钟。30分钟后将沉淀细胞制成悬浮液，转移到平底孔中。

⑧用倒置显微镜观测形成玫瑰花环的杂交瘤细胞数，周围有5个以上SREC的属于阳性。阳性细胞超过10%的为阳性培养上清。

（2）细胞毒性试验

可检测固定补体的抗细胞表面抗原的抗体。

①将带有靶抗原的 10^5 — 10^6 细胞与10—100 μ l培养上清混合，置于4℃下30—60分钟使与抗体结合。然后洗1—2次。

②加入适当稀释（本底低而活性高）的豚鼠血清或幼兔血清。37℃下孵育30分钟使细胞分解。含补体的血清需快速操作，小量分装的低温冻存。一旦化冻应立即使用，余者废弃，避免反复冻融招致失活。一般稀释比为1:10—1:20。

③用PBS配制染液：0.2%台盼蓝。检查细胞活力时，在载片上滴一滴细胞悬液，再加一滴染液，盖上盖玻片，在显微镜下观察。也可用吖啶橙和溴化乙锭（百万分之一的贮存液）染色。加滤光片用荧光显微镜观察时，活细胞染成鲜绿色，而死细胞呈鲜橙色。吖啶橙或溴化乙锭染色法的准确性较高，但这两种染料都是致癌剂，操作时需小心。

补体的最适稀释度因提供血清的动物个体而异，应事先测定。5—10%的细胞分解本底是不可避免的。

（3）直接血凝集试验与间接血凝集试验

直接血凝集试验的一般操作程序是：用含1%BSA的PBS制备1%（v/v）红细胞悬浮液，取25 μ l加入孔内，随后再加入50 μ l单克隆抗体，室温下孵育1—2小时后观察凝集情况。间接血凝集试验

需将细胞洗涤后，悬浮于50 μ l抗小鼠IgG抗体中，孵育1小时后观察。血凝集试验大多用于红细胞膜抗原。

4. 免疫细胞化学试验

这种方法的优点是可以检测针对亚细胞结构或细胞亚群的抗体。

(1) 用50 μ g/ml多聚L-赖氨酸预处理多孔载玻片，然后在孔内加入靶细胞，温育30分钟。也可以让细胞在多孔载片上生长过夜以固定细胞。

(2) 加一滴1%BSA以封阻多聚赖氨酸的过剩结合力。

(3) 载片在甲醇或乙醇中固定15分钟。随即将固定的载片移至PBS+1%BSA中彻底清洗，换液3次，历时1小时。

(4) 将载片水平置于潮湿的塑料盒内，加入一滴杂交瘤上清液，孵育0.5—1小时。用PBS冲去过剩的抗体。

(5) 用PBS+1%BSA洗三次。

(6) 加一滴荧光标记或过氧化物酶标记的第二抗体，在潮湿的盒内温育30分钟。

(7) 同(5)。

(8) 如(6)加的是荧光标记二抗，则将载片置于显微镜下观察；如用酶标二抗，则在0.05%的3,3'-二氨基联苯胺（溶于含0.03% H_2O_2 的PBS中）溶液中温育载片30分钟。PBS洗后，显微镜下观察。

(三) 单克隆抗体的鉴定

1. 抗体类和亚类的测定

有多种测定抗体类型的方法，如ELISA、SDS和等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳等。这些方法各具特点，但共同缺点是不便测定亚类。测定Ig类与亚类的最简单方法是琼脂扩散试验，其操作步骤如下：

(1) 培养上清液的浓缩：在0.5ml上清液中缓慢加入等体积的饱和 $(NH_4)_2SO_4$ ，等第一滴散开之后再加第二滴。3小时后在

4℃、10000g下离心10分钟。用40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗沉淀2—3次，最后用50 μl PBS将沉淀溶解，再对PBS透析过夜以去除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

(2) 制备琼脂扩散板：用0.01M pH7.4的PBS制备1%的琼脂溶液（沸水浴加热使琼脂完全溶解），吸取约3ml溶液，浇在水平放置的盖玻片上。琼脂凝固后，用直径2—3mm的模具打孔，使中央小孔与周围环状排列的6个小孔间的距离为4—6mm，用针头将孔中琼脂去掉。

(3) 加样：在中央小孔内加入10—20 μl 浓缩的上清或适当稀释的腹水或血清，周围各孔中加入10—20 μl 标准试剂：家兔抗小鼠IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃和IgM等抗体。

(4) 将盖片置于底部铺有湿纱布或棉花的塑料盒或平皿内，室温下放置12—24小时。观察并记录中央孔与外周孔间出现沉淀线的位置。用0.25%考马氏蓝（溶于甲醇：乙酸：蒸馏水为5：1：5的溶剂中）染色有助于沉淀线的观察。

2. 对抗体所针对的抗原决定基进行分析

这种分析有助于选择性地扩增抗原决定簇互不相同的抗体，从而能节省很多组织培养时间。Western印迹法是有特殊价值的一种分析技术。一般步骤如下：

(1) 用SDS-或尿素-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）分离纯化抗原。留下一部分胶板待转移后染色。

(2) 其余部分胶板铺在一张同样大小的湿硝酸纤维素膜（孔径0.45 μm ）上，操作时不要在凝胶面与膜之间形成气泡。胶面与膜的外侧面各垫一张湿的Whatman 3mm滤纸。滤纸外面再加一块约0.5cm厚的泡沫塑料垫片，然后用两块多孔的有机玻璃夹住。有机玻璃上的孔，便于电解质进入夹在中间的凝胶内，并使电流容易通过。用橡皮筋将之捆紧，垂直插入电泳槽中间。电泳槽的两极由不锈钢制成。如果转移的是SDS-PAGE胶板，由于胶上的蛋白质带负电荷，则需将硝酸纤维素膜置于靠近阳极一边；如果转移的是尿素-PAGE板，就使硝酸纤维素膜面向阴极。

(3) SDS 胶所用的转移缓冲液为 25mM Tris·HCl, 192mM 甘氨酸(pH8.3)、20%(v/v)甲醇和 0.002% SDS。尿素胶的缓冲液为 0.7% 乙酸。电泳的电压梯度以 6V/cm/小时为宜, 也可再高些, 但在电压高、转移时间长时, 最好有致冷条件以减少扩散。转移所需时间取决于胶的浓度和蛋白分子的大小, 分子量在 100000 以上的蛋白质印迹特别困难, 除非胶的浓度很低, 或者用 5%—20% 的梯度 PAGE。一般分子量为 50000 的蛋白在 10% 的胶中约需转移 2 小时。

(4) 电泳结束后, 取下硝酸纤维素膜, 剪下一小条, 用 0.1% 氨基黑(溶于 10% v/v 乙酸-45% v/v 甲醇)染色 1 分钟。继而用 70% V/v 甲醇、4% V/v 乙酸脱色, 以观察转移的多肽区带。其余的硝酸纤维素膜浸于 0.01M PBS-0.3% 吐温 20 中(当分析的是血清抗体时), 或者浸在 50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 3% BSA, 5% 成年绵羊、山羊或牛的血清和 0.05% NaN₃(pH7.4)(抗体来源为杂交瘤上清时)中温育 1—2 小时, 以饱和其余的结合部位。

(5) 对步骤(1)中留下的没有印迹处理过的那部分胶板, 以及作过印迹转移的凝胶, 用 0.25% 考马斯蓝(用甲醇:乙酸:水为 5:1:5 的溶剂配制)染液染色。

(6) 另取一条未染色的硝酸纤维素膜单独处理作为对照, 处理方法除温育时不加单抗而加培养基外, 其余步骤与下述膜的处理步骤一样。将步骤(4)中作过封闭处理的膜与单克隆抗体一起温育 4—16 小时, 缓冲液为 50mM Tris HCl、150mM NaCl、3% BSA、0.05% NaN₃(pH7.4)。如单抗样品为杂交瘤上清液, 则需事先作浓缩处理以提高效价, 腹水或抗血清可适当稀释。

(7) 用 50mM Tris HCl、150mM NaCl(pH7.4)摇浴洗涤硝酸纤维素膜, 换液三次。

(8) 将膜放入过氧化物酶标记的绵羊或家兔抗小鼠第二抗体稀释液(一般用 1:100 稀释度或经测定最适于 ELISA 的浓度, 稀释液为 pH7.4 的 0.01M PBS), 室温下浸泡 1 小时。

(9) 同(7)。

(10) 将膜于黑暗中放入底物溶液中孵育约10分钟, 溶液应在临用前新鲜配制, 方法是将溶于甲醇中的3mg/ml 4-氯-1-萘酚贮存液与PBS按1:5混合, 再加上 H_2O_2 (0.01%)。

(11) 硝酸纤维素膜上与抗原对应的蛋白带应显示浅蓝色。显色后用蒸馏水洗膜以终止反应。

(12) 给显色后的膜照相(不要晚于1周, 否则会逐渐褪色), 并与原来的凝胶或染过色的膜进行对照, 以确定与单克隆抗体特异结合的区带。

也有用同位素标记的第二抗体代替酶标二抗的, 其结果更佳, 但同时亦伴有设备复杂、延时、费事等缺点。

(四) 单克隆抗体的应用

单克隆抗体一问世, 便显示出巨大潜力。十几年来这一技术已由免疫学范畴迅速渗透到生命科学的各个领域, 其应用范围几乎遍及生物基础科学、医药学和农学的各个分支学科, 如遗传学、分子生物学、病毒学、细菌学、寄生虫学、肿瘤学、药理学、血清学、临床诊断与治疗学、兽医学、农业植物病理学等。目前, 全世界已有上千个实验室从事杂交瘤和单克隆抗体技术的研究, 几乎每个月都有成百篇文章发表。专门生产和研究杂交瘤单克隆抗体的公司也在不断增加, 随时都有新的研究进展出现。杂交瘤数据库的内容越来越多, 因此用短短的篇幅全面论述它的现状、发展与应用前景是比较困难的, 这里只能简略地作些一般介绍。

单抗在人类疾病诊断方面所取得的进展十分引人注目。现在已制备出大量的针对各种病毒的单克隆抗体, 如流感病毒、肝炎、脊髓灰质炎、呼肠病毒、爱泼斯坦—巴尔病毒(EB病毒)等的单抗。这些单抗具有很高的特异性, 可以准确地区别鉴定抗原决定簇十分相近的病毒株系, 如单纯疱疹病毒I型与II型。对肿瘤的诊断是现时最感兴趣的应用领域, 尤其是仅与肿瘤相关抗原反应的单抗。已制备出抗各种淋巴细胞表面抗原和上皮细胞的单抗。针对人胃肠癌、绒膜癌、宫颈癌、卵巢上皮腺癌、各种类型肺癌

以及畸胎瘤的单抗的专利也已陆续形成。具有高度专一性与亲和力的单抗加上同位素标记，可以对肿瘤患者作体内定位诊断，通过闪烁扫描仪描出肿瘤图象，这不仅可用来早期检测原发肿瘤，而且可根据特异性抗体集中于肿瘤组织的量与存积时间，研究药物的半衰期，监测病情和检验治疗的效果，制订出适宜的治疗措施。这些单抗同样可检测肿瘤患者血清中的肿瘤标志，随着有关技术的发展，自然也可以用来研究有异常组织成分和血清成分出现的疾病，如心血管病、自身免疫病等。对寄生虫病如疟疾、利什曼原虫病、血吸虫病，以及某些细菌性疾病，单抗同样有巨大的开发潜力，不仅可作出准确的诊断，而且可深入研究疾病的病理机制和病原体的抗原差异。

在疾病的治疗方面，单抗同样有广阔的应用前景。各种肿瘤的导向药物的研制，便与单抗密切相关：单抗本身能与特异性肿瘤组织结合，具有一定的抗肿瘤作用，只是作用有限，如果将单抗与抗肿瘤药物如干扰素、蓖麻毒素、白喉毒素等免疫调节剂连结在一起，抗体就可以把抗肿瘤药物定向转移到肿瘤组织中杀伤癌细胞，而周围的正常细胞则不受影响。将单抗与组织血纤维蛋白溶酶原活化剂或尿激酶连结在一起，研制出可防止体内形成血栓和治疗血栓病的导向药物，这对心血管患者无疑是一福音。单抗对心脏移植、肾脏移植以及骨髓移植时受体免疫抑制的形成亦大有用武之地，能抑制肾脏移植排斥反应的小鼠单抗已有商品问世。病毒病如2型肝炎的疫苗单抗也已商业化生产。不过，迄今为止研究治疗用的单抗多数来自小鼠，种间宿主效应便成为普遍存在的问题。现在对人—人单抗以及人—鼠嵌合抗体的研究越来越受到重视。由患者自身的病原组织成分作抗原，经过免疫后获得的抗个体基因型单抗有可能给自身免疫病患者的特异性免疫治疗带来希望。

单克隆抗体在兽医以及农作物病害防治方面的研究虽不及医学那样活跃，但同样迈出了探索的步伐。现已研制出家畜、家禽和鱼类多种病原微生物的单克隆抗体，如牛和羊布氏杆菌、大肠

杆菌K99纤毛抗原、猪传染性胃肠炎病毒、鸡球虫、鱼流行性坏死性沙门氏菌、狂犬病病毒等的单抗。这些单抗的高度特异性，可以解决过去用常规抗血清很难解决的一些问题，如某些疾病的野毒感染(强毒株)和人工接种疫苗(弱毒株)的鉴别诊断问题，方便了流行病学的调查。此外，在家畜妊娠诊断、胚胎性别鉴定单抗的研究方面也取得了一定进展。对某些畜禽疾病如牛的腹泻和细菌性乳房炎，用专一性单抗治疗也收到明显效果。在植物保护方面，已分别以植物病毒、昆虫病毒、植物细菌、植物类菌质体和螺原体等病原作为抗原，开展有关单克隆抗体鉴别诊断试剂的研究。在这些病原方面，同样以病毒作出的成绩最多，如已研制出抗马铃薯Y病毒、玉米矮缩花叶病毒、大麦黄矮病毒、大豆花叶病毒、香石竹蚀纹环病毒等数十种病毒的单克隆抗体。所有这些针对植物病原体的单克隆抗体不仅可用于植病的诊断，还可用于病害的流行病学调查，开展生物防治，以及了解不同农作物间的各种病害的相互关系。

在生物产业方面，单克隆抗体尤其拥有难以估量的潜力。1980年，Secher和Burke用 α 干扰素粗制品免疫小鼠，取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后得到杂交瘤，将所分泌的单克隆抗干扰素抗体制成免疫亲和吸附柱，纯化了人的 α 干扰素。这是用单克隆抗体制备生物活性物质的一个最早实现的成功例证。从原则上讲，只要把任何针对预定抗原的单克隆抗体固定到亲和柱上，都有可能从粗制混合物中大量提纯所需的抗原。

利用单克隆抗体纯化抗原和抗体并作生物学特性鉴定的手段，在实验室里亦大有可为。如利用单克隆抗体纯化信使RNA以研究基因结构；可以纯化生长激素和尿激酶原、胰岛素等有重要生物学功能的分子，再通过DNA重组技术使其在其它系统中表达。如今，单克隆抗体和杂交瘤技术已被作为一种重要的工具，广泛应用于酶、蛋白质及核酸、激素等生物大分子的纯化，以及结构与功能的研究方面。单抗还可能成为对决定细胞表型的染色体蛋白质进行分析的一种理想研究手段。对没有抗原性或仅有半抗原

性的小分子物质，也可以将其结合于大分子的蛋白质载体上，使其表现出抗原性，然后再用杂交瘤技术研究。单克隆抗体还广泛用于各种遗传学，特别是免疫遗传学的研究，如免疫球蛋白结构的分析、免疫球蛋白基因的表达、定位和多样性等。

总之，可以毫不夸张地说，单克隆抗体技术的应用潜力是难以估量的。任何从事生物学、医学和农学的科研人员，都有可能直接或间接地因接触或利用这一技术而受益。当然，单克隆抗体的研究仍存在不少有待解决的问题：如生产与克隆过程中工作量过于繁重；制备鼠类以外动物、特别是家兔和人的单克隆抗体时存在着较大的困难；制备针对免疫原性差的抗原的单克隆抗体仍是一个需要深入研究的课题。

(魏 钧)

第六章

遗传工程

第一节 遗传工程的现状

从60年代开始，科学家陆续发现了各种不同的特异性蛋白质酶。一种称为限制性内切酶，它可以识别DNA分子链上的特定区域，同时可切断DNA链上的不同部位，这样就可以把个别基因从一条DNA链上分离出来，然后用一种称为连接酶的酶把分离出来的基因拼接到载体DNA链上。这种工具酶的制备成功，为生物技术提供了有力的武器。同时，进一步为特定基因的DNA片断进入受体得到增殖和表达提供了保证。1972年，由美国斯坦福大学生化系P·伯格首次用类人猿病毒SV40的DNA与噬菌体P22的DNA连接在一起，构成了第一批重组DNA分子。这是生物学史上第一次将两种不同的基因在体外拼接在一起。1973年，美国斯坦福大学S·科恩博士和加州大学旧金山分校的博耶博士又进一步发展了这项技术。同年，在美国的一次分子生物学会议上，他们共同报道了体外组建的重组质粒在细菌中繁殖成功，引起学术界的震动。自此，DNA重组技术迅速发展。70年代后期，人们在分子生物学和细

胞生物学理论上基础上，综合采用了基因重组、杂交瘤、固定化酶和动植物细胞大规模培养等技术，建立起一个现代生物工程的技术体系。

一般认为，生物工程技术主要包括：遗传工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。在这些技术体系中，最基本的核心体系是遗传工程。也就是说，只有通过基因进行剪裁、拼接的改造和加工，才能按照人们预先设计的蓝图产生特定的生物性状、物种和制品。从物质层次上来说，生物工程可以在四种水平上进行，即分子水平、染色体水平、细胞水平、个体水平。遗传工程是在分子水平上的生物工程。广义的生物工程包括以上四种水平的生物工程；狭义的生物工程是指分子水平上的基因的外科操作，即遗传工程。

(一) 遗传工程及其特点

遗传工程又称DNA重组。就是按照人们预先设计好的生物蓝图，在分子水平上对基因进行外科手术。人为地将不同生物的遗传物质(基因)进行人工“剪裁”，“组合”、“拼接”，使遗传物质得以重新组合。然后通过载体或直接转入受体，进行无性繁殖，并使新的基因在受体细胞内表达，产生出人类所需要的物质，或组建出新的生物类型，以达到定向改变生物性状的目的。

遗传工程的特点是：第一，分子生物学研究表明，所有生物都有共同的遗传密码（目前发现例外的情况是线粒体和一些原生动物的个别遗传密码有不同的翻译方式）。这就为生物的基因在四大类生物，即人类、动物、植物和微生物之间进行交流和转移提供了可行性。也就是说，人或动物的基因可以在微生物——大肠杆菌中得到表达；细菌里的基因可以在人类或植物细胞里得到表达，打破了物种长期进化中不同的物种之间形成的生物屏障，使得亲缘关系很远的物种之间转移遗传物质成为可能，为后代遗传性更大改变和创建新类型开拓了广阔的前景。第二，后代遗传性的改变是完全处于人们有目的和有计划的控制之下，因而可以定向地

改造生物的遗传特性，获得所需要的变异，甚至创造新的生命类型，这是育种工作上的一次重大突破。第三，由于直接操作遗传物质，较之于常规育种获得新品种的速度快得多，而且后代生物性状能快速稳定，避免常规的有性杂交育种中的生物性状长期分离，并无需多代重复选择。

(二) 遗传工程的施工程序

完成基因或DNA片断的转移和重组，十分重要的是要有供体、载体和受体三种生物体。遗传工程的施工程序可分为三个步骤。

1. 目的基因的获得

在DNA长链上分离出目的基因，是通过限制性内切酶在特定的位点上切割DNA，使之切成许多相当于或大于一个基因的独特DNA片断。这样从供体细胞的丰富的基因库中，分离出不同的基因。

1969年底，美国学者夏皮罗等第一次从大肠杆菌中分离出部分乳酸操纵子DNA以来，不少科学家通过生物学方法、物理化学方法，如分子杂交技术和密度梯度超速离心等技术方法，已分离了许多纯化的基因。但总的说来，数量还是不多，其原因是分离困难。在原核生物中，虽然只有一个简单的细胞，但最简单的病毒也有近三、四个基因到数百个基因。更不要说真核生物，其基因数更大。而要分离许多量大但性质差异微小的基因，用物理和化学方法进行有很大的困难。再加上每一种基因含量又少，如血红蛋白的珠蛋白基因，约有五百对碱基，它在细胞总的DNA的 2.9×10^9 个碱基对中只占千万分之一。这些问题都造成分离基因的困难程度。

目前，提取不同基因的另一个方法是通过化学方法来合成含有一定碱基顺序的基因。

美籍印度血统学者科纳拉在人工合成基因方面成绩卓著。1970年，他合成了77对碱基的酵母丙氨酸的结构基因。1973年，他

又合成了126对碱基的大肠杆菌酪氨酸 tRNA 的结构基因。但是在上述两次合成的基因都不能得到表达。1976年8月，科纳拉成功地合成了具有表达功能的人工基因——193对碱基的大肠杆菌酪氨酸 tRNA 的基因。自此以后，在世界范围内，人工合成基因的报道不断出现。研究者认为，人工合成基因比分离提取基因的优越之处在于合成的随意性，只需根据人们的意愿，就可以任意地合成目的基因，也可改变、增加或减少基因中的一个或几个核苷酸。

2. 目的基因与载体的体外重组

任何一种生命类型，都是长期历史进化的产物。它们都具有一种不受外来异种生物侵入而稳定地延续其种族的特性。当外源DNA一旦侵入受体细胞内，就会受到受体细胞内的限制性核酸内切酶的破坏。这种酶的特性是专门破坏外源DNA，但不破坏自己细胞中的DNA。其原因是因为在细胞中还有一种与限制性核酸内切酶共存的但作用相反的一种称为修饰酶的存在。修饰酶的作用在于保卫自身的DNA。这两种酶形成相互关联又相互制约的限制修饰酶系统。由于修饰酶的作用，它能够使限制性核酸内切酶要切断的碱基甲基化，使内切酶失去“识别”这些碱基的作用。

目前发现，只有少数的细菌质粒、噬菌体和某些病毒可作为基因的载体。而其中质粒的作用更大。所以有人称质粒是遗传工程的主角。

质粒是细菌细胞中染色体外的遗传成分。它存在于细菌细胞中，是细胞质中的共价键闭合环状双链DNA分子，它并能自主地复制。质粒的大小范围约从1kb至300kb。具有复合特性（如在接合作用中指导基因转移的能力）的质粒，一般为6kb或更大一些。属于严紧型的较大质粒，它的复制取决于蛋白质的继续合成，而与DNA聚合酶的功能无关；属于松弛型的较小质粒，它的复制取决于聚合酶的活力，而与蛋白质的继续合成无关。随着质粒大小的增加，拷贝数成比例地减少。以小质粒ColE1质粒而言，当加入氯霉素以阻止蛋白质合成和染色体复制，可得到每

个细胞含有1000—3000拷贝数，它约为DNA总量的40—50%，而较大质粒大概只有1—3个拷贝。

原则上，质粒无性繁殖载体只要求必需的复制功能，这种复制功能不会因质粒中的一些单一酶切位点的插入DNA而失活。还要求质粒含有这样一个基因，通过它能从大量细胞群体（其大多数细胞缺少这种质粒）中选择出带有该种质粒的细胞。现已检定了数种这样的质粒，其中rSCo1已用于首次分子无性繁殖实验。后来，大多数质粒中的基因无性繁殖实验都是用 α MB9、质粒 λ dv及ColE1⁴⁵或它们的某一种衍生物。

质粒一般带有抗药性基因，因而当它进入细菌后，使原来不带抗药性的细菌也变成了抗药性的菌种，这一特性成为测知质粒是否进入其它不具有抗药性菌体内的识别标志。

除质粒以外，有些病毒如 λ 噬菌体和SV40也被用作基因的载体。目的基因与载体是靠一种连接力很强的T4连接酶的作用，把两者联系在一起，成为重组DNA分子的。其连接方式可分成粘性末端连接和平端连接两种。所谓粘性末端连接是指通过互补单链的粘接末端，将DNA片断接合，并由DNA连接酶以共价键将其闭合。互补末端可由两种不同途径形成，一是加接一定单链顺序（同聚体接尾）；二是用限制性内切酶切断，形成错开的切口，产生粘性末端，将其相同又互补的末端连接起来。随后，可用DNA连接酶将接头牢牢地闭合。而平端连接是指连接无单链结尾的平整末端的双链DNA。T4连接酶就具有连接碱基完全成对的平端DNA的能力。这样，限制性内切酶切割所得到的DNA片段，都不必加接单链的“接尾”，可先用DNA聚合酶将末端不平齐的双链补齐，然后由连接酶加以连接。

3. 杂种重组DNA分子引入受体细胞并正确表达

由于大肠杆菌在适温摄氏37度以下，每30多分钟即可繁殖一代，目前一般把大肠杆菌系统作为受体。除此以外，还有酵母系统和枯草杆菌系统。

重组DNA分子进入受体后进行筛选，挑出含目的基因的菌落

或细胞克隆。如果目的基因与载体的启动子插入的方向一致，插入的位置又合适，那么目的基因在受体细胞中能够得到正确的表达。基因在受体细胞中能否得到表达成为遗传工程成败的关键。

目前看来，克隆系统的表达效率及表达产物的分离纯化是一个大问题。要使外源基因在微生物载体系统中得到高水平的表达，必须有两个步骤：一是有效地转录；二是有效地翻译。转录主要取决于基因的启动子，这是一个能被宿主DNA聚合酶识别的启动子；而有效翻译关键是要有一个核糖体的结合位点。

启动子是一段DNA，不同启动子对转录的效率不同，强启动子能高频率地起始mRNA的合成。研究表明，大肠杆菌的lac、trp、 λ pe、trp与lac启动子杂合的tac及酵母系统中的PGK、ADHe、suc₂和PHO₅等均为较强的启动子。此外，还可利用启动子的调节因素，如利用诱导物，调节温度等条件来加强外源基因的表达。

影响翻译效率的原因，可能涉及到核糖体的结合位点的结合效率问题。在大肠杆菌中核糖体结合位点包括基因起始密码AUG及SD顺序。此外SD顺序和AUG之间的核糖酸长度也影响表达。目前研究者已合成了核糖体结合位点的共同顺序，它在大肠杆菌中有效地引导了从哺乳动物来的外源基因的表达。

此外，提高表达效率还需解决外源基因的载体在受体中的稳定性问题。载体是一个自主性复制系统。在细胞分裂过程中很容易被丢失。这主要是由载体的复制能力和细胞分裂时载体分配的均匀性等因素所决定。如果能弄清楚质粒的复制及分配机制，就可望提出载体稳定性措施。

大量的表达产物对宿主细胞来说是不正常的，这些表达产物常常影响宿主细胞的生长，甚至使其致死。要克服表达产物对宿主细胞的不良作用，对于一个未知基因先被克隆于可诱导的系统中，如果产物对宿主无害，可以再克隆进组成型系统，这样可防止由于产物对宿主的有害作用而影响表达的检测。

如何控制宿主的蛋白酶对表达产物的破坏作用又不影响宿主

正常生命活动，这也是提高表达水平的一个方面。在表达分子量小的多肽（如胰岛素）时，有人试验筛选蛋白酶活性低的菌株作为受体。有人则用造成不溶性的融合蛋白来防止体内蛋白酶的水解作用，一般说是很有用的。

建立能使表达产物分泌到细胞外的载体受体系统，不仅可以防止产物积累在细胞内影响正常生长，从而提高表达水平。另外，这样还可以大大简化产物的提纯步骤。因为此时可不必破碎细胞来提取表达产物，只要把产物与培养基的成分相互分离就行了。在培养基中只有少数几种蛋白，分离产物相对地较容易。瑞士有人利用 *Bacillus amyloliquefaciens* 中得到的 α -淀粉酶基因克隆，建立了分泌载体，把人白细胞干扰素基因直接连接于 α -淀粉酶基因的信号顺序之后，干扰素的产量达 10^5 单位/毫升，其中90%以上已分泌在培养基中。

在重组DNA受体细胞，又称表达系统中，一般把大肠杆菌、枯草杆菌和酵母菌等的表达系统称为第一代表达系统。第二代表达系统为动物细胞和植物细胞等真核细胞。目前，对第一代表达系统研究比较成熟。真核生物的基因比原核生物复杂得多，如果蝇的每个细胞中，大约有2亿个核苷酸对，而人和哺乳动物含有30—40亿个核苷酸对，其基因数在一万到十万之间。在真核生物的DNA结构中，有高度重复的顺序、中度重复顺序和单拷贝顺序的安排，所以它的分子大小和结构都是十分复杂的。尽管如此，哺乳动物细胞作为重组DNA表达系统其表达蛋白质产量比原核细胞表达系统高，还可以简化提纯工序，降低成本。因此，随着遗传工程研究的深入，使用哺乳动物细胞表达系统来生产遗传工程产品展现着深远的前景。

此外，国外还正在探索建立其它的表达系统，如伤寒杆菌、巨大芽孢杆菌、多角病毒、昆虫卵巢细胞链霉菌等，以寻求适用性广、产量高且无毒的表达系统。

总之，微生物载体受体系统的研究是遗传工程的重要环节之一。最终的目标是使外源基因在微生物载体受体中得到高效率的

表达。解决这些课题，无疑将推动遗传工程向更高一层次发展。

(三) 第二代遗传工程——蛋白质工程

蛋白质工程是遗传工程和蛋白质结构的研究相互渗透的产物。它把核酸研究和蛋白质研究结合起来；把基础研究和应用研究结合起来，从而把认识生命与改造生命两者统一起来。蛋白质工程的研究是在蛋白质空间结构和结构与功能研究基础上，借助计算机图象显示和分子辅助设计提出对某一蛋白质分子的改造方案。

学者认为，开展蛋白质工程研究必须避免以下两种混淆：

(1) 一般遗传工程与蛋白质工程。不能将任何定义上的基因改造（修饰）都称为蛋白质工程。蛋白质工程必须是在空间结构，至少在良好结构功能下进行的，它不是分子的随机突变。

(2) 蛋白质合成、化学修饰与蛋白质工程。研究表明，对20—30个氨基酸以下的小肽结构研究的最优选择是多肽合成，它易于获得各种类似物。目前已合成出数千种脑非肽类似物。而这类小肽表达产物的稳定性有很大问题，因此，企图通过蛋白质工程来研究这类小肽的结构与功能问题无疑是小题大作，事倍功半。

目前蛋白质工程研究最彻底的酶之一是酪氨酸 tRNA 合成酶 (TyrTs)。这个酶催化在 ATP 存在下酪氨酸的活化和转移活化的酪氨酰到 tRNA^{Tyr} 的 3' 末端。从嗜热芽孢杆菌来源的 TyrTs 的空间结构已解析到 3.1 Å，它与底物酪氨酰腺苷复合体的空间结构也已测定。这些研究揭示酶与底物之间可能形成 11 对氢键，其中 8 对来自氨基酸侧链。

在实际应用方面，一批将给国民经济带来重要影响的蛋白质，已被列入蛋白质工程的候选名单。有的在研究上已取得瞩目的成果，展示出广阔的应用前景。在医药方面有可能通过单克隆抗体免疫球蛋白基因与毒素肽基因融合起来创造“生物导弹”药物，用于肿瘤及其它疾病的治疗。通过蛋白质工程研究消除或减少控制光合作用的核酮糖—1.5—二磷酸羧化酶的活力，就能提高光合作用的效率。这种效率的提高将直接影响农业的增产及全球范

国内人类对太阳能的贮藏和利用。至今人们已经发现并鉴定了数千种酶，但真正有商业价值的酶仅几种。通过蛋白质工程对酶的性质改造，将大大提高现有酶的工业实用性，从而产生巨大的经济效益。

为推进蛋白质工程研究高速发展，学者认为在技术手段上需解决两个问题。

(1) 构象的快速测定手段。以分子定向改造为目标的蛋白质工程必须借助于精确分子三维结构的信息，目前对构象研究的唯一手段是X—射线单晶结构分析，它又受到单晶培养的严重制约，正在发展的电子衍射三维重组、二维核磁共振以及分子动力学研究可望弥补这一缺陷。

(2) 基因高速度表达及有效后处理(下游)技术，是蛋白质工程的另一个限速因素。欲用尽可能小的工作量得到尽可能多的突变体蛋白质以开展其结构以及性质测试，从而尽快提出预期性质与测试性质差异，并寻求其结构上的原因，为制定新的改造方案提供反馈信息均有赖于产物的高效表达和分离。因此，高效表达载体、分泌性寄主系统以及各种高效批量分离技术无疑是今后主要探索目标。

(四) 遗传工程的开发及其进展

近二十年来，遗传工程技术已从实验室开始走向流通领域。根据基因表达产物，有的已投放市场，有的小批量生产试验产品，有的是正处于实验室阶段的遗传工程产品。可分以下几个方面。

1. 重组DNA活性蛋白质和多肽

在国外，重组DNA活性蛋白质和多肽研究起步早、种类多、进展快。目前已有50—60种产品已取得不同程度上的重要进展。这些产品大多数是生化药物或生物制品，对人体具有调节生理功能和免疫功能的新疫苗，在医药及轻工、食品等方面有很大价值。

胰岛素是治疗糖尿病的有效药物，它是由51个氨基酸连接而成的一种蛋白质。1982年，美国最先开始用“工程菌”生产，目前

已商品生产。1983年，中国科学院细胞研究所科学家，利用人工构建的合成胰岛素的多功能质粒做载体，在大肠杆菌表达胰岛素的效率高达30—40%，大大超过当时美国、日本的10%的实验室最高水平。但其产业化进程则比国际水平差。加拿大科学家改变以往直接生产胰岛素方法，而将人胰岛素原(proinsulin)的基因引入大肠杆菌，生产胰岛素原，进而生产胰岛素。此方法比直接生产的胰岛素浓度高一倍。

人的生长激素(HGH)和人的绒毛膜生长激素(HCS)的基因已在大肠杆菌中获得表达。人生长激素是脑下垂体分泌的一种蛋白质，由191个氨基酸组成。由重组DNA已生产松弛素。美国应用分子遗传公司从鸡脑垂体中获得鸡生长激素(CGH)的mRNA，通过cDNA与pBR322—SV40杂合运载体在大肠杆菌中克隆并表达。另外，一大批活性蛋白质和多肽，如IL-1.3集落刺激因子(CSF)、B细胞生长因子(BCGF)、巨噬细胞活因子(MAF)、免疫球蛋白(Ig)、表皮生长因子(EGF)、人受孕激素类、肾素、心钠素、血管紧张素、降钙素、内啡肽、消化酶类、凝血VIII因子、红细胞生长成素(EPO)等的重组DNA研究正处于实验室阶段。

干扰素是人体细胞分泌的类活性多肽，有 α 、 β 、 γ 、三种类型。它们具有广谱的抗毒、抗肿瘤和免疫调节活性。它对乙型肝炎病毒在人体内的繁殖有明显的抑制作用。1980年以来，美国已用重组DNA的 α -干扰素临床试验，用于病毒病和恶性肿瘤。FDA已于1986年10月批准美国基因公司生产的 α A型干扰素投放市场。日本已批准 β -干扰素投放市场。预计其它类型干扰素将于1988年后陆续投放市场。

由于遗传工程生产干扰素单位产量高，这样有可能在临床试验中有足够量来进行正确评价。芬兰利用 α -干扰素治疗多发性硬化症病，发现有发热、疲劳等副作用。法国用 α -干扰素治疗转移性肾肿瘤，有不同程度的缓解和萎缩。英国认为用以做鼻腔喷射预防感冒效果好，但美国报道有头痛、充血等副作用。看来 α -干扰素的临床应用还需有待进一步的改进， β -干扰素据报道认为用

于治疗带状疱疹效果较好。

白细胞介素 α (IL- α)是一种淋巴因子,它具有增强数种免疫细胞,如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、自然杀伤细胞(NK细胞)和杀伤细胞(K细胞)的活性。1983年,美国重组DNA IL- α 的研究首次获得成功。1984年3月,日本发表了利用重组DNA方法将白细胞介素- α 克隆并在大肠杆菌中表达,它可刺激T细胞杀死肿瘤细胞或治疗免疫缺陷病,如麻疯病。重组DNA IL- α 的临床试验还表明,仅用一次剂量就可使爱滋病的一个重要病症——Kaposis肉瘤、慢性白血病、卵巢癌和黑色素瘤等缩小或消失,显示其良好的抗癌作用。国外还致力于重组DNA的IL-1和IL-3的研究,并已获得表达。IL-1能诱导产生IL-2,并能刺激表皮细胞的生长,有可能用于治疗创伤和炎症性疾病。IL-3能诱导某些T细胞产生特殊酶类,正试用于治疗贫血症。

组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(TPA)基因在大肠杆菌中已获得克隆表达。目前还准备在酵母和哺乳动物细胞中生产。科学家发现TPA溶解血栓的作用比尿激酶、链激酶更好更安全。TPA还可用于抢救因出血性休克而产生的血管内弥漫性凝血。国外已克隆出TPA的抑制物,可用它来治疗出血性疾病。

治疗血友病的因子VIII已被克隆表达,目前正进行小批量生产。

1981年底,美国发表口蹄疫病毒表面抗原在大肠杆菌中得到表达。并经免疫试验产生高效价的中和抗体。正准备大规模生产。

1980年,法国科学家首先发表乙型肝炎病毒表面抗原在大肠杆菌中得到表达,但表达水平不高,免疫原性也差,许多实验室已转向酵母系统。1984年初,日本发表已在酵母系统中得到表达。产量可达 5×10^5 分子/细胞,并能形成似天然病毒一样具有免疫性的颗粒。为提高亚基疫苗的免疫原性,美国已将表面抗原基因插到牛痘病毒TK基因位置上,其抗体效价很高。将流感病毒血凝素(HA)基因,用同样方法插入牛痘病毒也得到较好的免疫反应。

其它如幼畜腹泻亚基疫苗、痘疹病毒III疫苗、牛的烂舌病疫苗等都处于小批量生产和试验中。霍乱菌的肠道毒素 β -亚基也已被克隆，并在大肠杆菌中表达。肿瘤坏死因子(TNF)已获得表达并在临床上进行预备试验。具有利纳、利尿，抗扩血管，降低血压和抗心律失常作用的心钠素及红细胞造血系统的特异性调节因子——红细胞生长素(EPO)，目前还处于实验室研究阶段。

2. 次级代谢产物

氨基酸、抗生素等都不是基因直接表达产物，而是许多酶协同作用形成的代谢物质。代谢产物的遗传工程已在生产中发挥积极作用。

抗菌素是一类很重要的常用药。目前，抗菌素的遗传工程已初具条件。人们已经发现，可作为链霉菌的载体有质粒(如变青链霉菌的SLP、委内瑞拉链霉菌的PUC₃质粒等)和噬菌体(如R₄、SH₁₀、 ψ C₃₁等温和噬菌体)。灰色链霉菌和卡那链霉菌可以用DNA直接转化，噬菌体DNA可转染其原生质体，且已有几个链霉素抗性基因克隆化。最近研究表明，有七种抗生素的结构基因不是分散，而是以基因簇的形式存在，这就有可能一起转移到载体上进行克隆化。同时，还发现某些抗生素合成基因就位于质粒上，如含次甲基霉素基因的SCP₁(PSV₁)和含庆丰霉素基因的SQP₁等，这些抗生素的遗传工程方面相对地简单。

应用遗传工程使氨基酸产量大幅度提高，自1980年以来已有陆续报道。

苏联的氨基酸遗传工程是利用抗拮物筛选菌株，获得了thrA基因产物对Thr不敏感变种和Thr-Ile途径即分阻断的变种，然后对thr操纵子进行活化，并将thr操纵子由pBR322载入Thr-变种，经这样改造的菌株，发酵48小时，苏氨酸的产量可达30g/l。也以同样步骤获得L-高丝氨酸生产株，其最高产量在70—90小时发酵，产量可达60g/l。

1978年，美国和法国分别研究成功，将鸡的卵清蛋白的基因引入大肠杆菌得到表达。这就意味着，人们可利用发酵技术，培

养出含卵清蛋白的菌体。1980年，法国巴斯德研究所又成功地将卵清蛋白的基因转入酵母内，并得到表达。这种酵母营养成分丰富，含有维生素、消化酶类和蛋白质，又加上了卵清蛋白，适用于人类食用蛋白质和家畜高级饲料蛋白。

法国Ricaud等与康佩尔大学合作，进行重组DNA的赖氨酸研究工作。他们对参与赖氨酸合成的头六个基因进行分离与鉴定，并分别在具有高拷贝数的质粒pBR322上进行基因扩增，使拷贝数达50个以上。再用这些杂合质粒去转化大肠杆菌 TOCR₂₁ 菌株(这个菌株由于经过突变处理，改变了天冬氨酸激酶的反应，能生产赖氨酸)。他们发现，只有携带daPA基因(编码二氢二吡啶羧酸合成酶)的杂合质粒，才能使赖氨酸的产量增高，重组DNA技术使 TOCR₂₁ 的产量提高了五倍。

3. 基因元件

基因元件的遗传工程，即利用基因无性繁殖技术，把所需大量扩增的目的基因的片断重组入载体，通过宿主细胞大量复制出目的基因片断。基因元件不仅可作为构建各种遗传工程工作系统的部件，还可作为基因分析的探针，它在对基因结构的分析，基因定位和医学诊断中都极为有用。在遗传病和病毒病的诊断上已显示出专一的灵敏的优越性。

可作为疾病诊断和基础研究的DNA杂交探针，是国外遗传工程研究的一个重要领域。其原理是根据单股DNA具有特异的互补性结合作用，标记上同位素或生物素的单股DNA互补性结合后可显示荧光。因此用它可检测病人血清、痰、粪或肝细胞标本，缩短诊断时间。美国基因探针公司已研制出检验军团菌病的DNA杂交探针。细胞间mRNA特异的(如Src癌基因mRNA)DNA杂交探针还可测出哪个癌基因已开启，利于癌症的临床诊断。另外已有用于血型和器官移植的CMC探针和前列腺癌DNA杂交探针已投放市场。

4. 改良和创建生物性状

遗传工程技术在定向改良农作物和家畜品种，甚至创建自然

界中没有的生物新品种的研究工作中，均具有很大的实践意义和经济价值。虽然这个领域的研究难度很大，但也已取得了很大的进展。

1982年，美国孟山度公司和比利时根特大学的学者成功地把细菌的新霉素磷酸转移酶基因(NPTII)转入向日葵、烟草、胡萝卜等细胞中，结果使培养出来的植物抗卡那霉素能力比同类植物强八倍以上。这是细菌基因在高等植物中获得表达的第一个实例。

除草剂草甘磷是一种广谱除草剂，它抑制植物细胞的5-烯醇磷酸莽草酸-3-磷酸(EPSP)合成酶，使得植物细胞不能获得芳香族氨基酸，进而使莽草酸积累而导致细胞死亡。1985年，Comai等将伤寒杆菌中编码EPSP合成酶的一种突变基因 $aroA$ ，拼接上能在植物中起作用的5'启动序列及3'加尾序列，然后引入烟草细胞，再生的烟草转化株对草甘宁有明显的抗性。1986年Shah等以大量产生EPSP合成酶的矮牵牛细胞中分离出编码EPSP合成酶cDNA，并将此DNA置于花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子控制之下，然后将此镶嵌基因导入矮牵牛细胞，也得到了抗草甘宁的转化植株。

植物固氮问题是一个诱人的课题。研究人员企图通过遗传工程使根瘤菌的固氮能力提高，或使它和非豆科植物也能共生。具有固氮的其它细菌，科学家们想找到能和作物共生，而作物可以从中得利的固氮菌。他们也想把固氮能力转给和作物一起生活，但没有固氮能力的细菌。如果把克氏肺炎杆菌的17个固氮基因转给大肠杆菌，大肠杆菌就能固氮。但是，固氮问题异常复杂，要把固氮基因转给作物，看来还为期过早。

在植物抗病毒方面，利用遗传工程技术也取得了重要的进展。Prowell·Abel等将烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白基因的cDNA置于CaMV的35S的启动子下，然后将此镶嵌基因导入烟草及西红柿细胞中，从而获得抗TMV病毒的烟草及西红柿植株。所获得的抗性能稳定地遗传。利用同样的方法，Bryan等将黄瓜花叶病毒

(CMV)卫星RNA的DNA拷贝导入烟草细胞中，使得在转化的烟草及其有性后代中，CMV复制大大降低了。在植物的抗虫育种方面，取得了一项重要的成果，即抗虫植株的获得。苏云金芽孢杆菌(BT)是一种在形成孢子时产生毒性蛋白质晶体的杀虫菌，将编码此蛋白的基因装上能在植物中起作用的5'及3'调节信号后，导入烟草及西红柿细胞，从而获得了抗虫的烟草及西红柿植株。

在动物方面，利用遗传工程技术也取得了重要的进展。动物遗传工程的成功取决于外来基因是否植入精子、卵子或接合子中。把外来基因植入动物染色体有几种方法，其一是用微注射法把外源基因注入已经受精，但精核卵核尚未结合的精核中。在最佳的实验条件下，在出生的小动物中有10—30%，其种系细胞中有外源DNA。另一种方法是用反转录病毒作为载体，把外源DNA转给动物。反转录病毒能把它的DNA植入细胞DNA中，能使动物或人长癌。经过遗传工程操作，去掉它的致癌基因，换上我们所欲传递的基因，就可作为载体。

1983年，美国的一所大学和赛克尔研究所成功地培育出所谓的超级鼠。他们将大白鼠的生长激素基因注入到小白鼠的受精卵细胞中，将注射的受精卵移植到母体中，由此发育而来的小鼠在体型上比一般小鼠大二倍，而且生长速度很快。1987年，J. Paul Sinons等将羊的 β -乳球蛋白基因导入小鼠的受精卵中，然后将此受精卵植入母体中，由此受精卵发育的雌性小鼠乳汁中，充满了羊的 β -乳球蛋白。这些研究成果为动物遗传育种开拓了崭新的途径。

研究发现，编码促性腺释放激素(GnRH)的基因缺失突变，将导致小鼠的不育。Anthôuy J. 等将正常小鼠含GnRH基因的DNA片段导入含此突变基因的同质小鼠受精卵中，使该受精卵发育成正常的小鼠，并能繁殖后代。另一类似的研究是，Readhead. C等用编码髓鞘质基础蛋白(MBP)的正常基因治愈了患颤抖及痉挛症的小鼠。携带有隐性突变的“颤抖”基因的同质小鼠，由于不能产生传导信息必需的髓鞘质基础蛋白，而导致早期死亡。

用上述正常的MBP编码基因导入患此病的小鼠受精卵中，由此发育而来的小鼠成为正常的小鼠。Saviol等利用重组的逆转录病毒感染培养的肝细胞，使转化的肝细胞产生一种新的蛋白，这为遗传缺陷的肝细胞产生正常的蛋白质成为可能。上述这些研究表明，利用遗传工程技术治疗遗传性疾病的年代已为时不远了。

遗传工程用于遗传病的治疗，也称为“基因治疗”。这种治疗为控制及治疗人类遗传病开辟了广阔的前景。

基于科学和伦理学的考虑，可以把基因治疗分成二类。第一种类型是体细胞基因治疗，即把单个基因植入病人一小块组织的细胞中，用以缓解病情。植入基因不会扩散，也不会传代，不存在伦理方面的问题。

已知单基因遗传病有200多种，如肌肉萎缩、镰状细胞贫血、血友病、本性纤维变性和自毁容貌症……等。办法是取出一部分病人骨髓，用重组DNA转化，再放回去。转化的方法有微注射，用化学或电导入反转录病毒。这些技术都已经过关。此法的基因植入位置不定，要求植入基因相对稳定，表达适度，恰好足以缓解病情，且无害的副作用。但这些问题尚未解决。

第二类是种系基因治疗。即把外源基因植入种系细胞中，并传之后代，但要用于人，近期还有不少困难。一是治愈成功率不高；二是基因植入的位置无法控制，如植入位置不当，表达当然不当，后果不堪设想。所以近期不会进行人的种系基因治疗。

至于优生遗传工程的问题，更为复杂，目前只是一种设想。

(赵功民)

第二节 遗传工程基本操作技术

重组DNA技术，又称基因操作。其意义可概括为：①它可改

变生物体的基因型；②可作为研究的工具。应用这种技术可以分离和扩增基因，研究基因的结构与功能，研究基因的高效表达。它的发展巨大地推动了生物学的理论研究和实际应用，在现代生物工程的发展和利用中占有中心地位，使生物工程显现出前所未有的光彩。重组DNA技术的基本含意是在离体条件下，将非同源的DNA片段剪接，再把离体重组的DNA分子转入活细胞内，合成DNA分子所编码的蛋白质产物，从而创造在自然条件下所不能出现的新的生物个体。

一个典型的重组DNA实验包括：

- ①外源DNA片段，也称目的基因。
- ②载体分子，它可以是质粒或噬菌体。
- ③限制性核酸内切酶。
- ④DNA连接酶。
- ⑤作为转化受体的原核或真核细胞

质粒是一类双链环状的小分子DNA，它和噬菌体、病毒一样能够独立复制。大多数作为克隆载体的质粒都是经过改造的，使之更符合实验的要求。一般作为载体的质粒有下列一些特性：①质粒应尽可能小，因为质粒愈大往往转化效率愈低。②应该知道质粒上基因的位置，限制性内切酶的切点，甚至核苷酸顺序。③容易在宿主中增殖，便于获得大量的质粒和重组DNA分子。④具有选择标志以便区分质粒转化的细胞与非转化的细胞。⑤一个好的载体应具有一个能被外源片段插入失活的标志基因，根据表型的改变就可将重组分子和非重组分子区分开。⑥有尽可能多的限制性内切酶单切点，有利于插入不同类型的限制性片段。

一旦分离出外源DNA和载体，使用相同的限制性内切酶处理，产生互补的特异末端，当两种DNA片段配对时，便产生重组DNA分子，留下未连接的3—5磷酸二酯键利用DNA连接酶连接，通过转化或微量注射将重组的DNA分子导入适宜的受体细胞，选择含有外源DNA的转化体并测定外源DNA的表达。

(一) 染色体DNA的制备

分离不同来源的细胞染色体DNA，有多种方法，但基本原理和主要步骤是相同的。①首先要破碎细胞壁和膜，释放出可溶的高分子量DNA；②因为DNA和蛋白质是结合在一起的，要通过变性和蛋白酶处理将蛋白质与DNA分开，除去蛋白质；③再将DNA与其它大分子分开，如用RNase处理去除RNA等。

根据材料的不同，可采用不同的破碎细胞的方法，它们包括：先用溶菌酶处理细胞，形成原生质体，而后在有去污剂的条件下，如SDS，使原生质体破裂；少量的细胞可用超声波破碎；反复冻融细胞也可破碎细胞，对动植物细胞可采用研磨法，组织匀浆法。将上述方法结合使用，效果更好。除用蛋白酶降解蛋白质外，常用的简便方法是用苯酚或苯酚和氯仿的混合液反复抽提去除变性蛋白质。RNase处理可水解RNA。当用乙醇沉淀DNA时，DNA呈现丝状物，可缠绕在玻璃棒上。乙醇沉淀DNA既可浓缩高分子量的DNA，又可去除RNA、寡核苷酸、去污剂和有机溶剂。最终DNA溶液对缓冲液透析，可除去盐和残存的有机溶剂。

提取过程中要避免强烈和过度的搅拌，这会使DNA链断裂，降低DNA的平均分子量。当DNA从细胞释放时，缓冲液含有10—25%的蔗糖，可减少DNA分子的断裂。

1. 分离细菌细胞DNA的一般方法

①用一个菌落接种100ml LB培养液，37℃培养过夜。

②离心2000g，20分钟，收集细胞。

③将细胞悬浮在5ml 50mM Tris-HCl，pH8.0，50mM EDTA缓冲液中，放-20℃冷冻。

④制备新的溶菌酶液（10mg/ml溶在0.25M Tris-HCl中，pH8.0）。细胞冻结后加入0.5ml溶菌酶液，融化混合，融化后冰浴45分钟。

⑤加入1ml STEP溶液，充分混合后于50℃保温60分钟，随即温和振荡。

STEP液: 0.5% SDS, 50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.4MEDTA,
放在室温, 用前加入proteinase K(1mg/ml)。

