

物中为最强,但对去垂体大鼠体重增加无生物活性。根据上述实验结果, rhGH-E174A 有可能成为 hGH 的拮抗剂,在临床上能治疗由于 hGH 分泌过多而引起的疾病(例如巨人症和肢端肥大症)。

## 讨 论

据文献<sup>[1]</sup>报道, hGH 分子表面存在二个受体结合区, G120 位于 hGH 的第二个 hGHR 结合区。陈闻远等人的工作<sup>[3]</sup>已证实 hGH-G120R 是一个很强的生长激素拮抗剂,转 rhGH-G120R 基因的小鼠表现为侏儒鼠。我们的实验结果表明,其具有一定的

促去垂体大鼠体重增加的生物活性。Agneta Mode 等 1996 年的研究<sup>[4]</sup>和我们的研究结果基本相似。为什么陈闻远等人用此基因构建的转基因鼠却为侏儒鼠,究其原因尚不清楚,有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Cunningham B. C., et al., 1991, *Science*, **254**: 821 - 825.
- [2] Fraenkel-Conrat H., et al., 1940, *Endo*, **27**: 605 - 613.
- [3] Chen W. Y., et al., 1994, *J. Biol. Chem*, **269** (22): 15892 - 15897.
- [4] Mode A., et al., 1996, *Endo*, **137**(2): 422 - 454.

## PREPARATION OF HUMAN GROWTH HORMONE MUTANTS AND STUDIES ON ITS RECEPTOR BINDING ABILITIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

LI Wei ZHU Li Hua WANG En Bi XU Yan Ping JIANG Xiao Dong GUO Li He

(*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

**ABSTRACT** Three recombinant human growth hormone hGH mutants, rhGH-G120T, rhGH-E174A and rhGH-G120R, were constructed and expressed in *E. coli*. Their receptor binding activities were evaluated with their abilities to inhibit the binding of <sup>125</sup>I-hGH to growth hormone receptor on the membrane of pregnant rabbit liver cells. The results showed that the order of their receptor binding activities was: rhGH-E174A > rhGH-G120R > rhGH > rhGH-G120T. rhGH-G120T and rhGH-G120R had lower biological activities to promote the body weight gain in hypophysectomized rat than rhGH, but rhGH-E174A mutant did not have any biological activity to promote the body weight gain in hypophysectomized rat. Therefore, rhGH-E174A is likely to be a good candidate for hGH antagonist.

**Key words:** hGH Site-directed mutagenesis Antagonist.

## 血清及 BSA 对牛体外受精胚胎发育过程超微结构影响的研究

刘东军\* 杨东山\* 其木格\*\* 旭日干\*

(\* 内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021

\*\* 内蒙古医学院电镜中心 呼和浩特 010059)

**摘 要** 本研究将牛 IVF 胚胎分别在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 三种培养系统内进行培养,然后分别取三个系统中发育到原核期、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚和囊胚阶段的胚胎进行透射电镜的观察,了解培养系统中血清和 BSA 的添加与否对胚胎发育过程中细胞内脂滴、细胞连接、细胞凋亡和微绒毛发育的影响。观察结果表明:各培养系统胚胎的细胞质中均存在大量的脂滴,表明外培养系统是造成脂滴积累的主要原因;血清的添加不会进一步促进脂滴的大量积累,反而可以避免多个脂滴聚合成更大的脂滴。三种培养系统条件下胚胎细胞连接无显著差异。培养系统中添加 FCS 或 BSA 时,桑椹胚期以后的胚胎细胞中存在凋亡小体,表明血清成分是引起细胞凋亡的重要原因。培养系统中血清成分的缺乏会影响胚胎表面微绒毛的发育。

**关键词:** 牛 IVF 胚胎 超微结构 早期发育

目前牛体外受精(in vitro fertilization, IVF)胚胎已广泛应用于畜牧业生产以及转基因动物、克隆动物等相关生物技术的研究中,但 IVF 胚胎与体内受精胚胎相比质量上还有很大差距,在形态上主要

表现在细胞坏死增多、细胞质碎片化、囊胚细胞数较

本文 2002 年 7 月 1 日收到,11 月 20 日接受。  
基金项目:内蒙古自然科学基金项目资助课题(99104-2)。  
E-mail: dwzx@imu.edu.cn

少及发育速度较慢等方面<sup>[1,2]</sup>。有关牛胚胎发育过程中细胞超微结构的研究最早是在体内胚胎上进行的<sup>[3-5]</sup>,关于 IVF 胚胎超微结构的研究近几年开始引起关注。

血清及 BSA 是目前牛 IVF 胚胎体外培养系统中添加的重要成分。最近的研究结果表明,牛 IVF 胚胎与体内受精胚胎相比在超微结构上存在显著差距<sup>[6]</sup>,培养系统中血清的添加与否会显著影响胚胎的超微结构,并进一步影响到胚胎的生理特性<sup>[7,8]</sup>。但目前对 IVF 胚胎的电镜观察大多只选择某一发育阶段,如原核期<sup>[9,10]</sup>、桑椹胚或囊胚<sup>[6-8]</sup>等,相关报道的数量也比较少,对体外培养牛胚胎超微结构进行系统研究的报道更为少见。本研究在 SOF (synthetic oviduct fluid) 系统下,系统观察了培养系统中添加 FCS (fetal calf serum)、BSA (bovine serum albumin) 以及不添加这些成分对 IVF 胚胎各发育阶段(原核期—囊胚期)细胞内脂滴、细胞连接、细胞凋亡以及细胞表面微绒毛发育的影响,为进一步探讨影响胚胎体外发育的因素提供实验依据。

## 材料与方 法

### 1. 卵母细胞的采集、体外成熟及体外受精

本研究中牛卵母细胞的采集、卵母细胞的体外成熟培养及体外受精处理过程均采用旭日干等<sup>[11]</sup>的方法并略加改进。其过程是:将来自屠宰场的屠宰母牛卵巢置于 30-35℃ 生理盐水中带回实验室,用注射器从卵泡中抽取卵母细胞,采卵液为 PBS + 4mg/ml BSA。将卵母细胞置于成熟培养液中培养 22-24h,每个 50 $\mu$ l 培养小滴内培养 15 个卵母细胞。成熟培养液为: M199 + 10mmol/L HEPES + 3AU/ml FSH + 1  $\mu$ g/ml E2 + 10% FCS。将细管冷冻精液在 37℃ 水浴中解冻后用含有 10mmol/L 咖啡因的 BO 液稀释,然后以 2000r/min 离心洗涤两次,每次 5min。洗涤后将上浮的活精子用 BO + 20mg/ml BSA + 2 $\mu$ l/ml 肝素稀释一倍,使精子浓度达到 2  $\times$  10<sup>6</sup> ml。然后将培养成熟的卵母细胞移入该精子悬浮液制成的微小滴中共同培养 7h,每个 100 $\mu$ l 的精液小滴中含有 15 个卵母细胞。

### 2. 体外受精卵的体外发育培养

将受精处理后的卵子涡旋震荡去除卵丘细胞,洗涤后分别在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA (polyvinyl alcohol)<sup>[12]</sup> 培养系统中培养,于受精后 15、24、36、84、120、144h 采集各系统中发育到原核期、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚和囊胚期的胚胎。各培养系统每 48h 更换一次培养液。

### 3. 胚胎的固定、包埋、制片和电镜观察

将采集到的胚胎用 3% 戊二醛固定,4℃ 保存。胚胎收集齐后,将戊二醛固定的胚胎经二甲酸钠缓冲液清洗,而后用 1% 四氧化锇后固定 1 小时,再用巴比妥缓冲液清洗,

然后用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的梯度乙醇脱水处理,最后用 Epon812 包埋,包埋块在 37℃ 条件下渗透 24 小时后,再在 60℃ 条件下聚合 48 小时。包埋好的样品用 LKB-J 型超薄切片机制备 500 $\text{\AA}$  超薄切片,然后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,用 H-700H 日立电子显微镜对切片进行观察拍照。本研究不同培养系统、不同发育阶段的胚胎各观察 5 枚胚胎。

## 结 果

本研究对牛 IVF 胚胎在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 三种培养系统下早期发育各阶段细胞内脂滴、细胞连接、细胞凋亡以及细胞表面微绒毛发育的超微结构进行了系统的观察,同时对三种体外培养系统下胚胎超微结构差异。下面按照所观察的各种细胞器在不同发育阶段的特征,对观察结果叙述如下。

### 1. 脂滴

各培养系统原核期-4 细胞期胚胎细胞质中均可见脂滴分布,脂滴内具少量内容物,并随着发育过程内容物逐渐增加。8 细胞期胚胎细胞的脂滴内容物明显增加,但各培养系统间无明显差别。桑椹胚期三种培养系统条件下细胞内均存在大量脂滴,脂滴内充满了大量的内容物(图版图 1),表明脂滴的积累与血清的存在与否无关。胚胎发育至囊胚期后,在 SOF + FCS 系统内的胚胎细胞出现许多较大脂滴,小空泡内也积累出脂肪酸(图版图 2)。在 SOF + BSA 和 SOF + PVA 系统内胚胎细胞出现大型脂滴(图版图 3),其体积显著大于 SOF + FCS 培养系统胚胎细胞内脂滴的体积,可能是由多个脂滴聚合而成。小空泡内也积累有脂肪酸。这一结果进一步表明,血清并不是引起脂滴积累的因素,而且血清中的一些成分可以避免一些脂滴聚合成大型脂滴。