⑥加6ml用水饱和的苯酚, 缓慢混合5分钟。

⑦离心, 1000g, 15分钟。

⑧将水相转移到另一管里。加入0.1体积3M NaAc (pH5.2)
缓慢混合。

⑨加2倍体积乙醇, 用细棒缠绕DNA, 除去过多的乙醇(靠管
壁旋转玻璃棒)。

⑩将DNA溶解在5ml 50mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA,
200 μ g/ml RNase A中, 为溶解完全, 放4 $^{\circ}$ C过夜。

⑪DNA完全溶解是重要的, 如未完全溶解可再加一些缓冲液,
而后加入等体积氯仿, 倒置数次混合。

⑫离心, 1000g, 15分钟。

⑬将水相转移到新管, 加0.1体积3M NaAc, 再加2倍体积冷
乙醇, 倒置混合, DNA呈长丝状沉淀。

⑭用细棒缠绕DNA, 溶于2ml 50mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM
EDTA溶液中。贮存在4 $^{\circ}$ C。

2. 分离枯草杆菌染色体DNA

①离心收集1g对数生长期细胞。

②用20ml TEN缓冲液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mMEDTA,
10mM NaCl)洗细胞, 离心6500rpm, 4 $^{\circ}$ C 5, 分钟。

③将细胞悬浮在10ml SET缓冲液(20%蔗糖, 50mM Tris,
pH7.6, 50mM EDTA)中, 加1ml溶菌酶液15mg/ml溶在TEN中),
37 $^{\circ}$ C保温30分钟。用相差显微镜检测原生质体的形成。如数量少
可适当延长保温时间。

④加入10ml TEN缓冲液和1ml 25%SDS, 混合。

⑤加入2ml 5M NaCl和等体积用缓冲液饱和的苯酚。混合 5
分钟。

⑥离心6500rpm 5分钟, 4 $^{\circ}$ C。

⑦将上层液转移到新管中, 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:

1),混合5分钟后,离心。

⑧吸出上层液,加入2倍体积95%冷乙醇,混合溶液。

⑨用玻璃棒缠绕DNA,并悬浮在10ml TEN缓冲液中,放4℃过夜,使DNA溶解。

⑩加0.05ml RNase溶液(10mg/ml RNase溶在0.1M NaAc, 0.3M EDTA, pH4.8, 80℃处理10分钟)。37℃保温2小时,再加0.5ml pronase液(2mg/ml溶在TEN中, 37℃预处理15分钟)继续保温1小时。

⑪加5ml饱和缓冲液的苯酚和5ml氯仿-异戊醇,缓慢混合5分钟,离心。

⑫再用10ml氯仿-异戊醇重复抽提一次,离心。

⑬对上相液加入2倍体积95%冷乙醇,沉淀用95%乙醇洗涤后,溶解在2—4ml TEN缓冲液中。

3. 分离大分子量大肠杆菌DNA

①离心收集5ml对数生长期细胞培养液。

②将细胞悬浮在25ml 1M NaCl中, 4℃振荡1小时。

③离心,再悬浮在25ml冷TES(5mM EDTA, 50mM Tris pH8.0, 50mM NaCl)缓冲液中。

④离心,将沉淀悬浮在5ml TE(50mM Tris, pH8.0, 20mM EDTA)中

⑤加入0.5ml溶菌酶(2mg/ml溶在TE缓冲液中),小心混合,置37℃保温15分钟。

⑥加入0.6ml Sarcosyl-pronase溶液(10% Sarcosyl, 5mg/ml pronase溶在TE缓冲液中), 37℃保温1小时。

⑦加5ml苯酚,重复抽提2—3次,再加5ml氯仿抽提一次。

⑧加入NH₄Ac至0.3M,加0.54倍体积异丙醇。

⑨离心,用70%乙醇洗一次。

⑩将DNA沉淀溶解在1—2ml TE中,放4℃过夜。

⑪用0.5%琼脂糖凝胶电泳测DNA大小(Tris-HAC缓冲液, pH7.8)。

4. 酵母DNA的分离

①将酵母菌接种在YEPD（每升含蛋白胨20g，酵母粉10g，葡萄糖20g）中，于30℃生长至静止期，离心收集1000ml培养液中的细胞，6500rpm，4℃，5分钟。

②将细胞悬浮在60ml蒸馏水中，离心，6500rpm，4℃，5分钟。

③将细胞悬浮在SB原生质体缓冲液（0.2M Tris-HCl, pH7.5, 1M山梨醇，0.1M EDTA，0.1M 2-巯基乙醇）中，浓度为0.25g/ml（~40ml）。加入2ml Zymolyase（1mg/ml溶在TEN中），30℃保温1小时，不时摇动混合。

④加入等体积TEN缓冲液（10mM Tris-HCl; pH7.6, 1mM EDTA, 10mM NaCl），2ml SFS（终浓度为1%）0.5ml RNase 溶液（10mg/ml），缓慢混合，37℃保温2小时。再加1ml（2mg）pro-nase，继续保温2小时，不时混合。

⑤于65℃加热处理30分钟，再冷却至室温。

⑥加入等体积苯酚-氯仿（1:1），混合振荡5分钟。

⑦离心使两相分离，6500rpm，4℃，15分钟。

⑧将水相用移液管移出，再用氯仿-异戊醇抽提，重复⑥⑦步骤。

⑨加入1/25体积的5M NaCl，加入2倍体积的95%冷乙醇，用玻璃棒缠绕DNA，并溶于50ml TEN缓冲液。

⑩加0.1ml RNase液，37℃保温1小时。

⑪重复步骤⑥和⑦，去除RNase和残留蛋白质。加1/25体积的5M NaCl，2倍体积的95%冷乙醇，缓慢混合后冰浴放置5分钟。

⑫用玻棒缠绕DNA，溶在1—5ml TEN缓冲液中，存放在4℃。

5. 分离真核细胞高分子量DNA

①将组织用小刀切碎。

②把液氮倒入Waring Blendor匀浆器里。

③加入碎组织盐，粉碎1—5分钟，直至组织变成细粉。

④让液氮蒸发掉，加10倍体积的裂解液[(0.5M EDTA (pH 8.0)100 μ g/ml Proteinase K, 0.5% sarcosyl)]

⑤悬浮后50 $^{\circ}$ C水浴3小时。

⑥加入等体积苯酚，重复抽提3次。由于样品中盐的浓度高，离心后的酚相一般为上相，除去苯酚，合并水相。

⑦3次抽提后，水相对4升透析液(50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA, 10mM NaCl)透析。更换几次透析液，至OD₂₇₀ < 0.05使样品在体积上增加3倍。

⑧加入100 μ g/ml RNase, 37 $^{\circ}$ C处理3小时。

⑨用苯酚—氯仿温和抽提2次。

⑩对TE缓冲液充分透析。

⑪测量DNA浓度并在0.3%琼脂糖凝胶上电泳，DNA应大于100kb，比完整的入DNA移动的更慢。DNA溶液存放在4 $^{\circ}$ C。

6. 乙醇沉淀DNA

①将DNA溶解在TE缓冲液中(10mM Tris-HCl pH7.6, 1mM EDTA)。

②加入0.1体积的3M KAc(pH5.2)混合。

③加入2倍体积的95%冷乙醇，混合。

④将管置-20 $^{\circ}$ C冰柜或干冰乙醇浴中5分钟。

⑤离心收集DNA沉淀。

⑥弃掉上清液，将管倒置在滤纸上，空干乙醇溶液。

⑦去掉残存的少量乙醇，将管放于干燥器中1—2分钟。

⑧将DNA沉淀溶解在所需的缓冲液中。

为了防止污染DNA，纯化时最好带手套。加乙醇前必须加入一定量的单价阳离子，浓度可以在0.1—0.4M之间。如果DNA溶液的浓度小于0.1mg/ml，为帮助DNA沉淀可加入1 μ l酵母tRNA(10mg/ml溶解在水中并煮沸5分钟)，也可延长放置在干冰乙醇浴中或-70 $^{\circ}$ C冰柜中的时间直至几个小时。如果沉淀的DNA片段较小，则可用 Beckman Sw41 或相当的转子于35000 rpm 离心半小

时，收集沉淀。

7. 用冷冻干燥的植物材料制备DNA

分离植物DNA的一个主要问题是要有效地破坏植物细胞壁，一些破碎细胞壁的方法同时会剪断DNA分子。实验证明，用冷冻干燥的植物组织制备DNA可克服上述问题。将收集的植物组织洗净，冷冻干燥，在干燥器中贮存几年，而不会影响DNA的质量。

①对1.0g冻干植物材料加入4.0g氧化铝(Sigma type305)，在研钵中研成细粉。这不但能有效地破碎细胞壁，也会提高DNA的得率

②将粉末倒入50ml聚丙烯离心管中，加15ml提取缓冲液(EB)，用塑料搅棒温和搅拌，使粉末均匀分散开。

③盖上离心管盖，于56℃水浴中保温20分钟，不时轻微振荡，保持提取液处于混合状态。

④将保温混合物冷至室温，千万不要使温度降至15℃以下，因为溴化十六烷基三乙胺(CTAB)将会沉淀。

⑤加15ml氯仿-辛醇(24:1v/v)，加盖，温和地反复倒置离心管，形成乳化相。在通气柜中进行，不时松盖减压。

⑥用Sorval ss-34转子(8000g，20℃)离心，10000rpm，10分钟。

⑦将水相(上层)转到一个干净的50ml离心管中，避免吸取界面处的变性蛋白。

⑧加1/10体积(~1.5ml)10%(w/v)CTAB溶液(用0.7M NaCl配制)，缓慢混合后，重复用氯仿:辛醇抽提。

⑨将水相转至合适的无菌玻璃管中，如16×125mm管。

⑩加入等体积的沉淀缓冲液，温和混匀，室温放置30分钟至沉淀形成。

⑪于室温离心1500g，10—15分钟，不要使沉淀变得太结实，以致难以重新溶解，一个好的制品沉淀应该是白色的或淡白色。

⑫将离心管倒置于吸水纸上，空干沉淀。此时可将沉淀放置4℃过夜，或继续做梯度离心分离。

提取缓冲液(EB):50mM Tris-HCl, pH8.0, 0.7M NaCl, 10mM EDTA, 1%(w/v)CTAB(Sigma H5882),1%(v/v)2-巯基乙醇。配制该溶液时先不加巯基乙醇,将溶液加热搅拌,避免形成泡沫,而后灭菌,冷至室温后加入巯基乙醇。

沉淀缓冲液: 50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 1%(w/v)CTAB。

8.用新鲜植物组织提取DNA

①用70%酒精处理材料表面,蒸馏水冲洗后,将10g组织迅速放液氮中冷冻。

②将冷冻的组织放在预冷的研钵中,捣碎大盐材料加入4g氧化铝,迅速研磨成细粉末。

③将匀浆转入50ml离心管,加0.2ml巯基乙醇,10ml 2x提取缓冲液(预先加热至95℃),立即用塑料搅拌棒混合。

④盖住离心管,放56℃水浴保温20分钟,以后操作同上述实验7-④以后步骤。

9.植物DNA的区带离心

①通过56℃水浴加热第12步得到的沉淀溶解在2.4ml 1M CsCl/EtBr (1M CsCl,50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.2mg/ml EtBr)中,溴化乙锭将显示贴在管壁上的核酸。虽然在加入1M CsCl/EtBr后,大部分不透明的CTAB沉淀会很快溶解,核酸的溶解则需要更长的时间。

②将溶解了的核酸转入Beckman VTI65超离心管或与之相应的管子,加入2.9ml 7M CsCl/EtBr (7M CsCl, 0.1% Sarcosyl, 0.2mg/ml EtBr),将管口封好,轻轻倒置混合。

③离心,58000rpm4小时或40000rpm过夜(16小时)。

④用长波紫外线(320nm)照射,可见DNA带,用带19号针头的1ml注射器穿进管壁,吸出DNA,由于RNA正被离到管壁上,所以必须小心,勿吸出RNA。

⑤用NaCl饱和的异丙醇抽提5次,去除溴化乙锭(溴化乙锭进入有机相)。

⑥对2升蒸馏水透析。4℃，去除CsCl。磁力搅拌透析24小时内，最少换水3次。

⑦于260nm测DNA浓度 (1.0OD值 = 50μg/ml)。

⑧加1/10体积3M乙酸钠，然后加2倍体积冷乙醇，-20℃过夜沉淀DNA。

⑨用台式离心机离心3分钟沉淀DNA，真空干燥沉淀，重新溶于无菌水中，至所需浓度。DNA可在-20℃保存几年保持稳定。也可保存在80%乙醇中。

10. 为Southern印迹法制备少量DNA

①将0.1克冻干的愈伤组织或0.07克冻干的已去掉中脉的叶片材料，放在小研钵中(9cm直径)，加入0.3克氧化铝将组织研碎。也可以研磨更多的样品，然后再称出所需量，提取DNA。

②将研成粉末的植物组织转入台式小离心机管中，加入600μl提取缓冲液(EB)，用塑料搅棒温和搅拌，56℃保温10分钟。

③加入600μl氯仿-辛醇(24:1)，振荡后离心两分钟，将水相(上层)转至一洁净离心管。

④用100μl EB洗原管中的变性蛋白界面，离心，合并水相。

⑤加入1/10体积10% CTAB (~70μl)到合并的水相中，混匀。重复氯仿-辛醇抽提。

⑥将水相转至一洁净的硅化离心管中(16×125mm)，加等体积的沉淀缓冲液(600μl)，混匀，室温放置20分钟。

⑦用台式离心机收集沉淀(2000g，15分钟)，弃上清液，空干沉淀。如果沉淀沉降不好，再在硅化管中，20℃，8000g离心15分钟。

⑧将核酸/CTAB沉淀溶于400μl 1M NaCl中，为溶解可加热至56℃，将该溶液转至无菌的离心管中。

⑨核酸/CTAB沉淀完全溶解后，加2倍体积乙醇(800μl)，混匀，-20℃放置过夜。

⑩用台式离心机离心2分钟。加1ml 65%乙醇洗1分钟，弃乙醇，重复洗涤两次，再用85%乙醇洗涤一次，如果沉淀被冲起，

则应离心沉降。乙醇洗涤将洗掉核酸中的CTAB，使DNA易于被限制性内切酶消化。

⑩真空干燥沉淀后，溶解在85 μ l无菌水中。

⑪取10 μ l核酸溶液，用二苯胺法测定DNA浓度。

⑫相应地稀释或浓缩至所需DNA浓度(例如200-500 μ g/ml)，按此法制备的DNA可用于限制性内切酶分析及Southern印迹技术，样品中的RNA不会影响分析，因为绝大多数情况下，电泳时RNA会跑出凝胶。

11. 二苯胺法定量测定DNA

(1) 配制下列溶液：

①3N高氯酸：取49.2ml高氯酸，加蒸馏水至200ml，混匀，保存于加塞的瓶中。3N高氯酸具有极强的腐蚀性。该溶液可在室温保存几个月。

②二苯胺溶液：用含有0.01%三聚乙醛(Paraldehyde)的冰醋酸配制4%的二苯胺溶液，以上成分均有危险性，尤其是二苯胺。因此应在通风厨中操作。

(i) 将20 μ l三聚乙醛(分析纯)加到198ml冰醋酸中(分析纯)。

(ii) 称取8克二苯胺(分析纯，戴手套)加到冰醋酸溶液中，迅速用铝箔纸包好避光，振荡至二苯胺完全溶解，可在暗处，室温保存6周。

(2) 以下操作在通风厨中进行，依次将各组份加入到1.5ml小离心管中。

140 μ l 无菌蒸馏水

10 μ l DNA溶液

150 μ l 3N高氯酸

180 μ l 二苯胺溶液

(3) 盖上离心管，反复倒置混匀，置暗处30 $^{\circ}$ C保温16—20小时。每次测定必须严格控制在相同的温度和时间，否则每次测定都需用标准DNA样品建立标准曲线。

(4) 于600nm测光密度，通过标准曲线计算浓度，每次测定

都需空白对照（蒸馏水，不加DNA）以调零点。在5—50 μ g DNA/ml范围内，O.D.₂₆₀与DNA浓度呈线性关系。

12. 从新鲜叶片或愈伤组织中分离核DNA

①称取200克组织，用2 $^{\circ}$ C蒸馏水洗涤，其后操作均需冰浴进行（2—4 $^{\circ}$ C），最好在冷室中操作。

②如叶片要去掉中脉，在一个大培养皿中用刀片将组织切成碎片。

③将组织放在1000ml烧杯中，加二乙醚覆盖，搅拌2分钟。

④弃二乙醚，用冷无菌蒸馏水洗，加入400ml预冷的分离核缓冲液A，中速匀浆1分钟，可用Polytron匀浆器或用Waring搅拌器，以2个5秒脉冲中速破碎组织。

⑤用4层无菌平纹纱布加一层Miracloth，将匀浆液过滤至无菌的1000ml烧杯中。

⑥把匀浆液转入无菌的大体积离心管中，2000g，4 $^{\circ}$ C离心10分钟，收集粗制细胞核。

⑦悬细胞核于25ml洗核缓冲液B中，用无菌硅化离心管在水平转子中离心2000g，4 $^{\circ}$ C，10分钟。继续洗涤直到细胞核制品中不再有细胞碎片（洗3—4次）。

⑧如需要高纯度制品，可用非连续的Percol梯度离心细胞核。将细胞核悬于7ml分离核缓冲液A中，铺到非连续Percol密度梯度上，该梯度由7ml 35%Percol和7ml 80%Percol制成，用分离核缓冲液A配制在无菌硅化离心管中。水平转子 8000g，4 $^{\circ}$ C，离心30分钟。两层之间的区带含有核，取出该区带，用25ml分离核缓冲液A稀释，离心沉降核，2000g，用相同缓冲液洗一次（水平转子），纯化的核可在核贮存缓冲液中-70 $^{\circ}$ C存放。

⑨冰浴中将核悬于5ml核裂解缓冲液中（该溶液不含渗透压稳定剂），将细胞核在Vortex振荡器上振荡10次，每次5秒钟，其间冰浴冷却。也可将核冷冻融化，悬在5ml含有500 μ g/ml预消化的Pronase的核裂解液中，37 $^{\circ}$ C保温30分钟。

⑩加0.1ml β -巯基乙醇，5ml预热至95 $^{\circ}$ C的2倍提取缓冲液（见

实验1.7)，立刻用塑料搅棒混匀，以后操作则按从冷冻干燥的植物材料制备DNA的步骤④进行。

分离核缓冲液A：1M蔗糖，10mM Tris-HCl，pH7.2，5mM MgCl₂，2mM β-巯基乙醇(2ME)，除2ME以外缓冲液应灭菌，使用前加入2ME。

洗核缓冲液B：与分离核缓冲液相同，只是加有0.5% Triton X-100。

核贮存缓冲液：250mM蔗糖，20mM Hepes，pH 7.8，5mM MgCl₂，1mM 二硫苏糖醇，50%葡萄糖。

核裂解液：10mM Tris-HCl，pH 1.2，10mM EDTA，5mM 2ME，0.5% Triton X-100。

13. 叶绿体DNA的分离

①按实验12.①—⑤步骤，用细胞器提取液F代替核提取液A，匀浆200克植物材料。

②于4℃，100g离心10分钟去细胞核，1800g离心10分钟(4℃)收集叶绿体。将上清液滤入一洁净管中，将叶绿体离心沉淀置冰浴。

③将此种细胞器悬于25ml DNase缓冲液G中，冰浴1小时，不时摇动。以消除核DNA片段污染细胞器DNA，此保温过程中的DNase浓度需靠经验确定，可参考使用150—500μg/ml的浓度。

④加入EDTA (pH8.0) 至终浓度10mM，终止DNase活性。

⑤4℃，1,800g离心15分钟收集叶绿体。

⑥将此种细胞器悬浮于7ml细胞器提取液F中，按实验12.⑨步，用非连续Percol密度梯度离心纯化细胞器制品。

⑦用25ml细胞器提取液F稀释所得叶绿体4℃在1800g离心15分钟。

⑧重悬在25ml细胞器洗涤液H中，再离心洗涤细胞器。

⑨将离心沉降的叶绿体在干冰/乙醇浴中冷冻，然后在22℃水浴中融化，重复冻融3次后，悬于5ml核裂解缓冲液中。

⑩以下操作按实验12-⑨、⑩步骤进行。

细胞器提取液F: 300mM甘露醇, 50mMTris-HCl, pH8.0, 3mM EDTA, 0.1% 小牛血清蛋白(BSA), 1mM β -巯基乙醇(2ME)。配制该溶液时先不加入BSA和2ME, 该溶液灭菌后, 使用前再加入BSA和2ME。

DNase缓冲液: 与细胞器提取液相同, 只是用前加入MgCl₂和DNase分别至终浓度13mM和150—500 μ g/ml。

细胞器洗涤液H: 150mM NaCl, 100mM EDTA, pH8.0。

(二) RNA的制备

研究RNA的合成和功能, mRNA指导的蛋白质合成和cDNA的制备, 都需要分离提纯RNA。细胞中的RNA有多种, mRNA仅占RNA的1—5%, 且分子量不同。RNA大多同蛋白质结合在一起, 因此提取RNA需要把RNA与蛋白质分开, 连续去除蛋白质, 同时要避免在抽提过程中RNA的降解, 最重要的是抑制RNase的活性, 这是操作成败的关键。RNase不仅在细胞中有, 在培养液和汗里也有, 必须尽可能迅速而有效的抑制它。这就是为什么许多实验要用去污剂, 例如SDS, 它可使RNase变性。当除去去污剂后, RNase可复性而再次激活。为避免RNA降解, 必须注意以下操作: ①要在清洁的条件下操作, 戴上手套。②全部玻璃器皿需高温灭菌, 最好将它们浸泡在0.5%二乙基焦碳酸(diethylpyrocarbonate, 一种很强的蛋白质变性剂)中, 100 $^{\circ}$ C保温5分钟, 再清洗干净, 灭菌。③溶液要高压灭菌。配制溶液的水可用DEPC处理, 每升水加1毫升DEPC, 搅拌1小时, 高压灭菌。④应用高纯度的化学试剂。使用RNase抑制剂如特制皂土、RNasin。⑤RNA可作为乙醇沉淀物, 置-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C存放, 这种条件可维持RNA二级结构, 阻止核酸酶降解。

mRNA分子大小不同, 对RNase尤其敏感, 为此分离和提纯特异mRNA的最成功的例子是从含有大量特异mRNA的细胞中提纯。但所有mRNA的制备, 都需把mRNA同DNA、rRNA、tRNA分开, 采用选择性抽提, 分级分离与亲和层析。在许多情况下, 从

总的mRNA里分离特殊mRNA是根据分子大小，以蔗糖密度梯度离心或制备凝胶电泳分离。

由于细胞来源和细胞内RNase浓度的不同，提取RNA有多种操作程序，下叙面述果蝇提取RNA的方法，可作为提取RNA的一般指导。

1. 抽提果蝇成体总RNA

①在85ml的匀浆杯中，室温，放入30ml RNA抽提缓冲液(0.15M NaAc, 50mM Tris-HCl, pH9.0, 5mM EDTA, 1% SDS, 20 μ g/ml聚乙烯硫酸)，匀浆前加入二乙基焦碳酸(DEPC)到1%浓度。

②高速匀浆3次，每次30秒，每次间隔30秒冰浴冷却。

③加入25ml用抽提缓冲液饱和的苯酚(4 $^{\circ}$ C)继续匀浆45秒钟。以下操作于4 $^{\circ}$ C下进行并将所有溶液预冷到4 $^{\circ}$ C。

④将匀浆液倒入离心管，振荡10分钟，而后离心，10000 \times g，10分钟。

⑤用10—15ml抽提缓冲液(省去DEPC)再抽提，离心。

⑥合并两次离心的上清液，同上述用苯酚抽提2—3次。

⑦用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(24:24:1)抽提水相离心，吸出上清液。

⑧加NaAc到上清液使其浓度为0.15M，随后加入2.5倍体积的95%(-20 $^{\circ}$ C)冷乙醇沉淀RNA，于-20 $^{\circ}$ C置2小时，离心收集RNA沉淀，10000 \times g，10分钟。

⑨将RNA悬浮在10ml 10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mM EDTA, 0.1% SDS溶液中，转移到经DEPC处理的离心管里，离心沉淀多糖，25000rpm (Backman SW50.1转子) 45分钟，2—4 $^{\circ}$ C。

⑩吸取上清液，加蛋白酶K为100 μ g/ml，37 $^{\circ}$ C保温20分钟，之后用苯酚抽提溶液2次，用苯酚-氯仿-异戊醇抽提一次，同上述加入NaAc并用乙醇沉淀RNA，再用70%乙醇洗RNA一次，将RNA存放在95%乙醇中，放入-20 $^{\circ}$ C冰箱。

2. 提取果蝇胚胎的多聚核糖体RNA

①将胚胎在0.7% NaCl, 0.01% Triton X-100中清刷, 而后在2倍稀释的5.25%次氯酸钠中浸2分钟, 再用 NaCl-Triton溶液洗胚胎, 除去大部分次氯酸。

②将10g胚胎悬浮在25—50ml 的多聚核糖体抽提液中缓慢匀浆破碎细胞。

多聚核糖体抽提液: 0.25M KCl; 0.05M Tris-HCl; 0.025M MgCl₂, 0.25M Sucrose, pH7.6。

③用尼龙布或几层纱布过滤匀浆液, 然后离心, 10000×g, 20分钟。

④在 Beckman SW25.2 离心管 (预先用0.2% 二乙基焦碳酸处理和无菌水洗刷) 中, 放入15ml 无菌的含有50% (w/v) 蔗糖的多聚核糖体抽提液, 其上加离心后的上清液。

⑤于4℃的 SW25.2 转子中离心, 沉降多聚核糖体, 25000 rpm 5小时, 倒出上清液, 迅速用冰冷的多聚核糖体抽提液洗涤多聚核糖体, 然后弃掉缓冲液。

⑥将沉淀悬浮在RNA抽提液中, 一般20g胚胎需10ml, 在室温振荡几小时方可完全悬浮。

RNA抽提缓冲液: 0.15M NaAc, 0.05M Tris-HCl, 0.005M EDTA, 1% SDS, 20μg/ml 聚乙烯硫酸, 混合后用HCl调pH为9.0。

⑦用等体积饱和缓冲液-苯酚抽提3次, 用苯酚-氯仿-异戊醇抽提1次。

⑧将上层液移入 DEPC 处理的离心管中, 用 SW40 转子于 40000rpm 离心45分钟, 20—25℃。

⑨加NaAc至终浓度0.15M, 用2.5倍体积的95%冷乙醇沉淀RNA, 在-20℃放置至少2小时。

⑩离心10000×g, 10分钟, 空干后用70%乙醇洗2次, RNA在95%乙醇中, 置-20℃存放。

3. 植物总RNA的制备

①称取新鲜植物材料 (如5—10克) 尽可能快的在液氮中冷冻, 保存在液氮中。

②取5—10克冷冻的叶片材料，在一个液氮致冷的研钵中研成细末，不时添加液氮使组织处于冰冻状态。

③加50ml 匀浆缓冲液，缓慢研磨，然后用4层无菌平纹纱布过滤，滤液放入250ml三角瓶中。

④将匀浆液转至无菌的30ml离心管中，4℃，8000g离心10分钟（8×50转子）。

⑤上清液通过4层无菌的平纹纱布过滤。

⑥加1/20体积的10%SDS，使终浓度达0.5%。

⑦加等体积的水饱和酚，再加等体积的氯仿-异戊醇(24:1)，室温下磁力搅拌20分钟。

⑧转移混合物到无菌的50ml离心管中，2500g离心，10分钟。

⑨将水相（上层）和界面部分一起转入一洁净的250ml三角瓶中，加等体积氯仿，混匀10分钟，离心分相，只吸取水相。

⑩重复氯仿抽提，直至能见到很薄的一层蛋白（通常只需重复一次）。避开变性蛋白，将水相转至无菌的30ml离心管中，加1/20体积的3M乙酸钠，再加2倍体积乙醇，-20℃，过夜沉淀核酸。

⑪4℃，8000rpm离心20分钟，收集核酸（Sorval SS-34转子）。

⑫用1—2ml 3M乙酸钠，pH6.0，4℃洗涤沉淀2次以去除乙醇与DNA。

⑬用含0.1M乙酸钾的80%乙醇洗沉淀2次，并贮存在这种溶液中（-20℃）。将RNA干燥，溶于蒸馏水，用分光光度计测RNA含量。 $O.D_{260nm} = 40\mu\text{g/ml}$ ，纯净的RNA的 $O.D_{260}/O.D_{280} = 2.0$ 。

匀浆缓冲液：0.2M Tris-HCl，pH8.5，0.2M 蔗糖（去除RNase活性），30mM Mg(Ac)₂，60mM KCl，或者用新鲜的灭菌溶液，或者灭菌后保存于-20℃，用前加1%聚乙烯吡咯烷酮和0.31%(v/v) β -巯基乙醇。

4. 提纯PolyA-mRNA

从真核细胞抽提的RNA大部分是核糖体RNA、tRNA和各种

核RNA，只有一小部分是mRNA，通常低于5%。这些 mRNA几乎都在3'末端含有PolyA，因此可用 Oligo(dT)-cellulose 柱层析分离mRNA，当抽提的细胞RNA通过柱时，PolyA-mRNA 结合在柱上，然后用洗脱缓冲液洗脱，回收结合在柱上的 PolyA-mRNA。

除明确指出外，所有操作在室温进行。

①将RNA沉淀去除乙醇，溶解在 Oligo(dT)洗脱缓冲液中，测量 A_{260} 和 A_{280} 的吸收，使 $A_{260}/A_{280} \approx 2$ 。

Oligo(dT)洗脱缓冲液：10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mM EDTA, 0.1% SDS。

②用洗脱缓冲液把RNA溶液调成5—10mg/ml，于65℃加热5分钟，迅速冷却，用等体积的2×Oligo(dT)结合缓冲液混合。

2×Oligo(dT)结合缓冲液：10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mM EDTA, 0.8M NaCl, 0.1% SDS。

③使RNA溶液通过Oligo(dT)纤维素柱(约2g，装在一个0.9厘米直径的柱子中)，柱子预先用5倍体积的1×Oligo(dT)结合缓冲液洗涤。也可用缩小的柱子，如移液器头(在底部填上少量硅化的玻璃丝)。柱子的流速是10—15ml/小时。

1×Oligo(dT)结合缓冲液：10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mM EDTA, 0.4M NaCl, 0.1% SDS。

④将出液再返回柱子，循环一次，使未结合的polyA-mRNA能第二次结合在柱上。

⑤用5—8倍柱体积的1×Oligo(dT)结合缓冲液洗柱子，再用2—3倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱 mRNA，分部收集洗脱液，每部分25—35滴，RNA开始洗脱在No.16—25管之间。

⑥测定吸收值，合并紫外吸收部分。

⑦再层析，在⑥步以后，测定合并部分的体积，在65℃溶液被加热5分钟，迅速冷却，用等体积的2×Oligo(dT)结合缓冲液稀释，将样品通过同一个柱(柱子已用几倍体积的洗脱缓冲液和几倍体积的结合缓冲液洗涤)，重复③—⑥步骤。最后加入

NaAc到0.3M和2.5倍体积的95%冷乙醇沉淀RNA，置-20℃2小时，离心10,000×g，15分钟，用70%乙醇洗2次，空干。

③用2—3倍体积的0.1NKOH洗过的Oligo (dT) 纤维素柱，再用5—7倍体积的1×Oligo (dT) 结合缓冲液(含有0.02% NaN₃)洗后将柱放在室温备用。

(三) 质粒DNA的分离

有些重要的细菌基因不是定位在染色体DNA上，而是位于独立复制的环状双链质粒DNA上，分子克隆的主要兴趣不是研究质粒本身的复制和表达，而是把质粒作为插入外源DNA片段的载体。大多数用作载体的质粒不是天然质粒，都经过人工修饰。质粒的表示方法，如pAB123，“p”为plasmid，“AB”为分离质粒的人或实验室，数字则表示实验室对质粒的编号。

根据复制模型可将质粒分为两类，即严紧型质粒和松弛型质粒。严紧型质粒在细胞中的拷贝数只有几个或十几个，这类质粒的复制依赖于宿主蛋白质的合成。遗传工程最常用的质粒是松弛型质粒，它们在细胞中的拷贝数一般有几个，而且它们的复制不依赖于宿主的蛋白质合成，在抑制宿主蛋白质合成的情况下，质粒继续复制，拷贝数增加10—20倍。利用这种特性，比较容易提取大量质粒DNA，也同样可以合成大量质粒编码的产物。因此通过使细菌生长在丰富培养基中，当细胞浓度达 5×10^8 /ml时，加入氯霉素(150μg/ml)或奇放线菌素(Spectinomycin, 300μg/ml)继续培养12—15小时，可增加质粒DNA量。

质粒DNA有三种不同的构型，即线状双链形式；开环形式，即一条DNA链完整，而另一条有缺口；共价闭合环状分子。基因操作要求分离共价闭合环状分子，根据它们物理行为的不同，一般采用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法分离，快速小规模的分离合可用碱抽提法。

在氯化铯密度梯度中加入溴化乙锭，可对不同构型的质粒有不同的影响。溴化乙锭可在邻近碱基对间产生相互螯合作用，而

伸展 DNA 双螺旋，从而可降低分子密度。环状分子由于超螺旋构型可限制这种作用，结果线性和开环DNA螯合溴化乙锭多于环状DNA分子，故在氯化铯-溴化乙锭梯度里，环状DNA分子成带在更高密度，可与线性和开环DNA分开。另外由于溴化乙锭结合DNA，在紫外光照射下，DNA 吸收的能量转给溴化乙锭会显著增强荧光，便于观察。但要注意，短波紫外线会损伤 DNA，破坏它的功能，一定要用长波紫外线照射离心管来观察。

碱抽提方法是基于环状、开环和线性 DNA 在碱性条件下的行为不同。碱处理使DNA氢键破裂仅在很小的pH范围内，pH12—12.5，在此范围内，只有线性和开环分子的H键分开，而超螺旋环状DNA保持原样，以致粗细胞抽提液的pH为12—12.5时，导致选择性的变性，再中和时变性DNA复性和团聚，经离心可沉淀除去它。从上清液里用乙醇沉淀环状质粒DNA。

一般裂解细胞的方法是用溶菌酶处理含质粒的细胞，形成原生质体，同时缓冲液中含有蔗糖，阻止原生质体的裂解。完全裂解需加入一种去污剂。去污剂有离子型去污剂，如SDS、Sarcosyl，可使细胞释放出总DNA，而后用切剪力（而使溶液多次通过注射针头）使染色体DNA断成片段，质粒DNA由于小和超螺旋构型而保持完整。也可用非离子型去污剂，如 Triton X-100、Bri-58，使大部分染色体DNA吸附在细胞成分上，在低速离心时同细胞碎片一起沉淀。高分子量的质粒会某种程度地共沉淀，因此这种方法主要用于分离多拷贝的小质粒。

1. 大量制备大肠杆菌质粒DNA

①取单菌落接种于60ml LB培养液（每升含蛋白胨10g，酵母膏5g，NaCl 5g，pH7.5，含有适量的抗生素Ap 20 μ g/ml，或Tc25 μ g/ml，Kan 10 μ g/ml）。37 $^{\circ}$ C，振荡培养过夜。

②次日，将10ml过夜培养液接入1升LB培养液，含有适量的抗生素。37 $^{\circ}$ C，培养至OD₆₀₀ = 0.8—1.0。

③为扩增质粒拷贝数，加入300 μ g/ml奇放线菌素（Spectinomycin）或150 μ g/ml氯霉素。37 $^{\circ}$ C，振荡培养16小时。

④离心收集细胞，4500g，15分钟，4℃。

⑤将细胞悬浮在30ml 50mM Tris-HCl，pH8.0和25%蔗糖溶液里。

⑥加入10ml溶菌酶(5mg/ml，溶在0.25M Tris-HCl，pH8.0)和10ml EDTA (0.25M，pH8.0)，混合冰浴保温15分钟。

⑦加入50ml去污剂混合液。

去污剂混合液：5ml 10% Triton-X 100 (溶在0.25 M Tris-HCl，pH8.0)；125ml 0.25M EDTA；25ml 1.0M Tris-HCl，pH8.0；加H₂O到500ml。

⑧冰浴保温30分钟。

⑨用 Beckman SW27 转子离心，27000 rpm，15℃，1.5小时。上清液含有质粒DNA。

⑩将已处理过的蛋白酶 (pronase) 加入到上清液中，终浓度为250μg/ml (pronase需在37℃预保温30分钟)。

⑪37℃保温30分钟。

⑫加入0.5倍体积用50mM Tris-HCl (pH8.0)饱和的苯酚，混合，离心1000g，10分钟，4℃。

⑬吸出水相，加入0.1倍体积的3M NaAc和2倍体积的95%冷乙醇，混合后-20℃过夜，或-70℃，30分钟。

⑭离心收集沉淀，6000×g，20分钟，4℃。

⑮除去乙醇，干燥后将沉淀溶在18ml 20mM Tris-HCl，10mM EDTA (pH8.0)缓冲液中。

⑯加入18g固体氯化铯和0.1ml溴化乙锭溶液 (30mg/ml溶在水中)，混合均匀。

⑰把氯化铯溶液转到适合的离心管中，管的上部用液体石蜡封盖。

⑱离心，65000 rpm，15℃至少16小时或40000 rpm 15℃ 48小时。

⑲离心完毕，在光照下可见二条DNA带，较上部的带由线状细菌DNA和开环的质粒DNA组成，靠下面的带则是闭合环状质粒

DNA。

②打开离心管盖，用一个注射针头从离心管侧面刺入质粒DNA带下部（针口平面朝向DNA带），收集到玻璃或塑料离心管中。

③除去溴化乙锭。步骤如下：

a. 加等体积水饱和的异丁醇或异戊醇。

b. 使两相混合。

c. 室温离心1500g，3分钟。

d. 把下部水相转到清洁试管中，重复以上步骤4—6次，直到水相中粉红颜色消失。

④水相对TE缓冲液（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH8.0）透析数次。

⑤用乙醇沉淀DNA。

⑥将质粒DNA溶在少量TE缓冲液中。

2. 大量制备枯草杆菌质粒DNA

①离心250—500ml过夜培养物。

②将菌体悬浮于0.1倍体积的25%蔗糖，0.1M NaCl和0.05M Tris-HCl，pH7.5。

③加入溶菌酶0.5mg/ml，混合，37℃保温20分钟。

④对每20ml悬液依次加入4.8ml 5M NaCl，1.2ml 0.5MEDTA（pH8.5），26ml 2% SDS—0.7M NaCl。

⑤缓慢倒置混合一次，置4℃，18小时。

⑥离心，15000×g，45分钟。

⑦向上层液加入0.3M NaAc。

⑧加2倍体积的冷乙醇，于-20℃至少放2小时。

⑨离心5000g，30分钟。用5ml TES液（30mM Tris-HCl，pH7.5，50mM NaCl，5mM EDTA）溶解沉淀。

⑩加RNase A（50μg/ml），RNase T（1μ/ml），混合后置37℃，30分钟。

⑪加预处理过的Pronase（500μg/ml），37℃保温至溶液清亮。

②进行CsCl、EB离心。方法同前。

3. Ti质粒DNA的制备

①用10ml前培养液接种于1000ml PA培养基中（每升含蛋白胨4g, MgSO₄ 2mM, pH7.2）。28℃通气培养24—48小时。

②离心收集菌体，用200ml TE缓冲液洗菌，最后悬浮在80ml TE缓冲液中。加入10ml Pronase (5mg/ml, 溶在TE缓冲液中, 37℃预保温1小时), 10ml SDS (10%溶在TE缓冲液中), 缓慢混合后, 37℃保温1小时或直到溶液变清。

③将裂解液转移到250ml烧杯中, 边缓慢搅拌边加入3M NaOH调pH到12.4 (用pH计调准), 室温下慢慢搅拌30分钟, 再加2M Tris-HCl (pH7.0), 调溶液pH为8.5, 此时溶液粘性消失, 如果溶液仍然粘, 则重复上述变性—复性步骤。

④将裂解液转移到250ml离心管中, 加5M NaCl至终浓度为1M, 缓慢倒置混合, 放冰浴至少4小时。

⑤离心沉淀染色体DNA, 蛋白质和细胞碎片10000rpm, 4℃20分钟 (日立高速离心机)。将上层液转移到一个新管中, 加入50% PEG6000至终浓度为10%, 缓慢混合, 放冰浴过夜。

⑥离心沉淀DNA, 7000rpm, 4℃, 15分钟。弃上清液, 将DNA悬浮在2.5ml TE缓冲液, 操作要温和, 避免大质粒断裂, 取0.2ml进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定质粒的存在。

⑦对其余2.3ml, 加入5.7ml TE缓冲液, 加8.6g氯化铯和0.5ml 溴化乙锭溶液110mg/ml, 缓慢混合后, 转移到离心管中, 用50Ti转子离心, 38000rpm, 15℃, 42小时。

⑧在紫外线下(366nm)下观察质粒DNA带, 用注射针头刺入, 吸出质粒DNA。

⑨用1倍体积饱和TE缓冲液的异丁醇连续抽提5次, 去除溴化乙锭, 再用2倍体积的TE缓冲液稀释质粒DNA, 加2倍体积的乙醇, 置-20℃过夜。

⑩离心收集DNA沉淀, 10000rpm, 20分钟。沉淀干燥后, 悬浮在0.5ml TE缓冲液, 转入1.5ml小离心管, 再加乙醇沉淀。1000

ml培养液大约得到50 μ gTi质粒DNA。

4. 快速分离少量质粒DNA的方法

(1) 碱抽提法

①取1个单菌落接种到5ml含适当抗生素的LB培养液里,37 $^{\circ}$ C培养过夜。

②离心收集菌体,1500 \times g,10分钟。

③细胞被悬浮在0.2ml溶菌酶溶液(50mM葡萄糖,10mM EDTA,25mM Tris—HCl,pH8.0,贮存在4 $^{\circ}$ C,临用前加入溶菌酶,浓度为5mg/ml),将菌液转移到1.5ml塑料离心管,冰浴5分钟。

④加0.4ml NaOH—SDS溶液(0.2N NaOH+1%SDS,此溶液应从10N NaOH和20%SDS贮备液配制)。混合,置冰浴5分钟,溶液变成半透明。

⑤加入0.3ml醋酸钾溶液(60ml 5M KAc,11.5ml HAc,28.5ml H₂O,pH4.8,放室温),混合后出现沉淀物,冰浴10分钟或-20 $^{\circ}$ C放5分钟。

⑥用小型台式离心机离心收集沉淀,~12000g

⑦小心吸出0.75ml上清液,转移到一个新的小离心管里,加入0.45ml异丙醇,混合。置-20 $^{\circ}$ C5分钟。

⑧转至室温后,离心5分钟收集DNA沉淀。

⑨除去上清液,用1ml 70%乙醇洗沉淀,离心2分钟。

⑩真空干燥DNA沉淀,加50 μ l TE缓冲液溶解质粒DNA,用2 μ l做限制性内切酶分析。

此方法适宜提取大肠杆菌、芽孢杆菌等质粒DNA。也可以扩大提取规模,从1升培养液中提取质粒。开始步骤是将细胞溶在20ml溶菌酶溶液中,而后相应按比例加入其它试剂。质粒DNA会含有部分RNA,电泳分析时,RNA会随同小分子量的DNA片段移动,故必要时需用RNase处理,经苯酚—氯仿抽提后,用乙醇沉淀DNA。

(2) Triton X-100裂解法

①离心5ml过夜培养物,8000rpm,5 $^{\circ}$ C,10分钟。

②将菌体悬浮于100 μ l 20%蔗糖溶液(制备在40mM Tris-HCl中, pH8.0), 再转移到1.5ml小离心管里, 冰浴5分钟。

③加入20 μ l浓度为10mg/ml的溶菌酶, 冰浴10分钟。

④加入10 μ l 0.5M EDTA, pH8.0, 0 $^{\circ}$ C 10分钟。

⑤加入100 μ l裂解液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 1% Triton X-100)。

⑥离心30,000g 30分钟, 4 $^{\circ}$ C。

⑦转移上清液到新管中, 加100 μ l H₂O和100 μ l 饱和10mM Tris(pH8.0)的苯酚, 混合, 离心3分钟。

⑧吸出水相加100 μ l 1M NaCl和100 μ l苯酚, 混合, 离心。

⑨吸出水相加1ml冷乙醇, 置-70 $^{\circ}$ C 5分钟。

⑩离心, 沉淀用70%冷乙醇洗2次。

⑪干燥后溶在50 μ l TE缓冲液里。

(3) 煮沸裂解法

①在含有适当抗生素的平皿上划线培养含质粒的菌株。

②用牙签刮部分细胞, 悬浮在50 μ l冷STET溶液里。混合, 置冰浴。

STET: 8%蔗糖, 5% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH8.0。

③加4 μ l新制备的溶菌酶(10mg/ml, 制备在水中)。

④将小离心管放在沸水中处理40—60秒。

⑤室温离心10分钟。

⑥用牙签挑出沉淀物, 保留上层液。

⑦加入40 μ l异丙醇。

⑧于-20 $^{\circ}$ C放5分钟。

⑨离心收集沉淀。

⑩弃上层液, 真空干燥沉淀后, 将其溶在15 μ l水里。

这种方法简便, 可以抽提一个菌落的质粒, 但质粒DNA会污染有染色体DNA。

悬浮细胞前应将离心管和STET溶液预冷。

5. 酵母质粒DNA的分离

①离心40ml酵母培养液(5×10^7 细胞/ml)。

②将菌体悬浮在40ml双蒸水中,洗涤、离心。

③将沉淀悬浮在20ml预处理缓冲液中,室温放10分钟,离心。

预处理缓冲液: 0.2M Tris-HCl, pH9.1, 1.2M山梨醇, 0.1M EDTA, 0.1M β -巯基乙醇

④细胞被悬浮在25ml SCE缓冲液中连续洗涤2次。SCE缓冲液: 1.0M山梨醇, 0.1M柠檬酸钠, pH 5.8, 60mM EDTA。

⑤加25ml SCE缓冲液悬浮细胞(细胞密度不超过 10^8 /ml), 加Zymolyase 60000 至终浓度100 μ g/ml。

⑥37 $^{\circ}$ C保温25分钟。

⑦离心5分钟, 收集原生质体。

⑧将原生质体缓慢悬浮在0.5ml ST缓冲液中。

ST缓冲液: 25%蔗糖, 50mM Tris-HCl, pH8.0。

⑨在磁力搅拌的同时滴入9.5ml裂解缓冲液, 搅拌1.5分钟。裂解缓冲液: 50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1%SDS, pH为12.45 (23 $^{\circ}$ C)。

⑩37 $^{\circ}$ C保温裂解液25分钟。

⑪通过搅拌加2M Tris-HCl(pH7.0)缓冲液, 将pH调至8.5—8.9。

⑫测量体积, 加入固体NaCl至终浓度为3% (w/v), 室温下保温30分钟。

⑬加入等体积NaCl饱和的苯酚, 搅拌混合2分钟。

⑭离心回收水相, 加入2倍体积95%冷乙醇。

⑮置-20 $^{\circ}$ C 2小时。

⑯离心收集沉淀(6500rpm, -5 $^{\circ}$ C, 30分钟)。

⑰用10ml 70%乙醇洗沉淀, 除去过多的盐, 离心, 真空干燥沉淀后, 将其溶在50 μ l TE缓冲液中, 放置4 $^{\circ}$ C。

6. 从质粒DNA中去除RNA

某些实验（如Bal 31 酶切或用多核苷酸激酶标记限制性内切酶水解如质粒DNA片段的5'末端），要求DNA制剂不带小分子RNA，尽管经氯化铯超离心制取的质粒DNA中污染物已很少，但还是有影响的。可用下列两种方法去除RNA。

(1) 1M NaCl离心法：

①测定DNA溶液的体积，加入0.1倍体积的3M NaAc (pH5.2)，加2倍体积的乙醇，混匀，放-20℃。

②离心收集DNA，弃乙醇，在真空干燥器中抽干DNA沉淀。

③将DNA沉淀溶于TE缓冲液，浓度至少为100μg/ml。

④加无DNase的RNase终浓度为10μg/ml，室温保温1小时。

⑤在适合的离心管中，加入用TE缓冲液配制的1M NaCl 4ml，在其上加1ml RNase处理过的质粒DNA溶液，如有必要，用TE充满离心管，离心40000 rpm，20℃6小时（Beckman SW50—1转子）。质粒DNA沉到管底，寡聚核苷酸仍留在上清液中。

⑥弃上清液，把质粒DNA重新溶于所需体积的TE中。

(2) Bio-GelA-150层析：

①按上述方法①—④步骤，用RNase处理质粒DNA。

②用等体积的苯酚抽提一次。

③Bio-GelA-150柱(1cm×10cm)用TE(pH8.0)和0.1%SDS溶液平衡后，加1ml质粒DNA溶液到柱上。

④用含0.1%SDS的TE缓冲液洗脱，以0.5ml分部收集。

⑤当收集到15管时，停止层析，每部分取10μl在0.7%琼脂糖凝胶电泳上分析，确定质粒DNA的位置。

⑥将含有质粒DNA的部分合并，按前述方法①—③步所述，用乙醇沉淀DNA。

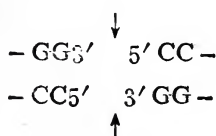
(四) 限制性内切酶和DNA连接酶的应用

细菌有限制和修饰系统，每个系统都有一种甲基化酶和一种限制性内切酶。甲基化酶识别一种特异的碱基顺序，甲基化该顺序中的腺嘌呤或胞嘧啶。相应的限制性内切酶识别这段相应的顺

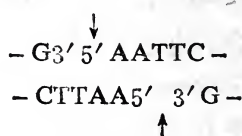
序, 当这个顺序未被甲基化酶甲基化时, 则切断 DNA 双链, 产生等摩尔 DNA 片段。限制和修饰系统可以在外源 DNA 的某些位点切断 DNA, 从而终止外源 DNA 的功能。

在限制和修饰系统中, 只有第二类限制性内切酶广泛应用在重组 DNA 技术中, 目前已从细菌中分离出 350 多种限制性内切酶, 至少识别 85 种不同的识别顺序。这些酶识别 4—6 碱基对的特异顺序, 切断双链 DNA 可产生 DNA 断头整齐的平末端或 DNA 断头互补的粘性末端。如,

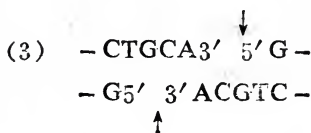
(1)



(2)



(3)



典型的限制性内切酶反应是使 DNA 和酶在含有 Mg^{2+} 和 Na^+ , pH 接近 7.5 的缓冲液中反应。一般的反应条件见表 18。

在实际操作中, 应特别注意影响限制酶活性的一些因素, 它们包括: ① 限制性内切酶的反应条件和贮存要遵守厂商的说明, 有些酶要求特异的反应条件, pH 或离子强度的改变会严重影响酶的活性。② 应用酶级试剂并用双蒸水配制。③ 一些试剂, 像乙醇、甘油、苯酚、二甲基亚砷会改变某些酶的裂解特异性, 尤其对 Bam HI, Eco RI, Kpn I, Sau 3A, Sal I, Hba I, Pst I, Dde I。在酶的贮存液中通常含有 50% 甘油, 以防止低温贮存时冻结, 但在最终酶反应液中, 甘油浓度不要超过 4%。④ 在建立酶反应时, 不要认为延长反应时间, 可以减少加入的酶量。⑤ 酶和 DNA 可以吸附在管壁上, 最好应用硅化管并在酶介中加入小牛血清蛋白或明胶。⑥ 避免重复冷冻和融化 DNA。⑦ 加入 DNA 应不明显改变反应液的

表18

限制性内切酶的一般反应条件

| 条 件 | 反 应 类 型 | |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 分 析 | 制 备 |
| 体 积 | 20—100 μ l | 0.5—5ml |
| DNA | 0.1—10 μ g | 10—500 μ g |
| 酶 | 1—5u/ μ g DNA | 1—5u/ μ g DNA |
| Tris-HCl(pH7.5) | 20—50mM | 50mM |
| MgCl ₂ | 5—10mM | 10mM |
| 2巯基乙醇 | 5—10mM | 5—10mM |
| 小牛血清蛋白 | 50—500 μ g/ml | 200—500 μ g/ml |
| 甘 油 | <4%(v/v) | <4%(v/v) |
| NaCl | 按需要 | 按需要 |
| 时 间 | 1小时 | 1—5小时 |
| 温 度 | 37 $^{\circ}$ C | 37 $^{\circ}$ C |

pH和盐浓度。⑧避免重金属离子污染DNA,重金属可抑制酶活性。

限制性内切酶的选择依赖于DNA分子上裂解位点的存在和位置。一些内切酶不适用,是因为它们在所要克隆的基因之内或载体并不含有这种裂解位点。如果尚不清楚所要克隆基因的酶切性质,应优先选择应用那些识别6个碱基顺序的内切酶,而不先用识别4个碱基顺序的内切酶。因为根据计算推测,每4096个碱基对有一个6核苷酸识别顺序,每256个碱基对有一个4核苷酸识别顺序。由于T4DNA连接酶连接平末端效率低,可优先使用产生粘性末端的内切酶。连接时如果DNA末端GC量高并有较长的单链伸展,比末端AT量高、单链伸展较短的DNA片段更有效。

分子克隆实验中的一个麻烦问题是连接时载体的自身环化,由于没有外源DNA片段插入,它们的转化效率更高。因此采取一些手段提高克隆效率十分重要,这里简述三种方法。

①质粒经内切酶消化后,用碱性磷酸酶除去5'-末端的磷酸基。去磷酸基的5'-末端DNA不能用T4DNA连接酶连接,而且线性质粒分子转化效率很低。只有外源DNA片段磷酸化的5'-末端

才能和质粒的3'-羟基末端连接，形成带有缺口的环状质粒，当这种质粒转化宿主细胞后，体内修复缺口构成带有外源插入的环状质粒分子。

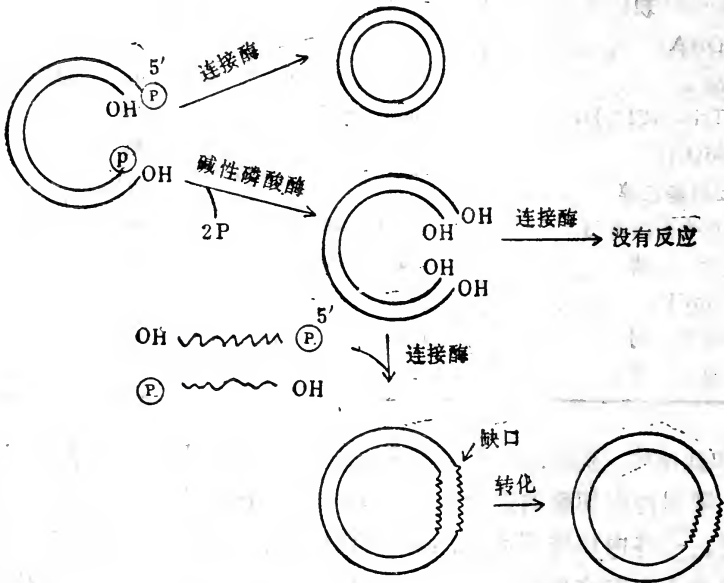


图6-1 用碱性磷酸酶阻止载体质粒自身环化的示意图

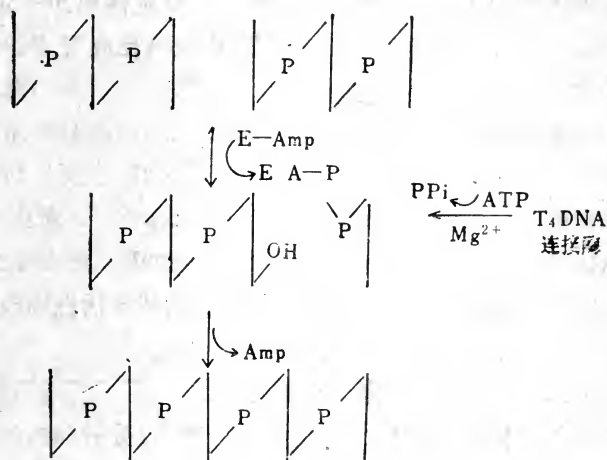
②用两种限制性内切酶分别处理载体和外源DNA，要求这两种酶识别不同的顺序，但可产生相同的单链末端。如质粒用BamHI裂解，外源DNA用BclI裂解，前者识别GGATCC，产生GATC单链末端，后者识别TGATCA也产生GATC单链末端。连接酶连接两种DNA片段形成一个杂交顺序，这个顺序再不为BamHI或BclI所识别。如果连接后的混合液再用BamHI处理，则可裂解自身环化的质粒分子，从而提高克隆效率。如要从质粒中切出插入的DNA片段，那末可用Sau3A1处理，它识别GATC顺序。

③应用末端脱氧核苷酸转移酶在DNA分子的3'-羟基末端加上一个同聚核苷酸的尾巴。如将polydG加在载体的3'-末端，将

polydc加在外源DNA的3'-末端，那末在连接时载体只能和外源DNA环化。选择适宜的多聚末端和内切酶，可以重建限制性内切酶切点。如对Pst1裂解的DNA加上 PolydG，则可恢复Pst1切点。

T4DNA连接酶不能连接具有不同单链伸展的DNA分子，或一头为单链伸展，一头是平末端的DNA分子，这些末端可以通过填充或删除单链尾巴建立平末端后再用连接酶连接。5'末端可用T4DNA聚合酶或DNA聚合酶I的Klenow片段和脱氧核苷三磷酸来填充，伸出的3'-末端可用特异的单链外切酶或内切酶除去。

T4DNA连接酶是T4噬菌体基因30的产物。它催化的连接反应要求ATP作为能源，可连接粘性末端或平末端DNA片段。反应机制分三步：①ATP中的AMP转移到酶分子中一个赖氨酸的E-NH₂上；②AMP从酶转移到DNA5'-末端磷酸上；③DNA的3'-OH和AMP-5'-P末端间形成一个磷酸二酯键，并释放出AMP。



虽然T4DNA连接酶的最适反应温度是37℃，但为使粘性末端配对更稳定，一般连接粘性末端反应是在10—16℃。ATP浓度为5mM时，会完全抑制平末端DNA的连接反应。为7.5mM时，则完全抑制粘性末端DNA的连接反应，连接反应的最适ATP浓度是0.6mM。

大肠杆菌DNA连接酶可选择性地连接粘性末端DNA分子,而不连接平末端DNA,不过反应需要 NAD^+ 催化。

有关连接反应的详细理论,请读者参见Maniatis等(1982)的叙述。一般地讲,相对于载体分子,要用过量的DNA片段,以便载体DNA优先同要克隆的片段形成分子间的连接。

附: DNA的限制性内切酶消化和连接

酶消化DNA反应一般用0.2—1 μg DNA,反应体积20—50 μl 或更小。每 μg DNA大约用1单位限制酶消化(通常把一个单位的酶定义为在一定反应条件下,保温1小时,完全消化1 μg pBR322或 λ DNA所需要的酶量)。这里例举的反应仅说明一般的操作程序,在实际研究中,使用的材料不同,目的不同,连接的DNA浓度、温度、时间等也不相同)。

①用合适的限制性内切酶分别消化质粒载体和插入DNA。依次将下列溶液加入1.5ml塑料离心管中,反应体积20—50 μl 。

| | 载体反应管 | 插入DNA反应管 |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| H_2O | $\times \mu\text{l}$ | $\times \mu\text{l}$ |
| 10 \times 缓冲液 | 5 μl | 5 μl |
| DNA | $\times \mu\text{l}$ | $\times \mu\text{l}$ |
| 内切酶 | $\times \mu\text{l}$ | $\times \mu\text{l}$ |
| 总体积 | 50 μl | 50 μl |

H_2O 、DNA和酶量随DNA浓度和内切酶的特异活性而改变。

②于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温1小时。

③于70 $^{\circ}\text{C}$ 热处理5分钟,使酶失活。

④加入等体积的氯仿,振荡混合,离心1分钟(42,000g)。

⑤将载体管和插入DNA管的水相合并在一个新的离心管中,加入1/10体积的3MNaAc。

⑥加2.5倍体积的乙醇,混合,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 10分钟。

⑦离心5分钟。真空干燥DNA沉淀。

⑧将DNA沉淀溶解在50 μl 1 \times 连接缓冲液中。10 \times 连接缓冲液(-ATP)

660mM Tris—HCl, pH7.5

66mM MgCl₂

100mM DTT

应用前取10 μ l 0.1MATP加入90 μ l 10 \times 连接缓冲液,再稀释10倍。制备0.1MATP时,用KOH中和pH至7.0。

⑨取出1—2 μ l作为未连接的对照。

⑩加入1 μ l T₄DNA连接酶(5—10单位),缓慢混合。

⑪保温在12 $^{\circ}$ C, 6—18小时,或4 $^{\circ}$ C 1—2天。

⑫取出1—2 μ l连接液连同上述对照液,用0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定连接情况。

⑬用1—5 μ l连接液转化感受态细胞。如果转化体不多,可用等体积的乙醚抽提连接液。离心后残留的乙醚以减压除掉。

(五)DNA的凝胶电泳

凝胶电泳技术已成为研究DNA分子的有力工具,这种方法的特点是迅速准确、省钱省时,需DNA量少。按分子量大小和构型,凝胶电泳可迅速地将各种DNA包括质粒DNA和DNA片段分离,并可以测定完整质粒和DNA片段的分子量。

DNA电泳可在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上进行,它们分离DNA的大小范围见表19与20中数据。

表19 琼脂糖凝胶分离DNA大小范围

| 凝胶中琼脂糖量(%) | 分离线性DNA大小范围(kb) |
|------------|-----------------|
| 0.3 | 60—5 |
| 0.6 | 21—1 |
| 0.7 | 10—0.8 |
| 0.9 | 7—0.5 |
| 1.2 | 6—0.4 |
| 1.5 | 4—0.2 |
| 2.0 | 3—0.1 |

表20

聚丙烯酰胺凝胶分离DNA大小范围

| 凝胶中丙烯酰胺量 (%) | 分离DNA大小范围(核苷酸数) |
|--------------|-----------------|
| 3.5 | 100—1000 |
| 5.0 | 80—500 |
| 8.0 | 60—400 |
| 12.0 | 40—200 |
| 20.0 | 10—100 |

琼脂糖是一种天然多糖,是以1,3- β 半乳糖苷键连接而成的二糖聚合物,键间H键形成交换。当DNA电泳时,DNA分子被迫通过网孔走向阳极,分子移动的速率决定于:DNA分子量、DNA的构型(环状闭合、开环、线性)、凝胶孔的大小(即琼脂糖的浓度)、电泳梯度和电泳缓冲液。方法的一般指导是:

- ①分离较小的DNA片段,应用较高的电压。
- ②分离高分子量的DNA,应用较低的电压,分辨力更好。
- ③小孔凝胶(0.7—1%琼脂糖)分离DNA小片段,直至分子量 10×10^6 。
- ④大分子DNA($15—40 \times 10^6$)常用0.3—0.5%低浓度琼脂糖凝胶。

⑤限制性内切酶裂解的DNA,通常用Tris-HAc缓冲液。

⑥分离部分提纯的质粒DNA可以用Tris-HAc或Tris- H_3BO_3 缓冲液(依赖于质粒的大小,小于20kb用Tris-HAc缓冲液)。

琼脂糖的浓度范围在0.3—2%,可用垂直板和水平板。当凝胶浓度低于0.8%时,用水平板更方便和稳定。用垂直板会得到更窄的带。做胶时先将琼脂糖悬浮在电泳缓冲液里,煮沸至溶液变得均一清亮。当琼脂糖溶液冷到50—60℃时制板。为了增加样品的密度,样品含有甘油或蔗糖(浓度为5—10%),加入5—10%Ficoll可避免形成U形带,加染料作为可见标志,通常用溴酚蓝,浓度为0.025%。用溴化乙锭染色凝胶可观察DNA带,染色的灵敏度决定于DNA量和片段的大小。染色方法可采用将溴化乙锭加在凝胶和缓冲液里同时电泳(对DNA移动度稍有影响),或停止电泳后,

将凝胶浸在0.5 μ g/ml的溴化乙锭溶液中，染色30—60分钟，而后用蒸馏水脱色，在紫外线下观察DNA带。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可分析6—1000对碱基的DNA片段。凝胶厚度一般为1mm。电泳装置和制凝胶板的方法与蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。贮存液的成份为

- A. 40% 丙烯酰胺
- B. 2% 双体丙烯酰胺
- C. 0.9M Tris-H₃BO₃缓冲液，含25mMEDTA (pH8.3)
- D. 四甲基乙二胺
- E. 10% 过硫酸胺 (新配制的)

不同孔径的凝胶是依据所用丙烯酰胺的量，改变B液也可改变孔径，但同时会影响胶的韧性和透明度。凝胶的制备见表21

表21 聚丙烯酰胺凝胶的制备

| 贮存液(ml) | 凝胶浓度% | | |
|---------|-------|-------|-------|
| | 5 | 12 | 20 |
| A | 12.5 | 30 | 50 |
| B | 12.5 | 20 | 3.3 |
| C | 10 | 10 | 10 |
| D | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| E | 1 | 1 | 1 |
| 蒸馏水 | 63.95 | 38.95 | 35.65 |

总体积为100ml

典型的非变性聚丙烯酰胺凝胶是12%丙烯酰胺，0.4%双丙烯酰胺，用于分离40—200核苷酸片段，电泳在10V/cm，18小时。

当应用低浓度的聚丙烯酰胺凝胶时，凝胶会很软，需要加入0.5%琼脂糖增加强度。

DNA分子在凝胶上的移动度在一定范围内是分子量的函数，分子量愈大，移动愈缓慢，因此利用琼脂糖凝胶电泳相对于标准

DNA的移动度,可测定DNA分子的相对分子量。通常用照片来测定移动距离,精确的方法是用微量密度计扫描照片,也可用放大的照片来测量,测量从样品到每条带顶的距离,并计算相对移动率。分子量的log值对相对移动度画一条曲线,即得到标准曲线。在一定范围内有线性关系,然而太大的DNA分子的移动度不再依赖于其分子大小,以致不再有线性关系。

电泳测定限制性内切酶消化后的DNA片段分子量,可用EcoRI消化的 λ DNA片段,HindIII消化的 λ DNA片段或EcoRI/HindIII双消化的 λ DNA片段作为电泳标准,计算分子大小。

表22 λ -DNA的限制性酶切片段大小(按碱基对计)

| EcoRI | HindIII | EcoRI/HindIII |
|-----------|-----------|---------------|
| 1. 21,800 | 1. 23,700 | 1. 21,800 |
| 2. 7,540 | 2. 9,400 | 2. 5,240 |
| 3. 5,930 | 3. 6,660 | 3. 5,050 |
| 4. 5,540 | 4. 4,230 | 4. 4,210 |
| 5. 4,800 | 5. 2,250 | 5. 3,380 |
| 6. 3,380 | 6. 1,960 | 6. 1,960 |
| | 7. 590 | 7. 1,910 |
| | 8. 100 | 8. 1,620 |
| | | 9. 1,320 |
| | | 10. 930 |
| | | 11. 880 |
| | | 12. 590 |
| | | 13. 100 |

1. 大量筛选含质粒细菌的方法

下述三种方法适于筛选含质粒的细菌,也可用于分子量测定。但前两种方法与第三种方法比有相当大的缺点。SDS裂解法简单,迅速,由于这种方法是严重的剪切染色体DNA,所以大质粒DNA同样会受到损伤,故这种方法不适于检测大于 50×10^6 的质粒或低拷贝数的小质粒。第二种方法操作比较温和,可筛选分子量达300

$\times 10^6$ 的大质粒，但步骤多，费时间。第三种方法既迅速又简单，能使质粒保持完整，并形成很细的DNA带，染色体DNA仍停留在槽孔中。三种方法不仅可用于E. coli，只要稍加改变还可适用于其它菌。

(1) SDS裂解法：

①取一个大菌落悬浮在100 μ l含20%蔗糖的TES液中。TES：

0.005M EDTA

0.05M Tris

0.05M NaCl, pH3.0

②加100 μ l溶菌酶 (5mg/ml) 室温5分钟。

③加100 μ l 0.25MEDTA，室温5分钟。

④加100 μ l 2.5% SDS。

⑤加100 μ l缓冲液饱和的苯酚。

⑥使溶液反复通过针筒的细针头数次。

⑦离心

⑧取20—50 μ l悬液进行琼脂糖凝胶电泳。

(2) 筛选大质粒的方法：

①离心收集4ml对数期细胞液。

②悬浮菌体在150 μ l蔗糖液中 (25%蔗糖溶在0.05M Tris, pH8.0)。

③加100 μ l溶菌酶 (5mg/ml溶在0.25M Tris, pH8.0) 反复倒置离心管混合，冰浴5分钟。

④加200 μ l EDTA (0.25M pH8.0) 倒置混合，冰浴5分钟。

⑤加250 μ l SDS (20%溶于TE缓冲液)，于70℃热处理5分钟。

⑥加3M NaOH，使pH为12.1—12.3，重复倒置2—3分钟。

⑦再加入pH7.0的2M Tris，降低pH到8.5—9.0。

⑧加入250 μ l冷的NaCl，充分混合，冰浴4小时或更长。

⑨离心，将上层液转移到新管中 (测体积)。

⑩加1/3体积的PEG 6,000 (42%PEG溶在0.01M磷酸钠缓冲液中，pH7.0)。

①缓慢混合，置冰浴4小时或更长。

②离心，5000rpm，4℃，10分钟。

③将沉淀溶在50—100 μ l 10%蔗糖和溴酚蓝溶液中，取10—40 μ l加在0.7—0.9%琼脂糖凝胶上，电泳用Tris—H₃BO₃缓冲液，10v/cm，4小时。

(?) Eckhardt凝胶电泳法：

试剂：

A. TBE缓冲液：89mM Tris，89mM H₃BO₃，2.5mM Na₂—EDTA，pH8.2

B. RNase溶液：2.5mg/ml RNase溶在TENG缓冲液（50mM Tris，pH7.5，1mMEDTA，50mM NaCl，5%甘油）中，90℃保温20分钟。

C. TE8：0.05M Tris，pH8.0，0.02M EDTA。

D. 溶菌酶液：对革兰氏阴性菌溶液制备在TBE中，含溶菌酶7,500 μ g/ml，RNase 0.3 μ g/ml、0.05%溴酚蓝和20%Ficoll40,000。对革兰氏阳性菌除含溶菌酶75,00 μ g/ml外，其它成份相同。

E. SDS溶液：对革兰氏阴性菌为含0.2% SDS，5%Ficoll的TBE溶液。对革兰氏阳性菌为含2% SDS，5%Ficoll的TBE溶液。

F. Ficoll溶液：制备含20%Ficoll40,000的TBE溶液。

操作：

①培养5ml生长至对数中期或静止期早期的培养液。

②调整细胞浓度约为 3×10^8 /ml。

③离心1ml菌液，用0.5ml含有0.1% Sarkosyl的TE8液洗菌。

④将细胞悬浮在50 μ l 20%Ficoll中。

⑤预先制备一个垂直型的琼脂糖凝胶板（0.7—1.10%琼脂糖，用TBE制备，3mm厚），在每个样品槽孔底部加2mm高的溶菌酶液。

⑥再加10 μ l细胞液，同溶菌酶液混匀，静置5分钟。

⑦加盖SDS溶液100 μ l，不要同溶菌酶液混合。

⑧再将熔化的琼脂糖加在SDS溶液之上，封住槽孔。

⑨加电泳缓冲液，接通电源，电泳在 $0.4\text{V}/\text{cm}$ ，1小时。

⑩增加电压到 $5\text{V}/\text{cm}$ ，继续电泳几小时。

⑪取出凝胶，染色30分钟后观察质粒DNA带。

2. 限制性内切酶消化和DNA的凝胶电泳

(1) 酶切DNA

①把下列溶液依次加入 1.5ml 离心管中

蒸馏水 直到 $25\mu\text{l}$

$10\times$ 缓冲液 $2.5\mu\text{l}$

DNA(直至 $1\mu\text{g}$) $2.0\mu\text{l}$

内切酶($1-2\text{u}/\mu\text{gDNA}$) $x\mu\text{l}$

总体积 $20\mu\text{l}$

②混合后， 37°C 保温1小时。

③ 70°C 处理10分钟，放冰浴。

(2) 琼脂糖凝胶电泳(参考第四章第一节)

①用 $20\times$ EB贮存液制备足够量的电泳缓冲液EB。

$20\times$ EB: 800mM Tris, 40mM Na_2EDTA , 400mM NaAc。

搅拌溶解 96.6g Tris, 15.38g Na_2EDTA , 53.43g NaAc, 用HAc调pH至 7.9 ，加水到 1000ml ，灭菌后放室温。

②用EB缓冲液制备 0.7% 琼脂糖凝胶溶液，煮沸熔化后冷却到 50°C ，倒入电泳槽制凝胶板。

③在小离心管里混合下列溶液： $2.5\mu\text{l}$ DNA消化液， $5\mu\text{l}$ 加样液(20% Ficol1和 0.05% 溴酚兰)，和 $10-15\mu\text{l}$ EB液，终体积为 $20-25\mu\text{l}$ 。

④加样，包括已知大小的DNA片段作为分子量标准。

⑤接通电源，DNA移向正极，电压不超过 $5\text{V}/\text{cm}$ 。

⑥用溴化乙锭染色，蒸馏水脱色后，在紫外灯下观察，照像。

(3) DNA片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳:

①为制备 50ml 丙烯酰胺溶液，混合下列溶液， 5ml $10\times$ TBE缓冲液， 7.5ml 6% 丙烯酰胺贮存液， 37.5ml 水， 0.5ml 10% 过硫酸铵(新配制的)， $50\mu\text{l}$ 四甲基乙二胺。

10×TBE: 500mM Tris, 500mM H_3BO_3 , 25mM Na_2EDTA , 即称量60.55g Tris, 30.90g 硼酸, 9.3g Na_2EDTA 加水搅拌溶解成1000ml, 放室温。

丙烯酰胺贮存液: 40g 丙烯酰胺和1.3g 双体丙烯酰胺, 溶于水制成100ml, 存放在4℃。

②将凝胶溶液倒入电泳装置, 制成凝胶板。按上述配方, 应在5—10分钟聚合。

②加样后电泳, DNA移向正极, 电泳缓冲液是1×TBE, 电压为1V/cm和8V/cm之间。

④染色凝胶, 观察照像。

(4) 限制性酶切DNA片段的分子量测定

①1μg质粒DNA和1单位内切酶同适宜的酶切缓冲液混合。终体积为20—25μl。

②按推荐的温度保温60分钟。

③于70℃处理样品5分钟, 停止反应。

④向样品加入1/10体积的50%甘油和0.25%溴酚兰溶液。

⑤样品和作为分子量标准的酶切入DNA片段(用前在70℃处理10分钟后迅速冰冷), 同时电泳在Tris—HAC缓冲液系统中。

⑥染色凝胶并照像, 而后按前述方法测定分子量。

3. 从琼脂糖凝胶上回收DNA

(1) 低熔点琼脂糖凝胶法

①将DNA样品电泳在低熔点琼脂糖凝胶上, 电泳后用刀片把含有所要回收的DNA带从凝胶上切下来, 放入1.5ml的离心管里。

②加1倍体积的TE缓冲液(需浸没凝胶, 否则再加入1倍体积的TE缓冲液)。

③置65℃保温10分钟, 凝胶熔化成均一液体。

④加入3倍体积TE饱和的苯酚(预热到37℃), 振荡混合, 离心10分钟。

⑤吸出上层缓冲液, 对剩余部分再加入3倍体积的苯酚, 振荡混合, 离心10分钟。

⑥用乙醚抽提上述缓冲液2次。

⑦加入1/10倍体积的3M NaAc, 加2倍体积的冷乙醇, 放-20℃过夜。

⑧离心15分钟, 沉淀DNA。

⑨使DNA干燥后, 悬浮在无菌水中, 终浓度为100μg/ml。

(2) 电洗脱法

①停止电泳后, 用刀片切下一条凝胶染色, 在uv线下观察, 与未染色的凝胶相配, 确定所需回收的DNA条带; 用刀片切下来, 转移到透析袋中, 加入无菌的TE缓冲液(10mM Tris, 1mM EDTA)。

②在一个电泳槽中, 放入浅层电泳缓冲液, 将封口的透析袋以平行电极方向放入槽中。

③于100V, 电泳2—3小时, DNA移出凝胶, 入缓冲液。

④逆向电泳30秒, 以使附着在透析袋上的DNA反向进入缓冲液。

⑤打开透析袋, 小心吸出袋中的所有缓冲液, 再用少量缓冲液洗袋。

⑥用溴化乙锭染色袋中的凝胶条, 在uv线下检查是否DNA全被洗脱。

⑦用苯酚-氯仿抽提DNA。

⑧加乙醇沉淀DNA。

⑨将DNA溶解在少量无菌水中, 终浓度为100μg/ml。

(3) 冷冻抽提法:

①用刀片切出含所需DNA的凝胶条, 切成小块后, 分配到1.5ml小离心管中, 加入200μl苯酚。

②振荡混合样品, 置低温冷冻。

③离心, 12,000xg, 15分钟, 使凝胶沉淀。

④吸出顶部水相, 这种从凝胶中排出的缓冲液含有要回收的DNA。

⑤加入200μl TE缓冲液到管中, 振荡混合后离心, 吸出水相

同④步水相合并。

⑥用等体积的苯酚抽提2次。

⑦乙醇沉淀DNA。

4. 制备琼脂糖凝胶电泳

①制备一个具有单加样槽的琼脂糖凝胶。

琼脂糖浓度：一般应用0.8%—1.4%琼脂糖，决定于所要分离DNA片段的大小，DNA带分开的程度和所分离的DNA量。为了减少DNA带拖尾，通常选择高百分比琼脂糖，尤其分离大量DNA的时候。但从低浓度琼脂糖凝胶上容易抽提大的DNA片段。分离2.5kb片段，通常用1%琼脂糖凝胶，分离500bp的片段用1.4%的琼脂糖凝胶。

凝胶大小：电泳距离愈长，分离效果愈好。通常玻璃板长15cm，宽10—12cm。分离50μg左右的DNA，胶厚1.5mm，分离100μg以上DNA为4mm。

②DNA同染料-甘油液混合，小心地加在样品槽的底部，不可造成DNA染料液同电泳缓冲液混合。

③电泳时间是所要分离的DNA片段大小、凝胶长度、浓度、厚度和所用电压的函数。典型条件是：

a. 2.5kb DNA片段，1.1%琼脂糖，板长15cm，1.5mm厚，150V (30—40mA)，3小时。

b. 500bp DNA片段，1.4%琼脂糖，板长15cm，4mm厚，80V (40—50mA)，4小时。

④DNA片段的定位

a. 用切片刀在凝胶顶部作标记。
b. 从凝胶两边各切下一窄条凝胶，放在4mg/ml溴化乙锭溶液中染色2分钟，而后水洗脱色。在紫外灯下观察凝胶DNA带，并确定所需DNA片段的位置。

c. 从胶上切出所需要的DNA区域。

⑤在一干净的玻璃板上，尽可能的将凝胶切碎，随时用DNA抽提液润湿凝胶。

⑥将切碎的琼脂糖胶块放入一个4ml离心管里,(可用几个管),加2—3ml DNA抽提液。

DNA抽提液:

NH_4Ac 3.86g (0.5M)

$\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 0.214g(10mM)

Na_2EDTA 3.72g (0.1mM)

SDS 0.1g (0.1%)

加 ddH_2O 至100ml

NH_4Ac 不稳定,需将干燥固体放冰箱里。用新配制的缓冲液。

⑦用无菌玻璃棒将凝胶碎片悬浮在缓冲液中并再次搞碎。

⑧封盖离心管,置65℃保温8—12小时,DNA将扩散到抽提液中。

⑨离心(如Beckman sw50.1转子,30,000rpm,30分钟,20℃),移出水相。

⑩将沉淀的琼脂糖胶悬浮在3.5ml DNA抽提液中,65℃保温1—2小时,同上离心。

⑪合并DNA溶液,加入2倍体积的95%冷乙醇,于-20℃放置至少1小时。

⑫离心收集DNA沉淀,6,500rpm,5℃1小时。

⑬将DNA悬浮在0.5—1ml无菌双蒸馏水中,对双蒸馏水透析12—24小时(室温),以除去盐和SDS。

⑭把DNA转移到一个1.5ml离心管里,离心2分钟,吸出上清液,再加入0.2ml双蒸水,离心,合并2次上清液。

⑮加入0.1体积2M NaCl,加2倍体积95%冷乙醇沉淀DNA,最终将DNA溶在100 μl TE缓冲液中。

5. Southern印迹转移

DNA可从琼脂糖凝胶上转移到硝酸纤维素滤膜上或有化学活性的滤纸上(DBM滤纸),而后滤膜可用放射性标记DNA或DNA探针杂交,用放射自显影法显出图象。

①整个操作过程中都需带手套。DNA在琼脂糖凝胶上电泳以后，用溴化乙锭（ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）染凝胶，在uv线下照像。

②用切片切去凝胶边缘，使凝胶边缘整齐，并切去凝胶板的一角，以标记凝胶的方位。

③将凝胶放在一个玻璃盘或搪瓷盘内，加入500ml 0.25M HCl溶液（取21ml浓HCl加水至1000ml），每隔几分钟摇动盘子，浸泡15分钟后，重复用水洗。

④加入500ml 0.5M NaOH，1M NaCl变性缓冲液（即称取20g NaOH和58.44g NaCl加水至1升），浸泡15分钟后，重复用水洗。

⑤加入500ml 1M Tris—HCl（pH8.0），0.6M NaCl中和缓冲液（即称取121g Tris，34.8g NaCl，55ml浓HCl，加水至1000ml，用NaOH调pH为8.0），浸泡30分钟，而后用水重复洗涤凝胶。

⑥取一个搪瓷盘，加满 $20\times\text{SSC}$ （ SSC ：0.15M NaCl，0.015M Na-citrate pH7.0），把一个玻璃板架在瓷盘上，玻璃板要比凝胶大一点。在玻璃板上铺上5—6层浸湿的国产滤纸（或2层Whatman 3mm滤纸），不能有气泡出现。

⑦把凝胶小心铺在滤纸上，防止产生气泡。把相当于凝胶厚度的塑料条或玻璃条放在凝胶的四周，与凝胶相距2毫米。见图示。

⑧清除凝胶表面过量的液体。

⑨裁取一块硝酸纤维素滤膜，比凝胶长和宽都大1厘米，用 $20\times\text{SSC}$ 浸泡，干30秒后平铺在凝胶上，不得有气泡。（保持滤膜清洁十分重要，铺滤膜时要使用镊子和带手套，一旦铺在凝胶上就不要再改变纸的位置，否则要更换滤膜）。

⑩取两块与硝酸纤维素滤膜同样大小的滤纸（如Whatman 3MM或几层国产滤纸），在 $20\times\text{SSC}$ 中浸泡一下，铺在硝酸纤维素滤膜上，避免出现气泡。

⑪在滤纸上放上10cm厚的普通卫生纸，其大小要比滤纸稍小。再在纸上放一块玻璃板，并用500g的重物压在玻璃板上。

⑫室温转移12—24小时,转移的速率决定于DNA的大小和凝胶的浓度。在0.8%琼脂糖凝胶上转移小片段DNA (<1000bp) 需1—2小时,而转移大于15kb的DNA片段要15小时或更长时间,随着卫生纸变湿,要更换新的卫生纸。

⑬转移完毕后,去掉卫生纸和滤纸,用圆珠笔或软心铅笔标出凝胶和硝酸纤维素滤膜的方位。

⑭小心刮起硝酸纤维素滤膜,用 $2 \times \text{SSC}$ 充分漂洗,洗去它上面的任何琼脂糖凝胶。凝胶可重新用溴化乙锭染色,在uv线下观察转移是否完全。

⑮滤膜被清洗后,放在两层厚滤纸之间,吸干水溶液。

⑯再把滤膜放在两层新滤纸之间,置真空炉中, 80°C 2小时。如果不立刻用于杂交,可将硝酸纤维素滤膜密封在塑料袋中。

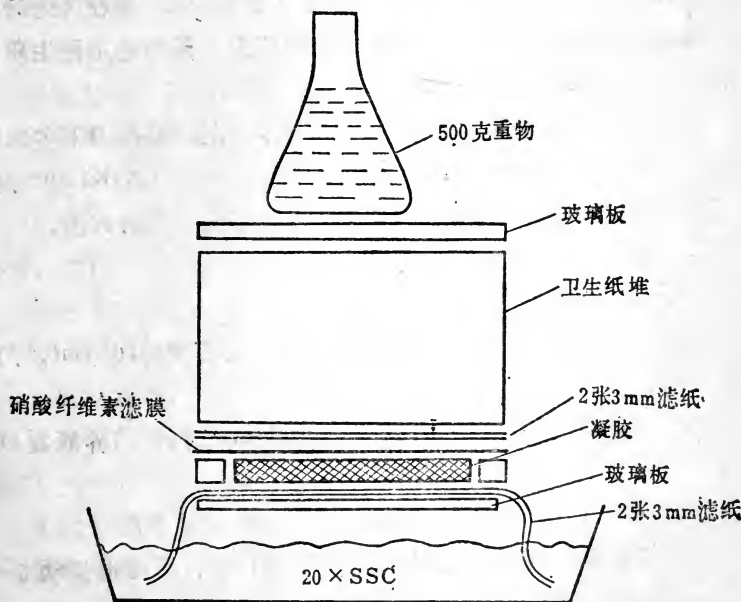


图6-2 Southern印迹转移图示

(六) 质粒的转化

在一些天然转化系统里，细菌需要进入一种称作感受态的生长时期，细胞才能摄入DNA。感受态细胞能够结合DNA，使DNA抵抗核酸酶的作用。这些功能是通过一些结合DNA的蛋白质完成的。进入细胞的DNA通过重组和基因表达，产生转化体。大肠杆菌没有天然的转化机制，但用氯化钙处理细胞，可以人工诱导感受态。在低温条件下用氯化钙处理的细胞会膨大，形成一种能抗DNase的复合物，当在42℃热击细胞时，DNA进入细胞，环状质粒DNA的转化频率要比线性质粒分子高10—100倍。由于受体存在着限制和修饰系统，以及为避免质粒与染色体同源部分重组，一般受体为缺失限制修饰系统和重组缺陷的菌株。

为了提高枯草杆菌的质粒转化频率，发展了原生质体转化方法。它包括在PEG诱导下，原生质体摄入质粒DNA和在再生培养基上细菌细胞壁的再生。缺少感受态的芽孢杆菌都可用原生质体转化方法。

酵母细胞也可用酶处理形成原生质体，在PEG作用下实现质粒转化，经再生细胞壁得到转化体。最近木村光(A·Kimura)报告了用阳离子处理酵母细胞，质粒可转化完整细胞的方法。

1. 大肠杆菌的质粒转化(I)

感受态细胞的制备和冷冻贮存

①用前培养液接种50ml LB培养液，细胞密度约 10^7 /ml，37℃振荡培养。

②当培养液的 $OD_{550} = 0.5$ ($\sim 5 \times 10^8$ /ml)时，将培养液置4℃冷却。

③4℃离心，8000rpm，8分钟(日立20—2转子)

④将细胞悬浮在20ml冰冷的0.1M CaCl₂中，缓慢地搅动5—10分钟，离心。

⑤再将沉淀悬浮在20ml冰冷的0.1M CaCl₂中，冰浴保持20分钟后，离心。

⑥把细胞重新悬浮在2ml 0.1M CaCl_2 , 15% 甘油液里, 此时可将细胞液按0.2ml分成若干小管, 贮存在 -70°C 或 -80°C 。每次转化时, 取出小管置冰浴融化。

转化过程:

- ①取100 μl 感受态细胞加10 μl DNA溶液, 缓慢混合。
- ②冰浴10分钟后, 转到 37°C 5分钟。
- ③加入2ml LB培养液, 于 37°C 振荡培养1小时。
- ④将100 μl 培养液涂布在适当的选择培养基上, 37°C , 保温过夜。

2. 大肠杆菌的质粒转化(II)

①将E. coli HB101接种到25ml N培养液中, 培养至对数期。

N培养液成分 (1000ml)

蛋白胨10g, 酵母膏1g, NaCl 8g

葡萄糖1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, pH7.0。

- ②将细胞培养液离心, 3000rpm, 5分钟, $2-4^\circ\text{C}$ 。
- ③将细胞重新悬浮在2.5ml 50mM CaCl_2 中, 离心。
- ④重新悬浮细胞沉淀在1.25ml 150mM CaCl_2 中, 冰浴静置3小时。

⑤取100 μl 上述细胞液与100 μl 转化缓冲液混合, 加入10 μl DNA, 置冰浴30分钟。

转化缓冲液:

10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

10% 甲酰胺, 10mM MgCl_2 , 10mM NaCl 。

⑥从 0°C 移入 42°C 水浴处理40秒, 立即加0.8ml N培养液 (预先 37°C 预热)。

⑦ 37°C 轻微振荡90分钟。

⑧将细胞涂布在含有不同抗生素的选择培养基上。

⑨ 37°C 保温24小时。

3. 枯草杆菌的质粒转化

①用0.5ml过夜培养液接种50ml SPI培养基, 37°C 强力振荡

培养。

SPI 培养基: SPI 盐液 100ml, 葡萄糖 1ml (50%), CAYE 1ml (水解酪素 1g, 酵母粉 5g, 加 ddH₂O 至 50ml)。

SPI 盐液的配制: (NH₄)₂SO₄ 1g, K₂HPO₄ 7g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, Nacitrate·2H₂O (柠檬酸钠) 0.5g, 加 ddH₂O 到 500ml。

②通过测吸收值监视生长, 直至对数末期。

③加 5ml 上述培养液到 45ml 预温的 SPII 培养液中, 37℃ 缓慢振荡 90 分钟。

SPII 培养液: SPI 盐液 100ml, 葡萄糖 1ml, CAYE 1ml, CaCl₂ 1ml (0.28g CaCl₂ 加 ddH₂O 至 500ml), MgCl₂ 1ml (2.54g MgCl₂ 加 ddH₂O 至 50ml)。

④加入 0.5ml EGTA (乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸), 37℃ 继续保温 5—10 分钟。

⑤取 0.1—0.5ml 细胞液加 1—3μg DNA, 混合在 1.5ml 无菌小离心管里, 37℃ 振荡 90 分钟。

⑥取 0.05—0.1ml 涂布在选择培养基上, 37℃ 保温。

⑦为以后应用而冷冻贮存细胞液, 则在第④步不加入 EGTA。冰浴冷却细胞后离心收集。

⑧将细胞悬浮在含 10% 甘油的 SPII 液中, 分成若干部分迅速冷冻, 放 -70℃ 存放。

⑨转化时, 将冷冻细胞液于 42℃ 迅速融化, 每毫升细胞加入 4ml SPII。

⑩加入 1/100 体积的 EGTA, 5 分钟后按步骤⑤⑥进行转化。

4. 枯草杆菌原生质球的质粒转化

①离心收集对数中期的受体菌 (1—2×10⁸/ml)。

②将菌体悬浮在 1/10 体积的 SMMP 液中。

SMMP: 4×Penassay broth 或 LB,

2×SMM

两个溶液等体积混合。

SMM: 0.5M蔗糖

0.02M顺丁烯二酸

0.02M $MgCl_2$ 用NaOH调pH为6.5。

③加溶菌酶到2mg/ml, 在37℃缓慢振荡30分钟至2小时。

④离心收集细胞 (2600g, 15分钟), 缓慢地悬浮在SMMP中, 离心洗涤2次。

⑤将洗涤的原生质球悬浮在1/10—1/15起始体积的SMMP液中, 此时形成的原生质球在室温放5小时是稳定的。

⑥取一个无菌管, 加入50 μ l 2 \times SMM液和50 μ l质粒DNA (Ipg-5 μ gDNA), 混合后加入0.5ml原生质球液, 再立即加入1.5ml40% PEG溶液, 缓慢混合。

PEG溶液: 40gPEG6000和50ml2 \times SMM溶液加水至100ml。

⑦2分钟以后, 加入5mlSMMP溶液稀释PEG。

⑧离心收集原生质球, 将沉淀悬浮在1mlSMMP中, 30℃振荡保温1.5小时, 使质粒基因表达。

⑨适当稀释PEG处理的原生质球, 涂布在DM3再生培养基上, 37℃保温2天。

DM3再生培养基: 每升含有

200ml 4%琼脂, 500ml 1M琥珀酸钠 (pH7.3)

100ml 5%水解酪素, 50ml 10%酵母粉,

100ml 3.5% K_2HPO_4 和1.5% KH_2PO_4

25ml 20%葡萄糖, 20ml 1M $MgCl_2$

5ml 2%牛血清蛋白。

⑩在适当的选择培养基上鉴定转化体。

5.嗜热脂肪芽孢杆菌的质粒转化

①用0.5ml嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 先培养液接种50mlLGS培养基, 55℃振荡培养4小时。

LGS培养基: 10g蛋白胨 5g酵母粉

5g NaCl 2.5g葡萄糖

0.15M蔗糖 加水至1000mlpH7.3

②当 OD_{600nm} 为0.4时，离心，4℃收集细胞。

③将菌体悬浮在2ml SMM—LG液中 ($1-2 \times 10^9/ml$)。

SMM—LG: 等体积的2×SMM和2×LG混合液。

SMM液: 0.33M蔗糖, 0.02M顺丁烯二酸

0.02M $MgCl_2$, pH6.5

LG液: 每升含10g蛋白胨, 5g酵母粉,

5gNaCl, 2.5g葡萄糖, pH7.3

④加入溶菌酶 (50 $\mu g/ml$, 溶在SMM—LG液中), 终浓度为1 $\mu g/ml$ 。

⑤在48℃缓慢振荡20分钟。

⑥离心, 4,000×g, 4℃, 10分钟。

⑦用2ml SMM—LG液洗一次, 离心, 同上。

⑧将原生质体悬在2ml SMM—LG液中。

⑨含1 μg 质粒DNA的50 μl TE缓冲液, 同50 μl 2×SMM缓冲液混合, 加入0.5ml原生质体液, 随后加入1.5ml40%PEG(制备在SMM液中, 预热到48℃)。

⑩于48℃, 缓慢混合2分钟。

⑪加入5mlSMM—LG液。

⑫离心4,000×g, 4℃, 10分钟。

⑬将原生质体悬浮在1mlSMM—LG和0.01%小牛血清蛋白中, 于48℃缓慢振荡1.5小时。

⑭用SMM—LG液(含0.01%小牛血清蛋白)适当稀释后, 取100 μl 加3mlRGTA琼脂(50℃)倒在含25mlRGA平皿上(平皿需预保温48℃), 如直接选择抗性转化体, 可将抗生素加在RGA和RGTA中, 平皿放48℃保温5天。

RGA(再生培养基):

700ml 2.86%琼脂, 1.43%蛋白胨

0.71% 酵母粉 0.71% NaCl

200ml 1M 蔗糖 50ml3% KH_2PO_4 + 7% K_2HPO_4

20ml25%葡萄糖 10ml1%水解酪素

10ml 2M $MgCl_2$ 10ml 2% 小牛血清蛋白(用滤膜灭菌)
pH 7.3.

RGTA: 除琼脂浓度为0.85%外, 与RGA相同。

6. 致瘤农杆菌的转化

① 将受体细胞 *A. tumefaciens* 接种在 YEB 培养液中, 30℃ 培养过夜, 再转接到 5ml YEB 中, 细胞浓度为 10^7 /ml

YEB 培养液: 每升含牛肉膏 13.3g, 酵母膏 1.0g 蔗糖 5g,
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.24g.

② 30℃ 振荡培养至细胞浓度为 4×10^8 /ml

③ 离心收集细胞, 5,000rpm, 4℃。将细胞悬浮在 YEB 中。

④ 离心浓缩细胞, 弃去上清液。

⑤ 将细胞悬浮在遗留的少量液体中, 冰浴之后在干冰上冷冻 2 分钟。

⑥ 在 37℃ 融化 3 分钟, 取 0.2ml 细胞转入 1.5ml 无菌小离心管里。

⑦ 加入 90μl YEB 和 10μl DNA。将管放在干冰中 2 分钟, 而后放 37℃ 25 分钟。

⑧ 30℃ 保温 1 小时, 不需振荡。

⑨ 将转化细胞液加到 5ml 523 培养基中, 30℃ 振荡培养 1 小时。

523 培养基: 每升含蔗糖 10g, 水解酪素 8g, 酵母膏 4g,
 K_2HPO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15g, pH 7.1。

⑩ 4℃ 离心, 弃上清液, 将细胞悬浮在 200μl 523 培养液中。

⑪ 取 100μl 涂布在选择培养基上, 30℃ 保温 48 小时。

7. 用碱性阳离子处理酵母细胞的转化

① 酵母细胞生长在 100ml YPD 培养液 (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖, pH 5.37) 中, 于 30℃ 振荡培养至对数末期。

② 离心收集细胞, $10,000 \times g$, 5 分钟。

③ 用 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 洗一次。

④ 沉淀被悬浮在 TE 缓冲液中, 浓度为 2×10^8 /ml

⑤取0.5ml转入一支试管，加0.5ml 0.2M 氯化铯或醋酸锂，30℃振荡1小时。

⑥取0.1ml转入1.5ml小离心管，加15μl质粒DNA(1—10μg) 30℃静置30分钟。

⑦加入等体积70%PEG4,000 (PEG4,000 溶在水中，120℃充分混合。

⑧于30℃静止1小时。

⑨将1.5ml小离心管浸在42℃水浴中5分钟，立即在室温冷却细胞。

⑩用水将细胞洗涤2次，最后悬浮在1ml水中。

⑪取0.1ml涂布在选择培养基上，30℃保温。

(七) 特异DNA顺序的检测

鉴定重组转化体的直接方法包括质粒DNA的物理分离和限制性内切酶分析；应用放射性探针同质粒DNA进行离体或原位杂交；利用免疫方法测定质粒DNA所合成的蛋白质产物。

首先应检测重组转化体的选择标志。提取转化体的重组质粒，进行再转化，证实所需的表型同质粒的存在有关。作重组DNA的限制性酶切物理图，既可以了解插入DNA的方向，也可为进一步进行亚克隆DNA片段提供依据。在含有各种重组分子的细菌群体中，检测所需的DNA顺序，在缺少有效的遗传方法时，则可采用分子杂交方法，发现含有特异DNA顺序的重组分子。先使变性DNA结合一种滤膜，如硝酸纤维素滤膜，而后用所需DNA顺序的特异探针杂交，通过放射自显影检出含所需DNA顺序的菌落。有时可用免疫方法筛选基因文库中的特异重组质粒，如单克隆的DNA片段，能在体内被有效地转录和翻译，合成某种特异蛋白质产物，则可用这种产物的抗体来检测。免疫测定法有多种，包括抗体和产物在平皿上形成沉淀带，放射性标记抗体法和酶标记抗体法等。通常将抗体或抗体片段吸附在固体支持物上，如聚丙烯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯塑料薄膜上，而后同平皿上裂解的菌

落接触，结合抗原的位点可再用放射性标记或酶标记抗体结合，通过放射自显影或酶使产物变色的反应检测出所需的分子克隆。这个过程可用图5—3概括：

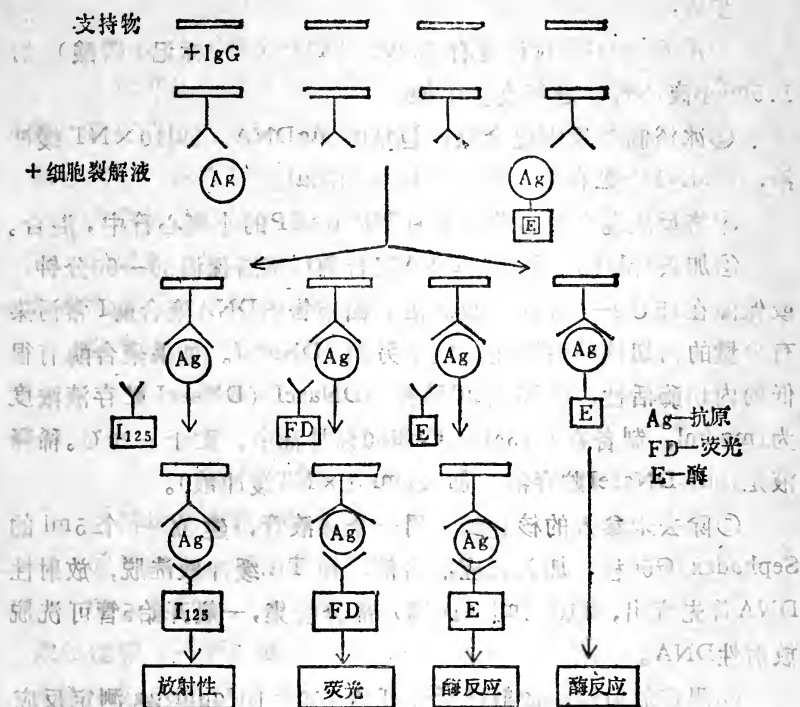


图6-3 免疫测定法示意图

1. 杂交探针的制备—缺口平移

试剂:

DNA 0.5 μ g

DNA聚合酶I (E.coli)

dNTPs贮存液: dCTP dGTP dTTP 每种浓度0.03M 溶解在水中, 置20 $^{\circ}$ C存放。

10 \times NT缓冲液:

500mM Tris-HCl, pH7.8, 50mM MgCl₂, 10mM β -巯基乙醇, 500 μ g小牛血清蛋白。

10×洗脱缓冲液:

0.1M Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA,

闪烁液: 4gPPO + 0.2gPOPOP/升二甲苯。

步骤:

①用 Parafilm 封住含有 50 μ Ci dATP (32 P标记 α 磷酸) 的 1.5ml小离心管, 进行真空干燥。

②冰浴制备反应混合液, 包括0.5 μ gDNA, 5 μ l10×NT缓冲液, 1 μ ldNTPs贮存液, 加水至终体积50 μ l。

③将反应混合液转移到含有 32 P-dATP的小离心管中, 混合。

④加入1 μ l (5个单位) DNA聚合酶I, 室温保温30—60分钟, 或保温在15 $^{\circ}$ C 2—3小时后放冰浴。因市售的DNA聚合酶I常污染有少量的内切核酸酶活性, 故不另加 DNaseI。如果聚合酶有很低的内切酶活性, 则加入4 μ l稀释的DNaseI (DNaseI 贮存液浓度为1mg/ml, 制备在0.15MNaCl和50%甘油中, 贮于-20 $^{\circ}$ C。稀释液是10 μ l DNaseI贮存液, 加入1ml 1×NT缓冲液)。

⑤除去未参入的核苷酸。用一个移液管, 建立一个5ml的 Sephadex G50柱, 加入反应混合液, 用TE缓冲液洗脱, 放射性DNA首先流出, 以0.5ml (10滴) 部分收集, 一般开始5管可洗脱放射性DNA。

⑥测定放射性, 放射性活性可达 100 $\times 10^8$ cpm/ μ g 测定反应动力学的方法如下: 在反应过程中, 吸取0.5 μ l反应混合液加到冰浴的5%三氯醋酸中, 然后用GF/C玻璃滤纸过滤, 用3ml5%三氯醋酸和乙醇洗涤。滤纸干燥后, 放入闪烁瓶, 加入10ml闪烁液, 计数放射性。

2. DNA—DNA杂交

①把烘干的硝酸纤维素滤膜 (见实验5.6) 漂浮在6×SSC液面上, 滤膜湿润后再使滤膜完全浸没在6×SSC中2分钟。

②将湿滤膜装入塑料袋中 (要求袋不透气, 不透水)。

③对每平方厘米的硝酸纤维素滤膜加入0.2ml温热到68 $^{\circ}$ C的预杂交液。

预杂交液: $6 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{SDS}$, $5 \times \text{Denhardt}$ 溶液, $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ 变性鲑精DNA。

Denhardt 溶液 ($50 \times$),

Ficoll 5g, 聚乙烯吡咯烷酮5g 小牛血清蛋白5g
加水到500ml, 贮存在 -20°C 。

④尽可能从杂交袋中挤出所有气泡, 用加热封口器密封塑料带。杂交袋浸泡在 68°C 水浴中, 轻轻来回摆动, 使袋中预杂交液能够流动。保温2—4小时。

⑤取出杂交袋, 在袋的一角剪一个十字口, 挤出预杂交液。

⑥把杂交液加到袋中, 加入杂交液的量, 只要足以使滤膜保持湿润就可以 ($50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 滤膜)。

杂交液: $6 \times \text{SSC}$, 0.01MEDTA , $0.5\% \text{SDS}$, $5 \times \text{Denhardt}$ 溶液, ^{32}P -标记的变性探针DNA, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑精DNA (先将探针DNA和变性鲑精DNA混合在小管中, 沸水煮沸5分钟, 迅速冰浴冷却)。

⑦挤出杂交袋中的气泡, 密封袋。

⑧于 68°C 水浴保温塑料袋, 一般几小时到十几小时。

⑨杂交完后, 小心地将放射性杂交液挤到一个试管里, 迅速取出滤膜 (不要让滤膜干燥), 立即放入 $2 \times \text{SSC}$ $0.5\% \text{SDS}$ 溶液中 (室温或 $40-50^\circ\text{C}$), 缓慢搅动, 15分钟后重复洗一次。

⑩将滤膜放在 $2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$ 溶液中洗, 不时搅拌, 室温15分钟。重复洗3次。

⑪再用 $0.1 \times \text{SSC}$, $0.5\% \text{SDS}$ 溶液洗, 68°C 保温, 不时轻轻搅动, 2小时后更换溶液, 继续保温30分钟。

⑫洗后, 用普通滤纸吸干滤膜上的溶液, 把滤膜包在塑料膜中, 在暗室内取同样大小的x光片, 进行放射自显影。放 -70°C 曝光十几小时到一周。

变性鲑精DNA的制备:

将DNA (type-III, Na盐) 溶解在水里, 浓度为 $10 \text{mg}/\text{ml}$, 需要在室温下磁力搅拌2—4小时, 促进DNA溶解, 将DNA溶液

通过几次注射针头，煮沸10分钟，分成小份后，在 -20°C 贮存。

3. 原位噬菌斑杂交

①将适当的E.coli菌株的一个单菌落接种在5ml含有0.2%麦芽糖的LB培养液中， 37°C 振荡培养过夜。

②离心，将细胞悬浮在2.5ml 10mM MgSO_4 溶液中，于 4°C 贮存。

③为原位杂交制备噬菌斑。吸取50 μl 细胞液同稀释的噬菌体液（每平皿约产生 10^4 噬菌斑）混合。室温保温5分钟。加入4ml 45°C 0.7%的软琼脂。浇灌在干的LB平皿上。

④ 37°C 保温平皿过夜。

⑤将含有噬菌斑的平皿置 4°C 冷却1小时，以增加平皿上层软琼脂的硬度。

⑥放一块干的与平皿大小相同的硝酸纤维素滤膜在平皿琼脂上（滤膜光滑面朝下）。在琼脂和滤膜间不得留有气泡。一旦铺上滤膜，则不可再揭起和移动位置。

⑦把铺上滤膜的平皿置 4°C 放15分钟。为标记滤膜和平皿的方位，用吸有蓝墨水的针头在滤膜的边缘穿刺滤膜和琼脂（黑墨水可混含有 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的变性未标记的探针DNA）。

⑧应用一种圆头镊子十分细心而缓慢地将滤膜提起，绝不可损伤琼脂表面，提起后的滤膜再不可接触琼脂。取出滤膜后，用塑料薄膜包裹平皿，室温存放。

⑨取3个玻璃盘，分别放三张Whatman 3MM滤纸。

⑩用0.5M NaOH, 1.5M NaCl溶液饱和第一个盘的滤纸，将滤膜放在纸堆上10分钟（滤膜的噬菌斑面向上）。

⑪用1M Tris-HCl, pH7.5, 1.5M NaCl溶液饱和第二个盘的滤纸，把滤膜转移到这个纸堆上，10分钟。

⑫用 $2\times\text{SSC}$ 溶液饱和第三个盘的滤纸，把滤膜从第二个盘转移到第三个盘的纸堆上，处理5分钟。

⑬将滤膜放在干净的3MM纸上干燥。放 80°C 处理2小时。

⑭预杂交和杂交过程同前（见7.2）

⑯洗涤杂交滤膜，将它铺在X射线胶片上进行放射自显影，方法同前。

⑰1—2天后冲洗X射线胶片，确定特异的DNA探针的杂交位置。

⑱重叠胶片和原平皿的位置，找出具有杂交活性的噬菌斑。

⑲将有杂交反应的噬菌斑挑到一个含有宿主菌的上层软琼脂平皿上，37℃，保温平皿过夜。

⑳铺上新的硝酸纤维素滤膜，重复杂交实验。

㉑用一支细的移液管口取出含噬菌斑的琼脂块，放在1mlTMG液中，存放在4℃。

TMG液：每升含Tris1.21g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.20g, 明胶0.1g, 用HCl调pH到7.4，高压灭菌。

㉒纯化噬菌斑，制备噬菌体贮存液。

(八)质粒编码多肽的合成

细菌染色体编码几千种多肽，鉴定哪一种基因产物同哪一个基因相配是困难的，或者说是不可可能的，为克服这种困难，发展了重组DNA技术，将感兴趣的基因克隆在细菌质粒里，而后利用一些方法，检定质粒编码的蛋白质。

有三种方法，用放射性氨基酸选择标记质粒决定的蛋白质：

A. 大细胞(maxicells)方法：

从对紫外线高度敏感的E. coli可以得到大细胞，这是由于E. coli带有uvrA，phr，和recA基因突变，后者突变使得细胞被照射后损伤的DNA分子降解。phr突变允许实验在一般实验室光照条件下进行，当用紫外线照射含有质粒的大细胞时，作用目标有两个，即大的染色体和小质粒DNA。在低剂量时，染色体将受到巨大冲击，而许多小质粒分子不会受到冲击或影响不大。因此照射后经培养，使得损伤的DNA降解，而细胞里将主要含有质粒分子。这些质粒继续复制并指导蛋白质合成，将这种细胞保温在含有放射性氨基酸的培养基里，则会选择性的标记质粒编码的蛋白质。

B. 小细胞突变体是细胞分裂缺失突变体。分裂时隔膜的形成是在细胞的极端，结果产生一个正常的细胞和一个小细胞。小细胞不含染色体，但可含有质粒，由于小细胞具有正常细胞的基本代谢能力，所以质粒基因可以表达，能用放射性氨基酸标记合成多肽。

C. 离体转录和翻译偶联系统

除去染色体DNA的细胞抽提液能够转录翻译外源DNA外还可以选择标记由质粒产生的蛋白质。

1. 大细胞的基因表达系统操作

①将E. coli CSR603 和含有质粒的CSR603分别接种在5ml培养液中(M9培养液补充1%水解酪素)。

②37°C振荡培养过夜。

③第二天用0.5ml过夜培养液接种10ml新鲜培养液，37°C继续培养到OD_{590nm}为0.6。

④将培养液转移到培养皿里，用UV灯照射(除去皿盖!)260nm，可用一杀菌灯，使细胞存活数降低到500个/ml(应在实验前进行准确地测定)。

⑤取0.1ml涂布在肉汤平皿上，监测杀死程度。

⑥将照射后的细胞转入三角瓶中，37°C培养1小时。

⑦加200μl新配制的D-环丝氨酸(20mg/ml)继续培养过夜。环丝氨酸能够杀死那些在保温时继续生长的活细胞和能够合成染色体蛋白质的那些细胞。

⑧在第三天标记大细胞的时期，制备15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶。用去污剂彻底清洗电泳装置的玻璃板。

⑨配制15%分离胶，混合下列溶液：

缓冲液A：16.3ml(0.75MTris-HCl, pH8.8, 0.2%SDS)

丙烯酰胺：11.1ml(44%丙烯酰胺, 0.8%双丙烯酰胺)

水：4.4ml

过硫酸铵：1.2ml(10mg/ml)

Temed：100μl(四甲基乙二胺)

混合后灌胶，直到距梳底1cm，盖上一层0.1%SDS，聚合30分钟。

⑩除去SDS，用水洗胶面，用滤纸条吸于玻璃板。（小心不要损坏凝胶）。

⑪制备7%浓缩胶，混合下述溶液：

缓冲液B：7.5ml(0.25MTris-HCl, pH8.8, 0.2%SDS)

丙烯酰胺：2.5ml

水：5.4ml

过硫酸胺：0.38ml

Temed：30 μ l

混合后灌在分离胶上，把梳子安放好，聚合30分钟，小心除去梳子。

⑫将电泳缓冲液倒入上下电泳槽中，用缓冲液洗加样小槽。

⑬在制备SDS凝胶时，标记大细胞，方法如下：

离心收集照射后培养的细胞，再悬浮在5mlM9培养液中（补充有苏氨酸(0.1mg/ml)，亮氨酸(0.1mg/ml)，脯氨酸(0.2mg/ml)和精氨酸），37 $^{\circ}$ C保温1小时。

⑭加50 μ l [35 S]-蛋氨酸 (>100Ci/mmmole) 继续培养1小时，离心收集细胞，弃上清液将细胞悬在残留的液体里。

⑮加100 μ l电泳样品缓冲液(0.125MTris-HCl, pH6.8, 4%SDS, 20%甘油, 1.4M巯基乙醇, 0.001%溴酚蓝)，煮沸3分钟。取20ml样品进行电泳分析，同时在一个电泳孔中加入已知分子量的 14 C—标记的多肽。

⑯恒定电流3mA，电泳4小时，当染料到达胶底时，停止电泳，固定凝胶（用30%异丙醇加10%醋酸）。

⑰第四天加工凝胶，进行放射自显影，如下：弃固定液，加入二甲基亚砜，缓慢振荡30分钟。

⑱用新的二甲基亚砜代替老的，继续缓慢振荡30分钟。

⑲弃二甲基亚砜，加入含有22%(w/V)ppo[2.5-diphenyloxazole]的二甲基亚砜。

②1小时后，用水代替上述溶液，每小时用新水代替1次，共7次。

②把凝胶放在滤纸上干燥，并对X射线底板曝光， -70°C 过夜或更长时间。

②冲洗胶板，如果曝光不够或过度，则重复进行放射自显影，并调整曝光时间。

2. 小细胞的基因表达系统操作

①制备小细胞产生菌的感受态细胞，用待测质粒DNA转化，涂布在适宜的选择平皿上， 37°C 保温。

②应用快速抽提质粒方法，证实转化体含有质粒。

③500ml三角瓶装有250ml M9培养液，1瓶接种含有质粒的转化体，1瓶接种小细胞产生菌，作为对照， 37°C 振荡培养16小时。

④制备密度梯度离心管。取Beckman SW27转子离心管，依次分别加入12ml 20%，12.5%，和5%的蔗糖溶液。或者制备20%—5%的蔗糖梯度，先加入18ml 20%蔗糖，再加入18ml 5%蔗糖，而后重复冷冻、融化3次。（蔗糖溶液制备在50mM Tris-HCl，pH7.5，100mM NaCl，0.1mM EDTA溶液中）。

⑤低速离心小细胞培养液，2,500rpm， 4°C ，10分钟（Sorvall GSA转子），保留上层液，弃沉淀。

⑥高速离心收集小细胞8500rpm 4°C ，15分钟（Sorvall IGSA转子），弃上层液。

⑦将小细胞沉淀悬浮在2ml 冷BSG缓冲液中，加在蔗糖梯度上，离心，5,000rpm， 4°C ，15分钟（Beckman SW27转子）。

BGS缓冲液：NaCl 4.25g； KH_2PO_4 0.15g；

Na_2HPO_4 0.3g；明胶50mg；加双蒸水到500ml（灭菌）。

⑧小细胞带通常位于5%和12.5%蔗糖层的方面，特别小心地吸出小细胞带，移到一个50ml离心管里。

⑨加入等体积的冷BGS缓冲液，将管倒置混合，离心沉淀小细胞，12,000rpm， 4°C ，15分钟（Sorvall ss34转子）。

⑩将小细胞悬浮在10ml含有1mg/ml 环丝氨酸的M9培养液中，

37℃振荡培养1小时，环丝氨酸将裂解继续生长的细胞。

⑩离心沉淀小细胞(12,000rpm, 4℃, 15分钟), 再悬浮在2ml冷BGS缓冲液中。

⑪将小细胞进行第二次蔗糖密度梯度离心, 重复步骤⑦、⑧、⑨。

⑫悬浮小细胞沉淀在1mlM9标记培养液中, 调节A260为0.2 (M9标记培养液为M9+0.4%葡萄糖+所要求的营养补充物, 但省去水解酪素和蛋氨酸)。

⑬取0.1ml 10^{-1} 稀释液涂布在LB琼脂平皿上, 37℃保温。这将测出存活细胞的污染程度, 如果每毫升制备的小细胞液污染多于 10^5 活细胞, 则会干扰小细胞蛋白质合成系统。

⑭取1ml小细胞液, 放入一个15ml的离心管里, 37℃振荡保温15分钟。

⑮加入5-50 μ Ci[35 S]-蛋氨酸, 37℃继续保温30分钟。

⑯离心收集标记的小细胞, 12,000rpm, 4℃15分钟, 转子停转后, 立即吸出上层液, 如停止时间过长, 小细胞将迅速悬浮。

⑰用1ml冷TE缓冲液悬浮小细胞, 以离心浓缩, 除去放射性的水层液。

⑱加入40 μ l样品缓冲液, 混合均匀, 用台式离心机离心2分钟, 吸出样品放入1.5ml离心管, 置100℃煮沸35分钟。

⑲取5—15 μ l样品加在12.5%SDS聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。

⑳电泳和放射性自显影同前。

3. 细菌离体蛋白质合成系统操作

应用离体蛋白质合成可在转录和翻译水平上分析基因表达。这里叙述大肠杆菌和枯草杆菌依赖于mRNA或DNA的离体蛋白质合成系统。

(1) 细胞抽提液的制备

B. subtilis 168T⁺或 *E. coli* MRE600(RNase⁻)生长在CHT50培养基中, 37℃振荡培养, (CHT50培养基成分为0.125%水解

酪素, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4% K_2HPO_4 , 0.6% KH_2PO_4 , 0.1%柠檬酸钠, 0.5%葡萄糖, 0.5mM CaCl_2 , 0.8mM MgSO_4 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 色氨酸)。生长到对数中期 ($A_{570} = 0.5$) 将菌液浇在碎冰盐上, 离心收集细胞, 用缓冲液 I 洗2次(缓冲液 I: 0.01M $\text{Tris}-\text{HCl}$, pH7.5, 0.015M MgCl_2 , 1M KCl , 5mMEDTA, 10%甘油, 0.01M 2-巯基乙醇), 再用缓冲液II洗一次(缓冲液II: 缓冲液 I + 0.05 MKCl), 迅速冷冻细胞并贮存在 -80°C 。在收集和洗涤细胞过程中, 永远冰浴细胞, 所用缓冲液要灭菌后放在 4°C , 并在应用前加入2-巯基乙醇。

将冷冻的 *B. subtilis* 或 *E. coli* 细胞冰浴融化, 悬浮于缓冲液 III(缓冲液 III: 0.01M $\text{Tris}-\text{HCl}$, 0.015M MgCl_2 , 0.06M NH_4Cl , 10%甘油, 5mM 2-巯基乙醇, 3.45mM PMSF, 0.2mM DFP, pH 7.0)。

加蛋白酶抑制剂到缓冲液 III 的方法如下:

- ① 将缓冲液加热到 37°C 。
- ② 边搅拌缓冲液, 边加入 PMSF 每升缓冲液 III 加 0.6g PMSF (溶在 25ml 乙醇中)。移液管头浸没在液面之下, 防止沉淀出现。
- ③ 加入 PMSF 后调 pH 到 7.0。
- ④ 将缓冲液冷到 25°C , 然后加 2-巯基乙醇 (0.35ml/L)。
- ⑤ 调 pH 到 7.0。
- ⑥ 加 1ml DFP (溶于异丙醇的 0.2M 贮存液)。
- ⑦ 最终在 4°C 调 pH 到 7.5。

每克湿菌悬浮在 1.5ml 缓冲液 III, 除特别指出外, 以后的悬浮细胞步骤都按这样的体积。压榨破碎细胞, 使细胞 2 次通过 French 压榨机 (16,000psi), 将裂解液冰浴搅拌 30 分钟以切断 DNA 分子, 离心, 13,000rpm, 20 分钟 (Sorvall ss-34 转子), 小心吸出上层液, 再离心, 上层液即为 S-30 抽提液。如将 S-30 抽提液离心 45,000rpm, 4.5 小时 (4°C Beckman 50Ti 转子), 所得沉淀为核糖体, 上清液部分即为 S-150 抽提液。将 S-150 抽提液对 1 升缓

冲液III透析4小时(换4次透析液),分成若干小份,迅速冷冻放-80℃贮存。

离心后立即将核糖体沉淀,缓慢悬浮在缓冲液III中,完全溶解后加入DNaseI至1μg/ml,于4℃搅拌核糖体30分钟,以降低内源DNA活性。离心核糖体溶液,10,000rpm,10分钟,去除膜物质。再离心溶液,45,000rpm,4.5小时。将核糖体悬浮于缓冲液IV(即缓冲液III的NH₄Cl浓度增加到1M),缓慢搅动16小时。离心(10,000rpm,10分钟),同上述将上清液再进行超离心。此时离心后所得上清液含有起始因子。加入(NH₄)₂SO₄(47g/100ml)4℃搅拌1小时,离心收集沉淀(13,000rpm,20分钟)将沉淀溶解在缓冲液L中(缓冲液L:0.02MTris—HCl,0.02MNH₄Cl,5mMEDTA,5mM MgCl₂,5%甘油,0.2mMDFP,5mM2-巯基乙醇,pH7.0)。每100g湿菌的起动因子悬浮在5ml缓冲液L中,并对1升缓冲液L透析12小时(更换透析液4次)。离心13,000rpm,45分钟,除去不溶物质,将溶液分成小份,迅速冷却放-80℃存放。

把核糖体沉淀悬浮在缓冲液III中,铺在10ml30%蔗糖(用缓冲液III配制)垫子上,离心45,000rpm,16小时。在核糖体沉淀上面有一棕色层,刮去弃之,将核糖体悬浮在缓冲液III中,浓度为1000A₂₆₀/ml,分成小份,迅速冷冻在-80℃。

制备核糖体亚基主要根据Cannon和Bott方法[MGG,174:149(1979)]。从制备洗涤的70S核糖体的第一次超速离心步骤起,将核糖体悬于SUBI缓冲液(SUBI:0.02MTris—HCl,0.02M Mg(Ac)₂,0.1MNH₄Cl,pH7.8,用前加入6mM2-巯基乙醇和0.2mMDFP),每克湿菌用0.5ml缓冲液。12,000rpm,10分钟离心澄清,对SUBII缓冲液透析4次,每次1升SUBII缓冲液(SUBI+0.2mM Mg(Ac)₂),尔后小心将悬液铺在新制备的冷的35ml10—30%蔗糖梯度上,离心23,000rpm13小时,(Beckman SW28转子),以1ml分部收集(冰浴),测260nm吸收,合并峰值。将Mg(Ac)₂浓度提高到20mM,超离心收集亚基部分,45,000rpm,8小时。将亚基沉淀悬浮在SUBI中,对SUBII透析,重复进行蔗糖梯度离

心。最终30S和50S亚基为2000A260/ml。各种缓冲液应用前需加入DFP。

(2) RNA的制备

所用玻璃器皿和缓冲液都要灭菌。细胞生长在37°C CH150培养液中,于对数中期收集,把细胞倒在碎冰上,冰上撒有固体MgCl₂和NaN₃,使终浓度分别为1mM和10mM。离心收集细胞,-80°C冷冻细胞后再冷冻干燥。在一个研钵里加入等量的玻璃球(175—150 μm)研磨使细胞干破裂,共处理8次,每次1分钟,间隔致冷30秒。破碎的细胞和玻璃球被直接加入到新制备的饱和水的酚里(冰浴),每克干细胞加15ml酚液。再加入15ml缓冲液VI[0.01M Tris-HCl, pH7.5, 0.01MKCl, 5mMMgCl₂, 0.01M NaN₃(灭菌)]和50mg Macaloid(一种特制的精细皂土),37°C缓慢混合10分钟,离心10,000rpm,15分钟。将水相移入无菌三角瓶(冰浴),剩下的酚层再用等体积缓冲液VI抽提10分钟(37°C),离心后合并两次水相,加固体NaCl至0.1M,加2倍体积冷乙醇沉淀RNA,置-20°C至少3小时。离心,将RNA沉淀溶解于NaAc缓冲液(0.1MHAc用NaOH调pH到5.0。按每克干细胞溶于15ml缓冲液),用等体积的酚抽提,离心,移出水相再用酚抽提,直到界面没有蛋白沉淀,将水相转移到干净的三角瓶里,加固体NaCl到2M,乙醇沉淀同前。沉淀用TNE缓冲液(0.1M Tris-HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 70%乙醇)洗3次,而后溶解在TNH缓冲液(0.01M Tris-HCl, pH7.0, 0.1M NH₄Cl),离心12,000rpm,40分钟。再次乙醇沉淀RNA,最后溶在无菌水中,浓度为750A260/ml, -20°C存放。

(3) DNA的制备

以不同方法制备的多种来源DNA,活性差别不大。一般质粒DNA分离可按J. Bacteriol. 116:1064, (1973),噬菌体DNA分离按J. Bacteriol. 120:219, (1974)。

(4) 依赖于RNA的离体蛋白质合成系统

制备各种贮存液

Tris-AA: 19种氨基酸(每种0.3mM),省去苯丙氨酸,用无菌

的0.3M Tris—HCl, pH7.4溶液制备, -20°C存放。

Mg(Ac)₂: 0.5M醋酸镁, 灭菌, 4°C存放。

NH₄Ac: 3M醋酸铵, 灭菌, 4°C存放。

DTT: 0.1M二硫苏糖醇, -20°C存放。

苯丙氨酸: 3.2mM, -20°C存放。

Tris—HCl: 0.01M, pH7.4灭菌, 4°C存放。

DFP: 0.2M溶在异丙醇中, -20°C存放。

能量分子: 0.1M ATP, 0.25MPEP(磷酸烯醇丙酮酸)0.005M
GTP, 用NH₄OH中和, -20°C存放。

丙酮酸激酶: 5000u/ml, 4°C存放。

叶酸 : 5mM, -20°C存放。

EDTA 0.5M, pH7.5, 灭菌, 4°C存放。

混合液制备:

抑制剂: 0.070ml Tris—HCl

0.020ml EDTA

$\frac{0.010\text{ml DFP}}{0.100\text{ml}}$

预保温混合液(PM)

0.250ml Tris—AA

0.125ml Mg(Ac)₂

0.025ml NH₄Ac

0.025ml DTT

0.025ml 苯丙氨酸

0.010ml 抑制剂

$\frac{0.277\text{ml Tris—HCl}}{0.625\text{ml}}$

反应混合液(RM, 可供20管测定)

0.500ml Tris—AA

0.050ml Mg(Ac)₂

0.050ml NH₄Ac

0.050ml DTT
 0.050ml 能量
 0.005ml 丙酮酸激酶
 0.050ml 叶酸
 0.001ml DFP
 0.050ml [^{14}C]-phe(每ml反应液为5 μci)
 0.200ml 粗IF₃
0.500ml Tris-HCl
 1.506ml

预保温(PRE, 可供测定20管):

0.250ml PM
 0.020ml 70S核糖体(1000A260/ml)
 0.080ml 缓冲液III(不含抑制剂)
0.150ml S-150
 0.500ml

37°C预保温15分钟。如用亚基则混合0.067ml30S和0.033ml 50S(都为200A260/ml), 在37°C保温20分钟, 而后加入PM和 S-150, 再37°C

保温15分钟。

测定方法:

始终将各种溶液和混合液保持冰浴。核糖体S-150和IF因子要在用前融化, 不可再冷冻和应用。每支测定管含有:

0.075ml RM
 0.010ml RNA(750A260/ml)
 0.015ml Tris-HCl
0.025ml PRE
 0.125ml

Tris可含有抗生素或含有其它影响反应的底物, 以供研究。

将测定管保温在37°C, 30分钟。置冷浴加入2ml5%TCA, 90°C处理15分钟, 用玻璃纤维滤膜收集沉淀, 洗膜后进行放射性计数。

以polyU为模板时,每测定管用100 μ g polyU,且RM中的IFs用亚精胺(Spermidine, 0.0625M溶在0.01M Tris-HCl, pH7.4溶液中)代替。

(5) 依赖DNA的离体蛋白质合成系统

除需用所有翻译系统溶液外, 还需制备下列溶液。

PEP (磷酸烯醇丙酮酸): 0.375M, 用NH₄OH中和, 置-20 $^{\circ}$ C存放。

XTP: 17mM GTP, 17mM UTP, 17mM CTP, -20 $^{\circ}$ C存放。

KAc: 1.25M, 4 $^{\circ}$ C存放。

³H-UTP: 加入到RM中代替¹⁴C-phe, 每测定管需4.2 μ Ci

³H-UTP

混合液: PM和抑制剂的混合液没有改变。PRE(供20个测定管)

0.250ml PM

0.050ml 70S核糖体

0.200ml S-150

0.500ml

RM(供20个测定管)

0.500ml Tris-AA

0.050ml Mg(Ac)₂

0.050ml NH₄Ac

0.100ml KAc

0.050ml DTT

0.050ml 能量

0.050ml 叶酸

0.020ml XTP

0.020ml PEP

0.005ml 丙酮酸激酶

0.001ml DFP

0.050ml ¹⁴C-phe

0.200ml 粗IFs
0.355ml Tris—HCl
1.501ml

测定方法：每个测定管含有

0.075ml RM

0.010ml DNA(170 μ g/ml)

0.015ml Tris—HCl

0.025ml PRE
0.125ml

当反应用 ^{14}C —phe时，则测热处理TCA中的 ^{14}C 参入量，当反应用 ^3H —UTP时，则测不加热处理TCA中的放射量。

上述反应的各种成分是采用它们的最适浓度，但IFs和S-150可以改变。因其最适量依每次制备的制剂有所变化。这系统对 Mg^{2+} 浓度十分敏感，在依照RNA或DNA的系统中，最适浓度可能不同，依系统而决定。细胞抽提液可贮存一年，不致丧失活性。

(九)真核细胞离体翻译系统

利用离体蛋白质系统，可以鉴定克隆的基因或mRNA，研究生长和发育过程mRNA的变化，研究蛋白质合成的调节和翻译后修饰。现已发展了多种真核生物离体蛋白质合成系统，最通用的有麦胚系统和兔网织红细胞系统。一般讲真核细胞的mRNA能用其它真核细胞离体蛋白质合成系统翻译。麦胚抽提液可翻译动物mRNA，兔网织红细胞系统也可翻译植物的mRNA。因为它们有相同的遗传密码，有相似的识别和结合核糖体的核苷酸顺序。当然也有少数例外，如大的mRNA分子，不能在麦胚系统中得到有效翻译，产生肽链的提前终止。一种特异的mRNA有可能优先在麦胚系统中翻译，而不在网织红细胞系统中，或反之。

用mRNA微量注射蛙卵，也可合成蛋白质，研究基因表达和翻译后的加工。但严格讲它不是一个离体蛋白质合成系统，由于蛙卵也同样合成它自身的蛋白质，使对结果的分析解释带来复

杂性。如果研究的是一种可识别的外源蛋白质，便可克服这个问题。

离体蛋白质合成的一般图式

制备大肠杆菌、麦胚或兔网织红细胞
离体蛋白质合成系统

抽提和纯化RNA，细胞总RNA或多
聚核糖体RNA，或 PolyAmRNA，
叶绿体和线粒体RNA

将所用缓冲液灭菌、无菌操作。按少
量分份贮存的抽提液，最好放在液氮
里。抽提液所含内源mRNA应尽量地
少，作为放射性标记的那些氨基酸。
其浓度要尽量地低。

在抽提和纯化中防止 RNase 降解
RNA，除去DNA、蛋白质、碳水化
合物等。RNA 作为乙醇沉淀物贮存
在 -20°C



冰浴融化适宜体积的抽提液，加入放
射性氨基酸和其它所需的成分。

用80%乙醇洗RNA几次，去除离子
和去污剂，干燥后RNA被溶解在无
菌蒸馏水中、或冷冻贮存 (-20°C 或
 -80°C)。



每个测定管的终体积为 $10-50\mu\text{l}$ ，加入
适量RNA，于所需温度保温 30-90分
钟



终止反应，测定参入到蛋白质中的放
射性，如要进一步研究，可分离放射
性蛋白质。

1. 离体麦胚翻译系统

(1) 试剂:

①麦胚应取自硬粒冬麦，并非每种冬麦都有活性，且不同批
号活性也不同。贮存麦胚在 4°C 真空条件下，麦胚的湿度高会降低
翻译活性。

② 研磨缓冲液:

20mM Hepes, pH7.6(用KOH调节)

1mM Mg(Ac)₂, 100mM KCl,

2mM CaCl₂, 6mM 2-巯基乙醇。

③ 柱层析缓冲液:

20mM Hepes, pH7.6(用KOH调节)

120mM KCl, 5mM Mg(Ac)₂, 6mM 2-巯基乙醇

④ 麦胚翻译混合液 (以小份贮存在 -70℃)

100μl 10mM 的各种氨基酸(缺少蛋氨酸)

200μl 200mM ATP (用KOH中和)

10μl 100mM GTP, 0.01M Hepes, pH7.2 (用KOH调)

200μl 1.6M 磷酸肌酸, 0.01M Hepes pH7.2(用KOH调节)

80μl 1M DTT

960μl 1M Hepes 用KOH调pH7.2。

50μl 200mM 亚精胺(游离碱)

1600μl 蒸馏水

总体积3.2ml。

⑤ 5.4mg/ml 磷酸肌酸激酶(CPK), 制备在50%甘油中。

(2) 麦胚抽提液的制备:

应用无菌的玻璃器皿和缓冲液。许多缓冲液不能用高压灭菌, 必须应用滤膜过滤。滤膜可在沸水中预先煮沸2次, 以除去塑胶物。一般应在尽可能低的温度下操作。

① 实验在不高于4℃的冷室里进行。将研钵和棒预冷到2℃, 放入冰浴, 加入12g麦胚和12g石英砂(预先将砂洗净, 于100℃以上烘烤过夜), 开始研磨麦胚, 随着继续研磨缓慢地加入28ml研磨缓冲液(2℃), 持续15分钟, 产生一种粘浆。

② 离心30,000g, 10分钟, 2℃(ss34Sorvall转子)

③ 移出上层液, 避免吸取沉淀和表面脂肪层。大约得到10ml₁上层液, 加入磷酸肌酸激酶至40μg/ml, 置30℃保温15分钟。

④制备一个Sephadex G25 (中等粒度)柱 (3.5×35cm), 在4℃冷室中进行层析。(预先用层析缓冲液将柱平衡)。把抽提液加在柱上, 流速每分钟1毫升, 按1ml分部收集。

⑤合并最混浊的部分, 用无菌注射器将抽提液按小滴滴入液氮。在-70℃贮存抽提液几年, 不会失活。

⑥如对照实验指出抽提液含有较高的内源mRNA, 则需用微球菌核酸酶(Micrococcal nuclease)处理抽提液, 加入1mM CaCl₂, 对每毫升抽提液加50单位的核酸酶, 于20℃保温10分钟, 加入EGTA到2mM后, 如上述方法冷冻。

(3) 翻译反应:

①反应在1.5ml小离心管中进行, 将管置冰浴, 加入0.1-1μg RNA (如RNA 溶在大体积的水中, 需真空蒸发。RNA 溶液含有盐, 则需沉淀RNA, 用70%的乙醇洗涤)。

②加入2μl 麦胚翻译混合液, 0.5μl 25mM Mg(Ac)₂, 2μl 1M KAC, 2-5μl (³⁵S) 蛋氨酸 (950-1300Ci/m mole, 5-6mCi/ml), 加入蒸馏水, 终体积至17μl。

③于22℃保温5分钟, 加8μl 抽提液, 继续保温1.5-3小时。将反应管置冰浴停止反应, 如较长时间贮存需冷冻反应液。

④取1μl 反应液滴到直径为2.4cm的whatman 3mm滤纸上, 放入10%三氯醋酸(TCA)中, 4℃浸泡1分钟, 再在50ml 5%TCA中将滤膜煮沸10分钟, 然后用乙醇洗, 再用乙醚洗, 滤膜干燥后做放射性计数。

⑤通常放射性参入值为5000cpm/μl。高活性的抽提液参入可高6-10倍。如翻译产物的放射性达100,000cpm, 则可用聚丙烯凝胶电泳和荧光自显影分析, 1天后可观察到翻译产物。

2. 离体网织红细胞翻译系统

(1) 制备网织红细胞抽提液

①为致使兔子贫血, 先用乙酰苯胍皮下注射6只家兔 (每只重2-3公斤)。乙酰苯胍注射液为1.2%乙酰苯胍 (Acetylphenhydrazine, 溶于0.14M NaCl, 1.5mM Mg(Ac)₂, 5mM KCl溶液,

用1M Hepes (pH7.0 调到 pH7.5)。第1天注射 1ml, 第2天注射 1.6ml, 第3天注射1.2ml, 第4天注射1.6ml, 第5天注射2ml。

②第7天和第8天放血。先用二甲苯棉球擦净一只耳朵, 用新的切片刀做耳静脉切口, 每只兔子放出50—60ml血, 收集在 50ml 冷的含有0.01%肝素的生理盐水里。

③用粗棉布过滤, 离心2,000xg, 5分钟。用生理盐水洗细胞 3次, 最后一次离心在8,000xg。

④加入等体积的冷水(0℃)裂解细胞, 1分钟后离心20,000xg, 20分钟。

⑤将抽提液分成0.5ml部分, 存放在-70℃, 在几个月内是稳定的。

(2) 用微球菌核酸酶处理抽提液:

①取100份细胞抽提液加 20份 50mM CaCl₂, 加1份 4mg/ml Hemin(氯高铁血红素, 将20mg Hemin溶于 0.4ml 0.2M KOH, 加0.6ml水, 混合后加入0.1ml 1M Tris-HCl(pH7.8), 并用 HCl¹ 调pH7.8, 最后加4ml乙二醇)。混合后使溶液温度为20℃。

②加入0.05份微球菌核酸酶(150,000u/ml溶在50mM甘氨酸 (pH9.0), 2.5mM CaCl₂中, -20℃存放), 保温。

③加入2份100mM EGTA, 混合。

④加入0.4份40mg/ml磷酸肌酸激酶, 混合。

⑤以250-500μl部分分份冷冻在-70℃。

保温液中包含Hemin, 如缺少 Hemin, 会在保温后不久停止蛋白质合成。

(3) 翻译反应:

①制备翻译混合液:

100μl 100mM亚精胺, 400μl 800mM 磷酸肌酸, 200μl 5mM 各种氨基酸(-Met), 80μl 1M DTT, 1600μl 50mM Hepes (pH7.4), 710μl水, 总体积为3200μl。

将翻译混合液以50—100μl为一份, 分份存放在-70℃。

②标准反应液

2 μ l 翻译混合液, 2 μ l 1M KCl, 0.5 μ l 32.5mM Mg(Ac)₂,
10 μ l [³⁵S]-met (100 μ Ci)

10 μ l 微球菌处理的抽提液, 0.5 μ l 水, 1 μ l RNA, 37 $^{\circ}$ C 保温60
分钟。

KCl 浓度随 mRNA 和不同批的细胞抽提液而改变, 需要测定。
总 RNA 可加到直至 10 μ g 或 0.2 μ g poly A-RNA。加入饱和量的
mRNA, 将会提高 [³⁵S]-met 参入 10—25 倍。在最适条件下,
25 μ l 反应液参入 3×10^6 — 5×10^8 cpm。如需要可增加放射性加入
量, 可蒸发浓缩 [³⁵S]-met 液。

③ 反应产物可用免疫沉淀和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

(十) 蛋白质的凝胶电泳分析

现今几乎每个实验室都广泛应用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋
白质, 这种方法简单、迅速、样品用量少, 用微克量蛋白质就可
测知蛋白质的分子量、等电点等。

聚丙烯酰胺凝胶的三维结构是丙烯酰胺和交联剂双体丙烯酰
胺聚合, 形成具有各种孔径的凝胶, 其实际意义就像一个筛子,
阻止大分子的移动, 特异的孔径适于分辨某些蛋白质混合物, 以
致控制孔的大小是改进电泳效果的一个重要因素 (但不是唯一因
素)。

丙烯酰胺和双体丙烯酰胺聚合是一种自由基成链反应。通常
用过硫酸铵 (~0.3% w/v) 和四甲基乙二胺 (Temed ~0.2% v/v)
的混合液启动反应。过硫酸铵激活四甲基乙二胺, 使之产生一个
未配对电子, 这个基团和一个丙烯酰胺分子反应, 生成一个新的
基团, 其再和另一个丙烯酰胺反应, 以致生成一种聚合物, 偶尔
双体丙烯酰胺分子的一端连到一个聚合物中, 而这个双体丙烯酰
胺分子的另一端则连到另一个聚合物中, 如此形成一种网状结构。
聚合时, 交联是随机的, 凝胶中孔的实际大小并不是固定的,
但孔的平均大小却决定于凝胶中丙烯酰胺的量及丙烯酰胺和双体
丙烯酰胺的比例。凝胶中丙烯酰胺含量表示为 % (w/v), 即在凝

胶聚合前每100ml 混合液中丙烯酰胺和双体丙烯酰胺的总克数，交联剂的量通常表示为交联剂同丙烯酰胺的比，为%(w/w)。如果20%的凝胶和15%的凝胶含有相同量的双体丙烯酰胺，则20%凝胶的平均孔径更小。为获得小的平均孔径，最适双体丙烯酰胺和丙烯酰胺比是5%(w/w)，比5%大或小都会产生更大的孔，与丙烯酰胺量关系不大。

市售丙烯酰胺和双体丙烯酰胺放在室温暗处是相当稳定的固体。但几年后可自发地聚合和水解。应用贮存液制备凝胶十分方便，将贮存液放在4℃，在几个月内都是稳定的。凝胶聚合前应将溶液抽气去氧，防止铸胶时形成气泡以及氧化掉自由基，抑制聚合反应。

现已发展了多种聚丙烯酰胺凝胶电泳，包括SDS凝胶电泳、尿素凝胶电泳、缓冲液凝胶电泳、梯度凝胶电泳、等电聚焦凝胶电泳、双向凝胶电泳等，读者有兴趣了解详细原理和操作，可参考J. M. Walker等Techniques in Molecular Biology (1983)和J. E. Celis Two-Dimensional Gel Electrophoresis of protein(1984)。

1. SDS蛋白质抽提液的制备

①制备5ml LB培养液。

②接种所要分析菌株的一个单菌落，30℃振荡培养过夜。

③吸取0.2ml接种10ml LB培养液，37℃振荡培养。

④生长到对数末期。测定细胞密度(OD_{600})，按照下列公式计算抽提时所用的细胞培养液体积。

$$x \text{ ml} = \frac{4.8}{OD_{600}}$$

如 $OD_{600} = 1.0$ 时，则应用4.8ml细胞培养液。

⑤离心，1500g，10分钟。

⑥将细胞悬浮在0.35ml 2×SDS样品缓冲液里。

2×SDS样品缓冲液、20%(w/v)甘油，10%(w/v)2-巯基乙醇，4.6%(w/v) SDS，0.125M Tris-HCl，pH6.8，0.1% 溴酚蓝。

⑦于100℃煮沸样品5分钟。

⑧离心5分钟。

⑨取30—35 μ l进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质

(1) 试剂配制:

分离胶缓冲液: 1.5M Tris-HCl, pH6.8, 0.4% SDS。

浓缩胶缓冲液: 0.5M Tris-HCl, pH6.8, 0.4% SDS。

丙烯酰胺贮存液: 29.2% 丙烯酰胺

0.8% 双体丙烯酰胺

加双蒸水到100ml。溶解后将溶液过滤, 放4℃存放。

10%过硫酸铵溶液: 0.1g过硫酸铵

0.95ml双蒸水 (每次新配制)。

电泳缓冲液: 0.25M Tris-HCl, pH8.3

0.192M甘氨酸

0.1% SDS

样品缓冲液: 20%(W/v)甘油

10%(w/v)2-巯基乙醇

4.6%(w/v) SDS

0.125M Tris-HCl, pH6.8

0.1%溴酚蓝

染色液: 5%(v/v)冰醋酸

10%(v/v)甲醇

染料液: 1%考马斯蓝溶解在双蒸水里

脱色液: 7%(v/v)醋酸溶液

(2) 操作过程:

①1个152×152×0.8mm的板凝胶需要按下表配制15ml分离胶和6ml浓缩胶。将凝胶溶液混合后, 减压抽气, 加入Temed(四甲基乙二胺)凝胶开始聚合

| 试 剂 | 分 离 胶 | | | | | | 4%浓缩胶 |
|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 5% | 7.5% | 10% | 12.5% | 15% | 17.5% | |
| 分离胶缓冲液 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | 3.75 | — |
| 浓缩胶缓冲液 | — | — | — | — | — | — | 1.25 |
| 丙烯酰胺贮存液 | 2.50 | 3.75 | 5.00 | 6.25 | 7.50 | 8.75 | 0.80 |
| 双蒸水 | 8.70 | 7.45 | 6.20 | 4.95 | 3.70 | 2.45 | 3.93 |
| 10%过硫酸铵 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.02 |
| | 减 压 抽 气 | | | | | | 减压抽气 |
| Temed | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.004 |

②将分离胶灌入电泳凝胶板装置，加盖 2—3mm 高的丁醇或水。

③聚合后，用水冲洗除去丁醇或水，而后灌入浓缩胶并且插入梳子。

④浓缩胶聚合后，小心取出梳子，清洗样品槽孔除去未聚合的丙烯酰胺。

⑤安装好电泳装置，倒入电泳缓冲液。

⑥用样品缓冲液制备样品，加入样品槽孔。

⑦电泳在 5—40mA 电流，2—8 小时，或直至染料达到凝胶前沿。

⑧拆开装置，取出凝胶进行染色或放在 3MM 滤纸上干燥进行放射自显影。

(3) 染色操作：

染色溶液和染色方法有多种，下述方法迅速，重现性好。

①将凝胶放在带盖搪瓷盘中，加 50ml 染色液盖放 50—55℃，15 分钟。这可以固定蛋白质带并从凝胶上除去 SDS。

②倒掉染色液，加入 50ml 染色液和 5ml 染料，放 50—55℃，15—20 分钟。

③倒掉染色液，加入 100ml 脱色液，放 50—55℃ 缓慢振荡 15 分钟。

④倒掉脱色液，加入100ml新的脱色液，重复③步骤。

⑤重复④步骤，一般可在5—15分钟后可见蛋白质带。完全脱色需2—24小时，它决定于凝胶的厚度。用小体积脱色液重复洗涤比用大体积洗涤效果更佳。脱色温度可用20°—65℃。

3. 凝胶电泳分离蛋白质的银染色法

染色过程的基本步骤包括固定、洗涤、染色、漂洗、还原、增色、观察。所有溶液用双蒸水配制。整个过程应盖住凝胶盘子，以免溶液蒸发。

①将凝胶放在干净的搪瓷盘内，加入500ml固定液（50% HAc和50%乙醇），缓慢振荡过夜。

②将固定液吸出，加500ml新固定液，振荡2小时。

③将固定液吸出，加双蒸水500ml，缓慢振荡，每小时换1次水，共4次。

④将水吸出，加500ml新配制的AgNO₃溶液（1.9g/L AgNO₃溶在双蒸水中，用前减压除氧），振荡2小时。

⑤将AgNO₃吸出，加入双蒸水（去氧气），洗2分钟。

⑥吸取3.75ml HCHO加到500ml去氧的0.75N NaOH溶液中，然后将此溶液倒入凝胶盘中，振荡10分钟。

⑦将⑥还原溶液吸出，加500ml Na₂CO₃（7.5g/L溶在双蒸水中，缓慢振荡1小时，再换一次Na₂CO₃液以除去过剩的NaOH。颜色逐渐显出，通常6小时达到最高效果。凝胶可在Na₂CO₃中贮存数日。可见到黄、红、蓝、绿染色斑。

(十一) 利用Cosmid载体建立基因文库

cosmid是一种质粒载体，应用它进行克隆实验就像应用其它质粒载体一样，不过它含有λ噬菌体的粘性末端(λcos)，故可被离体包装在λ噬菌体头中，形成有侵染力的λ噬菌体，通过侵染进入E. coli，而后DNA分子的行为又如同一个质粒。除了有λcos外，被包装的DNA，其长度必须是在野生型λDNA(49kb)的78% (38 kb) 到105% (51kb) 范围内。由于通常cosmid质粒的大小仅有5-

10kb,因此只有含有外源DNA片段(40—45kb)的cosmid才能被正常包装。cosmid系统允许插入大的DNA片段,正是这个系统的特点。 λ DNA的离体包装是基于 λ 噬菌体头部的形态发生过程,这是一种自我装配的过程。离体包装系统由两株E. coli, BHB2688和BHB2690构成,两株菌携带的 λ 突变体各不相同。BHB2688的 λ 突变体缺失前早期蛋白质pE(Eam)的合成,而BHB2960的 λ 突变体缺失晚期成熟蛋白质pD(Dam)的合成。同时两种原噬菌体都是可以诱导的(CIts),而且还是裂解缺陷(sam),都有 λ 附着位点缺失和一种失活的重组系统。分别培养两株菌,通过热诱导便积累 λ 蛋白质,然后把它们合并,通过细胞裂解产生一种包装混合液,含有完整系列的 λ 蛋白质,它们可以在加 λ DNA的离体系统里,自身包装成成熟的 λ 颗粒。

cosmid载体容易构建,即将 λ 噬菌体的cos区插入现成的质粒载体,这个 λ 顺序的大小可以小到400bp,因此构建了一系列的cosmid,它们的大小在5—24kb,克隆DNA的大小范围在28—46kb。常用的cosmidpHC79, 6.4kb,由 λ 的cos区和pBR322构成。

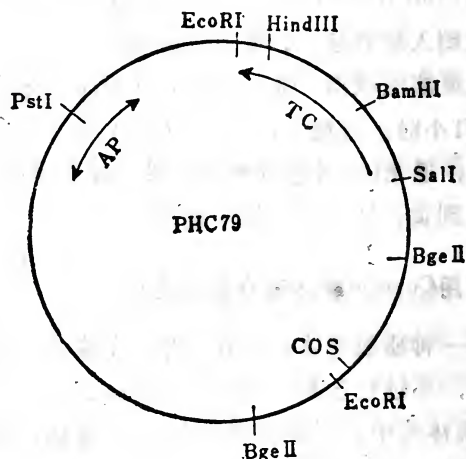


图6-4 pHC79的限制性内切酶图谱

下图概括了建立基因文库的基本步骤:

$$N = \ln(1 - 0.99) / \ln(1 - 0.0008) = 5754$$

于是建立这个基因文库需选择5754个菌落。

下面叙述用cosmid pHC79建立基因文库的基本操作。

1. Sau 3A酶部分消化细菌DNA

①分离高分子染色体DNA的方法参见第一节所述。

②在1.5ml小离心管里，依次加入

H₂O 至终体积150μl

10 × Sau 3A缓冲液 15μl

DNA 10μg

10 × Sau 3A缓冲液：500mM NaCl，

60mM Tris-HCl, pH7.5

50mM MgCl₂

1mg/ml小牛血清蛋白

③取9个1.5ml小离心管，标上数字，置冰浴。向第一管加入30μl步骤②混合液，向2—8管依次加入15μl混合液，剩余的混合液放入第9管。

④将4单位的Sau 3A加入第一管，混合(即每μg DNA用2单位的酶)，吸取15μl加入第二管，混合，吸取15μl加入第三管，依次加到第8管，第9管不加其它溶液。

⑤置各管在37℃下保温1小时。

⑥把各管置冰浴，加入EDTA至20mM停止反应。

⑦将第1—9管样品和已知分子量的DNA样品加在0.7%琼脂糖凝胶上，电泳过夜(1—2v/cm)。

⑧用溴化乙锭染色凝胶，蒸馏水洗涤后在紫外灯下观察，根据已知分子量的DNA条带，确定哪一管有合适的反应，即产生大量的所需DNA大小，计算出每μg DNA需要多少酶进行反应。

⑨在最适条件下，消化200-500μg DNA。

⑩取1μg消化后的DNA，电泳在0.7%琼脂糖凝胶上，鉴定DNA片段的大小。

⑪用等体积氯仿—异戊醇抽提DNA一次，并用乙醇沉淀

DNA, 将DNA溶解在200 μ l TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)

②用电泳大量分离消化的DNA片段

2. 分离Sau 3A部分消化的45kb DNA片段

①用0.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳分离 Sau 3A 部分消化的DNA片段(Tris-HAc电泳缓冲液, 30mA, 4 $^{\circ}$ C, 20小时)同时电泳40—50kb的标准DNA样品, 例如未消化的 λ DNA。

②用溴化乙锭溶液染色含有分子量标准的凝胶条, 确定含有45kb DNA长度的凝胶部位。

③用刀片切出相应的凝胶区, 并转移到经硅化的带帽玻璃管里。

④以后步骤参见实验5.4

⑤测定DNA浓度。

3. 应用溴化乙锭琼脂糖平皿测定DNA浓度

①制备溴化乙锭琼脂糖平皿: 用蒸馏水煮沸溶解1%琼脂糖, 加入溴化乙锭, 终浓度为5 μ g/ml。于每个平皿中倒20ml琼脂糖溶液。用塑料薄膜包裹平皿, 放4 $^{\circ}$ C可保存几周。应用前将平皿开盖置37 $^{\circ}$ C保温30分钟, 以使平皿干燥。

②制备标准DNA浓度溶液, 可采用鲑精DNA, 浓度从1 μ g/ml到30 μ g/ml, 以5 μ g/ml量逐增。

③取5 μ l不同浓度的标准DNA滴在测定皿上, 将待测DNA适当稀释, 取5 μ l不同稀释度的待测DNA也滴到测定皿上。

④将平皿放37 $^{\circ}$ C保温, 使DNA扩散10—15分钟

⑤将平皿去盖, 在uv灯下观察比较待测DNA与标准DNA的荧光强度, 从而计算测定DNA的浓度。

4. Cosmid杂交分子的形成

①用BamHI酶在标准条件下消化cosmidpHC79DNA

②通过1%琼脂糖凝胶电泳鉴定完全消化pHC79, 并测定DNA浓度。

③吸取2 μ g插入DNA同BamHI消化的pHC79DNA混合, 充分

子比为1:3。

④用乙醇沉淀，并将DNA溶解在连接缓冲液中，计算体积使DNA终浓度不低于400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

⑤在标准条件下连接。

⑥连接混合液不能直接用于包装反应，需用等体积的氯仿-异戊醇抽提，而后乙醇沉淀，再溶解在适当体积的TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)缓冲液中。

5. 包装混合液的制备和离体包装反应

(1) 冻融裂解液FTL的制备

预冷全部试剂，离心管和转子。

①将BHB 2688的一个单菌落在2个LB平皿上划线，把平皿分别保温在30 $^{\circ}\text{C}$ 和42 $^{\circ}\text{C}$ ，正常的BHB 2688只在30 $^{\circ}\text{C}$ 生长。

②从30 $^{\circ}\text{C}$ 的平皿上挑几个菌落接种500ml LB培养液(用一个2000ml三角瓶)。

③30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养4—5小时，至细胞密度约为 $3 \times 10^8/\text{ml}$ ($\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.6$)。

④将培养瓶放在90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴里迅速摇动，使培养液温度提高到43 $^{\circ}\text{C}$ (用一个酒精消毒的温度计测定)，而后立即放入43 $^{\circ}\text{C}$ 水浴，强力振荡15分钟，再放入38 $^{\circ}\text{C}$ 水浴强力振荡2.5小时。

⑤冰浴冷却培养瓶，将培养液倒入2个离心管中，离心10,000g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15分钟。弃去上清液，除尽液滴，置细胞沉淀于冰浴。

⑥向一个离心管加入0.3ml冰冷的含10%蔗糖的50mM Tris-HCl溶液(pH7.4)，悬浮细胞(不可用振荡器)，将悬液移入另一个离心管，悬浮细胞，用0.3ml冰冷的10%蔗糖, 50mM Tris-HCl溶液(pH7.4)洗刷前一个离心管，再转移到后一个离心管中，用移液管充分混合菌液，使之不再有细胞团。

⑦将这种浆状菌液分配到2个冰冷的10ml超速离心管中，每管0.5ml(这些管应耐液氮冷冻)。

⑧向每个离心管加入30 μl 所制备的冷溶菌酶液(2mg/ml 溶

在0.25M Tris-HCl, pH8.0), 迅速混合(不可用振荡器), 立即放液氮里冷冻, 维持15分钟后将管浸冰浴慢融化, 直至变成粘稠液体, 加入125 μ l M1缓冲液。

M1缓冲液: 用前配制, 依次加入

| | |
|----------------------|-------------|
| H ₂ O | 110 μ l |
| β -巯基乙醇 | 1 μ l |
| 0.5M Tris-HCl, pH7.4 | 6 μ l |
| 0.05M亚精胺, 0.1M丁二胺 | 300 μ l |
| (用1M Tris调pH为7.0) | |
| 1M MgCl ₂ | 9 μ l |
| 0.1M ATP(用KOH中和) | 75 μ l |

冰浴中混合, 离心35,000rpm, 25分钟(2 $^{\circ}$ C Beckman 50Ti转子), 而后将离心管冰浴。吸取25 μ l分别加入冰浴的75个带帽的贮存管中, 立即盖帽, 液氮冷冻, 此项操作越快越好。

(2) 超声波抽提液SE的制备

预冷全部试剂, 离心管和转子。

①取BHB2690 -一个单菌落在2个LB平皿上划线, 分别在30 $^{\circ}$ C和42 $^{\circ}$ C。

②—⑤制冻融裂解液步骤同上述1操作②—⑤。

⑥用3ml冰冷缓冲液A(20mM Tris-HCl, pH8.0, 3mMMgCl₂, 10mM β -巯基乙醇, 1mMEDTA) 悬浮细胞沉淀, 并将它转移到一个冰冷的30ml离心管里。

⑦将离心管放在冰盐水中, 用超声波处理细胞, 每次3秒钟, 调至最大检出值, 间隔冷却15秒, 要避免产生泡沫, 悬液变得很粘, 而后又降一些粘度, 呈红色, 处理8—20次后最终溶液为奶油稠度。

⑧离心, 6,000rpm, 2 $^{\circ}$ C, 10分钟(用预冷的sorvall ss-34转子), 如果超声波处理的很合适, 沉淀则少。向上层液加入0.6ml M1缓冲液, 以每管25 μ l量将抽提液分配到冰冷带帽的小管里, 立即放入液氮或-70 $^{\circ}$ C贮存。存放在-20 $^{\circ}$ C会丧失活性。

(3) 离体包装反应

①冰浴融化FTL和SE需15—30分钟。抽提液很粘。

②室温依次缓慢混合SE、DNA、和FTL，但防止起泡。

SE 5 μ l

DNA 直至500ng(DNA体积不得超过3 μ l)

FTL 25 μ l

③室温保温1小时。

④加入300 μ l λ dil液和50 μ l氯仿，振荡混合，离心3分钟分相。吸出小相转移到一个新管中（氯仿在下相）。

λ dil: 每升含Tris 1.21g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.20g

明胶0.1g, 用HCl调pH为7.4, 灭菌。

⑤4 $^{\circ}C$ 暗贮存包装反应液并测滴度。包装效率达 10^4 — 10^6 / μ g DNA。

6. 侵染和重组体的选择

①0.1ml噬菌体包装液同1ml E.coli受体混合例如 E. coli HB101(应用含有0.2%麦芽糖的TB培养液培养受体, TB培养液每升含蛋白胨10g NaCl 5g, 灭菌后加入10ml 1M $MgSO_4$)。

②37 $^{\circ}C$ 保温混合液30—60分钟。

③离心, 洗沉淀后再悬在LB培养液中。

④涂布肉汤平皿(含有适当的抗生素), 筛选转染的细胞。

⑤计算每 μ g插入DNA所产生的抗氨苄青霉素细胞数。

⑥将抗氨苄青霉素菌落复制到含四环素平皿上, 测定polycosmids(Ap^rTc^r)百分数。

每 μ g连接的插入DNA应得到 10^4 重组体, 如达不到这个数值则要重新制备45kb大小的DNA片段。另一个影响因素是载体和插入DNA的克分子比和连接液中DNA的浓度。低百分数的polycosmids说明建立了一个好的cosmid基因文库。进一步应测定基因文库是否是完整的, 这可通过转染营养缺陷突变体来测定。

(白应林)

附 录

一、主要的遗传学期刊目录

【说明】

1. 本目录收编了国内外有关遗传学期刊共200种, 中文刊名按拉丁字母顺序排列。

2. 本目录的著录项目包括刊名、译名、创刊年、出版编辑机构、国别、期次和国际刊号(ISSN)。

3. 刊名前有“*”号者, 系指遗传学核心期刊, 共52种。首先按“文摘法”分析了《遗传学文摘》(Genetics Abstracts) 1986年全年12期的被摘文摘8635条, 涉及到819种期刊, 按每种期刊被摘次数的多少, 排列出一个顺序表, 摘自此表前46种期刊的计有5202条, 占全年文摘总数的60%以上, 故是遗传学的核心期刊。根据中国科学院遗传研究所图书馆近三年的借出率排列出一个顺序表, 与核心期刊对照、比较、出借率最高的期刊, 基本与核心期刊相吻合。又参考中国科学院生物学口各研究所图书馆和上海复旦大学遗传所图书室的期刊订购情况, 又筛选出6种期刊, 连同前46种期刊, 共选择出遗传学核心期刊52种, 供遗传学工作者参考。

Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology/美国微生物学会年会文摘
(formerly Bacteriological Proceedings)

American Society for Microbiology

1 nos

ISSN 0067-2777

Acta Botanica Sinica/植物学报 1952-

中国植物学会 北京 中国科学院

6 nos

ISSN 0577-7496

Acta Cytologica/细胞学报 1957-

International Academy of Cytology

2 Jaclynn Court. U.S.A.

6 nos

ISSN 0001-5547

Acta Experimentali-Biologica Sinica/实验生物学报 1954-

实验生物学报编辑委员会 上海 科学技术出版社

4 nos

ISSN 0001-5334

Acta Genetica Sinica/遗传学报 1974-

中国遗传学会 北京 科学出版社

6 nos

ISSN 0379-4172

Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae/遗传医学与双生学学报

Alan R. Liss, Inc. U.S.A.

4 nos

ISSN 0001-5660

Acta Microbiologica Sinica/微生物学报 1953-

中国微生物学会 北京 科学出版社

4 nos

ISSN 0001-6209

Acta Virologica/病毒学报 1957-

Academic Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0001-723X

Acta Zoologica Sinica/动物学报 1953-

中国动物学会 北京 中国科学院

4 nos

ISSN 0001-7302

Acta Hortique Genetica/植物遗传学报 1943-

Plant Breeding Institute

Weibullsholm

Landskrona, Sweden.

4 nos

ISSN 0002-1172

American Journal of Human Genetics/美国人类遗传学杂志 1949-

University of Chicago Press.

6 nos

ISSN 0002-9297

American Journal of Medical Genetics/美国医学遗传学杂志 1977-

Alan R. Liss, Inc. U.S.A.

12 nos

ISSN 0148-7299

Animal Breeding Abstracts/家畜育种文摘 1933-

Commonwealth Agricultural Bureaux, UK.

12 nos

ISSN 0003-3499

Animal Genetics/动物遗传学 1970-

(formerly Animal Blood Groups and Biochemical Genetics),

UK.

4 nos

ISSN 0268-9146

Annales de Genetique/遗传学纪事 1958-

Expansion Scientifique Francaise

France.

4 nos

ISSN 0003-3995

Annales de Genetique et Selection Animal/ 遗传学与动物选育纪事

1969-

Institut National de la Recherche

Agronomique. France.

4 nos

ISSN 0003-4002

Annales d'Embryologie et de Morphogenese/ 胚胎学与形态形成纪事

1968-

Centre National de la Recherche

Scientifique

France.

4 nos

Annals of Human Genetics/ 人类遗传学纪事 1925-

(formerly Annals of Eugenics)

Cambridge University Press. UK.

4 nos

ISSN 0003-4800

Annual Review of Biochemistry/ 生物化学年评 1932-

Annual Reviews. USA.

1 nos

ISSN 0066-4154

Annual Review of Genetics/ 遗传学年评 1967-

Annual Reviews. USA.

1 nos

ISSN 0066-4197

Annual Review of Microbiology/ 微生物学年评 1947-

Annual Reviews. USA.

1 nos

ISSN 0066-4227

Applied Genetics News/ 应用遗传学新闻

Business Communications. Co., Inc. USA.

12 nos

- ISSN 0271-7107
Australian Journal of Agricultural Research/澳大利亚农业研究杂志
1950-
Commonwealth Scientific and
Industrial Research Organization
6 nos
ISSN 0004-9409
Australian Journal of Biological Sciences 澳大利亚生物科学杂志
1948-
Commnwealth Scientific and
Industrial Research Organization
6 nos
ISSN 0004-9417
Bacteriological Reviews/细菌学评论 1916-
American Society for Mricrobiology
4 nos
ISSN 0021-1193
Behavior Genetics/行为遗传学 1977-
Plenum Publishing Co, USA,
6 nos
ISSN 0001-8244
Biochemical Genetics/生化遗传学 1967-
Plenum Publishing Co, USA,
12 nos
ISSN 0006-2928
*Biochimica et Biophysica Acta/生物化学与生物物理学学报 1947-
Elsevier Publishing Co. The Netherlands,
125 nos
ISSN 0006-3002
*Biochimistry/生物化学 1962-
American Chemical Society, U,S.A.
26 nos
ISSN 0006-2960

Biological Bulletin (Woods Hole) / 生物学通报 1898-

woods Hole Oceanographic

Institution

Woods Hole, Mass, U.S.A.,

6 nos

ISSN 0006-3185

Biometrics/生物统计学 1945-

Biometrical Society

U.S.A.,

4 nos

ISSN 0006-341X

BioPolymers/生物聚合物 1963-

John Wiley and Sons, Inc, U.S.A.,

12 nos

ISSN 0006-3525

Biosystems/生物系统 1976-

(formerly Currentsin Moden Biology)

North-Holland Publishing Co. Ireland,

4 nos

ISSN 0303-2647

The Botanical Magazine/植物学杂志 1887-

Botanical Society of JaPan,

Tokyo Japan,

4 nos

ISSN 0006-803X

Botanical Review/植物学评论 1935-

New York Botanical Garden, U.S.A.,

4 nos

ISSN 0006-8101

British Poultry Science/英国家禽科学 1960-

Longman GrouP Ltd, UK,

4 nos

ISSN 0007-1668

Bulletin of Biology/生物学通报 1952-

〈生物学通报〉编委会、编辑部 北京 科学出版社

12 nos

ISSN 0006-3193

Cambridge Scientific Biochemistry Abstracts Part 2; Nucleic Acids

/生物化学文摘：第二部分：核酸 1971-

(formerly Nucleic Acids Abstracts)

Cambridge Scientific Abstracts, U.S.A.,

12 nos

ISSN 0143-3318

*Canadian Journal of Genetics and Cytology/加拿大遗传学与细胞学杂志 1959-

Genetics Society of Canada

Canada.

6 nos

ISSN 0008-4093

Canadian Journal of Microbiology/加拿大微生物学杂志 1954-

National Research Council of Canada.

12 nos

ISSN 0008-4166

Cancer Genetics and Cytogenetics/癌遗传学与细胞遗传学 1979-

Elsevier/North Holland, U.S.A.

12 nos

ISSN 0165-4608

Carnivore Genetics Newsletter/动物遗传通讯 1966-

Carnivore Genetics Research Center

U.S.A.

ISSN 0008-6711

Caryologia/细胞学杂志 1948-

Journal of Cytology, Cytosystematics
and Cytogenetics

Italy,

4 nos

- ISSN 0008-7114
*Cell/细胞 1974-
The MII Press
U.S.A.,
13 nos
ISSN 0092-8674
- Cell Biology International Reports/细胞生物学, 国际报道 1977-
Academic Press, UK,
12 nos
ISSN 0309-1651
- Cell Differentiation/细胞分化 1972-
Elsevier/North-Holland, Ireland,
6 nos
ISSN 0045-6039
- Cellular and Molecular Biology/细胞生物学与分子生物学
Pergamon Press, U.S.A.,
6 nos
ISSN 0145-5680
- Cellular Immunology/细胞免疫学 1970-
Academic Press, U.S.A.
12 nos
ISSN 0008-8749
- La Cellule/细胞 1884-
S. A. Vander
Belgium,
3 nos
ISSN 0008-8757
- Chemistry of Life; Communications of the Chinese Biochemical
Society/生命的化学: 中国生物化学通讯 1981-
«生命的化学—生物化学通讯»编辑部 上海 中国生物化学学会
24 nos
ISSN 1000-1336
- Chinese Journal of Cell Biology/细胞生物学杂志 1979-

细胞生物学杂志编辑委员会 上海 科学技术出版社

4 nos

Chinese Journal Microbiology and Immunology / 中华微生物学和免

疫学杂志 1981-

北京 该会

24 nos

ISSN 0254-5101

Chinese Journal of Virology/病毒学报

病毒学报编委会 北京 中国微生物学会

4 nos

*Chromosoma/染色体 1939-

Springer-Verlag, U.S.A.

10 nos

ISSN 0009-5915

Clinical Genetics/临床遗传学 1970-

Munksgaard Forlag, Denmark.

12 nos

ISSN 0009-9163

CRC Critical Reviews in Microbiology/CRC微生物学评论 1971-

Chemical Rubber Company Press

U.S.A.

4 nos

ISSN 0045-6454

*Crop Science/农作物科学 1961-

Crop Science Society of America

Madison, Wisconsin, U.S.A.

6 nos

ISSN 0011-183X

*Current Genetics/现代遗传学 1980-

Springer-Verlag, U.S.A.

6 nos

ISSN 0172-8083

Cytobios/细胞生物学 1969-

Faculty Press

England.

12 nos

ISSN 0011-4529

Cytogenetics and Cell Genetics/细胞发生学与细胞遗传学 1962-

S. Karger AG, Switzerland.

8 nos

ISSN 0301-0171

*Cytologia (Tokyo) /细胞学 1929-

Botanical Society of Japan

Tokyo, Japan

4 nos

ISSN 0011-4545

*Developmental Biology/发育生物学 1959-

Academic Press, U.S.A.

12 nos

ISSN 0012-1606

Developmental Genetics/发育遗传学 1979-

Alan R. Liss, Inc. U.S.A.

4 nos

ISSN 0192-253X

Differentiation/演变 1976-

Springer-Verlag, U.S.A.

6 nos

ISSN 0301-4681

DNA/脱氧核糖核酸

(formerly Recombinant DNA)

Mary Ann Liebert, Inc.

New York, U.S.A.

4 nos

ISSN 0198-0238

Egyptian Journal of = Genetics and Cytology / 埃及遗传学与细胞学

杂志 1972-

Egyptian Society of Genetics

Department of Genetics

Faculty of Agriculture

Alexandria, University

Alexandria, Egypt

2 nos

ISSN 0046-161X

*The EMBO Journal/欧洲分子生物学组织杂志 1981-

IRL Press Ltd.

Oxford, UK,

12 nos

ISSN 0261-4139

Environmental Mutagenesis/环境导致遗传突变 1979-

Alan R. Liss, Inc. U.S.A.

6 nos

ISSN 0192-2521

Enzyme/酶 1961-

(formerly *Enzymologia Biologica et Clinica*)

S. Karger AG, Switzerland,

8 nos

ISSN 0013-9432

*Euphytica/荷兰植物育种杂志 1952-

Netherlands Journal of Plant

Breeding

Holland;

3 nos

ISSN 0014-2336

*European Journal of Biochemistry/欧洲生物化学杂志 1906-

Springer-Verlag, U.S.A.

24 nos

ISSN 0014-2956

European Journal of Cell Biology/欧洲细胞生物学杂志 1969-

(formerly *Cytobiologic*)

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, WG,

6 nos

ISSN 0171-9335

*Evolution/进化 1947-

Society for the Study of Evolution

Entomology Department

University of Kansas, U.S.A.

6 nos

ISSN 0014-3820

Experimental Cell Biology/实验细胞生物学 1938-

S. Karger AG, Switzerland.

6 nos

ISSN 0304-3568

Experimental Cell Research/实验细胞研究 1950-

Academic Press, U.S.A.

14 nos

ISSN 0014-4827

*Experientia/实验 1945-

Birkhauser Verlag,

Basel; Switzerland.

12 nos

ISSN 0014-4754

*FEBS Letters/欧洲生化学会联合会快报 1968-

Elsevier Biomedical Press,

The Netherlands.

28 nos

ISSN 0014-5793

Federation Proceedings/美国实验生物学联合会会报 1942-

Federation of American Societies

of Experimental Biology, U.S.A.

12 nos

ISSN 0014-9446

*FEMS Microbiology Letters/欧洲微生物学会联合会微生物学快报

- 1977-
Elsevier Biomedical Press,
The Netherlands;
12 nos
ISSN 0378-1097
- Gamete Research/配子研究 1978-
Alan R. Liss, Inc. U.S.A.,
8 nos
ISSN 0148-7280
- *Gene/基因 1976-
Elsevier/Horth-Holland.
15 nos
ISSN 0378-1119
- Gene Analysis Techniques/基因分析技术 1983-
Elsevier Science Publishing Co., Inc.,
New York, U.S.A.
6 nos
ISSN 0735-0651
- Genetic Engineering News/遗传工程新闻 1981-
Mary Ann Liebert, Inc.,
New York; U.S.A.,
6 nos
ISSN 0270-6377
- *Genetica (The Hague) /遗传学 1919-
Dr. W. Junk, Publishers,
The Netherlands,
9 nos
ISSN 0016-6707
- Genetica Agraria/农业遗传学 1946-
Istituto di Zoologia
Universita
Pavia, Italy.
4 nos

ISSN 0016-6685

Cenetica Iberica/伊比里亚遗传学 1949-

Section de Destribucion de

Publicaciones

C. S. I. C. Spain,

ISSN 0016-6693

Genetica Polonica/波兰遗传学 1960-

Institute Plant Genetics

Polish Academy of Science

Poznan, Poland,

4 nos

ISSN 0016-6715

*Genetical Research/遗传学研究 1960-

Cambridge University Press, UK,

6 nos

ISSN 0016-6723

*Genetics/遗传学 1916-

Genetics Society of America, U.S.A.,

12 nos

ISSN 0016-6731

Genetics Abstracts/遗传学文摘 1968-

Cambridge Scientific Abstracts,

Bethesda, U.S.A.

12 nos

ISSN 0016-674X

Genetika i Selekcija/遗传与选种 1968-

Academy of Agricultural Sciences

of Bulgaria

Sofia, Bulgaria,

6 nos

ISSN 0016-6766

*Hereditas/遗传 1920-

J. D. Tornqvists Bokhandel AB

- Landskrona; Sweden.**
4 nos
ISSN 0018-0661
- Hereditas/遗传 1979-**
曾用名: 遗传学通讯, 遗传与育种
中国遗传学会 北京 科学出版社
6 nos
ISSN 0253-9772
- *Heredity/遗传 1947-**
Longman Group Ltd. UK.
6 nos
ISSN 0018-067X
- The Heredity/遗传 1948-**
裳華房, 日本 东京
12 nos
ISSN 0387-0022
- Heredity and Disease/遗传与疾病**
〈遗传与疾病〉编辑委员会 成都华西医科大学
4 nos
ISSN
- Histochemical Journal/组织化学杂志 1969-**
Chapman and Hall
London, England.
12 nos
ISSN 0018-2214
- Histochemistry/组织化学 1958-**
Springer-Verlag, U.S.A.
12 nos
ISSN 0301-5564
- *Human Genetics/人类遗传学 1964-**
(formerly Humangenetik)
Springer-Verlag, U.S.A.
8 nos

ISSN 0340-6717

*Human Heredity/人类遗传学 1950-

(formerly Acta Genetica et Statistica Medica)

S. Karger AG, Switzerland.

6 nos

ISSN 0001-5652

Immunogenetics/免疫遗传学 1974-

Springer-Verlag, USA.

12 nos

ISSN 0093-7711

*Indian Journal of Genetics and Plant Breeding / 印度遗传学与作物育种学杂志 1941-

Indian Agricultural Research Institute

New Delhi 12, India.

3 nos

ISSN 0019-5200

International Journal of Peptide and Protein Research / 国际肽与蛋白质研究杂志 1969-

Munksgaard Förlag, Denmark.

10 nos

ISSN 0367-8377

International Journal of Radiation Biology / 国际辐射生物学杂志 1959-

Taylor and Francis Ltd.

18 Red Lion Court

Fleet Street

London, E.C.4, England.

12 nos

ISSN 0020-7616

In Vitro/离体培养 1965-

Williams and Wilkins, U.S.A.

13 nos

ISSN 0073-5655

- Japanese Journal of Bacteriology/日本细菌学杂志 1944-
日本细菌学会 日本 东京
6 nos
ISSN 0021-4930
- Japanese Journal of Breeding/育种学杂志 1951-
Japanese Society of Breeding c/o
Faculty of Agriculture
University of Tokyo
JaPan.
4 nos
ISSN 0536-3683
- *Japanese Journal of Genetics 遗传学杂志 1921-
Japan Publications Trading Co.
6 nos
ISSN 0021-504X
- Japanese Journal of Human Genetics/人类遗传学杂志 1956-
Institute of Medical Genetics
Tokyo Medical and Dental University
Tokyo, Japan.
4 nos
ISSN 0021-5074
- Japanese Journal of Microbiology/日本微生物学杂志 1951-77
Japan Bacteriologists and Virologists
Department of Microbiology
Keio University School of Medicine
Shinamachi, Shinjuku
Tokyo, Japan.
12 nos
ISSN 0385-5600
- Journal de Génétique Humaine/人类遗传学杂志 1952-
Institute of Medical Genetics
8, Chemin Thury
1205 Genève, Switzerland,

5 nos

ISSN 0021-7743

Journal de Microscopie/显微镜学杂志 1962-

Société Française de Microscopie

Electronique

Ecole Normale Supérieure

Laboratoire de Botanique

4, Rue Lhomond

Paris 5e, France.

9 nos

ISSN 0021-7921

Journal of Applied Bacteriology/应用细菌学杂志 1938-

Academic Press, UK.

6 nos

ISSN 0021-8847

*Journal of Bacteriology/细菌学杂志 1916-

American Society for Microbiology, U.S.A.

12 nos

ISSN 0021-9193

Journal of Biochemistry/生物化学杂志 1922-

Japanese Biochemical Society

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

University of Tokyo.

Tokyo, Japan.

12 nos

ISSN 0021-924X

Journal of Biological Chemistry/生物化学杂志 1905-

Williams and Wilkins, U.S.A.

24 nos

ISSN 0021-9258

Journal of Cellular physiology/细胞生理学杂志 1932-

(formerly Journal of Cellular and Comparative Physiology)

Alan R. Liss, Inc. U.S.A.

12 nos

ISSN 0021-9541

*Journal of Dairy Science/乳品科学杂志 1917-

American Dairy Science Association

113 North Neil Street

Champaign, U.S.A.

12 nos

ISSN 0022-0302

Journal of Embryology and Experimental Morphology / 胚胎学与实验形态学 1952-

Cambridge University Press, UK,

6 nos

ISSN 0022-0752

Journal of Experimental Biology/实验生物学杂志 1923-

Cambridge University Press, UK

6 nos

ISSN 0022-0949

Journal of Experimental Zoology/实验动物学杂志 1904-

Alan R. Liss. Inc. U.S.A.

12 nos

ISSN 0022-104X

*Journal of General Microbiology/普通微生物学杂志 1947-

Cambridge University Press, UK,

12 nos

ISSN 0022-1287

*Journal of General Virology/普通病毒学杂志 1967-

Cambridge University Press, UK,

12 nos

ISSN 0022-1317

Journal of Genetic Psychology/遗传心理学杂志 1891-

Journal Press, U.S.A.,

4 nos

ISSN 0022-1325

Journal of Genetics/遗传学杂志 1910-

Habshiguda-16

Hyderabad-7

India.

3 nos

ISSN

*Journal of Heredity/遗传杂志 1910-

American Genetic Association

Washington, D.C,U.S.A.

6 nos

ISSN 0022-1503

Journal of Histochemistry and Cytochemistry / 组织化学与细胞化学
杂志 1953-

Elsevier/North-Holland,

12 nos

ISSN 0022-1554

Journal of Human Evolution/人类进化杂志 1972-

Academic Press, UK,

8 nos

ISSN 0047-2484

Journal of Immunogenetics/免疫遗传学杂志 1974-

Blackwell Scientific Publications, UK,

6 nos

ISSN 0305-1811

*Journal of Medical Genetics/医学遗传学杂志 1964-

Publishing Department

British Medical Association-House

Tavistock Square

London, England.

6 nos

ISSN 0022-2593

Journal of Molecular and Applied Genetics/分子与应用遗传学杂志

1981-

Raven Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0271-6801

Journal of Molecular and Cellular Immunology / 分子与细胞免疫学

杂志 1984-

Springer-Verlag, WG.

6 nos

ISSN 0724-6803

• Journal of Molecular Biology / 分子生物学杂志 1959-

Academic Press, UK.

36 nos

ISSN 0022-2836

Journal of Molecular Evolution / 分子进化杂志 1971-

Springer-Verlag, WG.

6 nos

ISSN 0022-2844

Journal of the National Cancer Institute / 国立癌症研究所杂志 1940-

National Cancer Institute

Bethesda, Maryland, U.S.A.

12 nos

ISSN

Journal of Neurogenetics / 神经遗传学杂志 1983-

Elsevier/North-Holland.

4 nos

ISSN 0167-7063

Journal of Submicroscopic Cytology / 亚微观细胞学杂志 1969-

Editrice Compositori Biogona

Italy.

4 nos

ISSN 0022-4782

Journal of Ultrastructure Research / 超微结构研究杂志 1957-

Academic Press, U.S.A.

12 nos

ISSN 0022-5320

*Journal of Virology/病毒学杂志 1967-

American Society for Microbiology, USA.

6 nos

ISSN 0022-538X

Lancet/柳叶刀 1823-

Little, Brown & Co.

34 Beacon St.

Boston, Massachusetts, UK.

52 nos

ISSN 0140-6736

Life Sciences/生命科学 1962-

Pergamon Press, U.S.A.

52 nos

ISSN 0024-3205

Mammalian Chromosome Newsletter/哺乳动物染色体通讯 1960-

D. T. O. Hsu

Section of Cell Biology

M. D. Anderson Hospital

Houston, Texas, U.S.A.

4 nos

ISSN

Mankind Quarterly/人类季刊

American Philosophical Society

Library

U.S.A.

4 nos

ISSN 0025-2344

Microbial Genetics Bulletin/微生物遗传通报 1950-

Dr. H. Adler

P. O. Box Y

Oak Ridge National Laboratory

Oak Ridge, Tenn. U.S.A.

irr

ISSN 0026-2579

Molecular Biology and Evolution/分子生物学与进化 1983-

University of Chicago Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0737-4038

Molecular Biology Reports/分子生物学报告 1973-

Dr. W. Junk. Publishers, The Netherlands.

4 nos

ISSN 0301-4851

Molecular and Cellular Biochemistry/分子和细胞生化学 1936-

(formerly Enzymologia)

Dr. W. Junk. Publishers, The Netherlands.

16 nos

ISSN 0300-8177

*Molecular and Cellular Biology/分子和细胞生物学 1981-

American Society for Microbiology,

Washington, USA.

12 nos

ISSN 0270-7300

*Molecular and General Genetics/分子遗传学与普通遗传学 1908-

(formerly Zeitschrift für Vererbungslehre)

Springer-Verlag, WG.

12-16 nos

ISSN 0026-8925

Molecular Immunology/分子免疫学 1964-

Pergamon Press, U.S.A.

12 nos

ISSN 0161-5890

Molecular Pharmacology/分子药理学 1965-

Academic Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0026-395X

*Mutation Research/突变研究 1964-

Elsevier/North-Holland,

42 nos

ISSN 0027-5107

12 nos

ISSN 0000-2578

*Nature/自然界 1869-

Macmillan, UK,

52 nos

ISSN 0028-0836

*Nucleic Acids Research/核酸研究 1974-

Information Retrieval, Ltd.

London England.

24 nos

ISSN 0305-1048

The Nucleus/细胞核 1958-

Cytogenetics Laboratory Department of Botany University of
Calcutta

Calcutta 19, India.

3 nos

ISSN 0029-568X

Perspectives in Biology and Medicine/生物学和医学展望 1957-

University of Chicago Press, USA.

4 nos

ISSN 0031-5982

Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series

B, Biological Sciences/皇家学会哲学汇刊;B辑:生物科学 1665-

The Royal Society

London, England.

irr

ISSN

Phytochemistry/植物化学 1961-

Pergamon Press, U.S.A.

12 nos

ISSN 0031-9422

Plant Breeding Abstracts/植物育种文摘 1930-

Commonwealth Agricultural Bureau, UK,

12 nos

ISSN 0032-0803

*Plant Cell Reports/植物细胞报告 1981-

Springer-Verlag, U.S.A.

6 nos

ISSN 0721-7714

*Plant Cell, Tissue. & Organ Culture/植物细胞, 组织与器官培养

1981-

Kluwer Academic Publishers Group,

Distribution Center,

The Netherlands.

4 nos

ISSN 0167-6857

*Plant Molecular Biology/植物分子生物学 1981-

Kluwer Academic Publishers Group

Distribution Center,

The Netherlands.

4 nos

ISSN 0167-4412

Plant Molecular Biology Reporter/植物分子生物学报道者 1983-

Mary Ann Liebert, Inc.

New York, U.S.A.

4 nos

ISSN 0735-9640

*Plant Science/植物科学 1973-

(formerly Plant Science Letters)

Elsevier Scientific Publishers

Ireland Ltd.

12 nos

ISSN 0304-4211

Plants/植物杂志 1974- (曾用名: 植物学杂志)

中国植物学会 北京 科学出版社

6 nos

ISSN 1000-0631

Plasmid/质体 1978-

Academic Press, U.S.A.

6 nos

ISSN. 0147-619X

Poultry Science/家禽科学 1903-

Poultry Science Association

Texas A & M University

College Station, U.S.A.

12 nos

ISSN 0032-5791

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America/美国国家科学院院报 1915-

National Academy of Sciences

2101 Constitution Avenue

Washington, D.C.

12 nos

ISSN 0027-8424

Progress in Biophysics and Molecular Biology /生物物理学与分子生

物学进展 1950-

Pergamon Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0079-6107

Progress in Histochemistry and Cytochemistry/组织化学与细胞化学

进展 1970-

Gustav Fischer Verlag, WG,

irr

ISSN

Protein, Nucleic Acid, and Enzyme/蛋白质、核酸、酵素 1953-

Kyocitsu Shippun Co., Ltd. Publishers

Tokyo, Japan,

12 nos

ISSN 0039-9450

Protoplasma/原生质 1926-

Springer-Verlag, U. S. A.

15 nos

ISSN 0033-183X

Radiation Botany/辐射植物学 1961-75

Pergamon Press, U.S.A.,

4 nos

ISSN 0033-7560

Radiation Research/辐射研究 1954-

Academic Press, U.S.A.

12 nos

ISSN 0033-7587

***Science/科学** 1880-

American Association for the Advancement of Science

1515 Massachusetts Ave. N. W.,

Washington, D. C. U.S.A.

51 nos

ISSN 0036-8075

Scientia Agricultura Sinica/中国农业科学 1960-

中国农业科学院 北京 该院出版

6 nos

ISSN

Silvae Genetica/森林遗传学 1951-

(formerly Zeitschrift für Forstgenetik und Forstpflanzen-Züchtung)

J. P. Sauerlander's Verlag

West Germany.

6 nos

ISSN 0037-5349

Social Biology/社会生物学 1954-
(formerly Eugenics Quarterly)
University of Chicago Press, U.S.A.

4 nos

ISSN 0037-766X

*Somatic Cell Molecular Genetics/体细胞分子遗传学 1975-
(formerly Somatic Cell Genetics)
Plenum Publishing Company, U.S.A.

6 nos

ISSN 0098-0366

Soviet Genetics/苏联遗传学 1966-
(an English translation of Genetika)
Plenum Publishing Co.

12 nos

ISSN 0038-5409

Stain Technology/生物染色技术 1926-
Williams and Wilkins, U.S.A.

6 nos

ISSN 0038-9153

*Theoretical and Applied Genetics/理论与应用遗传学 1929-
(formerly der Züchter)
Springer-Verlag, U.S.A.

12 nos

ISSN 0040-5752

Theoretical Population Biology/理论群体生物学 1970-
Academic Press, U.S.A.

6 nos

ISSN 0040-5303

Tissue and Cell/组织与细胞 1968-
Longmans Group, Ltd. UK.

6 nos

ISSN 0040-8166

Tissue Antigens/组织抗原 1971-

Munksgaard Förlag, Dinmark,

10 nos

ISSN 0001-2815

Transplantation/移植术 1963-

Williams and Wilkins, USA.

12 nos

ISSN 0041-1337

Transplantation Proceedings/移植学汇刊 1969-

Grune and Stratton, Inc, USA.

4 nos

ISSN 0041-1345

***Trends in Genetics/遗传学趋势 1985-**

Elsevier Science Publishers,

Journal Division,

Amsterdam, The Netherlands.

12+1 nos

ISSN 0168-9525

***Virology/病毒学 1955-**

Academic Press, USA.

12 nos

ISSN 0042-6822

Virus/病毒 1951-

日本病毒学会 东京

2 nos

ISSN 0042-6857

Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology/罗克氏发育生物学文献集 1894-

Springer-Verlag, WG.

6 nos

ISSN 0340-0794

Zeitschrift für Naturforschung, Section B/自然研究杂志B辑 1973-

Verlag der Zeitschrift für

- Naturforschung
West Germany.
12 nos
ISSN 0340-5087
- *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung = Journal of Plant Breeding/
植物育种杂志 1913-
Paul Parey Verlag
West-Berlin, WG.
8 nos
ISSN 0044-3298
- Биохимия/生物化学 1936-
Москва, СССР.
12№
ISSN 0320-9725
- Генетика/遗传学 1965-
Москва, СССР.
12№
ISSN 0016-6758
- Доклады Академии Наук СССР. Серия Биология/苏联科学院报告。
生物学类 1933-
Москва, СССР.
36 №
ISSN 0002-3264
- Молекулярная биология/分子生物学 1967-
Москва, СССР.
6 №
ISSN 0026-8984
- Селекция и семеноводство/选种与育种 1929-
Москва, СССР.
12 №
ISSN 0037-1459
- Успехи современной биологии/现代生物学成就 1932-
Москва, СССР.

6 №

ISSN 0042-1324

*Цитология/细胞学 1959-

Ленинград, СССР.

12 №

ISSN 0041-3771

*Цитология и генетика/细胞学与遗传学 1967-

Киев, СССР.

6 №

ISSN 0564-3783

(白树蕈)

二、高等生物的染色体数

自从Sutton和Boveri提出遗传的染色体学说以来，染色体研究发展很快。染色体的概念是泛指任何一种基因或遗传信息的特定线性序列的连续结构，是一切生物遗传、变异，生长、发育和进化的物质基础。生物界每一种生物都有一定数目的染色体，任何染色体上的变化都将导致生物在形态学、解剖学、遗传学上的变异。因此，了解每种生物的染色体数目，并进行核型的分析，将会对遗传学，育种学和细胞工程学，提供必要和有益的科学资料。本书限于篇幅只能在此介绍一些主要农作物、经济作物、实验植物和一些家畜、家禽、实验动物的染色体数目。在本节末，提供了有关染色体数的专著目录，便于读者查找。

(一) 植物

1. 裸子植物

苏铁属 *Cycas*

苏铁 *C. revoluta* Thunb

$2n = 22$

华南苏铁 *C. rumphii* Mig

$2n = 22$

银杉属 *Cathaya*

银杉 *C. argrophylla*

$2n = 2x = 24$

福建柏属 *Fokienia*

福建柏 *F. hodginsii* Henry et

Thomas

| | | | |
|-------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| | 2n = 24 | | 2n = 40, 60, 90, 100. |
| <u>银杏属</u> | <i>Ginkgo</i> | <u>大麦属</u> | <i>Hordeum</i> x = 7 |
| 银杏 | <i>G. biloba</i> | 北美洲多年生野 生六倍体大麦 | <i>H. arizonicum</i> |
| | 2n = 2x = 24 | | 2n = 6x = 42 |
| <u>落叶松属</u> | <i>Larix</i> | 北美洲多年生野 生四倍体大麦 | <i>H. depressum</i> |
| 落叶松 | <i>L. gmelini</i> Rupr. | | 2n = 4x = 28 |
| | 2n = 24 | 北美洲一年生野 生二倍体大麦 | <i>H. californicum</i> |
| 黄花落叶松 | <i>L. olgensis</i> Henry | | 2n = 2x = 14 |
| | 2n = 24 | 栽培二棱大麦 | <i>H. distichum</i> |
| <u>水杉属</u> | <i>Metasequoia</i> | | L. emend. Lam. |
| 水杉 | <i>M. glyptostroboides</i> | | 2n = 2x = 14 |
| | Hu et Cheng | 二棱野生大麦 | <i>H. spontaneum</i> |
| | 2n = 22 | | C. Koch. |
| <u>松属</u> | <i>Pinus</i> | | 2n = 2x = 14 |
| 白皮松 | <i>P. bungeana</i> Zucc. ex | 大麦 | <i>H. sativum</i> Jess. |
| | Enal | | 2n = 2x = 14 |
| | 2n = 24 | 矮生大麦 | <i>H. vulgare</i> |
| 红松 | <i>P. koraiensis</i> Sieb. et | | 2n = 2x = 14 |
| | Zucc | | 2n = 2x = 14 |
| | 2n = 24 | <u>稻属</u> | <i>Oryza</i> x = 12 |
| <u>罗汉松属</u> | <i>Podocarpus</i> | 普通野生稻 | <i>O. perennis</i> Motnch |
| 罗汉松 | <i>P. macrophyllus</i> | | 2n = 2x = 24 |
| | 2n = 2x = 38 | 秈稻 | <i>O. sativa</i> subsp. <i>shien</i> |
| 2. 被子植物 | | | 2n = 2x = 24 |
| (1) 粮食作物 | | 粳稻 | <i>O. sativa</i> subsp. <i>keng</i> |
| <u>燕麦属</u> | <i>Avena</i> | | 2n = 2x = 24 |
| 燕麦 | <i>A. sativa</i> L. | <u>黍属</u> | <i>Panicum</i> x = 7, 9. |
| | 2n = 6x = 42 | 黍 | <i>P. miliaceum</i> L. |
| 莠麦 | <i>A. nuda</i> L. | <u>狼尾草属</u> | <i>Pennisetum</i> x = 7 |
| | 2n = 6x = 42 | 珍珠粟 | <i>P. glaucum</i> (Linnaeus) |
| 野生抗锈 | <i>A. sterilis</i> L. | | R. Br |
| 燕麦 | 2n = 6x = 42 | | 2n = 2x = 14 |
| <u>薯蓣属</u> | <i>Dioscorea</i> | <u>黑麦属</u> | <i>Secale</i> x = 7 |
| 甘薯 | <i>D. esculenta</i> | 黑麦 | <i>S. cereale</i> L. |
| | (Lour) Bourkhill. | | |

- $2n = 2x = 14$
狗尾草属 *Setaria* $x = 9, 19$.
 谷子 *S. italica* L. Beauv. $2n = 2x = 18$
茄属 *Solanum*
 野生四倍体马铃薯 *S. acaule* Bitt. $2n = 4x = 48$
 早熟马铃薯 *S. stenotomum* Juz. et But. $2n = 2x = 24$
 马铃薯 *S. tuberosum* L. $2n = 4x = 48$
蜀黍属 *Sorghum* $x = 5$
 黑高粱 *S. alatum* $2n = 3x = 10$
 高粱 *S. vulgare* $2n = 4x = 20$
小麦属 *Triticum* $x = 7$
 野生一粒小麦 *T. aegilopodes* $2n = 2x = 14$
 一粒小麦 *T. monococcum* L. $2n = 2x = 14$
 二粒野生外高加索小麦 *T. araraticum* Jakubz. $2n = 4x = 28$
 二粒小麦 *T. dicoccum* (Schrank) Thell $2n = 4x = 28$
 普通小麦 *T. aestivum* L. $2n = 6x = 42$
 密穗小麦 *T. aestivum* ssp. *compactum* (Host) MK $2n = 6x = 42$
 硬粒小麦 *T. durum* Desf. $2n = 4x = 28$
 波斯小麦 *T. persicum* Vav. $2n = 4x = 28$
 波兰小麦 *T. polanicum* L. $2n = 4x = 28$
 斯卑尔脱小麦 *T. spelta* L. $2n = 6x = 42$
 印度矮生小麦 *T. sphaerococcum* Perc. $2n = 6x = 42$
 提莫非维小麦 *T. timopheevi* Zhuk $2n = 4x = 28$
 圆锥小麦 *T. turgidum* L. $2n = 4x = 28$
小黑麦属 *Tritical*
 小黑麦 *Tritical* $2n = 8x = 56$
玉蜀黍属 *Zea*
 玉米 *Z. mays* L. $2n = 2x = 20$
 (2) 经济作物
葱属 *Allium*
 洋葱 *A. cepa* L. $2n = 2x = 16$
 葱 *A. fistulosum* L. $2n = 2x = 16$
 大蒜 *A. sativum* L. $2n = 2x = 16$
芸苔属 *Brassica*
 油菜 *B. campestris* L. $2n = 4x = 38$ (染色体组: C + A)
 青菜(白菜型油菜) *B. chinensis* L. $2n = 2x = 20$ (染色体组: AA)
 芥菜(芥菜型油菜) *B. juncea* (L.) Coss. $2n = 4x = 36$ (染色体组: B + A)

- 黑芥子 *B. nigra* (L.) K. Kock
 $2n = 2x = 16$ (染色体组: BB)
- 卷心菜 *B. bleifera* var. *capitata* L.
 $2n = 2x = 18$ (染色体组: CC)
- 白菜 *B. pekinensis* Rupr.
 $2n = 2x = 20$ (染色体组: AA)
- 黄麻属 *Corchorus*
 黄麻 *C. capsularis* L.
 $2n = 2x, 4x = 14, 28$
- 长蒴黄麻 *C. olitorius* L.
 $2n = 2x, 4x = 14, 28$
- 棉属 *Gossypium*
 中棉 *G. arboreum* L.
 $2n = 2x = 26$
- 海岛棉 *G. barbadense* L.
 $2n = 4x = 52$
- 草棉(非洲棉) *G. herbaceum* L.
 $2n = 2x = 26$
- 陆地棉 *G. hirsutum* L.
 $2n = 4x = 52$
- 印度棉 *G. indicum* Lam.
 $2n = 2x = 26$
- 加拉帕戈斯棉 *G. klotzschianum*
 Anders.
 $2n = 2x = 26$
- 向日葵属 *Helianthus*
 向日葵 *H. annuus* L.
 $2n = 2x = 34$
- 野生菊芋 *H. tuberosus* L.
 $2n = 6x = 102$
- 烟草属 *Nicotiana*
 粉兰烟草 *N. glauca*
 $2n = 24$
- 古氏烟草 *N. goodspeedii*
 $2n = 40$
- 郎氏烟草 *N. langsdorffii*
 $2n = 18$
- 普通烟草 *N. tabacum* L.
 $2n = 48$
- 黄花烟草 *N. rustica* L.
 $2n = 48$
- 野生烟草 *N. sylvestris*
 $2n = 12$
- 茶属 *Thea*
 茶 *T. sinensis* L.
 $2n = 2x = 30$
- 油桐属 *Aleurites*
 日本油桐 *A. cordata* (Thunb) R. Br.
 $2n = 2x = 22$
- 油桐 *A. fordii* (Hemsley) Airy
 -Shaw
 $2n = 2x = 22$
- 木油桐 *A. montana* Lour.
 $2n = 2x = 22$
- (3) 果树
- 猕猴桃属 *Actinidia*
 中华猕猴桃 *A. chinensis* Planch
 $2n = 116, 160.$
- 软枣猕猴桃 *A. arguta* Sieb. et Planch et mig
 $2n = 4x = 116$
- 柑桔属 *Citrus*
 柚子 *C. grandis* (L.) Osbeck
 $2n = 2x = 18$
- 柠檬 *C. limon* (L.) Burm
 $2n = 2x, 4x = 18, 36$
- 橘子 *C. reticulata* Blanco
 $2n = 2x = 18$
- 龙眼属 *Euphoria*
 龙眼 *E. longan* (Lour.) Steud

$2n = 2x = 30$

荔枝属 *Litchi*

荔枝 *L. chinensis* Sonn

$2n = 2x = 28, 30$

苹果属 *Malus*

沙果 *M. asiatica* Nakai.

$2n = 2x = 34$

山荆子 *M. baccata* (L.) Borkh.

$2n = 2x = 34$

海棠果 *M. prunifolia* Borkh.

$2n = 2x = 34$

苹果 *M. pumila* Mill

$2n = 3x = 51$

李属 *Prunus*

李子 *P. domestica* L.

$2n = 6x = 48$

梅 *P. mume* Sieb

$2n = 2x = 16$

桃 *P. persica* (L.) Batsch

$2n = 2x = 16$

櫻桃 *P. pseudocerasus* Lindl.

$2n = 2x, 3x = 16, 24.$

日本櫻花 *P. yedoensis* Matsum.

Yu

$2n = 2x = 16$

梨属 *Pyrus*

杜梨 *P. betulifolia* Bge

$2n = 2x = 34$

白梨 *P. bretschneideri*

$2n = 2x = 34$

葡萄属 *Vitis*

山葡萄 *V. amurensis* BuPr

$2n = 2x = 38$

美国葡萄 *V. labrusca* L.

$2n = 2x = 38$

葡萄 *V. vinifera* L.

$2n = 2x, = 4x = 38, 76,$

枣属 *Ziziphus*

枣 *Z. jujube* Mill.

$2n = 2x, 4x, 5x, 6x, 8x = 24, 48,$

$60, 72, 96.$

(4) 实验植物

山羊草属 *Aegilops* $x = 7$

拟斯卑尔脱山羊草 *A. speltoides*

$2n = 2x = 14$

染色体组 = BB

方穗山羊草
(节节麦) *A. squarrosa* L.

$2n = 2x = 14$ 染色体组 = DD

半山羊草 *A. ventricosa*

$2n = 4x = 28$

冰草属 *Agropyron* $x = 14$

水生冰草 *A. desertorum* (Fisch)

Schult

$2n = 2x = 28$

天兰冰草 *A. intermedium*

$2n = 3x = 42$

鸭跖草属 *Commelina*

鸭跖草 *C. communis* L.

$2n = 4x \quad 6x = 48 \quad 90.$

单冠毛菊属 *Haplopappus*

纤细单冠菊 *H. gracilis*

$2n = 2x = 4$

纳氏单冠菊 *H. reventii*

$2n = 4x = 8$

豌豆属 *Pisum*

豌豆 *P. sativum* L.

$2n = 2x = 14$

野豌豆属 *Vicia*

蚕豆 *V. faba* L.

$2n = 2x = 14$

(二) 动物

1. 节肢动物

飞蝗属 *Locusta*

东西飞蝗 *L. migratoria* L.

$2n = 23(\text{♂})$

稻蝗属 *Oxya*

中华稻蝗 *O. chinensis* Thunberg

$2n = 23(\text{♂})$

2. 脊索动物

文昌鱼属 *Branchiostoma*

文昌鱼 *B. belcheri* Gray

$2n = 24$

3. 脊椎动物

(1) 鱼类

大麻哈鱼属 *Oncorhynchus*

大麻哈鱼 *O. keta* Walbaum

$2n = 74$

草鱼属 *Ctenopharyngodon*

草鱼 *C. idellus* Guvier et Valenciennes

$2n = 48$

鲂属 *Megalobrama*

圆头鲂 (武昌鱼) *M. amblycephala* Yih

$2n = 48$

鲮属 *Cirrhinus*

鲮鱼 *C. molitorella* Cuvier et Valenciennes

$2n = 50$

鳊属 *Carassius*

鲫鱼 *C. auratus* L.

$2n = 100$

金鱼 *C. auratus auratus* L.

$2n = 100$

鲤属 *Cyprinus*

鲤鱼 *C. carpio* L.

$2n = 100$

鳙属 *Aristichthys*

鳙 *A. nobilis* Richardson

$2n = 48$

鲢属 *Hypophthalmichthys*

白鲢 *H. molitrix* Cuvier et Valenciennes

$2n = 43$

罗非鱼属 *Tilapia*

加纳罗非鱼 *T. galilaeus*

$2n = 44$

尼罗罗非鱼 *T. nilota* L.

$2n = 44$

(2) 鸟类

鸭属 *Anas*

鸭 *A. platyrhynchos domesticus* L.

$2n = 79(\text{♀}), 80(\text{♂})$

鹅属 *Cygnos*

鹅 *C. cygnopsis domesticus* L.

$2n = 81(\text{♀}), 82(\text{♂})$

原鸡属 *Gallus*

鸡 *G. gallus domesticum* Brisson

$2n = 77(\text{♀}), 78(\text{♂})$

鸽属 *Columba*

野鸽 *C. livia* Gmelin

$2n = 16$

家鸽 *C. livia domestica* L.

$2n = 79(\text{♀}), 80(\text{♂})$

3. 哺乳动物

猫熊属 *Ailuropoda*

大熊猫 *A. melanoleuca* Giant

| | | |
|-----|---|---------------------------------------|
| | Tania | 2n = 40 (♂) |
| | 2n = 42 | 家猪 <i>S. scrofa domestica</i> Brisson |
| 猫属 | <i>Felis</i> | 2n = 38 |
| 家猫 | <i>F. libyca domestica</i> Brisson | 4. 实验动物 |
| | 2n = 38 | 蚕属 <i>Bombyx</i> |
| 野牛属 | <i>Bos</i> | 家蚕 <i>B. mori</i> L. |
| 黄牛 | <i>B. taurus</i> | 2n = 50 (♀, ♂) |
| | 2n = 60 | 仓鼠属 <i>Cricetulus</i> |
| 牦牛 | <i>B. grunniens</i> L. | 黑线仓鼠 <i>C. barabensis</i> |
| | 2n = 60 | 2n = 22 |
| 水牛属 | <i>Bubalus</i> | 果蝇属 <i>Drosophila</i> |
| 水牛 | <i>B. bubalus</i> L. | 美洲果蝇 <i>D. americana</i> |
| | 2n = 48 | 2n = 8 |
| 绵羊属 | <i>Ovis</i> | 豹纹果蝇 <i>D. busckii</i> |
| 绵羊 | <i>O. aries</i> L. | 2n = 6 |
| | 2n = 54 | 得克萨斯果蝇 <i>D. texana</i> |
| 山羊属 | <i>Capra</i> | 2n = 10 |
| 山羊 | <i>C. hircus</i> Linn'e | 小鼠属 <i>Mus</i> |
| | 2n = 60 | 小鼠 <i>M. musculus</i> L. |
| 犬属 | <i>Canis</i> | 2n = 40 |
| 狗 | <i>C. familiaris</i> L. | 小白鼠 <i>M. musculus albula</i> Kishida |
| | 2n = 78 (♂) | 2n = 40 |
| 马属 | <i>Eguus</i> | 穴兔属 <i>Oryctolagus</i> |
| 马 | <i>E. caballus</i> L. | 家兔 <i>O. cuniculus domesticus</i> |
| | 2n = 64 | Gmelin |
| 驴 | <i>E. asinus</i> L. | 2n = 44 |
| | 2n = 62 | 爪蟾属 <i>Xenopus</i> |
| 野猪属 | <i>Sus</i> | 爪蟾 <i>X. laevis</i> Guenther |
| 野猪 | <i>S. leucomystax</i> Temminck et Sehlegel | 2n = 36 |

参考① Benirschke, K. and Hsu, T. G.

Chromosome atlas: fish, amphibians, reptiles and birds.

Vol. 1:3 Springer-Verlag, Berlin, 1973

② Darlington, C. D. & Wylie, A. P.

Chromosome Atlas of Flowering Plants

George Allen and Unwin Ltd. London. 1955

③ Hsu, T. C. and Benirschke, Kure,

An atlas of mammalian chromosomes, V1-7

Berlin, Springer, 1967-73

7V. illus Ref.

④ Makino, Sajiro

An atlas of the chromosome numbers in animals.

ed, rev. and enl. from the original Tokay ed, Ames,

Iowa, State College Press, C1957

⑤ 姚世鸿 <生物的染色体数目> 贵州师大学报丛刊编辑部 1987.

(赵世民)

三、常用缓冲液的配制

一些生物反应常常需要在一定PH值下进行,而且整个反应需要保持PH值基本不变。所以要在一定的缓冲液中进行。下面介绍几种常用的缓冲液的配制。

1. 甘氨酸-盐酸缓冲液(0.05M)

X ml 0.2M 甘氨酸 + Y ml 0.2N HCl, 再加水稀释至200ml

| pH | X | Y | pH | X | Y |
|-----|----|------|-----|----|------|
| 2.2 | 50 | 44.0 | 3.0 | 50 | 11.4 |
| 2.4 | 50 | 32.4 | 3.2 | 50 | 8.2 |
| 2.6 | 50 | 24.2 | 3.4 | 50 | 6.4 |
| 2.8 | 50 | 16.8 | 3.6 | 50 | 5.0 |

甘氨酸分子量 = 75.07.

0.2M 甘氨酸溶液含 15.01g/L.

2. 邻苯二甲酸-盐酸缓冲液(0.05M)

X ml 0.2M 邻苯二甲酸氢钾 + Y ml 0.2N HCl, 再加水稀释到20ml

| pH(20℃) | X | Y | pH(20℃) | X | Y |
|---------|---|-------|---------|---|-------|
| 2.2 | 5 | 4.670 | 3.2 | 5 | 1.470 |
| 2.4 | 5 | 3.960 | 3.4 | 5 | 0.990 |
| 2.6 | 5 | 3.295 | 3.6 | 5 | 0.597 |
| 2.8 | 5 | 2.642 | 3.8 | 5 | 0.263 |
| 3.0 | 5 | 2.032 | | | |

邻苯二甲酸氢钾分子量 = 204.23

0.2M 邻苯二甲酸氢钾溶液含 40.85g/L

3. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

| pH | 0.2M Na ₂ HPO ₄ (毫升) | 0.1M 柠檬酸 (毫升) | pH | 0.2M Na ₂ HPO ₄ (毫升) | 0.1M 柠檬酸 (毫升) |
|-----|---|------------------|-----|---|------------------|
| 2.2 | 0.40 | 19.60 | 5.2 | 10.72 | 9.28 |
| 2.4 | 1.24 | 18.76 | 5.4 | 11.15 | 8.85 |
| 2.6 | 2.18 | 17.82 | 5.6 | 11.60 | 8.40 |
| 2.8 | 3.17 | 16.83 | 5.8 | 12.09 | 7.91 |
| 3.0 | 4.11 | 15.89 | 6.0 | 12.63 | 7.37 |
| 3.2 | 4.94 | 15.06 | 6.2 | 13.22 | 6.78 |
| 3.4 | 5.70 | 14.30 | 6.4 | 13.85 | 6.15 |
| 3.6 | 6.44 | 13.56 | 6.6 | 14.55 | 5.45 |
| 3.8 | 7.10 | 12.90 | 6.8 | 15.45 | 4.55 |
| 4.0 | 7.71 | 12.29 | 7.0 | 16.47 | 3.53 |
| 4.2 | 8.28 | 11.72 | 7.2 | 17.39 | 2.61 |
| 4.4 | 8.82 | 11.18 | 7.4 | 18.17 | 1.83 |
| 4.6 | 9.35 | 10.65 | 7.6 | 18.73 | 1.27 |
| 4.8 | 9.86 | 10.14 | 7.8 | 19.15 | 0.85 |
| 5.0 | 10.30 | 9.70 | 8.0 | 19.45 | 0.55 |

Na₂HPO₄分子量 = 141.98; 0.2M 溶液为 28.40g/L.

Na₂HPO₄·2H₂O分子量 = 178.05; 0.2M 溶液含 35.61g/L

C₆H₈O₇·H₂O分子量 = 210.14; 0.1M 溶液为 21.01g/L

4. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

| pH | 钠离子浓度 (N) | 柠檬酸(g) $C_6O_7H_8 \cdot H_2O$ | 氢氧化钠(g) NaOH 97% | 盐酸(毫升) HCl(浓) | 最终体积 (升)① |
|-----|--------------|----------------------------------|---------------------|------------------|--------------|
| 2.2 | 0.20 | 210 | 84 | 160 | 10 |
| 3.1 | 0.20 | 210 | 83 | 116 | 10 |
| 3.3 | 0.20 | 210 | 83 | 106 | 10 |
| 4.3 | 0.20 | 210 | 83 | 45 | 10 |
| 5.3 | 0.35 | 245 | 144 | 68 | 10 |
| 5.8 | 0.45 | 285 | 186 | 105 | 10 |
| 6.5 | 0.38 | 266 | 156 | 126 | 10 |

① 使用时可以每升中加入1g酚，若最后pH值有变化，再用少量50%氢氧化钠溶液或浓盐酸调节，冰箱保存。

5. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1M)

| pH | 0.1M柠檬酸 (ml) | 0.1M柠檬酸钠 (ml) | pH | 0.1M柠檬酸 (ml) | 0.1M柠檬酸钠 (ml) |
|-----|-----------------|------------------|-----|-----------------|------------------|
| 3.0 | 18.6 | 1.4 | 5.0 | 8.2 | 11.8 |
| 3.2 | 17.2 | 2.8 | 5.2 | 7.3 | 12.7 |
| 3.4 | 16.0 | 4.0 | 5.4 | 6.4 | 13.6 |
| 3.6 | 14.9 | 5.1 | 5.6 | 5.5 | 14.5 |
| 3.8 | 14.0 | 6.0 | 5.8 | 4.7 | 15.3 |
| 4.0 | 13.1 | 6.9 | 6.0 | 3.8 | 16.2 |
| 4.2 | 12.3 | 7.7 | 6.2 | 2.8 | 17.2 |
| 4.4 | 11.4 | 8.6 | 6.4 | 2.0 | 18.0 |
| 4.6 | 10.3 | 9.7 | 6.6 | 1.4 | 18.6 |
| 4.8 | 9.2 | 10.8 | | | |

柠檬酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 分子量 = 210.14; 0.1M 溶液为 21.01g/L。

柠檬酸钠 $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 分子量 = 294.12; 0.1M 溶液为 29.41g/L。

6. 乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.2M)

| pH(18℃) | 0.2M NaAc (ml) | 0.2M HAc (ml) | pH(18℃) | 0.2M NaAc (ml) | 0.2MHAc |
|---------|-------------------|------------------|---------|-------------------|---------|
| 3.6 | 0.75 | 9.25 | 4.8 | 5.90 | 4.10 |
| 3.8 | 1.20 | 8.80 | 5.0 | 7.00 | 3.00 |
| 4.0 | 1.80 | 8.20 | 5.2 | 7.90 | 2.10 |
| 4.2 | 2.65 | 7.35 | 5.4 | 8.60 | 1.40 |
| 4.4 | 3.70 | 6.30 | 5.6 | 9.10 | 0.90 |
| 4.6 | 4.90 | 5.10 | 5.8 | 9.40 | 0.60 |

NaAc·3H₂O分子量 = 136.09;

0.2M溶液为27.22g/L

7. 磷酸盐缓冲液

(1) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(0.2M)

| pH | 0.2M Na ₂ HPO ₄ (ml) | 0.2M NaH ₂ PO ₄ (ml) | pH | 0.2M Na ₂ HPO ₄ (ml) | 0.2M NaH ₂ PO ₄ (ml) |
|-----|---|---|-----|---|---|
| 5.8 | 8.0 | 92.0 | 7.0 | 61.0 | 39.0 |
| 5.9 | 10.0 | 90.0 | 7.1 | 67.0 | 33.0 |
| 6.0 | 12.3 | 87.7 | 7.2 | 72.0 | 28.0 |
| 6.1 | 15.0 | 85.0 | 7.3 | 77.0 | 23.0 |
| 6.2 | 18.5 | 81.5 | 7.4 | 81.0 | 19.0 |
| 6.3 | 22.5 | 77.5 | 7.5 | 84.0 | 16.0 |
| 6.4 | 26.5 | 73.5 | 7.6 | 87.0 | 13.0 |
| 6.5 | 31.5 | 68.5 | 7.7 | 89.5 | 10.5 |
| 6.6 | 37.5 | 62.5 | 7.8 | 91.5 | 8.5 |
| 6.7 | 43.5 | 56.5 | 7.9 | 93.0 | 7.0 |
| 6.8 | 49.0 | 51.0 | 8.0 | 94.7 | 5.3 |
| 6.9 | 55.0 | 45.0 | | | |

Na₂HPO₄·2H₂O分子量 = 178.05; 0.2M溶液为75.61g/L

Na₂HPO₄·12H₂O分子量 = 358.22; 0.2M溶液为71.64g/L

NaH₂PO₄·H₂O分子量 = 138.01; 0.2M溶液为27.6g/L

NaH₂PO₄·2H₂O分子量 = 156.03; 0.2M溶液为31.21g/L

(2) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(1/15M)

| pH | M/15Na ₂ HPO ₄ (ml) | M/15KH ₂ PO ₄ (ml) | pH | M/15Na ₂ HPO ₄ (ml) | M/15KH ₂ PO ₄ (ml) |
|------|--|---|------|--|---|
| 4.92 | 0.10 | 9.90 | 7.17 | 7.00 | 3.00 |
| 5.29 | 0.50 | 9.50 | 7.38 | 8.00 | 2.00 |
| 5.91 | 1.00 | 9.00 | 7.73 | 9.00 | 1.00 |
| 6.24 | 2.00 | 8.00 | 8.04 | 9.50 | 0.50 |
| 6.47 | 3.00 | 7.00 | 8.34 | 9.75 | 0.20 |
| 6.64 | 4.00 | 6.00 | 8.67 | 9.90 | 0.10 |
| 6.81 | 5.00 | 5.00 | 8.18 | 10.00 | 0 |
| 6.98 | 6.00 | 4.00 | | | |

Na₂HPO₄·2H₂O分子量=178.05; 1/15M溶液为11.876g/L

KH₂PO₄分子量=136.09; 1/15M溶液为9.078g/L

8. 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(0.05M)

Xml0.2MKH₂PO₄ + Yml0.2NNaOH加水稀释至20ml

| pH(20℃) | X(ml) | Y(ml) | pH(20℃) | X(ml) | Y(ml) |
|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| 5.8 | 5 | 0.372 | 7.0 | 5 | 2.963 |
| 6.0 | 5 | 0.570 | 7.2 | 5 | 3.500 |
| 6.2 | 5 | 0.860 | 7.4 | 5 | 3.950 |
| 6.4 | 5 | 1.260 | 7.6 | 5 | 4.280 |
| 6.6 | 5 | 1.780 | 7.8 | 5 | 4.520 |
| 6.8 | 5 | 2.365 | 8.0 | 5 | 4.680 |

9. 巴比妥钠-盐酸缓冲液 (18℃)

| pH | 0.04M 巴比妥钠 溶液 (ml) | 0.2N 盐酸 (ml) | pH | 0.04M 巴比妥钠 溶液 (ml) | 0.2N 盐酸 (ml) |
|-----|-----------------------|-----------------|-----|-----------------------|-----------------|
| 6.8 | 100 | 18.4 | 8.4 | 100 | 5.21 |
| 7.0 | 100 | 17.8 | 8.6 | 100 | 3.82 |
| 7.2 | 100 | 16.7 | 8.8 | 100 | 2.52 |
| 7.4 | 100 | 15.3 | 9.0 | 100 | 1.65 |
| 7.6 | 100 | 13.4 | 9.2 | 100 | 1.13 |
| 7.8 | 100 | 11.47 | 9.4 | 100 | 0.70 |
| 8.0 | 100 | 9.39 | 9.6 | 100 | 0.35 |
| 8.2 | 100 | 7.21 | | 100 | |

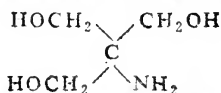
巴比妥钠盐分子量 = 206.18; 0.04M 溶液为 8.25g/L

10. Tris-盐酸缓冲液 (0.05M, 25℃)

50ml 0.1M 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液与 X ml 0.1N 盐酸混匀后, 加水稀释至 100ml。

| pH | X (ml) | pH | X (ml) | pH | X (ml) |
|------|--------|------|--------|------|--------|
| 7.10 | 45.7 | 7.80 | 34.5 | 8.40 | 17.2 |
| 7.20 | 44.7 | 7.90 | 32.0 | 8.50 | 14.7 |
| 7.30 | 43.4 | 8.00 | 29.2 | 8.60 | 12.4 |
| 7.40 | 42.0 | 8.10 | 26.2 | 8.70 | 10.3 |
| 7.50 | 40.3 | 8.20 | 22.9 | 8.80 | 8.5 |
| 7.60 | 38.5 | 8.30 | 19.9 | 8.90 | 7.0 |
| 7.70 | 36.6 | | | | |

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)



分子量 = 121.14;

0.1M 溶液为 12.114g/l。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳, 使用时注意将瓶盖

严。

11. 硼酸-硼砂缓冲液(0.2M硼酸根)

| pH | 0.05M 硼砂 (ml) | 0.2M 硼酸 (ml) | pH | 0.05M 硼砂 (ml) | 0.2 M 硼酸 (ml) |
|-----|------------------|-----------------|-----|------------------|------------------|
| 7.4 | 1.0 | 9.0 | 8.2 | 3.5 | 6.5 |
| 7.6 | 1.5 | 8.5 | 8.4 | 4.5 | 5.5 |
| 7.8 | 2.0 | 8.0 | 8.7 | 6.0 | 4.0 |
| 8.0 | 3.0 | 7.0 | 9.0 | 8.0 | 2.0 |

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分子量 = 381.43; 0.05M 溶液 (= 0.2M 硼酸根) 含 19.0⁷ g/L。

硼酸 H_3BO_3 , 分子量 = 61.84, 0.2M 溶液为 12.37g/L。

硼砂易失去结晶水, 必须在带塞的瓶中保存。

12. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05M)

Xml 0.2M 甘氨酸 + Yml 0.2N NaOH 加水稀释至 200ml

| pH | X | Y | pH | X | Y |
|-----|----|------|------|----|------|
| 8.6 | 50 | 4.0 | 9.6 | 50 | 22.4 |
| 8.8 | 50 | 6.0 | 9.8 | 50 | 27.2 |
| 9.0 | 50 | 8.3 | 10.0 | 50 | 32.0 |
| 9.2 | 50 | 12.0 | 10.4 | 50 | 38.6 |
| 9.4 | 50 | 16.8 | 10.6 | 50 | 45.5 |

甘氨酸分子量 = 75.07; 0.2M 溶液含 15.01g/L

13. 硼砂-氢氧化钠缓冲液(0.05M 硼酸根)

Xml 0.05M 硼砂 + Yml 0.2N NaOH 加水稀释至 200ml

| pH | X | Y | pH | X | Y |
|-----|----|------|------|----|------|
| 9.3 | 50 | 6.0 | 9.8 | 50 | 34.0 |
| 9.4 | 50 | 11.0 | 10.0 | 50 | 43.0 |
| 9.6 | 50 | 23.0 | 10.1 | 50 | 46.0 |

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分子量 = 381.43; 0.05M 溶液为 19.07g/L。

14. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1M)

Ca²⁺、Mg²⁺存在时不得使用

| pH | | 0.1M Na ₂ CO ₃ (ml) | 0.1M NaHCO ₃ (ml) |
|-------|-------|---|------------------------------|
| 20℃ | 37℃ | | |
| 9.16 | 8.77 | 1 | 9 |
| 9.40 | 9.12 | 2 | 8 |
| 9.51 | 9.40 | 3 | 7 |
| 9.78 | 9.50 | 4 | 6 |
| 9.90 | 9.72 | 5 | 5 |
| 10.14 | 9.90 | 6 | 4 |
| 10.28 | 10.03 | 7 | 3 |
| 10.53 | 10.28 | 8 | 2 |
| 10.83 | 10.57 | 9 | 1 |

Na₂CO₃·10H₂O分子量=286.2; 0.1M溶液为28.62g/L。

NaHCO₃分子量=84.0; 0.1M溶液为8.40g/L。

(赵世民)

四、植物、动物及微生物的常用培养基

目前迅速发展的生物技术都离不开培养技术。培养基种类繁多,并在不断地修改发展之中。这里汇集一些目前常用的培养基,以便工作中查阅。

(一)植物材料的常用培养基

1. 适用于组织培养的培养基(表中培养基的用量单位均为mg/L)

(1) 改良怀特(White)培养基(1963)

| | | | |
|-----------------------------------|-----|---|--------|
| MgSO ₄ | 720 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.001 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 300 | ZnSO ₄ | 3 |
| Na ₂ SO ₄ | 200 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.0025 |
| KNO ₃ | 80 | KI | 0.75 |

| | | | |
|---|------|-------------------|-------|
| KCl | 65 | 维生素B ₁ | 0.1 |
| NaH ₂ PO ₄ | 16.5 | 维生素B ₆ | 0.1 |
| H ₃ BO ₃ | 1.5 | 烟酸 | 0.3 |
| MnSO ₄ | 4.5 | 甘氨酸 | 3.0 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 2.5 | 蔗糖 | 20000 |
| | | 肌醇 | 100 |

pH5.6—5.8

生长素、分裂素另加。

(2) MS培养基 (Murashige, Skoog) 1962

| | | | |
|--|-------|--|-------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 | KI | 0.83 |
| KNO ₃ | 1900 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 27.8 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 440 | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 37.3 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 370 | 维生素B ₁ | 0.4 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | 菸酸 | 0.5 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 22.3 | 肌醇 | 100 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.025 | 甘氨酸 | 2.0 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.025 | 蔗糖 | 30000 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 8.6 | | |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.25 | | |

pH5.6—5.8

(3) B₅培养基 (Gamborg, 1968)

| | | | |
|---|-------|--|-------|
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 150 | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.25 |
| KNO ₃ | 2500 | KI | 0.75 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134 | Na-Fe-EDTA | 28.0 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 250 | 维生素B ₁ | 10.0 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 150 | 维生素B ₆ | 1.0 |
| H ₃ BO ₃ | 3.0 | 菸酸 | 1.0 |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 10.0 | 肌醇 | 100 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.025 | | |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.025 | 蔗糖 | 20000 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 2.0 | | |

pH = 5.5

(4) Schenk, Hildebrandt培养基 (1972)

| | | | |
|------------------|------|---------------------------------------|------|
| KNO ₃ | 2500 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 15.0 |
|------------------|------|---------------------------------------|------|

| | | | |
|-------------------------|-----|------------------------|-------|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 400 | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 20.0 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 200 | 维生素B ₁ | 5.0 |
| $NH_4H_2PO_4$ | 300 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 10 | 菸酸 | 5.0 |
| H_3BO_3 | 5.0 | 肌醇 | 100 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.0 | 2, 4—D | 0.5 |
| KI | 1.0 | P—氯苯氧基醋酸 | 2.0 |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.2 | 激动素 | 0.1 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.1 | 蔗糖 | 30000 |
| $CcCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.1 | | |

pH 5.9

(5) N₆培养基 (北京植物所、黑龙江省农科院, 1974)

| | | | |
|----------------------|------|----------------------|-------|
| KNO_3 | 2830 | $ZuSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.5 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 463 | H_3BO_3 | 1.6 |
| KH_2PO_4 | 400 | KI | 0.8 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 185 | 甘氨酸 | 2.0 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 166 | 维生素B ₁ | 1.0 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 27.8 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| Na_2-EDTA | 37.3 | 菸酸 | 0.5 |
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 4.4 | 蔗糖 | 50000 |

pH = 5.8

(赵世民)

2. 适于花粉和花药培养的培养基

Vasil培养基 (1959)

| | | | |
|----------------------|-----|-------------------------|-------|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 360 | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.025 |
|----------------------|-----|-------------------------|-------|

| | | | |
|--|-------|---|-------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 260 | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| Na_2SO_4 | 200 | 柠檬酸铁 $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 |
| KNO_3 | 80 | 甘氨酸 | 7.5 |
| KCl | 65 | 菸酰胺 | 1.25 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 165 | 维生素 B_1 | 0.25 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 3.0 | 维生素 B_6 | 0.25 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 | 泛酸钙 | 0.25 |
| H_3BO_3 | 0.5 | 吡啶乙酸 | 2.0 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 蔗糖 | 10000 |
| pH5.5 | | | |

Bourgin, Nitsch培养基 (1967)

| | | | |
|---|-------|--|-------|
| KNO_3 | 950 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 |
| NH_4NO_3 | 720 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.5 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 166 | 维生素 B_1 | 0.5 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 185 | 维生素 B_6 | 0.5 |
| KH_2PO_4 | 68 | 菸酸 | 5.0 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 25 | 叶酸 | 0.5 |
| H_3BO_3 | 10.0 | 生长素 | 0.05 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | 甘氨酸 | 2.0 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 肌醇 | 100 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 蔗糖 | 20000 |
| PH5.5 | | | |

Nitsch培养基 (1974)

| | | | |
|---|-------------------|--------|-------|
| KNO_3 | 950 | 肌醇 | 5000 |
| NH_4NO_3 | 720 | L-谷氨酰胺 | 800 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 185 | L-丝氨酸 | 100 |
| CaCl_2 | 166 | 玉米素 | 0.01 |
| KH_2PO_4 | 68 | 吡啶乙酸 | 0.1 |
| FeNa_2EDTA | 10^{-4}M | 蔗糖 | 20000 |
| PH5.3 | | | |

Chu, Wong, Sun, Hsü, Yin, Chu, Bi培养基 (1975)

| | | | |
|---|------|--------------------------------------|-------|
| KNO ₃ | 2830 | KI | 0.8 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 463 | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 166 | NaEDTA·2H ₂ O | 37.5 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 185 | 维生素B ₁ | 1.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 400 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 4.4 | 菸酸 | 0.5 |
| H ₃ BO ₃ | 1.6 | 甘氨酸 | 2.0 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1.5 | 蔗糖 | 50000 |

pH5.8

Keller, Rajhathy, Lacapra培养基 (1975)

| | | | |
|---|-------|--------------------------------------|--------|
| KNO ₃ | 2500 | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.02g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134 | 国家标准330Fe | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 750 | (14.2%三氧化 | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 250 | 二铁Fe ₂ O ₃) | 40 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 150 | 维生素B ₁ | 1.0 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 10 | 维生素B ₆ | 1.0 |
| H ₃ BO ₃ | 3.0 | 菸酸 | 1.0 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 2.0 | 谷氨酰胺 | 800 |
| KI | 0.75 | 肌醇 | 100 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 蔗糖 | 100000 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 | | |

pH5.8

马铃薯-II培养基 (庄家骏、欧阳俊闻等, 1978)

| | | | |
|--|------|--|-------|
| KCl | 35 | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 |
| KNO ₃ | 1000 | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 37.3 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 100 | 盐酸硫铵 | 1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 125 | 蔗糖 | 90000 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 | 琼脂 | 7000 |
| KH ₂ PO ₄ | 200 | | |

称取定量的马铃薯（每瓶培养基100克），洗净，切成小块，加一定量的蒸馏水煮沸半小时，用两层纱布过滤，余下的残渣用同样方法再煮一次，过滤，两次液加在一起不要超过培养基总体积的38%。然后加入其它附加成分。

本培养基是小麦花培最佳培养基。

3. 适于胚培养的培养基

Randolph, Cox培养基 (1943)

| | | | |
|--------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| KCl | 65 | Na(PO ₃) _n (标准 | |
| KNO ₃ | 85 | 等级的磷酸钠) | 10.00 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 236.8 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 36 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2.0 | 蔗糖 | 20000 |
| | | 葡萄糖 | 25000 |

Rijven培养基 (1956)

| | | | |
|--------------------------------------|-------|--|--------|
| KH ₂ FO ₄ | 340 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.287 |
| K ₂ HPO ₄ | 87 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.024 |
| CaCl ₂ | 55 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0.12 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 49 | 柠檬酸铁·5H ₂ O | 15 |
| MnSO ₄ | 0.45 | 蔗糖 | 120000 |
| H ₃ BO ₃ | 0.062 | | |

pH6.0

Brooks, Hough培养基 (1958)

| | | | |
|---|------|--|-------|
| Ca(NO ₃) ₂ | 820 | MnSO ₄ | 0.69 |
| MgSO ₄ | 240 | ZnSO ₄ | 0.25 |
| K ₂ SO ₄ | 348 | CuSO ₄ | 0.25 |
| KH ₂ PO ₄ | 104 | MoO ₃ | 0.015 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 132 | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 1.36 |
| NaCl | 58 | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 3.33 |
| H ₃ BO ₃ | 0.57 | | |

Raghavan, Torrey培养基 (1963)

| | | | |
|--|------|---|-------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 480 | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.55 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 63 | 维生素B ₁ | 0.1 |
| KNO_3 | 63 | $\text{FeC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ | 3.08 |
| KCl | 42 | 维生素B ₂ | 0.1 |
| KH_2PO_4 | 60 | 菸酸 | 0.5 |
| H_3BO_3 | 0.56 | 吡啶乙酸 | 0.1 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.36 | 激动素 | 0.001 |
| ZnCl_2 | 0.42 | 硫酸腺嘌呤 | 0.001 |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.27 | 蔗糖 | 20000 |

pH 4.9—5.0

Norstog培养基 (1973)

| | | | |
|---|-------|-------------------|-------|
| KH_2PO_4 | 910 | 维生素B ₁ | 0.25 |
| KCl | 750 | 维生素B ₆ | 0.25 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 740 | 泛酸钙 | 0.25 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 740 | L-谷氨酰胺 | 400 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 3.0 | L-丙氨酸 | 50 |
| H_3BO_3 | 0.5 | L-半胱氨酸 | 20 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 | L-精氨酸 | 10 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | L-亮氨酸 | 10 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | L-苯丙氨酸 | 10 |
| Na_2MoO_4 | 0.025 | L-酪氨酸 | 10 |
| 柠檬酸铁·5H ₂ O | 10.0 | 苹果酸 | 1000 |
| 肌醇 | 50.0 | 蔗糖 | 34200 |

*苹果酸溶在30毫升水中, 用NH₄OH调pH至5.0。

Mitchell, Gildow培养基 (1975)

| | | | |
|---|------|-------------|-------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 250 | 酪氨水解物的全部氨基酸 | |
| KNO_3 | 2500 | 天门冬酸 | 80.00 |
| KH_2PO_4 | 170 | 谷氨酸 | 210.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 400 | 丝氨酸 | 64.0 |

| | | | |
|---|-------|------------------|-------|
| NH_4NO_3 | 1650 | 赖氨酸 | 9.0 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 | 亮氨酸 | 80.0 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | 脯氨酸 | 82.0 |
| H_3BO_3 | 5.0 | 甲硫氨酸 | 27.0 |
| KI | 1.0 | 甘氨酸 | 20.0 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | 或者 | |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 | 酪朊水解物 | 1000 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0 | (用于继代组织培养) | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 30.0 | 2,4-D | 0.5 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 40.0 | 激动素 | 0.1 |
| 菸酸 | 5.0 | 蔗糖 | 30000 |
| 维生素 B_1 | 5.0 | 维生素 B_6 | 0.5 |
| 肌醇 | 100.0 | | |

4. 适于细胞悬浮培养的培养基

Torrey, Reinert培养基 (1961)

| | | | |
|------------------|------|-------|-------|
| 大量和微量元素与 | | 组氨酸 | 2.6 |
| White培养基同 | | 异白氨基酸 | 10.4 |
| (1943) | | 亮氨酸 | 15.6 |
| 维生素 B_1 | 0.1 | 蛋氨酸 | 13.0 |
| 维生素 B_6 | 0.1 | 苯氨基丙酸 | 2.5 |
| 菸酸 | 0.5 | 脯氨酸 | 5.0 |
| 胆汁素 | 10.0 | 酥氨酸 | 6.5 |
| 维生素 B_2 | 0.1 | 色氨酸 | 4.0 |
| 维生素C | 0.1 | 酪氨酸 | 40.0 |
| 泛酸钙 | 0.1 | 缬氨酸 | 13.0 |
| 生长素 | 0.01 | 谷氨酰胺 | 50.0 |
| 肌醇 | 100 | 天冬酰胺 | 20.0 |
| 天门冬酸 | 6.0 | 腺嘌呤 | 2.5 |
| 精氨酸 | 7.8 | 2,4-D | 0.05 |
| 胱氨酸 | 1.5 | 蔗糖 | 20000 |
| 胶氨酸 | 14.0 | | |

甘氨酸

10.0

pH6.0

Graebe, Novelli培养基 (1966)

| | | | |
|--|-------|---|------------|
| Na_2SO_4 | 200 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 170 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| KNO_3 | 80 | H_2SO_4 (比重1.83) | 856(0.5ml) |
| KCl | 70 | 维生素 B_1 | 0.25 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 530 | 维生素 B_6 | 0.25 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 330 | 菸酸 | 1.3 |
| H_3BO_3 | 0.5 | 泛酸钙 | 0.25 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 3.0 | 甘氨酸 | 7.7 |
| 柠檬酸铁 | 10.0 | 天冬酰胺 | 2000 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 蔗糖 | 40000 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | | |

pH6.0

Gamborg, Eveleigh, PRL-4培养基 (1968)

| | | | |
|--|------|---|-------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 90 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 |
| Na_2HPO_4 | 30 | KI | 0.75 |
| KCl | 300 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 13.9 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 200 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 18.6 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 250 | 维生素 B_1 | 10.0 |
| KNO_3 | 1000 | 维生素 B_6 | 1.0 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 150 | 菸酸 | 1.0 |
| H_3BO_3 | 3.0 | 肌醇 | 100 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | 水解酪蛋白 | 20000 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 2,4-D | 2.0 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 蔗糖 | 20000 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3.0 | | |

pH6.2

Veliky, Rose71V培养基 (1973)

| | | | |
|--|------|--|-------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 147 | KI | 0.05 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 200 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 13.9 |
| NH_4NO_3 | 117 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 18.6 |
| NaNO_3 | 85 | 维生素B ₁ | 0.5 |
| KNO_3 | 2190 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 324 | 菸酸 | 1.25 |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 210 | 泛酸钙 | 1.0 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 肌醇 | 100 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 激动素 | 0.25 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4.0 | 苯乙酸 | 0.1 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.5 | 2,4-D | 1.5 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 吡啶乙酸 | 1.0 |
| H_3BO_3 | 5.0 | 蔗糖 | 20000 |

pH5.0

Smith, Stone培养基 (1973)

| | | | |
|--|-------|---|--------|
| Na_2SO_4 | 200 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1600 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 |
| KNO_3 | 80 | 维生素B ₁ | 0.25 |
| KCl | 70 | 维生素B ₆ | 0.25 |
| MgSO_4 | 360 | 菸酸 | 0.0012 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 200 | 泛酸钙 | 0.25 |
| H_3BO_3 | 0.5 | 酵母浸提物 | 5000 |
| MnSO_4 | 2.7 | 吡啶乙酸 | 1.0 |
| 柠檬酸铁 | 13.7 | 蔗糖 | 40000 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.026 | | |

pH5.5

Phillips, SCP培养基 (1974)

| | | | |
|--------------------------|------|---|-------|
| KH_2PO_4 | 300 | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| KNO_3 | 1000 | $\text{Fe}-\text{Na}_2\text{EDTA}$ | 32 |

| | | | |
|--|------|-------------------|-------|
| NH_4NO_3 | 1000 | 甘氨酸 | 2.0 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 500 | 菸酸 | 0.5 |
| KCl | 65 | 维生素B ₁ | 0.1 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 35 | 维生素B ₆ | 0.1 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4.4 | 肌醇 | 100 |
| H_3BO_3 | 1.6 | 2,4-D | 2.0 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.5 | 激动素 | 0.1 |
| KI | 0.75 | 蔗糖 | 30000 |

pH6.0

Phillips, SCN培养基(1974)

| | | | |
|---|------|---|-------|
| KH_2PO_4 | 300 | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 100 | Fe—Na ₂ EDTA | 32 |
| KCl | 65 | 甘氨酸 | 2.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 35 | 菸酸 | 0.5 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4.5 | 维生素B ₁ | 0.1 |
| H_3BO_3 | 1.5 | 维生素B ₆ | 0.1 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.5 | 肌醇 | 100 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 蔗糖 | 30000 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.04 | | |

pH6.0

Law-en Chu, Lark SLCC培养基(1976)

| | | | |
|---|-------|-------------------|-----|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 410 | 维生素B ₆ | 1.0 |
| NH_4NO_3 | 1650 | 维生素B ₁ | 0.3 |
| KNO_3 | 1900 | 肌醇 | 300 |
| KH_2PO_4 | 170 | 胆汁素 | 1.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | 维生素B ₂ | 0.1 |
| KI | 1.4 | 维生素C | 0.1 |
| H_3BO_3 | 6.0 | 泛酸钙 | 0.1 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 生长素 | 0.1 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 腺嘌呤 | 2.5 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 17.0 | 酪朊水解物 | 300 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 激动素 | 1.0 |

| | | | |
|--|------|-------|-------|
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 10.0 | 吡啶乙酸 | 2.0 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | 2,4-D | 2.0 |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 37.3 | 蔗糖 | 20000 |
| 菸酸 | 1.5 | | |

Shannon, Liu培养基(1977)

| | | | |
|--|-----------|---|-------|
| Na ₂ SO ₄ | 200 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 |
| KNO ₃ | 80 | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |
| KCl | 65 | H ₃ BO ₃ | 0.5 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 347 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.025 |
| KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 165 | 柠檬酸铁 | 10.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 530 | 维生素B ₁ | 0.4 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 2.23 | 蔗糖 | 30000 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 | | |
| | pH5.0-6.0 | | |

AA培养基

| | |
|--|-------------|
| KCl | 2950 (mg/L) |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 150 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 250 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 150 |

微量元素和有机成分同B₅培养基

| | |
|-------|---------|
| 氨基酸 | |
| 谷氨酰胺 | 876 |
| 天冬氨酸 | 266 |
| 精氨酸 | 174 |
| 甘氨酸 | 7.5 |
| 蔗糖 | 20克 |
| 2,4-D | 1mg/L |
| 激动素 | 0.2mg/L |
| 赤霉素 | 0.1mg/L |

本培养基适用于水稻细胞悬浮培养

5. 适于原生质体培养的培养基

Nagata, Takebe, (NT)培养基*(1971)

| | | | |
|---|------|--|-------|
| NH_4NO_3 | 825 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| KNO_3 | 950 | $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.03 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 220 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.3 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1233 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 |
| KH_2PO_4 | 680 | 肌醇 | 100 |
| H_3BO_3 | 6.2 | 维生素 B_1 | 1.0 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22.3 | 萘乙酸 | 3.0 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 8.6 | 6-苄基氨基嘌呤 | 1.0 |
| *KI | 0.83 | 蔗糖 | 10000 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 甘露醇 | 0.7M* |

pH5.8

Nitsch, Ohyama, 培养基(1971)

| | | | |
|---|--------|------------------|------|
| CaCl_2 | 1000 | 肌醇 | 100 |
| KNO_3 | 500 | 萘酸 | 5.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 250 | 维生素 B_6 | 0.5 |
| KH_2PO_4 | 25 | 维生素 B_1 | 0.5 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 2.5 | 叶酸 | 0.5 |
| H_3BO_3 | 1.0 | 生长素 | 0.05 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0 | 甘氨酸 | 2.0 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 2,4-D | 1.0 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.0025 | 6-苄基氨基嘌呤 | 1.0 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 | 甘露醇或蔗糖 | 0.6M |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ | 37.3 | | |

pH5.6

* 甘露醇,山梨醇或蔗糖用来保持一定的渗透压,各种植物或同种植物的不同品种间都可能存在差异,此处用量仅做参考。

Ohyama, Nitsch, 培养基(1972)

| | | | |
|--------------------------------------|------|----------------------|------|
| KNO ₃ | 2000 | Na ₂ EDTA | 7.3 |
| KCl | 1500 | 维生素B ₁ | 0.5 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1000 | 肌醇 | 100 |
| NH ₄ NO ₃ | 800 | 菸酸 | 5.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 400 | 维生素B ₆ | 0.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 200 | 生长素 | 0.5 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 50 | 叶酸 | 0.5 |
| H ₃ BO ₃ | 20 | 2,4-D | 0.1 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 20 | 6-苄基氨基嘌呤 | 1.0 |
| Na ₂ MoO ₄ | 0.5 | 甘露醇或蔗糖 | 0.6M |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | | |

pH5.6

Durand培养基(1973)

| | | | |
|---|-------|----------------------|-------|
| NH ₄ NO ₃ | 270 | Na ₂ EDTA | 37.3 |
| KNO ₃ | 1480 | 肌醇 | 100 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 340 | 叶酸 | 0.4 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 570 | 菸酸 | 4.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 80 | 维生素B ₁ | 4.0 |
| H ₃ BO ₃ | 2.0 | 维生素B ₆ | 0.7 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 5.0 | 生长素 | 0.04 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1.5 | 甘氨酸 | 1.4 |
| KI | 0.25 | 2,4-D | 1.4 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.1 | 6-苄基氨基嘌呤 | 0.4 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.015 | 蔗糖 | 0.05M |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.01 | 甘露醇 | 0.3M |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | | |

pH5.6

Harada培养基(1973)

| | | | |
|------------------|-----|----|-----|
| KNO ₃ | 950 | 肌醇 | 100 |
|------------------|-----|----|-----|

| | | | |
|---|-------|------------------|-------|
| NH_4NO_3 | 725 | 菸 酸 | 5.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 190 | 甘氨酸 | 2.0 |
| CaCl_2 | 170 | 维生素 B_5 | 0.5 |
| KH_2PO_4 | 70 | 维生素 B_1 | 0.5 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 12.5 | 叶 酸 | 0.5 |
| H_3BO_3 | 5.0 | 生长素 | 0.05 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 5.0 | 玉米素或苜蓿素腺嘌呤 | 1.0 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.125 | | |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.013 | 2,4-D或菸乙酸 | 1.0 |
| Na_2EDTA | 37.3 | 蔗 糖 | 0.06M |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 | 甘露醇 | 0.63M |
| 谷氨酰胺 | 800 | | |

(Kao, Michayluk)培养基(1975)

培养原生质体和细胞的相同成份

| | | | |
|---|-------|---------------------|--------|
| NH_4NO_3 | 600 | 肌 醇 | 100 |
| KNO_3 | 1900 | 菸酰胺 | 1.0 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 600 | 维生素 B_5 | 1.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 300 | 维生素 B_1 | 1.0 |
| KH_2PO_4 | 170 | 泛酸钙 | 1.0 |
| KCl | 300 | 叶 酸 | 0.4 |
| KI | 0.75 | 氨基苯甲酸 | 0.02 |
| H_3BO_3 | 3.0 | 生长素 | 0.01 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | 氯化胆碱 | 1.0 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2.0 | 维生素 B_2 | 0.2 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | 维生素C | 2.0 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 维生素A | 0.01 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | 维生素 D_3 | 0.01 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 28 | 维生素 B_{12} | 0.02 |
| | | 细胞培养 | 原生质体培养 |
| 2,4-D | 0.1 | | 0.2 |
| 玉米素 | 0.2 | | 0.5 |
| 菸乙酸 | 1.0 | | 1.0 |

| | | |
|-----|-------|-------|
| 蔗糖 | 20000 | 250 |
| 葡萄糖 | 10000 | 68400 |

pH5.6

为了使得率低的细胞和原生质体扩增，培养基中应加入下列成份：

| | | | |
|-------|-----|------|--------|
| 丙酮酸钠 | 20 | 木糖 | 250 |
| 柠檬酸 | 40 | 甘露糖 | 250 |
| 丁烯二酸 | 40 | 鼠李糖 | 250 |
| 反丁烯二酸 | 40 | 纤维二糖 | 250 |
| 果糖 | 250 | 山梨醇 | 250 |
| 胞核糖 | 250 | 甘露醇 | 250 |
| 酪朊水解物 | 250 | 椰乳 | 20毫升/升 |

pH5.5

在培养基中还需加入 21L-氨基酸（包括甘氨酸，谷氨酸和精氨酸），浓度为0.1毫克/升，所包成份为：

| | | | |
|-------|------|-----------|--------|
| 谷氨酰胺 | 5.6 | 谷氨酸 | 0.6 |
| 丙氨酸 | 0.6 | 半胱氨酸 | 0.2 |
| 腺嘌呤 | 0.03 | 椰乳 | 20毫升/升 |
| 鸟嘌呤 | 0.03 | 2, 6-二氧嘧啶 | 0.03 |
| 胸腺嘧啶 | 0.03 | 亚黄嘌呤 | 0.03 |
| 酪朊水解物 | 250 | 黄嘌呤 | 0.03 |

在这种培养基上能使细胞增殖的最低细胞密度为20—25个/毫升。

Von Arnold. Eriksoon LP培养基(1977)

| | | | |
|---|--------|--|----------|
| KH_2PO_4 | 340 | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 2.23 |
| KNO_3 | 1900 | H_3BO_3 | 0.63 |
| NH_4NO_3 | 1200 | ZnEDTA | 4.05 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 18.70 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1760 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 13.90 |
| KI | 0.75 | L-精氨酸 | 0.01微克/升 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | L-亮氨酸 | 0.01微克/升 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.0025 | L-苯丙氨酸 | 0.01微克/升 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.0025 | L-酪氨酸 | 0.01微克/升 |
| 叶酸 | 0.5 | 甘氨酸 | 2000 |

| | | | |
|-------------------|----------|-------|--------|
| 菸酸 | 2.0 | 蔗糖 | 34000 |
| 维生素B ₆ | 1.0 | 葡萄糖 | 180 |
| 维生素B ₁ | 5.0 | 木糖 | 150 |
| 肌醇 | 100 | 阿拉伯糖 | 150 |
| L-谷胺酰胺 | 0.4微克/升 | 山梨醇 | 455000 |
| L-丙氨酸 | 0.05微克/升 | 2,4-D | 1.0 |
| L-半胱氨酸 | 0.02微克/升 | 激动素 | 1.0 |

pH5.8

D₂培养基 李向辉(1981)

| 成份 | | D _{2a} | D _{2b} |
|---|-------|-------------------|-----------------|
| NH ₄ NO ₃ | 270 | 肌醇 | 100 |
| KNO ₃ | 1480 | 烟酸 | 4.0 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 900 | 维生素B ₁ | 4.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 900 | 甘氨酸 | 1.4 |
| KH ₂ PO ₄ | 80 | 维生素B ₂ | 0.7 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | 叶酸 | 0.4 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | 生物素 | 0.04 |
| H ₃ BO ₃ | 2.0 | NAA | 1.5 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 5.0 | 6-BAP | 0.6 |
| ZnSO ₄ ·4H ₂ O | 1.5 | 椰子乳 | 5% |
| KI | 0.25 | 2,4,5-T | 0.5 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.10 | 葡萄糖 | 0.4M |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.015 | 蔗糖 | 0.05M |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.010 | 琼脂 | — |
| | | | 4000 |

pH5.8

K₃培养基:

| | |
|--|------|
| NH ₄ NO ₃ | 250 |
| KNO ₃ | 2500 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 900 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 250 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 150 |

| | |
|---|--------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 134 |
| $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 50 |
| Na_2EDTA | 37.2 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 |
| H_3BO_3 | 3 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 2 |
| KI | 0.75 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| 肌醇 | 100 |
| 维生素B ₁ | 10 |
| 维生素B ₅ | 1 |
| 烟酸 | 1 |
| 木糖 | 250 |
| 蔗糖 | 137000 |
| NAA | 0.1 |
| Kinectin | 0.2 |

pH5.6

过滤灭菌

(二)微生物实验的常用培养基

实验所用的全部试剂均要无菌。一般培养基在15磅/英寸²压力下灭菌20分钟。葡萄糖、氨基酸、生物素等物质在8磅/英寸²压力下灭菌20分钟。抗菌素和酶类物质在无菌条件下用灭菌水配制，或者用滤膜过滤。

L-肉汤液体培养基：

| | |
|-------|--------|
| 胰蛋白胨 | 10克 |
| 酵母提出物 | 5克 |
| 氯化钠 | 10克 |
| 葡萄糖 | 1克 |
| 蒸馏水 | 1000毫升 |

上述成分完全溶解后，用氢氧化钠(NaOH)调pH至7.2

✓ L-肉汤固体培养基:

| | |
|------|--------|
| L-肉汤 | 1000毫升 |
| 琼脂 | 20克 |

✓ L-肉汤半固体培养基:

| | |
|------|--------|
| L-肉汤 | 1000毫升 |
| 琼脂 | 8克 |

✓ 0.3%肉汤软琼脂:

| | |
|------|--------|
| L-肉汤 | 1000毫升 |
| 琼脂 | 3克 |

By培养基:

| | |
|----------|--------|
| 牛肉膏 | 5克 |
| *酵母膏(国产) | 5克 |
| 蛋白胨 | 10克 |
| 氯化钠 | 5克 |
| 葡萄糖 | 5克 |
| 蒸馏水 | 1000毫升 |

用氢氧化钠调pH至7.5

*称酵母膏(国产)5克,溶于少量水中,将酵母浸出液煮沸,待浸出液冷却后,以3000rpm离心5分钟,弃沉淀,将上清液再煮沸离心,经过净化后的酵母浸出液才可配制By培养基。

By固体培养基:

| | |
|---------|--------|
| By液体培养基 | 1000毫升 |
| 琼脂 | 20克 |

Z-肉汤培养基:

| | |
|-----|--------|
| 蛋白胨 | 20克 |
| 牛肉膏 | 6克 |
| 葡萄糖 | 2克 |
| 蒸馏水 | 1000毫升 |

用氢氧化钠调pH至7.5

10×A缓冲液:

| | |
|-----------------------|------|
| 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) | 105克 |
| 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) | 45克 |
| 硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$) | 10克 |

| | |
|---|--------|
| 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 10克 |
| 加蒸馏水至 | 1000毫升 |
| pH7.0 | |

基本固体培养基:

各成份混合比例如下:

| | |
|---|-------|
| 10 × A缓冲液 | 100毫升 |
| 20%糖 | 20毫升 |
| 1毫克/毫升硫酸素(VB_1) | 4毫升 |
| 0.25M硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 4毫升 |
| 2%琼脂 | 880毫升 |
| 各种氨基酸(10毫克/毫升) | 4毫升 |
| 链霉素(50毫克/毫升) | 4毫升 |
| *利福平(25毫克/毫升) | 4毫升 |
| 卡那霉素(5毫克/毫升) | 4毫升 |

*利福平配时, 先加少许甲醇溶解, 再加无菌水至所要的量。

伊红美蓝(EMB)培养基:

| | |
|-----------|--------|
| 糖 | 10克 |
| 蛋白胨(胰蛋白胨) | 8克 |
| 氯化钠 | 5克 |
| 磷酸氢二钾 | 2克 |
| 伊红Y(曙红) | 0.4克 |
| 美蓝 | 0.065克 |
| 琼脂 | 20克 |
| 加蒸馏水 | 1000毫升 |

在加伊红Y和美蓝前调pH至7.2

磷酸盐贮备液Vogel50 ×:

| | |
|--|--------|
| 磷酸氢铵钠(NaCNH_4) $\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 175克 |
| 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 10克 |
| 柠檬酸 | 50克 |
| 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) | 50克 |
| 加蒸馏水至 | 1000毫升 |

10 × 最低盐溶液:

| | |
|-----------------------------------|------|
| 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) | 140克 |
|-----------------------------------|------|

($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 183.4克)

| | |
|-------------------------------------|--------|
| 磷酸二氢钾 | 60克 |
| 硫酸铵 | 20克 |
| 柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) | 10克 |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 2克 |
| 蒸馏水加至 | 1000毫升 |

在蒸馏水中依次溶解上述成份，然后加水至1000毫升。

10×最低盐溶液 + 色氨酸 + 胸腺嘧啶：

| | |
|------------|---------|
| 10×最低盐溶液 | 100毫升 |
| 葡萄糖 | 0.25克 |
| 胸腺嘧啶(thy) | 10微克/毫升 |
| L-色氨酸(trp) | 25微克/毫升 |

10×最低盐溶液固体培养基：

| | |
|----------|--------|
| 10×最低盐溶液 | 1000毫升 |
| 琼脂 | 20克 |

噬菌体培养液(枯草杆菌噬菌体)：

| | |
|----------------------------------|--------|
| 牛肉膏 | 8克 |
| 酵母膏 | 2克 |
| 氯化钠 | 4克 |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.2克 |
| 磷酸二氢钾 | 1.5克 |
| 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) | 5.7克 |
| 蒸馏水加至 | 1000毫升 |
| 氢氧化钠调pH至7.5 | |

噬菌体稀释液(枯草杆菌噬菌体)：

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| 氯化钠 | 20克 |
| 硫酸钾 | 25克 |
| 磷酸二氢钾 | 7.5克 |
| 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 18.8克 |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.6克 |
| 蒸馏水 | 1000毫升 |
| 1%氯化钙($CaCl_2$) | 50毫升(使用时加入) |
| 0.5%三氯化铁($FeCl_3$)(过滤灭菌) | 10毫升(使用前加入) |

生长培养基(CM): (使用时混合比例)

| | |
|-----------------|---------|
| 1×最低盐溶液 | 100毫升 |
| 1M硫酸镁 | 0.5毫升 |
| 50%葡萄糖 | 1毫升 |
| 5%水解酪蛋白(或水解乳蛋白) | 0.4毫升 |
| 受体菌所需氨基酸 | 50微克/毫升 |
| ±10%酵母提出物 | 1毫升 |

转化培养基(TM培养基): (使用时混合比例)

| | |
|-----------------|--------|
| 1×最低盐溶液 | 100毫升 |
| 1M硫酸镁 | 0.5毫升 |
| 50%葡萄糖 | 1毫升 |
| 5%水解酪蛋白(或水解乳蛋白) | 0.2毫升 |
| 氨基酸 | 5微克/毫升 |

*416培养基:

| | |
|-----------------|--------|
| 胰蛋白胨 | 20克 |
| 酵母提出物 | 10克 |
| 氯化钠 | 10克 |
| 去离子水 | 1000毫升 |
| 用10%氢氧化钠调pH至7.2 | |

2×SNM液:

| | |
|-----------------------------|--------|
| 蔗糖(分子量342.3) | 342.3克 |
| 马来酸(分子量160) | 4.64克 |
| 氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 8.13克 |
| 去离子水加到 | 970毫升 |
| 用10%氢氧化钠调pH至6.5(~30毫升) | |

2×SMN(+2%BSA):

| | |
|-----------------------------|--------|
| 蔗糖 | 342.3克 |
| 马来酸 | 4.64克 |
| 氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 8.13克 |
| 去离子水加到 | 700毫升 |
| 用10%氢氧化钠调pH至6.5(~32毫升) | |

灭菌后加入无菌滤膜过滤的牛血清蛋白(BSA)

4×PAB(4×Penassay Broth):

抗菌素培养基(Antibiotic Medium)*3, 就是 Penassay Broth.

Antibiotic Medium*3 70克
去离子水 1000毫升

附: Penassay Broth的配方如下:

| | |
|-------|-------|
| 牛肉膏 | 1.5克 |
| 酵母提出物 | 1.5克 |
| 蛋白胨 | 5克 |
| 葡萄糖 | 1克 |
| 氯化钠 | 3.5克 |
| 磷酸氢二钾 | 3.63克 |
| 磷酸二氢钾 | 1.32克 |

SMMIP(+BSA):

2 × SMM(+BSA) + 4 × PAB (1:1)

再生培养基DM3:

| | |
|-------------------------------|-------|
| (1) 琼脂 | 8克 |
| 去离子水 | 215毫升 |
| (2) 1M琥珀酸钠pH7.3 | 500毫升 |
| (3) 5%水解酪蛋白(无维生素) | 100毫升 |
| (4) 10%酵母提出物 | 50毫升 |
| (5) 3.5%磷酸氢二钾-1.5%磷酸二氢钾 | 100毫升 |
| (6) 50%葡萄糖 | 10毫升 |
| (7) 1M氯化镁(MgCl ₂) | 20毫升 |
| (8) 2%牛血清清蛋白(BSA) | 5毫升 |

牛血清清蛋白无菌滤膜过滤灭菌

以上各种成份, 除BSA之外, 各分别灭菌, 待冷却至50-55℃时混匀。氯化镁需最后加入, 即倒成平板, 否则易产生沉淀; 根据受体菌的营养缺陷型情况还需加入所需的氨基酸20微克/毫升。在转化平板内还需加入适当的抗生素, 用于选择转化子。但在任何再生培养基中都不能加入青霉素, 因为青霉素会抑制细胞壁的再生。

甘露醇再生培养基:

第I部分:

| | |
|-----------------------|-------|
| 去离子水 | 350毫升 |
| 酪蛋白氨基酸(Casamino acid) | 5克 |
| 酵母提出物 | 5克 |

| | |
|--------------------|-------|
| 琼脂 | 8克 |
| 第II部份: | |
| 1.4M甘露醇(pH8.1—8.2) | 500毫升 |
| 明胶 | 15克 |

以上两部份分别灭菌,待冷却到50—55℃,将第I部分倾入第II部份中。在无茵条件下分别加入:

| | |
|---------|-------|
| 50%葡萄糖 | 20毫升 |
| 5%磷酸氢二钾 | 100毫升 |
| 1M氯化镁 | 20毫升 |

此外还需加入受体菌所必需的氨基酸及选择转化子所需的抗生素,混匀倒平板。

再生培养基平板较厚为宜,每一培养皿中的培养基用量不要少于25毫升。

- 10×EcoRI反应缓冲液母液:
- 1000mM Tris-HCl(pH7.2)
 - 50mM氯化镁
 - 20mM 2-巯基乙醇(可以不灭菌)
 - 500mM氯化钠

注意:这里配溶液所用的水必须是重蒸水,不要用去离子水。

如缓冲液离子强度低,即10—20mM Tris-HCl,2mM氯化镁pH为8.5左右时,EcoRI的识别序列改变为4核苷酸,即N↓AATTN。在这条件下起作用的被称为EcoRI⁺活性,

- 10×T₄DNA连接缓冲液:
- 0.1M二硫苏糖醇
 - 0.2M Tris(pH7.6)
 - 0.1M氯化镁
 - 5mM ATP

配溶液的水是重蒸水,不要用去离子水。

ATP用无茵重蒸水配制,并用微孔滤膜过滤。上述缓冲液和ATP液需低温保存。

磷酸缓冲液:(大肠菌体转导实验用)

| | |
|---|--------|
| 磷酸二氢钾 | 2克 |
| 磷酸氢二钾 | 7克 |
| 硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.25克 |
| 蒸馏水加到 | 1000毫升 |

(三) 动物组织培养常用培养基

Eagle氏培养基的成分(毫克/升)

(括弧内为氨基酸的毫克分子当量)

| | 基础培养基(1955年) | 最低主要培养基 (1959年) |
|---|--------------|--------------------|
| 氨基酸 | | |
| L-盐酸精氨酸 | 21(0.1) | 123(0.6) |
| L-胱氨酸 | 12(0.05) | 24(0.1) |
| L-麦酰胺 | 292(2.0) | 292(2.0) |
| L-盐酸组氨酸 | 9.5(0.05) | 38(0.2) |
| L-异亮氨酸 | 26(0.2) | 52(0.4) |
| L-亮氨酸 | 26(0.2) | 52(0.4) |
| L-盐酸赖氨酸 | 36(0.2) | 72(0.4) |
| L-蛋氨酸 | 7.5(0.05) | 15(0.1) |
| L-苯丙氨酸 | 18(0.1) | 32(0.2) |
| L-苏氨酸 | 24(0.2) | 48(0.4) |
| L-色氨酸 | 4(0.02) | 10(0.05) |
| L-酪氨酸 | 18(0.1) | 36(0.2) |
| L-缬氨酸 | 24(0.2) | 48(0.4) |
| 维生素 | | |
| 氯化胆碱 | 1 | 1 |
| 叶酸 | 1 | 1 |
| 肌醇 | 2* | 2 |
| 烟酸 | 1 | 1 |
| 泛酸钙 | 1 | 1 |
| 盐酸吡哆醛 | 1 | 1 |
| 核黄素 | 0.1 | 0.1 |
| 硫胺素 | 1 | 1 |
| 盐类(Earle的BSS) | | |
| NaCl | 6800 | 6800 |
| KCl | 400 | 400 |
| CaCl ₂ | 200 | 200 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 200 | 200 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 150 | 150 |
| NaHCO ₃ | 2000 | 2000 |
| 葡萄糖 | 1000 | 1000 |

生物素(1.0毫克/升)也常包括在内。

*Eagle原方没有,但是商品培养基内常有的。

Finlay氏F16营养混合物的成分(毫克/升)
(括弧内为氨基酸的毫克分子当量)

| 氨基酸 | | 维生素 | |
|----------|--------------|--------------------------------------|---------|
| L-丙氨酸 | 8.91 (0.1) | 生物素 | 0.02 |
| L-盐酸精氨酸 | 211.00 (1.0) | 泛酸钙 | 0.71 |
| L-门冬氨酸 | 13.30 (0.1) | 氯化胆碱 | 0.60 |
| L-盐酸门冬酰胺 | 15.00 (0.1) | 叶酸 | 1.32 |
| L-盐酸半胱氨酸 | 31.50 (0.2) | 肌醇 | 0.54 |
| L-谷氨酸 | 14.70 (0.1) | 烟酰胺 | 0.61 |
| L-麦酰胺 | 146.20 (0.1) | 盐酸吡哆醇 | 0.20 |
| 甘氨酸 | 7.51 (0.1) | 核黄素 | 0.37 |
| L-盐酸组氨酸 | 21.00 (0.1) | 盐酸硫胺素 | 1.01 |
| L-异亮氨酸 | 2.60 (0.02) | 胸腺嘧啶核苷 | 0.73 |
| L-亮氨酸 | 13.10 (0.1) | 维生素B ₁₂ | 1.36 |
| L-盐酸缬氨酸 | 29.30 (0.1) | 核酸衍生物 | |
| L-蛋氨酸 | 4.48 (0.03) | 次黄嘌呤 | 4.03 |
| L-苯丙氨酸 | 4.96 (0.03) | 脂类 | |
| L-脯氨酸 | 11.50 (0.1) | 类脂酸 | 0.20 |
| L-丝氨酸 | 10.50 (0.1) | 葡萄糖之外的碳水化合物 | |
| L-苏氨酸 | 3.57 (0.03) | 丙酮酸钠 | 110.0 |
| L-色氨酸 | 0.60 (0.003) | 盐类 | |
| L-酪氨酸 | 1.81 (0.01) | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 1.52 |
| L-缬氨酸 | 3.50 (0.03) | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.004 |
| | | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.05 |
| | | NaCl | 7400.00 |
| | | KCl | 285.00 |
| | | Na ₂ HPO ₄ | 153.60 |
| | | KH ₂ PO ₄ | 83.00 |
| | | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 152.80 |
| | | CaCl ₂ | 33.30 |
| | | NaHCO ₃ | 1200.00 |
| | | 葡萄糖 | 1100.00 |

综合培养基199的成分(毫克/升)

(括弧内为氨基酸的毫克分子当量)

| 氨基酸 | 辅酶 |
|---------------------|--|
| L-丙氨酸 25.0 (0.30) | A. T. P 10.0 |
| L-盐酸精氨酸 70.0 (0.40) | |
| L-门冬氨酸* 30.0 (0.25) | 还原剂 |
| L-胱氨酸 20.0 (0.75) | 抗坏血酸 0.05 |
| L-谷氨酸* 75.0 (1.00) | L-盐酸半胱氨酸 0.1 |
| L-麦酰胺 100.0 (0.07) | 谷胱甘肽 0.05 |
| 甘氨酸 50.0 (0.70) | |
| L-盐酸组氨酸 20.0 (0.10) | 核酸衍生物 |
| L-羟脯氨酸 10.0 (0.75) | 腺嘌呤 10.0 |
| L-异亮氨酸* 20.0 (0.15) | 鸟嘌呤 0.3 |
| L-亮氨酸* 60.0 (0.45) | 次黄嘌呤 0.3 |
| L-赖氨酸 70.0 (0.20) | 胸腺嘧啶 0.3 |
| L-蛋氨酸* 15.0 (0.20) | 尿嘧啶 0.3 |
| L-苯丙氨酸* 25.0 (0.15) | 黄嘌呤 0.3 |
| L-脯氨酸 40.0 (0.35) | 腺苷酸 0.2 |
| L-丝氨酸* 25.0 (0.25) | |
| L-苏氨酸* 30.0 (0.25) | 脂类 |
| L-色氨酸* 10.0 (0.005) | 胆固醇 0.2 |
| L-酪氨酸 40.0 (0.20) | 吐温80 5.0 |
| L-缬氨酸 25.0 (0.20) | |
| | 葡萄糖以外的碳水化合物 |
| 维生素 | 2-去氧-D-核糖 0.5 |
| 对氨基苯甲酸 0.05 | I)-核糖 0.5 |
| 生物素 0.01 | 醋酸钠 50.0 |
| 泛酸钙 0.01 | |
| 氯化胆碱 0.5 | 盐类 |
| 叶酸 0.01 | NaCl 6300.0 |
| 肌醇 0.05 | KCl 400.0 |
| 烟酸 0.025 | CaCl ₂ 200.0 |
| 烟酰胺 0.025 | MgSO ₄ ·7H ₂ O 200.0 |
| 盐酸吡哆醛 0.025 | NaH ₂ PO ₄ 140.0 |
| 盐酸吡哆醇 0.025 | NaHCO ₃ 2200.0 |
| 核黄素 0.01 | Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O 0.1 |
| 盐酸硫胺素 0.01 | |
| 维生素A 0.10 | 葡萄糖 1000.0 |
| 维生素D 0.10 | |
| 维生素E 0.01 | |
| 维生素K 0.01 | |

Waymouth氏化学培养基MB752/1的成分(毫克/升)

(括弧内为氨基酸的毫克分子当量)

| | | | |
|--------------------|-------------|--------------------------------------|--------|
| 氨基酸 | | 还原剂 | |
| L-盐酸精氨酸 | 75.0 (3.6) | 抗坏血酸 | 17.5 |
| L-门冬氨酸 | 60.0 (4.6) | L-盐酸半胱氨酸 | 90.0 |
| L-胱氨酸 | 15.0 (0.06) | 谷胱甘肽 | 15.0 |
| L-谷氨酸 | 150.0(10.2) | | |
| L-麦酰胺 | 350.0(23.8) | 核酸衍生物 | |
| 甘氨酸 | 50.0 (6.6) | 次黄嘌呤 | 25.0 |
| L-组氨酸 | 150.0 (8.0) | | |
| L-异亮氨酸 | 25.0 (1.9) | 盐类 | |
| L-亮氨酸 | 50.0 (3.8) | NaCl | 6000.0 |
| L-赖氨酸 | 240.0(14.2) | KCl | 150.0 |
| L-蛋氨酸 | 50.0 (3.4) | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 120.0 |
| L-苯丙氨酸 | 50.0 (3.0) | MgCl ₂ ·6H ₂ O | 240.0 |
| L-脯氨酸 | 50.0 (4.4) | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 200.0 |
| L-苏氨酸 | 75.0 (6.4) | Na ₂ HPO ₄ | 300.0 |
| L-色氨酸 | 40.0 (2.0) | KH ₂ PO ₄ | 80.0 |
| L-酪氨酸 | 40.0 (2.2) | NaHCO ₃ | 2240.0 |
| L-缬氨酸 | 65.0 (5.5) | | |
| 维生素 | | 葡萄糖 | 5000.0 |
| 生物素 | 0.02 | | |
| 氯化胆碱 | 250.0 | | |
| 泛酸钙 | 1.0 | | |
| 叶酸 | 0.4 | | |
| 肌醇 | 1.0 | | |
| 烟酰胺 | 1.0 | | |
| 盐酸吡哆醇 | 1.0 | | |
| 核黄素 | 1.0 | | |
| 盐酸硫胺素 | 10.0 | | |
| 维生素B ₁₂ | 0.2 | | |

NCTC 109 培养基的成分(毫克/升)

(括弧内为氨基酸的毫克分子当量)

氨基酸

| | |
|-------------------|--------------|
| L-丙氨酸 | 31.48 (3.5) |
| L- α 氨基正丁酸 | 5.51 (0.5) |
| L-盐酸精氨酸 | 31.00 (1.5) |
| L-门冬酰胺 | 8.09 (0.6) |
| L-门冬氨酸 | 9.91 (0.7) |
| L-胱氨酸 | 10.49 (0.4) |
| D-氨基葡萄糖 | 3.20 (0.2) |
| L-谷氨酸 | 8.26 (0.5) |
| L-麦酰胺 | 135.73 (9.3) |
| 甘氨酸 | 13.51 (1.8) |
| L-组氨酸 | 19.73 (1.3) |
| L-羟脯氨酸 | 4.09 (0.3) |
| L-异亮氨酸 | 18.04 (1.4) |
| L-亮氨酸 | 20.44 (1.6) |
| L-赖氨酸 | 30.75 (2.1) |
| L-蛋氨酸 | 4.44 (0.3) |
| L-鸟氨酸 | 7.38 (0.6) |
| L-苯丙氨酸 | 16.53 (1.0) |
| L-脯氨酸 | 6.13 (0.5) |
| L-丝氨酸 | 10.75 (1.0) |
| L-牛磺酸 | 4.18 (0.3) |
| L-苏氨酸 | 18.93 (1.6) |
| L-色氨酸 | 17.50 (0.9) |
| L-酪氨酸 | 16.44 (0.9) |
| L-缬氨酸 | 25.00 (2.1) |

维生素

| | |
|--------------------|--------|
| 对氨基苯甲酸 | 0.125 |
| 生物素 | 0.025 |
| 泛酸钙 | 0.025 |
| 氯化胆碱 | 1.25 |
| 叶酸 | 0.025 |
| 肌醇 | 0.125 |
| 烟酸 | 0.0625 |
| 烟酰胺 | 0.0625 |
| 盐酸吡哆醛 | 0.0625 |
| 盐酸吡哆醇 | 0.0625 |
| 核黄素 | 0.025 |
| 盐酸硫胺素 | 0.025 |
| 维生素A | 0.025 |
| 维生素D | 0.25 |
| 维生素E | 0.025 |
| 维生素K | 0.25 |
| 维生素B ₁₂ | 10.00 |

辅酶

| | |
|------------|-----|
| DPN | 7.0 |
| TPN | 1.0 |
| 辅酶A | 2.5 |
| 辅羧酶 | 1.0 |
| 腺嘌呤核黄素二核苷酸 | 1.0 |
| UTP | 1.0 |

还原剂

| | |
|----------|-------|
| 抗坏血酸 | 9.9 |
| L-盐酸半胱氨酸 | 253.9 |
| 谷胱甘肽 | 10.4 |

核酸衍生物

续表

| | | |
|--|--------------------------------------|--------|
| | 去氧腺嘌呤核苷 | 10.0 |
| | 去氧胞嘧啶核苷 | 10.0 |
| | 盐酸去氧鸟嘌呤核苷 | 10.0 |
| | 胸腺嘧啶核苷 | 10.0 |
| | 5-甲基胞嘧啶 | 0.1 |
| | 脂类 | |
| | 吐温30 | 22.5 |
| | 葡萄糖以外的碳水化合物 | |
| | 葡萄糖苷酸酯乳酸 | 1.8 |
| | 葡萄糖苷酸酯钠H ₂ O | 1.8 |
| | 醋酸钠3H ₂ O | 50.0 |
| | 盐类 | |
| | NaCl | 6800.0 |
| | KCl | 400.0 |
| | CaCl ₂ | 200.0 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 200.0 |
| | Na ₂ HPO ₄ | 140.0 |
| | NaHCO ₃ | 2200.0 |
| | 葡萄糖 | 1000.0 |

五、酶

(一) 制备植物原生质体常用的酶

| 名称 | 常用浓度(%) | 厂家 |
|------------|---------|--|
| Cellulases | | Kyowa Hakko Kogyo |
| Driselase | 1.0—2.5 | Co. (Japan), Plenum Scientific, Hackensack NJ, |
| Cellulysin | | Yakult Honsha Co (Japan) |

| | | |
|--|---------|---|
| (Onozuka R-10) | 1-3 | Calbiochem San Diego CA |
| Cellulase RS | 1.0 | Yakult Honsha Co (Japan) |
| Meicclase | 1-4 | Meiji Seika kaisha Ita., Tokyo (Japan) |
| Hemicellulase | 1-2 | Corning Glass, Corning, NY |
| Rhozyme | HP150 | Sigma Chemical, St Louis, MO |
| Hemicellulase | 0.2-0.5 | |
| 名 称 | 常用剂量 | 厂 家 |
| Pectinase | 0.5-1.0 | Yakult Honsha Co, (Japan) |
| Macerase | | Calbiochem San Diego CA. |
| Macerozyme | | Corning Glass Covning NY. |
| PectinolAC | 0.15 | Kikkoman Shoyu Co., Lta, (Japan) |
| Pectolyase Y-23 | 0.1 | Hoechst, Germany |
| PATE (Pectic-acia- acetyltvans- ferase) | 0.1 | |
| Zymolyase (制备酵母原生质体) | 2 | 日本东京都中央区 生化学工业株式会社 |
| 溶壁酶 (制备食用菌原生质体) | 1-1.5 | 广东省微生物研究所 |

(二)常用的限制核酸内切酶

| 酶 | 微生物 | 最適温度 (°C) | 识别序列 | 切割位点数 | |
|---------|---------------------------------------|--------------|--------------|-------|------------|
| | | | | λ DNA | PBR322 DNA |
| Acc I | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 37 | GT↓(AG)AC | 7 | 2 |
| Alu I | <i>Arthrobacter luteus</i> | 37 | AG↓CT | 50 | 16 |
| Acu I | <i>Anabaena suboxyndrica</i> | 37 | G↓GNCC | 30 | 15 |
| Age I | <i>Anabaena variabilis</i> | 37 | G↓PyCGPuG | 8 | 1 |
| Ava II | <i>Anabaena variabilis</i> | 37 | G↓G(A)CC | 17 | 8 |
| Avr II | <i>Anabaena variabilis</i> | 37 | CCTAGG↓ | 2 | 0 |
| Bal I | <i>Brevibacterium albidum</i> | 37 | TGG↓CCA | 15 | 1 |
| BamH I | <i>Bacillus amyloquelaciens H</i> | 37 | G↓GATCC | 5 | 1 |
| Bbv I | <i>Bacillus brevis</i> | 37 | GC(A)↓GC | 30 | 21 |
| Bcl I | <i>Bacillus caldolyticus</i> | 60 | T↓GATCA | 7 | 0 |
| Bgl I | <i>Bacillus globigii</i> | 37 | GCCNNNN↓NGGC | 22 | 8 |
| Bgl II | <i>Bacillus stearothermophilus ET</i> | 37 | A↓GATCT | 5 | 0 |
| BstE II | <i>Bacillus stearothermophilus ET</i> | 60 | G↓GTNACC | 11 | 0 |
| BstN I | <i>Bacillus stearothermophilus H7</i> | 60 | CC(A)↓GG | >35 | 6 |
| Cla I | <i>Corynebacterium luteum H7</i> | 37 | AT↓CGAT | 12 | 1 |
| Dde I | <i>Desulfohalobium volcanicum</i> | 37 | C↓TNAG | >50 | 8 |
| Eco R I | <i>Escherichia coli RY 13</i> | 37 | G↓AA↓TTC | 5 | 1 |
| EcoR II | <i>Escherichia coli R 245</i> | 37 | ↓CC(A)GG | >35 | 6 |
| Fnu4H I | <i>Fusobacterium nucleatum 4H</i> | 37 | CG↓NCC | >50 | 42 |
| FnuD II | <i>Fusobacterium nucleatum D</i> | 37 | CG↓CG | >50 | 23 |
| Hae I | <i>Haemophilus aegyptius</i> | 37 | (A)↓CC↓CC(T) | 1 | 7 |

续表1

| 酶 | 微生物 | 最适温度 (°C) | 识别序列 | 切割位点 A pBR322 DNA DNA |
|----------|---|--------------|---|-----------------------------|
| Hae II | | 37 | PuGCGC+Py | >30 11 |
| Hae III | | 37 | GG+C* C | >50 22 |
| Hga I | <i>Haemo philus gallinarum</i> | 37 | GACG-CNNNNN ⁺ CTGCGNNNNNNNNN ⁺ G(A)GC(A):C GCG+C | >50 11 |
| HgiA I | <i>Herpetosiphongi ganteus</i> | 37 | | 20 8 |
| Hha I | <i>Haemophilus haemolyticus</i> | 37 | | >50 31 |
| Hinc II | <i>Haemophilus influenzae</i> (1160) | 37 | GTPy+PuAC | 34 2 |
| Hind II | <i>Haemophilus influenzae</i> R _s | 37 | GTPy+PuAC | 34 2 |
| Hind III | | 37 | A+AGCTT | 6 1 |
| Hinf I | <i>Haemo philus influenzae</i> R ₁ | 37 | G+ANTC | >50 10 |
| Hpa I | <i>Haemo philus parainfluenzae</i> | 37 | GTT+AAC | 11 0 |
| Hpa II | | 37 | C+C*GG | >50 26 |
| Hph I | <i>Haemo philus' parahemolyticus</i> | 37 | GGTGANNNNNNN ⁺ CCACT NNNNNNN ⁺ GGTAC+C | >50 12 |
| Kpn I | <i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8 | 37 | GATC | 2 0 |
| Mbo I | <i>Moraxella bovis</i> | 37 | GAAGANNNNNNN ⁺ CTTCTNNNNNN ⁺ | >50 22 |
| Mbo II | | 37 | CCTC | >50 11 |
| Mnl I | <i>Moraxella nonliquefaciens</i> | 37 | C+CGG | >50 26 |
| Msp I | <i>Moraxella species</i> | 37 | TGC+GCA | >50 26 |
| Mst I | <i>Micrococcus species</i> | | | >10 4 |

续表2

| 酶 | 微生物 | 最适温度 (°C) | 识别序列 | 识别位点数 | |
|----------|---|--------------|----------|-------|------------|
| | | | | λ DNA | pBR322 DNA |
| Pst I | <i>Providencia stuartii</i> 164 | 30 | CTGCA :G | 18 | 1 |
| Pvu I | <i>Proteus vulgaris</i> | 37 | CGAT :CG | 3 | 1 |
| Pvu II | | 37 | GAG :CTG | 15 | 1 |
| Rsa I | <i>Rhodospseudomonas phaeooides</i> | 37 | CT :AC | >50 | 3 |
| Sac I | <i>Sireptomyces achromogenes</i> | 37 | GAGCT :C | 2 | 0 |
| Sac II | | 37 | CCGC :GG | 4 | 0 |
| Sac III | | 37 | ACGT | >10 | 6 |
| Sal I | <i>Streptomyces albus</i> G | 37 | G :TCGAC | 2 | 1 |
| Sau3A I | <i>Staphylococcus aureus</i> 3A | 37 | :GATC | >50 | 22 |
| Sau96 I | <i>Staphylococcus aureus</i> P 596 | 37 | G :GNCC | >30 | 15 |
| Sma I | <i>Serratia marcescens</i> S ₁ | 37 | CCC :GGG | 3 | 0 |
| Sst I | <i>Sireptomyces stanford</i> | 37 | GAGCT :C | 2 | 0 |
| Sst VI | | 37 | CCGC :GG | 3 | 0 |
| Sst VIII | | 37 | ACGT | >10 | 6 |
| Tag I | <i>Thermus aquaticus</i> YT1 | 65 | T :CGA | >50 | 7 |
| Tba I | <i>Thermoplasma acidophilum</i> | 60 | CG :CG | >50 | 23 |
| Xba I | <i>Xanthomonas badrii</i> | 37 | T :CTAGA | 1 | 0 |
| Xho I | <i>Xanthomonas hololeicola</i> | 37 | C :TCGAG | 1 | 0 |
| Xma I | <i>Xanthomonas malvacearum</i> | 37 | C :CCGGG | 3 | 0 |

说明：识别序列仅写出DNA的一条链，从5'→3'。只有个别的酶写出了DNA的两条链。切点用“↓”符号表示。在括弧如(↓)中的碱基表示其中任一可在该位置。甲基化的碱基用“*”号表示。Pu代表嘌呤，Py代表嘧啶，N代表任何碱基。

(三) 重组DNA实验所用的主要酶

| 酶 | 功 能 | 应 用 |
|-----------------------------|--|---|
| E.coli DNA聚合酶I | 依赖于DNA的DNA合成, 3'—5'外切酶 5'—3'外切酶 | 合成DNA; 缺口移位 |
| E.coli DNA聚合酶I Klenow 片段 | 依赖于DNA的DNA合成 3'—5'外切酶 | DNA的序列分析; 填充3'—末端; cDNA合成 |
| T ₄ DNA聚合酶 | 依赖于DNA的DNA合成 3'—5'外切酶 | 填充3'—末端; 3'—末端标记; C—DNA合成 |
| 藤黄小球菌DNA 聚合酶 | 与E.coli DNA聚合酶I 相同 | 合成Poly (dA—dT)— Poly(dA—dT) 以RNA为模板的DNA合成 |
| 末端脱氧核苷酸转移 酶 | 在两股DNA的3'末端加 上dNTPs | 3'—同聚物加尾; 合成引 物; 3'—末端标记粘性 |
| T ₄ DNA连接酶 | 在两股DNA分子的5'磷 酸基和3'—羟基间形成磷 酸二酯键 反应要求有ATP | 末端连接, 平端连接 |
| E.coli DNA连接酶 | 功能同T ₄ DNA连接酶, 反应要求有DPN | 粘性末端连接 |
| T ₄ 多聚核苷酸激酶 | 将ATP的磷酸转移到多 聚核苷酸的5'—OH末端 | DNA和RNA的 ³² P 末端标记 |
| AMV 逆转录酶 | 依赖于RNA的DNA合 成; 降解RNA; DNA杂 交分子中的RNA | 从RNA合成cDNA |
| E.coli RNA聚合酶 | 依赖于DNA的RNA合 成 | 离体RNA合成 |
| 多聚核苷酸磷酸化酶 | 可逆的磷酸解; 多聚核 苷酸的合成 | 合成多聚核糖核苷酸 |

续表

| 酶 | 功能 | 应用 |
|----------------------|-------------------------------|--|
| E. coli poly (A) 聚合酶 | 将A加在RNA的3'-OH末端 | 加poly(A)到RNA以合成cDNA |
| 细菌或小牛碱性磷酸酶 | RNA和DNA的5'-末端去磷酸 | DNA去磷酸阻止连接; 末端标记前去磷酸 |
| S1 酶 | 特异的单链核酸酶 | 去除单链末端, 杂交研究 |
| 外切酶III | 去除DNA的3'和5'单核苷酸 | 生产DNA聚合酶的底物; DNA序列分析诱变DNA |
| 核酸酶BAL-31 | 从两股DNA的3'和5'末端同时降解核苷酸 | 从DNA片段的两端逐步缩短DNA |
| T4 RNA连接酶 | 连接RNA或DNA的3'-OH和RNA或DNA的5'-磷酸 | 连接粘性末端 |
| E. coli 核糖核酸酶H | 降解RNA; DNA杂交分子中的RNA | 从杂交分子中除去RNA; 从mRNA上除去poly(A); RNA的特异位点裂解 |

(赵世民)

六、遗传工程常用的菌株和质粒

(一) 大肠杆菌克隆系统

1. 常用的大肠杆菌菌株及性质

| 菌株 | 基因型 | 注解 |
|------------------|---|-----------------|
| C ₆₀₀ | F ⁻ , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻ | 此菌株又称CR34 |
| LE392 | F ⁻ , hsdR514 (r _K ⁻ , m _K ⁻), supE44, sup F58, lac Y1或Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55, λ ⁻ | 通常用来增殖噬菌体λ及其重组体 |

续表1

| 菌株 | 基因型 | 注解 |
|-----------------|--|---|
| HB101 | F ⁻ , hsdS20 (r _B ⁻ , m _B ⁻), recA ⁺ , 13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Smr ^r), xy1-5, mt1-1, supE44, λ ⁻ | 此菌株是E. coli k-12与E. coli B的杂种菌株, 通常用来作转化的受体菌, 也非常适合用作大规模提取和纯化质粒的宿主。 |
| RR ₁ | F ⁻ ; 除recA ⁺ 外与HB101相同 | HB101的recA ⁺ 衍生体, cDNA与质粒通过同源多聚尾退火后能以高频转化此受体菌。 |
| C-1a | 野生型菌株 | 大肠杆菌C的野生型菌株, 在合成培养基中能保持几年。大肠杆菌C为F ⁻ , 并缺少宿主限制-修饰活性。它是用来做噬菌体琥珀突变互补测验的Su ⁻ 宿主。 |
| CSH18 | Δ(lac pro), supE, thi ⁻ , (F' lacZ ⁻ proA ⁻ B ⁻) | 用来检测以携带Lac基因的噬菌体λ作载体的重组体。这些载体在其填充中含有-lac基因, 因此在x-gal存在的情况下, 形成兰色的噬菌斑, 由于在重组体中外源DNA片段代替了填充片段, 故在x-gal的培养基中, 它形成白色的噬菌斑。 |
| DH1 | F ⁻ , recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁻), supE44, recA1?, λ ⁻ | 用来涂布和生长质粒及柯斯质粒的宿主, 它是MM294菌株与KL16-99菌株杂交的gyrA ⁻ , recA ⁻ 衍生体。 |
| ED8767 | recA56, supE, supF, hsdS R ⁺ M ⁺ , met ⁻ | 用来涂布和生长柯斯质粒的recA ⁻ 受体菌。 |
| kro | recA ⁻ | 用来增殖λ BF101的菌株 |

续表2

| 菌株 | 基因型 | 注解 |
|---|---|---|
| SK1590 | gal, thi, sbc, B15, endA, hsdR ⁻ , hsdM ⁻ | ——高频转化菌 |
| Jc9156 | recA99, thr-1, leu-6, thi-1, lacY1, galK2, ara-14, xy1-5, mt1-1, proA2, his-4, argE3, str-31, tsx-33 | 在 π x检测方法中用来测量噬菌体琥珀突变抑制基因的菌株, 此菌是含有recA99琥珀突变的AB1157的衍生体, 注意Jc9156是S \bar{u} , 而AB1157是supE |
| NK5186 | thyA ⁻ , rha ⁻ , Sm ^r , lacZam | 在 π VX检测方法中, 用来测定琥珀突变抑制基因的噬菌体的菌株, 又称J6139 |
| K802 | hsdR ⁺ , hsdM ⁺ , gal ⁻ , met ⁻ , supE | 通常用来增殖噬菌体 λ 载体和他们的重组体的Su菌株。 |
| W3110 ^{r-} m ⁺ | F ⁻ , hsdR ⁻ , hsdM ⁺ | 由J. Ledberg的W3110菌株衍生而来的S \bar{u} 菌株 |
| W3110 ^{r-} m ⁺ (P ³) | F ⁻ , hsdR ⁻ , hsdM ⁺ , p ³ [kan ^r , tet ^s , amp ^s (tet ^r am, amp ^r am)] | 包含有pHMM ₂ 来源的双突变Rp ₁ 质粒的tra ⁻ 突变体的W3110 r ⁻ m ⁺ 衍生体。 |
| W3110 ^{r-} m ⁺ (P3) (π VX) | F ⁻ , hsdR ⁻ , hsdM ⁺ , p ³ , π VX (kan ^r , tet ^r , amp ^r) | W3110 ^{r-} m ⁺ (P3)的衍生体, 此衍生体含有携代SupF的微型质粒 π Vx。 |
| Q358 | hsdR _k ⁻ , hsdM ₂ ⁺ , supF, ϕ 80 ^v | 用来生长噬菌体 λ 载体1050的Su ⁺ 宿主。 |
| Q350 | hsdR _k ⁻ , hsdM _r ⁺ , supF, ϕ 80, p2 | 用来检测噬菌体 λ 的spi重组体的Su ⁺ 宿主。 |
| BHB 2638 | N205 recA ⁻ [γ imm ⁺ 34, cIts, b2, red ⁻ , Eam, Sam/ γ] | 用来制备包装提取物的 λ 溶源菌 |
| BHB 2690 | 205 recA ⁻ [γ imm ⁺ 34, cIts, b2, red ⁻ , Dam, Sam/ γ] | 用来制备包装提取物的 λ 溶源菌 |
| JM103 | Δ (lac pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR ⁻ , F' traD38, proAB, lacI', ZAM15. | 用来生长单链噬菌体M13及其重组体的宿主。 |

除注明外, 所有上列菌株均为大肠杆菌K-12。

2. 载体系统

(1) 克隆质粒载体

| 载体 | 大小 (kb) | 筛选性质 | 插入失活位点 | 注 解 |
|-----------|---------|---|--|---|
| pBR322 | 4.3 | Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI. | pBR322是应用最为广泛的克隆载体质粒 |
| pBR325 | 5.7 | Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI Cmr-EcoRI, PvuII, BalI | 它是含cmr ^r 基因的pBR322的衍生质粒 |
| pBR327 | 3.3 | Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI | 它是pBR322缺失了-1039bp非必须片段的衍生质粒 |
| pBR327par | 3.6 | Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI | 它是将pSC101的par位点引入pBR327的衍生质粒, par位点的引入使得此质粒能更有效地进入子细胞 |
| pBR328 | 4.907 | Cmr ^r , Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI. Cmr-EcoRI, BalI, PvuII. | 为pBR322衍生质粒, 含有氯霉素抗性基因 |
| pBR329 | 4.15 | Apr ^r , Tetr Cmr ^r | Apr-PstI. Tetr-BamHI, HindIII, SalI. Cmr-BalI, EcoRI, PvuII | 它是含有 Cmr ^r 基因的pBR322衍生载体 |
| pAT153 | 3.6 | Apr ^r , Tetr | Apr-PstI, Tetr-BamHI, HindIII, SalI. | 一多拷贝的pBR322的衍生质粒。 |

续表

| 质粒 | 大小 (kb) | 筛选性质 | 插入失活位点 | 注 解 |
|----------|---------|---------------------------------------|---|--|
| pxf3 | 3.16 | Ap ^r , Tet ^r | Tet ^r -BamH1, SalI, Ap ^r -PstI, XcrI1. | 为pBR322的衍生质粒。pBR322中包含复制起点的ThaI-A片段与编码Ap ^r 和Tet ^r 的AvaI至Sau3A片段融合形成3160bp的pxf3质粒 |
| pInk322 | 3.8 | Ap ^r | Ap ^r -PstI | 包含一多聚接头以增加有用的克隆位点的pBR322的衍生体。 |
| pMK16 | 4.6 | Km ^r , Tet ^r | Tet ^r -BamH1, HincII, SalI, Km ^r -SmaI, XhoI. | 克隆SmaI或XhoI末端的外源DNA的最合适的载体 |
| pKC7 | 5.8 | Km ^r , Ap ^r | Km ^r -BclI, BglII, Ap ^r -PvuI. | 外源DNA插入BglII位点使 Km ^r 基因失活 |
| pACYC184 | 4.0 | Cm ^r , Tet ^r | Cm ^r -EcoRI, Tet ^r -BamH1, HindIII, SalI. | 此质粒的特点是插入EcoRI位点使 Cm ^r 失活 |
| pSC101 | 9.09 | Tet ^r | Tet ^r -HindIII, | pSC101与pCRI没有可检测到的同源性 |
| pCRI | 11.4 | Km ^r | Km ^r -HindII | pCRI与pSC101没有可检测到的同源性 |
| pxx | 0.902 | SupF | | 此质粒包括3个EcoRI片段, 一是来自pMB1的502bp片段, 一是207bp人工合成的酪氨酸tRNA抑制基因和-115bp的多聚接头 |

(2) 表达质粒载体

| 质粒 | 启动子 操纵子 | 标 记 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|-------------------------|------------|---|---|--|
| A. 具有被乳糖操纵区控制的启动子的表达载体 | | | | |
| pPC ϕ 系列 | lac | Ap ^r | EcoR1 | 3个载体, 3个阅读 框架, 4.4kb与 β -半乳 糖苷酶形成相嵌蛋白 |
| fLG 系列 | lac | Ap ^r | Hind111 | 4个载体, 与 β -半乳 糖苷酸形成相嵌蛋白, 启动子可作为一整体 分离下来 |
| pCP 系列 | lac | Ap ^r , Tc ^r | EcoR1 | 2个载体, 根据有无 CAP位点形成相嵌或 非相嵌蛋白 |
| pMC系列 pSK系列 pFK系列 | lac | Ap ^r , Tc ^r or Km ^r . | BamH1, Cla1, Pst1, EcoR1, Sac1, Sal1, Hind111, Sma1, Xba1 or Xho1 | 9个载体, 3个阅读 框架, 9.9 - 10.1kb, 能与 β -半乳糖苷酶C- 末端形成相嵌蛋白 |
| pUC8 pVC9 | lac | Ap ^r | Hind111, Pst1, EcoR1, BamH1, Sma1, Sal1 | 6个载体, 包含两起 始端的3个阅读框架, 可与xGal1发生颜色反应 |
| pUC18 pUC19 | lac | Ap ^r | 同pUC8(+ Sst1, Sph1, Xba1, Kpn1) | 2个载体, 2.7kb. |
| pIC19 系列 | lac | Ap ^r | 同pUC9(+ Bgl11 Xho1, Nru1, Cla1, Sac1, EcoRV) | pUC ₉ 衍生物, 具有 六个限制内切位点的 多聚接头, 2.7kb |
| pIC20 | lac | Ap ^r | 同pUC19(+ Bgl11 Xho1, Nru1, Cla1, Sac1, EcoRV) | pUC19衍生物, 具有 六个限制内切位点的 多聚接头, 2.7kb |

续表1

| 质粒 | 启动子 操纵子 | 标 记 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|---|------------------|-----------------|--|--|
| pUC-M19 系列 | lac | Ap ^r | 同pEMBL8(+Bg111 Xho1,Nru1, Cla1,Sac1,EcoRV) | pEMBL8衍生而来, 具有六个限制内切位 点的多聚接头, 2.7kb |
| pHG165 | lac | Ap ^r | pUC3 | 低拷贝, pUC3衍生 而来 |
| pWR599 | lac | Ap ^r | Sac1, EcoR1, Sma1, Hind111, BamH1, Xba1 | pUC18衍生而来, 可与 β -半乳糖苷酶成 相嵌蛋白 |
| pIN11系列 pIN111 系列 pIC111 系列 | lpp- lac | Ap ^r | EcoR1, Hind111, BamH1 | 27个载体, 有3个克 隆位点可被选择, 以 合成融合、分泌蛋白。 pIN111携带lac1, pIC111携带lacZ |
| pNH7a | lac | Ap ^r | EcoR1, BamH1 | 需带有Int诱导蛋白的 宿主 |
| pDR540 | tac ^a | Ap ^r | BamH1 | tac控制galk的表达 其中galk来自PKO-1 质粒, 启动子能作为 -92-bp框架被切除。 此质粒大小为4kb |
| pTac 系列 | tac ^a | Ap ^r | Pvu11, Hind111, EcoR1 | 2个载体, 大小2.6 ~4.6kb, 克隆无RBS 的基因, 启动子可作为 一整体被分离下来 |
| pKK333-2 | tac ^a | Ap ^r | Nco1 | 含lac及BS和ATG 以利翻译启动 |
| pER系列 | lac | Ap ^r | EcoR1, Hind111, Cla1 | 与 β -半乳糖苷酶相 嵌 |

续表2

| 质粒 | 启动子 操纵子 | 标 记 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|----------------------------|------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| pYEJ001 | Scp | Apr ^r | 多种不一 | 由PBR327衍生而来, 包含2个串联的乳糖操纵子和一含有氯霉素乙酰转移酶的HindIII片段 |
| B. 带有被色氨酸启动-操纵区控制的启动子的表达载体 | | | | |
| pTrPED | trp | Apr ^r , Tc ^r | HindIII, SalI, BamHI, EcoRI | 3个载体, 大小6.7—9.8kb, 与trPD嵌合, 为trPE编码并带有衰减子 |
| pWT系列 | trp | Apr ^r , Tc ^r | HindIII, SalI, BamHI | 3个载体, 大小4.8 kb. 可与trPE嵌合, 能以3个阅读框架克隆, 质粒带有衰减子 |
| | | | | 5个载体, 无衰减子序列, 大小3.7—3.8kb |
| pEP系列 pHP系列 | trp | Apr ^r , Tc ^r | HindIII, BglII SstI | 7个载体, 大小7.9—18kb, 来自PBR313或者PBR345, 插入失活位点在色氨酸结构基因内 |
| pTrPL1 | trp | Apr ^r | ClaI | 大小4.6kb, 携带trPL RBS |
| pSTP1 | trp | Apr ^r , Tc ^r | ClaI, SalI, TaqI, HindIII, BamHI | 大小为3.72kb, 携带具有RBS的合成的色氨酸启动子 |

续表3

| 质粒 | 启动子 操纵子 | 标 记 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|--------|------------|------------------------------------|------------------------------|--|
| pDR720 | trp | Apr ^r | BamH1, Sal1 Sma1, | 色氨酸启动子引发galk 的表达。启动子可作为 一77kb的EcoR1框架被 切割下来。大小为4kb |
| pER103 | trp | Apr ^r , Tc ^r | Hind111 | 携带合成的启动子、 操纵子和RBS, 调控区 可作为一整体分离出来 |
| pKYP | trp | Apr ^r , Tc ^r | Hind111, Sal1 BamH1, Cla1 | 此系列含有2或3个 连接的色氨酸启动子和 RBS的4个载体。质粒带 有LPP转录终止位点, 启 动子可作为一整体分离 下来, 大小3.7—9.35kb |

C. 温度诱导转录的表达载体

| | | | | |
|----------------|----|------------------------------------|--|---|
| pHUB 系列 | pL | Km ^r , Apr ^r | EcoR1, BamH1 Sal1, 或HPa1 | 2个载体, 大小7.6— 6.5kb。携带或不携带反 终止子。 |
| pLc系列 pLa系列 | pL | Apr ^r | Ba11, EcoR1, Pst1, BamH1, Sal1, Acc1或 Hind111 | 5个载体, 允许带有自 己转录起始信号的基因 克隆, 或者与MS2Pol、 bla形成相嵌蛋白, 大小 2.8—3.8kb |
| pTL6 | pL | p | Cla1, Hind111, BamH1 | 为λCII基因的N-末端 编码, 并且携带一非常 有效的转录起始信号 |
| pAS1 | pL | Apr ^r | BamH1 | 允许任何编码序列与 λc11翻译起始信号形成 融合蛋白, 大小5.8kb |

续表4

| 质粒 | 启动子 操纵子 | 标 记 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|----------------|------------|-----------------|--|--|
| pKC 系列 | pL | Ap ^r | BamH1 Ava1 | 此系列具携带 λ N基因的 4个载体 |
| PFCE4 | pL | Ap ^r | BamH1 | 两个载体, 均包含F ₁ 壳体起始点, O _L P _L , matL, mutR, t, Nct11和 RBS。可用于DNA测序 |
| pEV-vrf 系 列 | pL | Ap ^r | EcoR1, BamH1, Cla1 | 3个载体, 在3个阅读 框架中表达, 包含RBS |
| pEMBLex2 | pL | Ap ^r | Sa11 EcoR1 Hind111 | 包含MS ₂ 复制酶和LacZ 的RBS大小4.4kb, pEMBL8的衍生物 |
| pANH-1 | pL | Ap ^r | Hpa1 | 形成非融合蛋白 |
| pANK-12 | pL | Ap ^r | Kpn1 | 形成非融合蛋白 |
| pPL2 | pL | Ap ^r | BamH1 | 形成非融合蛋白 |
| pCQV2 | pR | Ap ^r | BamH1 | 含有-ATG密码作为翻 译起始密码 |
| pEMBLex3 | pR | Ap ^r | BamH1, Sa11 Fst1 | 含有 λ cro和lacZ的RBS, 大小4.9kb, 由pEMBL8 衍生而来 |
| pEX 系列 | pR | Ap ^r | Pst1, Sa11 BamH1, Sma1, EcoR1 | ORF DNA表达载体, 同 λ cro和 β -Gal形成相嵌 蛋白 |
| pCL 系列 | pR | Ap ^r | BamH1 | ORF DNA表达载体, 同 λ cro和 β Gal形成相嵌 蛋白 |

D. 组成型启动子的表达载体

续表5

| 质粒 | 启动子 | 标记 | 克隆位点 | 注 解 |
|--------|--------|-----------------------------|---|---|
| pSPA系列 | PprotA | Apr, Tcr | EcoR1, Sma1, Sal1, Acc1, BamH1, Pst1或 Hinc11 | 两个载体, 大小6—7.5kb, 同葡萄球菌蛋白质形成相嵌蛋白 |
| pJP1 | T5P25 | Apr, Tcr | Hind111 | 大小4.6kb, 含有早期合成的T5的Promoter代替Tcr的Promoter |
| pINJ系列 | PLpp | Apr | EcoR1, Hind111, BamH1 | 9个载体, 对任何阅读框架选择克隆, 合成相嵌蛋白, 分泌蛋白 |
| pXJ002 | SCP | Apr, Cm ^r | Hpa11, BamH1, Sal1, Pst1 | pBR衍生而来。有强烈的肝素抗性。 |
| pY2 | SCP | Apr, Tcr cm ^r | | pBR327衍生而来。携带cat基因 |
| pSP系列 | SP6 | Apr | EcoR1, Sac1, Sma1, BamH1, Xba1, Sal1, Pst1, Hind111 | 携带噬菌体SP6的promoter, 合成ssRNA |
| pORF系列 | OmpF | Apr | Bgl1, Sma1, Xma1, Ava1, Sal1, BamH1, Pst1 | ORF DNA表达载体, 同OmpF和βGal形成相嵌蛋白 |

(3) λ 载体

| 载体 | 大小 (kb) | 标记 | 注解 |
|-------------------------------|--|--|--|
| A. 构建基因文库用的 λ 载体 | | | |
| λ gt wes, λ B | 40.4 | Wam403, Eam1100 Sam100, CI857ts需要 带supF的宿主菌 | 此载体被广泛用来克隆 中等大小的E.coRI片段 |
| Charon3A | 48.3 | Aam32, Bam1, Lac ⁺ imm80需携带SaII的 宿主菌, 在x-gal平皿上 形成兰色噬菌斑 | 用来克隆EcoRI消化的 真核片段 |
| Charon4A | 45.4 | Aam32, Bam1, Lac5 Bio256, ∇ KH54, ∇ NIN5, ϕ 80QSR在 x-gal平皿上形成兰 色噬菌斑 | 此载体被广泛用来克隆 15—20kb 大小的真核 DNA 片段 |
| Charon21A | 41.7 | Wam403, Fam1100, imm80, b1007, ∇ KH53 ∇ KH52, ∇ NIN5需 SupE或SapF的宿主菌 | 此载体被广泛用来克隆 HindIII片段, 由于它含 有琥珀突变, 故可用 π vix 检测系统来进行重组体 的检测 |
| Charon28A | 原种2221 - 39.39 原种2270 - 40.29 | b1007, KH54, NIN5 | 用来克隆BamHI及MboI 片段, 由于Chi位点的缺 失, 致使重组体出现大 小不一的噬菌斑, 由此 大大限制了此载体的使 用 |
| L47.1 | 40.6 | (srI λ 1-2), imm434 cI ⁻ , NIN5, chiA131 | 被广泛用来克隆大的 EcoRI, HindIII和 BamHI片段 |

续表

| 载体 | 大小 (kb) | 标记 | 注解 |
|------|---------|--------------|---|
| gt10 | 43.34 | b527, imm434 | 此载体用来克隆小的DNA片段及cDNA(最大到7.6kb), 在cI基因有一单一的EcoRI位点, 克隆到此位点的重组体可形成明显的噬菌斑 |

B 克隆和表达coNA及基因组DNA的λ载体

| | | | |
|------|------|---------------------------------------|---|
| gt11 | 43.7 | cI857, NIN5, S100 在x-gal平皿上形成兰色噬菌斑 | EcoRI插入位点在lacE基内, 在β-半乳糖苷酶转录终止密码的上游, 外源基因表达或相嵌蛋白, 插入的外源基因最大长度为7.2kb |
|------|------|---------------------------------------|---|

注: 噬菌体λ载体中所用的遗传标记

lac5

bio1 } 来自大肠杆菌lac和bio区域的置换

bio256 }

att⁸⁰

imm⁸⁰ } 来自噬菌体φ80的置换

CSR⁸⁰ }

imm²¹ 来自噬菌体φ21的置换

int²⁹ 来自噬菌体φ29的置换

KH100 带有 EcoRI位点的插入

pac129 带有克隆噬菌体λatt位点的 ColE1质粒

BW 1 引致基因O丧失EcoRI位点的缺失

bl 007 引致att位点损伤的b区域缺失, 从而阻止溶源化过程

KH53 噬菌体φ80中类似于λcI区域的缺失, 能有效地阻止溶源化过程

KH54 rex-cI区域的缺失, 有效地阻止溶源化

nin 5 去除转录终止位点tR₂的缺失, 因而导致不依赖于N基因产物的后期转录

ninL44 去除ral基因附近的BamHI位点的缺失

cI857 引致cI基因产物热不稳定的is突变

chi 促使定向重组的λ噬菌体的特异性位点

(4) 柯斯质粒 (Cosmid)

| 载体 | 大小 (kb) | 标记 | 克隆位点 | 注解 |
|---------|---------|-----------------------------------|----------------------------|--|
| pBT1-1 | 11.1 | Ap ^r , Tc ^r | BamH1 | 其克隆容量为27—41kb。此质粒含有酵母来源的lenI基因和2a环状DNA, 因此它可以大肠杆菌和酵母菌作为宿主。 |
| pHC79 | 6.43 | Ap ^r , Tc ^r | BamH1, Sal1, Pst1 | 克隆容量为31—47kb |
| pJB3 | 5.4 | AP ^r | BamH1, Hind111, Sal1 | 克隆容量为31—47kb |
| pJC74 | 15.8 | Ap ^r | EcoR1, BamH1, Bgl11, Sal1 | 克隆容量为21—47kb |
| pJC81 | 7.1 | Ap ^r , Tc ^r | Kpn1, BamH1, Hind111, Sal1 | 克隆容量为30—46kb |
| pJC74Km | 21 | AP ^r , Km ^r | BamH1 | 克隆容量为16—32kb |
| pTL5 | 5.6 | Tc ^r | Bgl11, Bal1 HPa1 | 克隆容量为31—47kb |
| pMF7 | 5.4 | AP ^r | EcoR1, Sal1 | 克隆容量为32—48kb |
| PHS262 | 2.8 | Km ^r | BamH1, EcoR1, Hincl1 | 克隆容量34—56kb |

(5) 单链载体

M13系列

| 载 体 | 克 隆 位 点 | 注 解 |
|------|--|---|
| mp2 | EcoR1 | 一方面M13噬菌体通过双链复制,因此能作为一般的双链质粒载体处理,另一方面成熟的M13噬菌体包含单链环状DNA,因此可以用来进行DNA测序。通过将 β -半乳糖苷酶互补系统和多克隆位点导入其中,构建了一系列广泛克隆和测序的M13系统。 |
| mp | | |
| mp2 | EcoR1 | |
| mp5 | EcoR1 - Hind111 - EcoR1 | |
| mp7 | EcoR1 - BamH1 - Sal1 - Pst1 - Sal1 - BamH1, EcoR1 | |
| mp8 | EcoR1 - Sma1 - BamH1 - Sal1 - Pst1 - Hind111 | |
| mp9 | Hind111 - Pst1 - Sal1 - BamH1 - Sma1 - EcoR1 | |
| mp10 | Acc1 - BamH1 - EcoR1 - Hinc11 - Hind111 - Pst1 | |
| mp11 | Xma1 - Xba1 - Sst1 - Sma1 - Sma1 - Sma1 - Sal1 - Pst1 - Hind111 - Hinc11 - EcoR1 - BamH1 - Acc1 | |
| mp12 | EcoR1 - Sst1 - Sma1 (Xma1) - BamH1 - Xba1 - Sal1 (Acc1, Hinc11) - Pst1 - EcoR1 | |
| mp13 | EcoR1 - Pst1 - Sal1 (Acc1 - Xba1 - BamH1 - Sma1 (Xma1) Sst1 - EcoR1 | |
| mp18 | EcoR1 - Sst1 - Kpn1 - Sma1 (Xma1) - BamH1 - Xba1 - Sal1(Acc1, Hinc11) - Pst1 - Sph1 - Hind111 | |
| mp19 | Hind111 - Sph1 - Pst1 - Sal1 (Acc1, Hinc11) - Xba1 - BamH1 - Sma1 (Xma1) - Kpn1 - Sst1 - EcoR1 | |

(二) 枯草杆菌克隆所用菌株和质粒

1. 克隆用的枯草杆菌菌株

| 菌 株 | 性 质 |
|-------|--|
| BR151 | trpC2, metB10 lys-3 |
| YB886 | trpC2, metB10, Xin-1, SPβ- |
| MI112 | leuA8, arg-15, thr-5, recE4, r ⁻ , m ⁻ |
| MI119 | leuB6, trpC2, r ⁻ , m ⁻ |
| MI120 | leuB6, recE4, r ⁻ , m ⁻ |
| CU403 | thyA, thyB, metB, divIVB1 |
| BD170 | trpC2, thr-5 |
| BD224 | trpC2, thr-5, recE4 |

2. 克隆用的质粒

| 质 粒 | 来 源 | 分子量 1×10^{-6} | 标 记 |
|----------|------------------------------|------------------------|-------------|
| pBC16 | <i>Bacillus cereus</i> | 3.0 | Tc |
| pAB124 | <i>B. stearothermophilus</i> | 2.9 | Tc |
| pPL10 | <i>B. pumilus</i> | 4.4 | bacteriocin |
| pPL7055 | <i>B. pumilus</i> | 4.6 | bacteriocin |
| pIM13 | <i>B. subtilis</i> | 1.5 | Em |
| pLS23 | <i>B. subtilis</i> (natto) | 4.1 | - |
| pBS1 | <i>B. subtilis</i> | 5.5 | - |
| pFTB14 | <i>B. amyloliquefacians</i> | 5.3 | - |
| pUB110 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3.0 | Km(Nm) |
| pE194 | <i>S. aureus</i> | 2.4 | Em |
| pC194 | <i>S. aureus</i> | 1.8 | Cm |
| pT127 | <i>S. aureus</i> | 2.9 | Tc |
| pC221 | <i>S. aureus</i> | 3.0 | Cm |
| pC223 | <i>S. aureus</i> | 3.0 | Cm |
| pUB112 | <i>S. aureus</i> | 3.0 | Cm |
| pSA501 | <i>S. aureus</i> | 2.8 | Sm |
| (pS194) | | | |
| pSA2100 | <i>S. aureus</i> | 4.7 | Cm, Sm |
| (pSC194) | | | |

3. 克隆用的重组质粒

| 质粒 | 分子量($\times 10^{-6}$) | 亲本质粒 | 标记 |
|--------|-------------------------|--|------------|
| pBD6 | 5.8 | pSA501, pUB110 | Sm, Km |
| pBD8 | 6.0 | pSA2100, pUB110 | Sm, Cm, Km |
| pBD9 | 5.4 | pE194, pUB110 | Em, Km |
| pBD64 | 3.2 | pC194, pUB110 | Cm, Km |
| pHV11 | 3.3 | pC194, pT127 | Cm, Tc |
| pHV41 | 4.5 | pC194, pUB110, pBR322 | Cm, Km |
| pLS103 | 5.0 | pUB110, <i>B. pumilus trp</i> gene | Km, trp |
| pLS105 | 5.4 | pUB110, <i>B. licheniformis</i> <i>trp</i> gene | Km, trp |
| pTL10 | 9.4 | pLS28, <i>B. subtilis leu</i> and <i>leu</i> , <i>Tp</i> <i>Tp-r</i> genes | |
| pTL12 | 6.4 | pLS28, <i>B. subtilis leu</i> and <i>leu</i> , <i>Tp</i> <i>Tp-r</i> genes | |
| pTB90 | 4.4 | pTB19 | Km, Tc |
| pPL608 | 3.5 | pUB110, <i>B. pumilus cat-86</i> gene, 0.3 kb SP02 phage promoter | Km, Cm |
| pPL703 | 3.3 | pPL603 with linker from phage M13mp7 | Km, Cm |

4. 大肠杆菌和枯草杆菌中均能复制的穿梭载体

| 质粒 | 分子量($\times 10^{-6}$) | 亲本质粒 | 标记 |
|---------|-------------------------|--|---------------|
| pHV14 | 4.6 | pC194, pBR322 | Cm Ap, Cm |
| pHV33 | 4.6 | pC194, pBR322 | Cm Ap, Tc, Cm |
| pHV23 | 6.1 | pC194, pBR322, pT127 | Tc, Cm Ap, Cm |
| pOG2165 | 5.0 | pC194, pUB110, <i>B. licheniformis</i> <i>pen-r</i> gene | Ap, Cm Ap, Cm |
| pJK3 | 5.0 | pBS161-1, pBR322 | Tc Ap, Tc |
| pCPP-3 | 3.7 | pBR322, pUB110, pC194 | Km Km |

5. pC194及pUB110的物理图谱

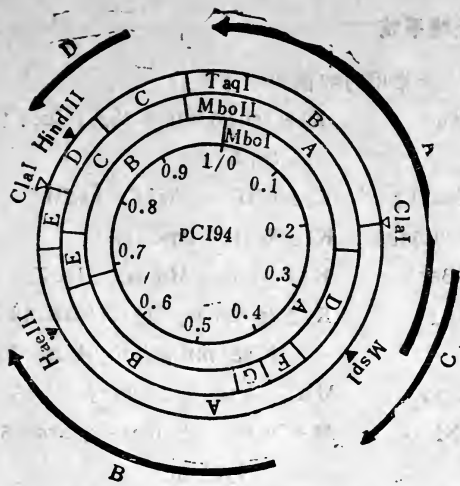


图7-1 pCI94的物理图谱，箭头表示阅读框架B编码氯霉素乙酰转移酶，框架C的序列与质粒复制有关。

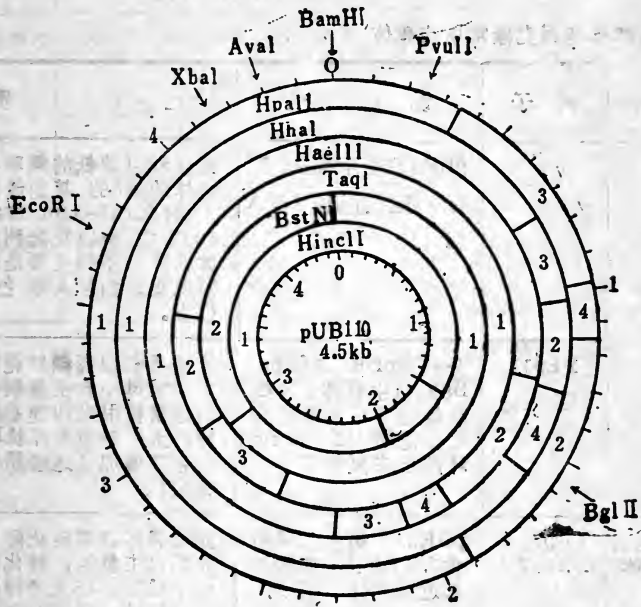


图7-2 pUB110物理图谱，BglII位点在Kan^r基因内，此抗性基因的界限不明确，复制起始点定位在3.2。

(三) 酵母克隆系统

1. 酵母基因克隆常用的细菌和酵母株系

- A. 细菌** C600 K12 *leuB6 thi-1 thr-1 lacY1 tonA21 supE44*
- hisB463 K12 *hisB463 hsdR⁺ hsdM⁺*
- trPC9830 K12 W3110 *trpC117*
- DB6656 K12 *pyrF::Mu trp_{em} lacZ_{em} hsdR⁻ hsdM⁺*
- BA1 K12 *leuB6 trpC1117 hisB463 Tn10::near hisB thr thi thyA str hsdR⁻ hsdM⁻*
- B. 酵母** LL20 *MATa leu2-3, 112his3-11, 15*
- YNN281 *MATa his-3 Δ trp1- Δ ura3-52 ade2-101 lys2-801*
- SR25-1A *Mata his4-912 ura3-52*
- W301-18A *Mata ade2-1 trp1-1 leu2-3, 112 his3-11, 15 ura3-1 can-100*

2. 酵母基因克隆常用的载体

| 类型 | 例子 | 说明 | 性质 |
|-----------------|------------------|---|--|
| 整入型 | YIp5 | pBR322衍生载体, 具有一选择标记, URA34 | 此质粒以较低的频率与染色体的ura的某些等位位点(即ura3-52or ura3-50)重组。所以克隆到此载体的酵母序列主要是通过同源重组而整入染色体位点。 |
| 自主多拷贝-2 μ m | YEp13 pJDB219 | 分别是pBR322和pmB9的衍生载体, 这些载体包含可选择的酵母标记LEU2 ⁺ 和2 μ m环的自主复制部分 | 这些质粒以高频转化酵母并在酵母中自主复制, 他们通常被用来构建基因文库, 天然2 μ m的环状DNA的存在增加了这些质粒的稳定性 |
| 自主多拷贝-染色体 | YRp7 YRp17 | pBR322衍生的质粒含有TRP1 ⁺ 基因和邻近染色体ars序列 | 此类载体高频转化酵母菌并能自主复制, 转化体相当不稳定, 在无选择压力下, 经过10代约90%的细胞丢失质粒, 保留质粒的细胞则含有多拷贝质粒。 |

续表

| 类型 | 例子 | 说明 | 性质 |
|-------------|---------------|--|--|
| 自主多拷贝-端粒 | YLp1 | 含有Tetrahymena巨核rDNA来源的端粒和酵母选择标记, LE U2+的pBR322衍生线状质粒 | 多拷贝载体。但此载体相对不稳定, 在无选择压力下经过10代后约10%的细胞含有质粒。此类载体用来克隆酵母的端粒序列和构建微小染色体。 |
| 自主低拷贝-着丝粒 | YCp19 | pBR322衍生的环状质粒含有两个选择标记TRP1+和URA3+染色体IV来源的染色体ars和着丝粒序列 | 相对稳定的低拷贝载体, 在无选择压力下经10代后约90%的细胞稳定。用来构建文库和克隆基因, 这些基因在每一细胞中如有一个以上的拷贝将会使这些细胞致死。 |
| 自主低拷贝-微型染色体 | YLp21 | YLp1的衍生线状质粒它含有噬菌体 λ 序列及染色体III来源的酵母着丝粒 | 相对稳定的低拷贝载体, 用来研究正常染色体功能所需的序列。 |
| 表达非调节 | pAAH5 | 含有乙醇脱氢酶启动子和合适的克隆位点的环状质粒 | 用来在酵母细胞中大量表达基因产物 |
| 表达调节 | YE p5 pYE4 | 含有调节启动子的半乳糖和磷酸调节的环状质粒 | 用来调节基因产物, 此产物的大量表达将控制某些基因产物的表达时间。 |
| 表达与调节 | pAB112 | 含有 α 因子基因MFaI加工位点的信号序列的环状质粒 | α 因子序列导致与MFaI基因信号部分融合的小蛋白的分泌 |

(四) 植物遗传工程中常用的菌株及穿梭载体和Ti质粒的衍生载体

| 菌株 | 性质 |
|--------|--|
| 大肠杆菌菌株 | |
| HB101 | F ⁻ , r _B ⁻ , m _B ⁻ , RccA, ara, proA, lacY, galk,] str, xyl5, mtI, SupE |
| GJ23 | 含有pGJ28和R64drd11的AB115的RecA的衍生体 |
| JM83 | ϕ 80上的LacZ Δ M15整合到染色体上的K12 (ara, Δ lac-pro, strA, thI, ϕ 80dlacZ Δ M15) |

续表

| 菌株 | 性质 |
|-------------|---|
| 农杆菌菌株 | |
| A136 | Ti质粒治愈的C58rif ^r |
| LA4404 | 含有PAL4404的A136 |
| GV3102 | 与A136等价 |
| 质粒 | |
| pBR322 | Ap ^r , Tc ^r |
| pGJ28 | 携带有ColE1mob和bom的km ^r , Nm ^r , Cda ⁺ , Ida ⁺ colD复制子 |
| R64drd11 | Tc ^r , Sm ^r 1α 型质粒, 它是R64的转移功能被解除抑制的衍生体 |
| pGV3850 | 携带有pBR322序列的nopaline pGV3839质粒的 Ap ^r onc ⁻ 衍生体 |
| pAL4404 | T-DNA区缺失的 octopine pTiAch5质粒的衍生体 |
| pLGVneo1103 | 具有hos-heo嵌合基因的Ap ^r Kn ^r pBR322衍生体 |
| pRK2013 | 具有RK2 tra基因的Km ^r ColE1衍生体 |
| pGV2215 | octopine型Ti质粒pTiB6s3的Km ^r tms突变体。 |
| pGV3851 | 携带有pBR322序列的nopaline型Ti质粒C48的 Ap ^r tms ⁻ 衍生体 |
| pMP61 | 由pTiC79插入到pGV3105的nos基因衍生而来的Trac ⁻ noc ^c ou ⁺ 载体 |
| pHC79 | Ap ^r Tc ^r 的柯斯质粒 |

1.pGV3850系统

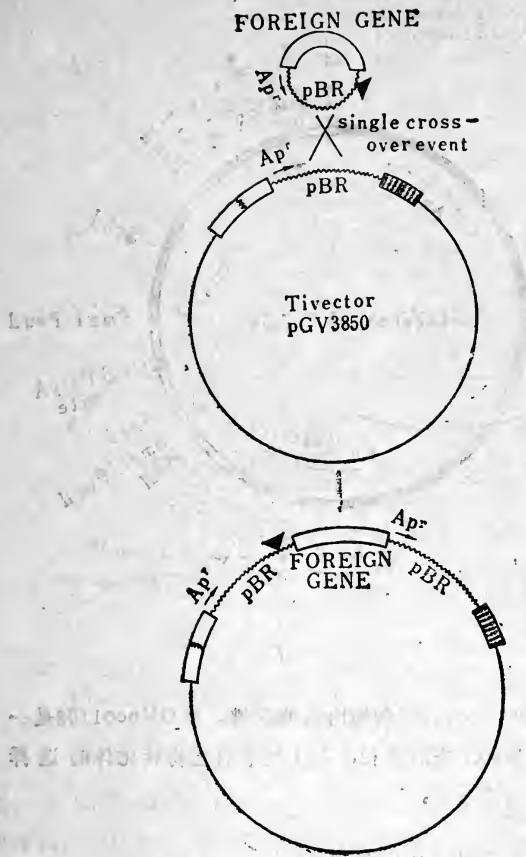


图7-3 目的基因首先被克隆到大肠杆菌的pBR322型的载体上，然后将此质粒泳动到农杆菌中，通过一次单交换此包含有外源基因的重组质粒将整入到 pGV3850上。实心三角表示Ap^r外的其它抗性基因。pGV3850上的pBR322序列（用~表示）两侧是包含左、右边界系列和nos基因的T-DNA。

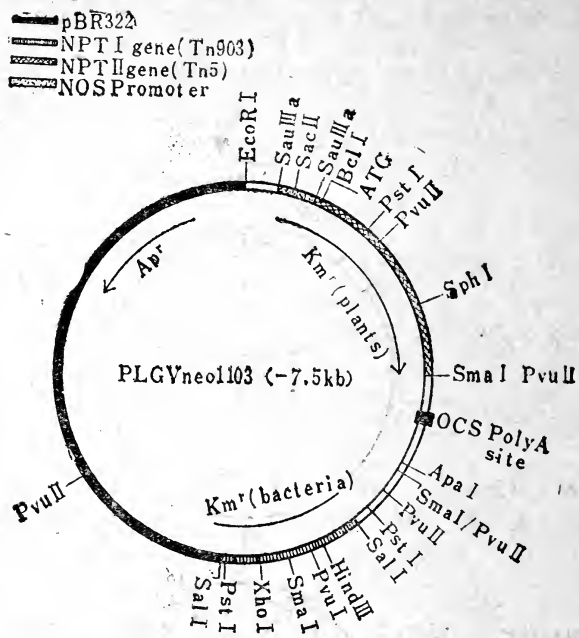


图7-4, pLGVneo1103的限制性内切酶图谱。pLGVneo1103是一能整合到pGV3850上去的质粒，其上携带有植物转化体的选择标记卡那霉素抗性标记。

2. SEV (SpLit End Vector) 系统

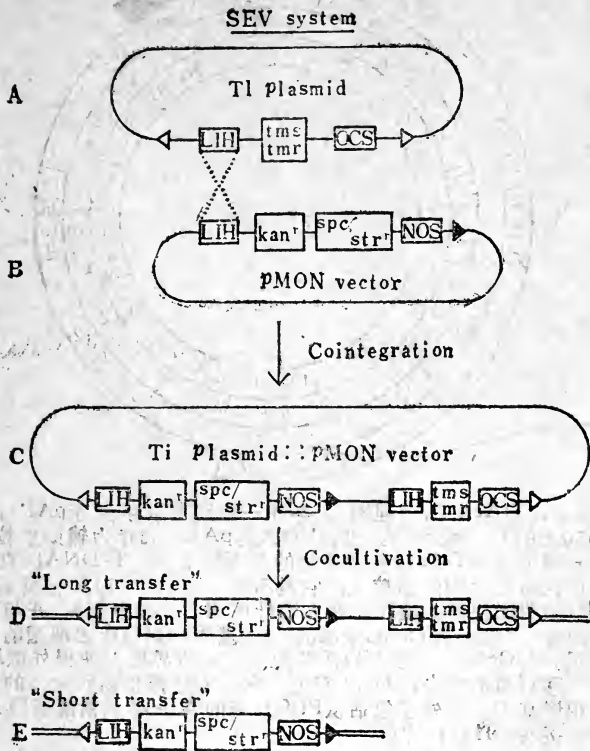


图7-5, SEV(SPLit End vector)系统。箭头代表T-DNA的边界序列, LIH是DNA重组的同源区, 癌基因用 *tms*, *tmr* 表示; OCS和NOS分别代表章鱼碱和烟酯碱合成酶基因, 嵌合的卡那霉素抗性基因用 *Kan^r* 表示, 用来筛选共整合体的壮观霉素和链霉素细菌抗性用 *Spc/Str^r* 表示。Ti质粒pTiB653(A)与pMON120衍生体pMON128(B) 重组产生共整合体(C)pTiB65 + 3 pMON128。将带此共整合质粒的农杆菌与植物共培养并用 *kan* 抗性选择后, 或者是整个T-DNA(D), 或者是无瘤基因的短的T-DNA(E)转移到植物基因组中

3. 双亲载体系统

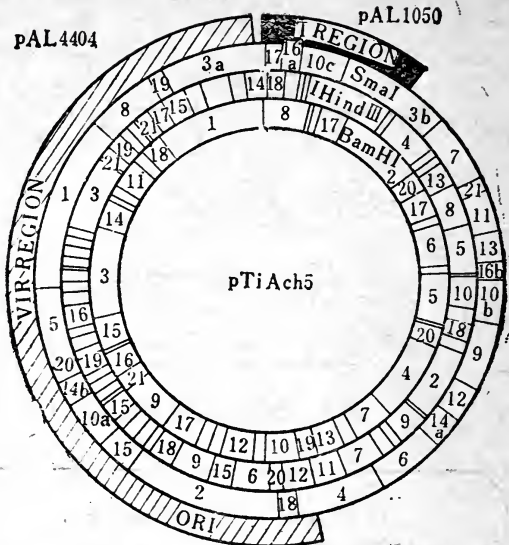
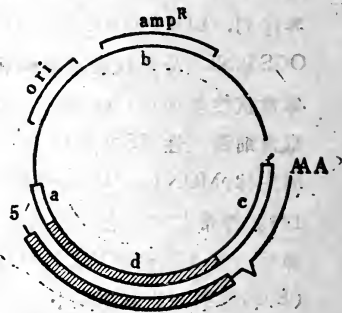


图7-6, pTiAch5的物理图谱。▨和▨分别表示存在于pAL4404和pAL1050上的Ti质粒片段。包含Vir区的pAL4404作为辅助质粒将另一复制子上的T-区转移到植物的基因组上去。T-DNA区克隆到一广泛寄生范围的质粒上,它具有如下特点。(1)具有质粒PK2的复制功能使得此质粒能在大肠杆菌和农杆菌中复制,并与Ti质粒相容;(2)含有Tn903来源的Kan^r基因(npt1)作为细菌的选择标记;(3)Octopine型的Ti质粒的左,右边界序列使得外源DNA能转移到植物中去;(4)左,右边界内含有选择植物转化体的Kan^r的相嵌基因。另外还包括从PUC18来的在β-半乳糖酶基因内有多聚接头的Hae11片段。

(五)哺乳动物遗传工程的载体

1. pSV2载体

图7-7, pSV2载体,许多哺乳动物的载体均是此质粒的衍生体。a. SV40早期表达区的启动子; b. pBR322来源的细菌启动子和amp^r基因; c. SV40来源的polyA位点和小的内含子; d. 在SV40早期表达的启动子控制下的目的基因。



2.pRSV载体

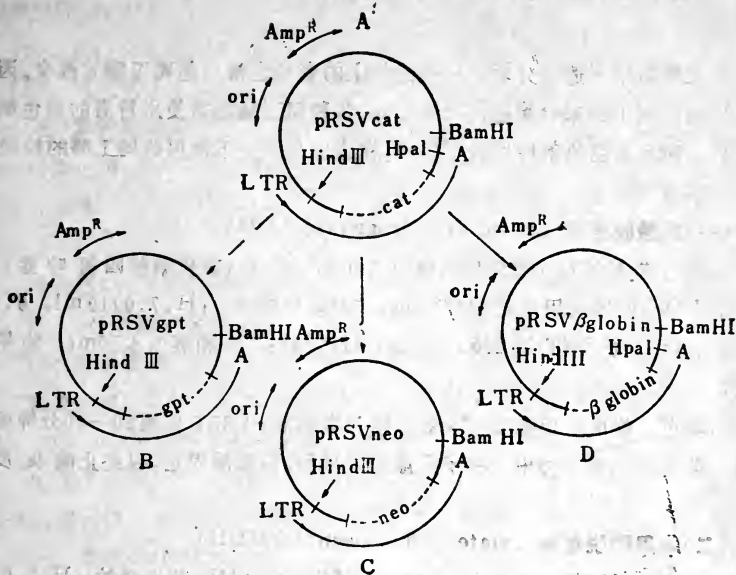


图7-8, 利用劳氏肉瘤病毒的长的末端重复序列(即RSVLTR)作启动子的载体。A, pRSVcat是瞬间表达载体。B, pRSVgpt和C, pRSVneo是显性选择标记的载体。D, pRSVbeta-globin是一很容易将任何目的基因置于RSVLTR控制下的载体。cat—氯霉素乙酰转移酶基因;gpt—次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因, neo—新霉素磷酸转移酶基因, β -globin— β -珠蛋白基因。

(陈炬)

注: 所用抗性标记

Tc: 四环素, Cm: 氯霉素, Sm: 链霉素, Km: 卡那霉素, Tp: 三甲氧苄二氮唑啉, Ap: 氨苄青霉素, Em: 红霉素, Nm: 新霉素。

七、常用的同工酶检验法

同工酶常用于遗传分析。一些遗传上的变异也常引起同工酶的改变。因而可以使用同工酶来检验遗传上的变异。各种同工酶都需使用特有的染色剂来染色、而且显色的条件也各不相同。在这里介绍一下常用的同工酶的检查法，以供参考。

(一) 乳酸脱氢酶 Lactic dehydrogenase(LDH)

1. 染色液: NAD^+ (氧化型辅酶I) 50mg, NBT (氯代硝基四氮唑蓝) 30mg, PMS (吩嗪二甲酯硫酸盐) 2mg, 1M 乳酸钠液 (pH 7.0) 10 ml, 0.1 M 氯化钠 5ml, 0.5M Tris HCl 缓冲液 (pH 7.1) 15 毫升和蒸馏水 70ml。临用前配制。

2. 显色: 将电泳后凝胶条 (板) 浸入染色液, 于 37℃ 保温 30—60 分钟即可显示蓝紫色区带。可用无离子水漂洗, 再用 7% 醋酸固定, 以终止酶促反应。

(二) 苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase(MDH)

1. 染色液: NAD^+ 50mg, NBT 30mg, PMS 2mg, 1M 苹果酸钠 (pH 7.0) 10ml, 0.5M Tris/HCl 缓冲液 (pH 7.1) 和蒸馏水 70ml。

1M 苹果酸钠 (pH 7.0), 也可以用 L-苹果酸 13.4g, $2\text{MNa}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (248 克/升) 49ml, 加蒸馏水到 1l 配制。

2. 显色: 将电泳后凝胶条 (板) 浸入染色液, 于 37℃ 保温 30~60 分钟, 显示深蓝色区带。用无离子水漂洗, 再用 7.5% 醋酸 (或 7.5% 醋酸—30% 乙醇—15% 甘油) 固定保存。

(三) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)

1. 染色液: NADP^+ (氧化型辅酶II) 30mg, NBT 20mg, PMS 20mg, G₆P (葡萄糖-6-磷酸) 187.5mg, 0.01M Tris/HCl 缓冲液 (pH 8.6, 内含 0.004 M EDTA) 62.5ml, 蒸馏水 37.5ml。临用前 15 分钟配制。

2. 显色: 将电泳后凝胶条 (板) 浸入染色液, 于 37℃ 保温约 90 分钟即显示深蓝色区带。用无离子水漂洗, 7.5% 醋酸固定保存。

(四) 谷氨酸脱氢酶 glutamate dehydrogenase(GDH)

1. 染色液: NAD^+ 60mg, NBT 30mg, PMS 2mg, 1M 谷氨酸钠液 (pH 7.0)

5ml, 0.5M磷酸缓冲液 (pH7.0)25ml, 蒸馏水70ml。

1M谷氨酸钠液 (pH7.0), 用10.9g谷氨酸钠溶于100ml的0.5M磷酸缓冲液(pH7.0) 中配制。

2.显色: 将电泳后凝胶条(板)浸入染色液, 于37℃保温, 直至显示深蓝色区带。用无离子水漂洗, 7.5%醋酸固定保存。

(五)异柠檬酸脱氢酶isocitric dehydrogenase(IDH)

1.染色液: NADP⁺30mg, NBT30mg, PMS2mg, MgCl₂100mg, 0.1M异柠檬酸钠液 (pH7.0)16ml, 0.2MTris/HCl缓冲液(pH8.0)20ml, 蒸馏水64ml。

2.显色: 电泳后凝胶条(板), 浸入染色液, 于37℃保温直至显示深蓝色区带。用7.5%醋酸固定保存。

(六)醇脱氢酶Alcohol dehydrogenase(ADH)

1.染色液: NAD⁺50mg, NBT30mg, PMS2mg, 95%乙醇(或其它醇类)4ml, 0.2MTris/HCl缓冲液(pH8.0)14ml和蒸馏水82ml。

2.显色: 将电泳后凝胶条(板)浸入染色液, 于37℃保温直至显示深蓝色区带。用无离子水漂洗, 固定保存于7.5%醋酸中。

(七)酯酶(esterase)

1.染色液: 1g α -醋酸萘酯和1g β -醋酸萘酯, 溶于50ml丙酮和50ml 蒸馏水中, 配制成1% α , β -醋酸萘酯。取1% α , β -醋酸萘酯3ml, 坚牢蓝RR100mg, 0.5MTris/HCl缓冲液(pH7.1)10ml, 加蒸馏水至100ml。

2.显色: 将电泳后凝胶条(板)浸入染色液, 于37℃保温约40分钟, 或室温下直至显出棕色(或红棕色)的区带。用无离子水漂洗, 固定保存于7.5%醋酸-30%乙醇-15%甘油中。

(八)胆碱酯酶(choline esterase)

1.染色液: 3.2mM乙酰硫代胆碱或丁酰硫代胆碱。3M硫酸胺液。二硫代草酰胺饱和的3M硫酸胺液。

2.显色: 先将电泳后凝胶条(板)放在1/15M磷酸盐缓冲液(pH6.1)中, 于22℃下预温30分钟。取出后浸入3.2mM乙酰硫代胆碱或丁酰硫代胆碱中, 22℃下保温90分钟。然后移至3M硫酸胺中, 在4℃冰箱放置24小时, 再移入二硫代草酰胺饱和的3M硫酸胺溶液中, 在4℃放置24小时显色。将显色后的凝胶条放入7.5%醋酸固定保存。

(九)过氧化物酶(oxidase)

1.染色液: (A)0.1%联苯胺(在0.1M, pH5.6醋酸缓冲液100ml中含0.1

联苯胺) 100ml, 3% H_2O_2 1ml, 临用前混合。(B) 2% 联苯胺 (2g 联苯胺溶于 18ml 冰醋酸, 加蒸馏水到 100ml) 20ml, 抗坏血酸 70.4mg, 0.6% H_2O_2 , 20ml 和蒸馏水 60ml, 临用时混合。注意: 在配制二苯胺贮液时, 加几滴酒精或微温热冰醋酸可起助溶作用。

2. 显色: 将电泳后凝胶条(板)浸入染色液, 室温下 1—5 分钟后显出蓝色区带。用无离子水漂洗, 固定保存于甲醇-冰醋酸溶液(甲醇:冰醋酸:水 = 5:1:5), 区带渐渐变成棕色。

(十) 过氧化氢酶(Catalase)

1. 染色贮液: (A) 20份 0.05M 磷酸钾缓冲液(pH7.0), 2.5份二氨基联苯胺(4mg/ml)水溶液和 1份过氧化物酶(1mg/ml)水溶液混合; (B) 含有 0.6% H_2O_2 的 0.05M 磷酸钾缓冲液(pH7.0)。

2. 显色(负带): 电泳后凝胶条(板)经无离子水漂洗, 浸入 A 贮液, 于 23℃ 下放置 5 分钟, 再用无离子水漂洗, 随后浸在 B 液中, 室温下直至棕色凝胶背景上出现白色区带。用无离子水漂洗, 保存于甲醇-冰醋酸溶液(甲醇:冰醋酸:水 = 5:1:5)。

(十一) 细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase)

1. 染色液: 1% 二甲基对苯二胺 1ml, 1% α -萘酚 1ml, 混合后再加入 25ml 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)。

2. 显色: 将电泳后凝胶条(板)浸入染色液中, 室温下放置直至显示蓝色区带。不宜久存。浸在水中, 仅保存几天不褪色。

(十二) α -淀粉酶(α -amylase)

1. 染色贮液: (A) 淀粉溶液, 可溶性淀粉 1g 溶于 100ml 的 1.2% NaCl 溶液中; (B) 5% 醋酸; (C) 碘溶液, 每升含 KI 30g 和 I_2 13g。

2. 显色(负带): 将电泳后的凝胶条(板)浸入 A 液, 37℃ 保温 30~120 分钟。取出胶条(板)用无离子水洗去残留淀粉液, 然后在 B 液中浸泡 5 分钟, 再用 C 液显色, 在暗蓝色的背景上可见到浅黄色或透明的区带。倒去 C 液, 用水洗后固定保存于 7.5% 醋酸—30% 乙醇—15% 甘油中。

(十三) 肌酸磷酸激酶

1. 染色液: 磷酸肌酸 300mM, ADP 2.8mM, AMP 11mM, NADP 1.2mM, 谷胱甘肽 9.9mM, 葡萄糖 22mM, $MgSO_4$ 4.1mM, G-6-PDH 20ug/ml, 己糖激酶 20ug/ml, 叠氮钠 10mM, PMS 0.06mg/ml, NBT 0.24mg/ml。

2. 显色: 电泳后凝胶条(板), 浸入染色液, 37℃ 保温直至蓝色区带。

(十四) 碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase

1. 染色贮液: (A) 底物溶液: α 或 β 萘酚磷酸盐2mg溶于1 ml 0.2M 硼酸缓冲液 (pH10); (B) 染色剂, 固兰RR或固兰BB1mg溶于1ml 0.2M 硼酸缓冲液 (pH10)。 (C) 硼酸缓冲液 (pH10), 0.2M 硼酸-0.3MKCl混合液200 ml与0.2N NaOH溶液100ml混合。

2. 显色: 将电泳后的凝胶条(板) 浸入底物溶液, 置37℃ 保温1—2小时后, 再换上染色剂温育直至红色区带。

(十五) 酸性磷酸酶 Acid phosphatase

1. 染色液: 0.1% α -萘酚磷酸钠和0.1% 固紫GBC溶于50mM 醋酸钠缓冲液 (pH5) 中。

2. 显色: 将电泳后凝胶条(板) 浸泡在50mM 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 中30分钟, 然后浸入染色液, 室温下放置60分钟显色。在7.5% 醋酸溶液中固定。

(十六) 肽酶 (peptidase)

1. 染色液: 邻联(二)茴香胺 (o-dianisidine) 10mg, L-氨基酸氧化酶 10mg, 过氧化物酶20mg, 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 100ml, 0.1M MnCl₂ 1ml, 甘氨酸-亮氨酸 (二肽) 20mg。

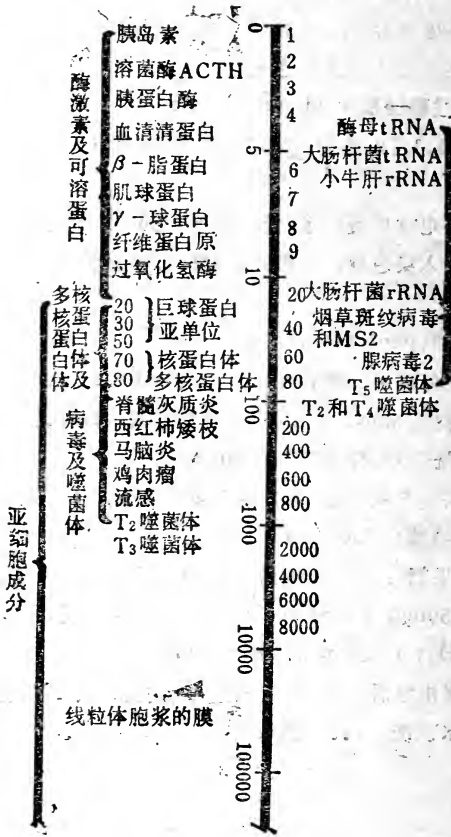
2. 显色: 将电泳凝胶条(板) 浸入染色液中, 于37℃ 保温直至显色。

(十七) 醛缩酶 (Aldolase)

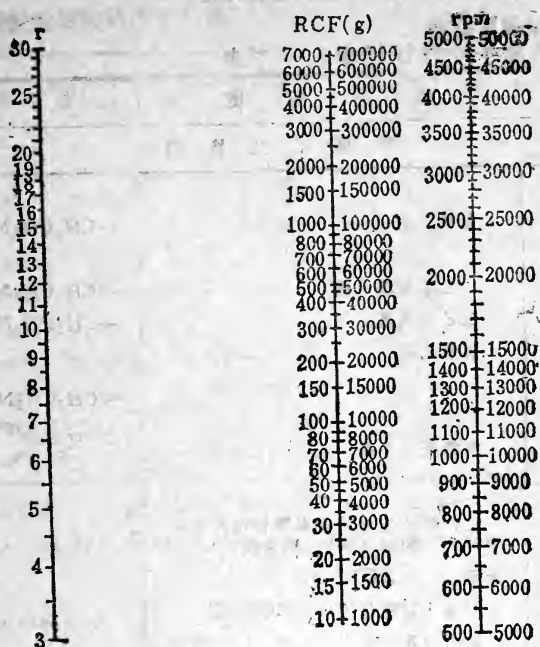
1. 染色液: 果糖-1,6-二磷酸钠545mg, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(167u/ml) 0.6ml, NAD⁺50mg, PMS2mg, 0.5M tris/HCl 缓冲液 (pH7.1), 砷酸钠 (Na₂AsO₄ · 7H₂O) 150mg和蒸馏水90ml。

2. 显色: 将电泳后凝胶条(板) 浸入染色液, 于37℃ 保温直至显蓝色区带。用无离子水浸洗, 7.5% 醋酸固定。

各种生物大分子，亚细胞器及微生物的沉降系数



离心机转数与离心力的列线图



r 为离心机头的半径（角头），或离心管中轴底部内壁到离心机转轴中心的距离（甩平头），单位为厘米。

rpm为离心机每分钟的转速。

RCF为相对离心力，以地心引力即重力加速度的倍数来表示，一般用g（或数字×g）表示。

附图是由下述公式计算而来的：

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2$$

将离心机转数换算为离心力时，首先，在r标尺上取已知的半径和在rpm标尺上取已知的离心机转数，然后，将这两点间划一条直线，在图中RCF标尺上的交叉点即为相应的离心力数值。注意，若已知的转数值处于rpm标尺的右边，则应读取RCF标尺右边的数值。同样，转数值处于rpm标尺左边，则读取RCF标尺左边的数值。

八、其它有关的生化数据

层析法常用数据表
常用的离子交换纤维素列于下表

| 离子交换剂 | 游 离 基 团 | 结 构 |
|-------------------------|--------------------------------|--|
| 阴 离 子 交 换 剂 | | |
| 中等碱性 AE | 氨基乙基 | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ |
| 强碱性 DEAE | 二乙基氨基乙基 | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ |
| TEAE | 三乙基氨基乙基 | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ |
| GE | 胍基乙基 | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\overset{\text{NH}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$ |
| 弱碱性 PAB | 对氨基苯甲基 | $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ |
| 中等碱性 ECTEOLA | 三乙醇胺经甘油和多聚甘油链偶联于纤维素的混合基团(混合胺类) | |
| DBD | 苯甲基化的DEAE纤维素 | |
| BND | 苯甲基化萘酚化的DEAE纤维素 | |
| PEL | 聚乙烯亚胺吸附于纤维素或较弱磷酸化的纤维素 | |
| 阳 离 子 交 换 剂 | | |
| 弱酸性 CM | 羧甲基 | $-\text{CH}_2\text{COOH}$ |
| 中等酸性 P | 磷酸 | $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}(\text{OH})_2$ |
| 强酸性 SE | 磺酸乙基 | $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}(\text{OH})_2$ |
| SP-Sephadex | 磺酸丙基 | $-\text{C}_3\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}(\text{OH})_2$ |
| 强碱性 QAE -Sephadex | 二乙基(2-羟丙基)季胺 | $-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ |

聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

| 型 号 | 排阻的下限 (分子量) | 分级分离的范围 (分子量) | 膨胀后的床体积 (毫升/克干凝胶) | 膨胀所需最少时间 (室温, 小时) |
|---------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Bio-gel-P-2 | 1,600 | 200—2,000 | 3.8 | 2—4 |
| Bio-gel-P-4 | 3,600 | 500—4,000 | 5.8 | 2—4 |
| Bio-gel-P-6 | 4,600 | 1,000—5,000 | 8.8 | 2—4 |
| Bio-gel-P-10 | 10,000 | 5,000—17,000 | 12.4 | 2—4 |
| Bio-gel-P-30 | 30,000 | 20,000—50,000 | 14.9 | 10—12 |
| Bio-gel-P-60 | 60,000 | 30,000—70,000 | 19.0 | 10—12 |
| Bio-gel-P-100 | 100,000 | 40,000—100,000 | 19.0 | 24 |
| Bio-gel-P-150 | 150,000 | 50,000—150,000 | 24.0 | 24 |
| Bio-gel-P-200 | 200,000 | 30,000—300,000 | 34.0 | 48 |
| Bio-gel-P-300 | 300,000 | 100,000—400,000 | 40.0 | 48 |

注: 上述各种型号的凝胶都是亲水性的多孔颗粒, 在水和缓冲溶液中很容易膨胀。
生产厂为Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.

琼脂糖凝胶的技术数据

(琼脂糖是琼脂内非离子型的组分, 它在 0° — 4°C , pH4—9范围内是稳定的)

| 名称、型号 | 凝胶内琼脂糖百分含量 (W/W) | 排阻的下限 (分子量) | 分级分离的范围 (分子量) | 生产厂商 |
|---------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------|--|
| Sepharose 4B | 4 | | 0.3×10^6 — 3×10^6 | Pharmacia, Uppsala, Sweden. |
| Sepharose 2B | 2 | | 2×10^6 — 25×10^6 | |
| Sagavac 10 | 10 | 2.5×10^5 | 1×10^4 — 2.5×10^5 | Seravac Laboratories, Maidenhead, England. |
| Sagavac 8 | 8 | 7×10^5 | 2.5×10^4 — 7×10^5 | |
| Sagavac 6 | 6 | 2×10^6 | 5×10^4 — 2×10^6 | |
| Sagavac 4 | 4 | 15×10^6 | 2×10^5 — 15×10^6 | |
| Sagavac 2 | 2 | 150×10^6 | 5×10^5 — 15×10^7 | |
| Bio-GelA-0.5M | 10 | 0.5×10^6 | $< 1 \times 10^4$ — 0.5×10^6 | Bio-Rad Laboratories, California U.S.A. |
| Bio-GelA-1.5M | 8 | 1.5×10^6 | $< 1 \times 10^4$ — 1.5×10^6 | |
| Bio-GelA-5M | 6 | 5×10^6 | 1×10^4 — 5×10^6 | |
| Bio-GelA-15M | 4 | 15×10^6 | 4×10^4 — 15×10^6 | |
| Bio-GelA-50M | 2 | 50×10^6 | 1×10^5 — 50×10^6 | |
| Bio-GelA-150M | 1 | 150×10^6 | 1×10^6 — 150×10^6 | |

葡聚糖凝胶的某些技术数据

| 分子筛类型 | 干颗粒直径 (μ) | 分子量分级的范围 | | 床体积 毫升/克 干分子筛 | 得水值 | 溶胀最小 平衡时间 (小时) | | 柱头压力 (厘米 H_2O) (2.5厘米直 径柱) |
|---------------|---------------------------------|------------------|----------------|---------------------|---------------|----------------------|-----|--|
| | | 肽及球形 蛋白质 | 葡聚糖 (线性分子) | | | 室温 | 沸水浴 | |
| Sephadex G-10 | 40—120 | —700 | —700 | 2—3 | 1.0 \pm 0.1 | 3 | 1 | |
| Sephadex G-15 | 40—120 | —1,500 | —1,500 | 2.5—3.5 | 1.5 \pm 0.2 | 3 | 1 | |
| Sephadex G-25 | 100—300 (\approx 50—100目) | 1,000— 5,000 | 100— 5,000 | 4—6 | 2.5 \pm 0.2 | 6 | 2 | |
| 粗级 | 50—150 (\approx 100—200目) | | | | | | | |
| 中级 | 20—80 (\approx 200—400目) | | | | | | | |
| 细级 | 10—40 | | | | | | | |
| 超细 | | | | | | | | |
| Sephadex G-50 | 100—300 | 1,500— 30,000 | 500— 10,000 | 9—11 | 5.0 \pm 0.3 | 6 | 2 | |
| 粗级 | 50—150 | | | | | | | |
| 中级 | 20—80 | | | | | | | |
| 细级 | 10—40 | | | | | | | |
| 超细 | | | | | | | | |

续表

| 分子筛类型 | 干颗粒直径 (μ) | 分子量分级的范围 | | 床体积 毫升/克 干分子筛 | 得水值 | 溶胀最小 平衡时间 (小时) | | 柱头压力 (厘米 H_2O) (2.5厘米直 径柱) |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------|----------------------|-----|--|
| | | 肽及球形 蛋白质 | 葡聚糖 (线性分子) | | | 室温 | 沸水浴 | |
| Sephadex G-75 超细 | 40—120 | 3,000— 70,000 | 1,000— 50,000 | 12—15 | 7.5 \pm 0.5 | 24 | 3 | 40—160 |
| | 10—40 | | | | | | | |
| Sephadex G-100 超细 | 40—120 | 4,000— 1,500,000 | 1,000— 100,000 | 15—20 | 10.0 \pm 1.0 | 48 | 5 | 24—96 |
| | 10—40 | | | | | | | |
| Sephadex G-150 超细 | 40—120 | 5,000— 400,000 | 1,000— 150,000 | 20—30 | 15.0 \pm 1.5 | 72 | 5 | 9—36 |
| | 10—40 | | | 18—22 | | | | |
| Sephadex G-200 超细 | 40—120 | 5,000— 800,000 | 1,000— 200,000 | 30—40 | 20.0 \pm 2.0 | 72 | 5 | 4—16 |
| | 10—40 | | | 20—25 | | | | |

| 国内产品型号 | 相 应 国 外 | | |
|-----------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------------|
| 华东强酸阳 42* | Zerolit 215 | Zeo Karb 215 Zeo Karb 315 | Amberlite IR Amberlite IR-100 |
| 强酸1×1~24 或 732(1×7) | Zerolit 225 | Zeo Karb 225 | Amberlite IR-120 |
| 华东弱酸阳 122* | Zerolit 216 | Zeo Karb 216 | |
| 弱酸 101×1~20 或 724(101×4) | Zerolit 226 | Zeo Karb 226 | Amberlite IRC-59 |
| 强碱 201(201×7) 或 717 | Zerolit FF | De Acidite FF | Amberlite IR-400 |
| 强碱 202×1~24 | | | Amberlite IR-410 |
| 弱碱 311(311×2) 或 704 | Zerolit G | De Acidite H | Amberlite IR-45 |
| 弱碱 301 | Zerolit H | De Acidite G | |
| 弱碱 320 | Zerolit E | De Acidite E | Amberlite IR-48 Amberlite IR-45 |
| 弱碱 330 或 701 | | | |
| 脱色树脂 1 号 或通用 1 号 | Decolorite | | |
| 中国生产(1) (2)(3)(4)等 | 英国生产 (8) | 英国生产 (7) | 美国生产 (5) |

生产厂名:

- (1) 上海树脂厂
- (2) 南开大学树脂厂
- (3) 华北制药厂
- (4) 大连化工厂
- (5) Rchm and Haas Co. (美)
- (6) Dow Chemical Co. (美)
- (7) Permutit Co. (英)
- (8) Unitod Water Softeners. (英)
- (9) Permutit AG (西德)

树脂型号对照表

| 树脂 | | 号 | | 树脂的类型 |
|-------------|--------------------------------------|--------|--------------|---------|
| Dowex 30 | Wofatit F Wofatit P Wofatit KS | 日本神胶 | 苏联 | 磺化酚醛型 |
| Dowex 50 | Wofatit KPS 200 | 神胶 1号 | KY-2 | 磺化聚苯乙烯型 |
| | Wofatit C | | | |
| | Wofatit CP 300 | | KB-4 | 丙烯酸型弱碱 |
| Dowex 1 | | 神胶 800 | AB-17 | 苯乙烯型强碱 |
| Dowex 2 | | 神胶 801 | AB-18 | |
| Dowex 3 | | | AH-22 | 苯乙烯型弱碱 |
| | | | AH-18 | |
| | Wofatit M Wofatit N | | AH-21 | 酚醛型 |
| | Wofatit L 150 | | 3A3-10 π | 环氧型弱碱 |
| | | | | 多孔弱碱 |
| 美国生产 (6) | 西德生产 (10) | 日本生产 | 苏联生产 | |

(10) Wolfen Farben (西德)

(11) H. Reeve-Angel & Co. Ltd. (英)

(12) Carl-Schloicher & Schuell Co. (美)

(13) Serva-Entwicklungs. labor, Heidelberg. (西德)

(14) 华东化工学院

(15) 上海有机所

(16) Pharmacia (瑞典, Uppsala)

• 除上海树脂厂产品外, 国内产品多以统一型号编号: 阳离子交换树脂强酸性为1—100, 弱酸性为101—200; 阴离子交换树脂强碱性为201—300, 弱碱性为301—400, $\times 3$ 则表明交联度为3%。

各种凝胶所允许的最大操作压

| 凝 胶 | 建议的最大静水压 (厘米H ₂ O) |
|----------------|----------------------------------|
| Sephadex | |
| G-10 | 100 |
| G-15 | 100 |
| G-25 | 100 |
| G-50 | 100 |
| Sephadex G-75 | 50 |
| Sephadex G-100 | 35 |
| Sephadex G-150 | 15 |
| Sephadex G-200 | 10 |
| Bio-Gel | |
| P-2 | 100 |
| P-4 | 100 |
| P-6 | 100 |
| P-10 | 100 |
| P-30 | 100 |
| P-60 | 100 |
| Bio-Gel P-100 | 60 |
| Bio-Gel P-150 | 30 |
| Bio-Gel P-200 | 20 |
| Bio-Gel P-300 | 15 |
| Sephrose | |
| 2 B | 1 |
| 4 B | 1 |
| Bio-Gel | |
| A-0.5M | 100 |
| A-1.5M | 100 |
| A-5M | 100 |
| Bio-Gel A-15M | 90 |
| Bio-Gel A-50M | 50 |
| Bio-Gel A-150M | 30 |

a. 每厘米凝胶浓度。











S0014579

| | |
|-----|----------|
| 收到期 | 90.3.17. |
| 来源 | 西单书 |
| 书价 | 11.50 |
| 书号 | 147619 |
| 日期 | 90.3.16. |

58.14073

25295

215

贵校已于 11.19

| 借者 | 还期 | 借者 | 还期 |
|----------|---------|-----|---------|
| 徐桂芬 | 90.3.22 | 王海燕 | 91.7.8 |
| 6229 | 92.11.9 | 王海燕 | 92.11.9 |
| 58.14073 | 215 | 王海燕 | 92.11.9 |

注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25295

封面设计：郑大正

ISBN 7—5357—0568—5

Q·15 定价：11.50元