### 2. 细胞连接

各培养系统条件下细胞连接未见显著不同。2 细胞-4 细胞胚胎细胞间无任何连接,为微绒毛互相镶嵌,细胞表面微绒毛稀疏(图版图 4)。8 细胞期胚胎细胞接触紧密,偶尔可见类似间隙连接的结构(图版图 5),但大多连接类型仍与 4 细胞期相同。桑椹胚期细胞间为间隙连接。囊胚期的滋养层细胞间存在桥粒(图版图 6),表明这一时期胚胎细胞间已建立起比较紧密的连接方式。内细胞团细胞间有细胞间隙,相邻细胞通过突起部分形成连接。

### 3. 细胞凋亡

胚胎发育至桑椹胚期后,在 SOF + FCS 系统样

品中发现开始有凋亡小体出现,在SOF+BSA系统样品中发现某些细胞明显区别于内部细胞,细胞质严重空泡化,出现大的空腔,细胞器少,线粒体呈致密的黑色小体,可能是细胞退化的表现。这些现象表明血清及BSA可能是诱发细胞凋亡和退化的重要因素。在SOF+FCS和SOF+BSA系统内培养的囊胚细胞中多处可见凋亡小体(图版图7),而在SOF+PVA培养系统内培养的所有样品的胚胎细胞中均未观察到凋亡小体的存在。这一结果表明血清及血清中的蛋白(BSA)可能是引起胚胎体外发育过程中产生细胞凋亡的重要原因。

#### 4. 微绒毛

在SOF+FCS和SOF+BSA系统内培养的囊胚在透明带下具丰富的微绒毛,细胞膜伸出较直立的微绒毛,有的深入透明带(图版图8);而在SOF+PVA培养系统内培养的囊胚其透明带下的微绒毛明显发育不好,成倒伏状(图版图9)。这表明血清成分对于微绒毛的发育起十分重要的作用。

## 讨 论

现有研究表明,牛IVF胚胎在SOF+FCS、SOF+BSA和SOF+PVA内的囊胚发育率无显著差异,而且培养液中PVA的作用主要是防止胚胎的粘连,而对于胚胎本身的发育无明显作用<sup>[12]</sup>。从本研究结果可以看出,培养系统中FCS和BSA的添加对胚胎发育过程中细胞的超微结构有显著影响。

#### 1. 脂滴的变化

脂滴是哺乳动物胚胎细胞中普遍存在的结构。目前有关体外培养系统对牛IVF胚胎发育过程中亚显微结构影响的一些研究着眼点就集中在这一方面<sup>[7,8]</sup>。目前的研究结果普遍认为:牛IVF胚胎细胞中的脂滴显著多于体内胚胎,产生这种现象的原因是由于培养系统中血清的添加所造成的,而且这些脂滴的积累会显著影响胚胎的抗冻性。从本研究的观察发现,无论体外培养系统中添加血清与否,IVF胚胎各个时期均具有较多的脂滴,并有一个逐步积累的过程。同时在囊胚期,SOF+BSA和SOF+PVA条件下胚胎细胞内存在大型脂滴,这些大型脂滴可能是由桑椹胚时期一些较小的脂滴聚合而成。而在SOF+FCS条件下,这些较小的脂滴则不会进一步聚合。这一研究结果表明,IVF胚胎细胞内脂滴的增多并不是由于血清的添加所造成的,而是由于体外培养系统本身的原因;培养系统中血清的添加反而可以避免较小脂滴的进一步聚合,这种

作用可能是血清中BSA以外的其他成分产生的。

Sata等<sup>[13]</sup>利用毛细管柱色谱分析详细比较了有血清系统及无血清系统下,体外胚胎中脂滴的组成成分,发现有血清系统中得到的胚胎中含较多的长链饱和脂肪酸,与血清中的脂类成分接近,而无血清系统中培养的胚胎则主要含有短链饱和脂肪酸和多聚不饱和脂肪酸。本研究也发现在SOF+FCS系统中胚胎细胞的脂滴颜色浅于其他两个系统中的,可能就是由于上述原因造成的。利用电镜测量方法,Crosier等<sup>[8]</sup>也发现在无血清的系统中桑椹胚脂滴数量同样增加,Crosier认为体外培养胚胎脂滴数的增加可能是由于不适培养条件导致膜结构改变,从而使脂类成分进入胚胎细胞,而不是由于胚胎对培养基成分的主动吸收。Abe等<sup>[8]</sup>发现无血清培养系统可减少脂滴的积累,这可能是由于他们使用的无血清培养系统内含有多种生长因子,这些生长因子可能会维持细胞膜的正常结构,避免脂类成分进入细胞,从而减少脂滴的积累。

#### 2. 细胞连接

胚胎细胞间的连接包括间隙连接、附着连接和紧密连接。通过电镜观察在牛的2-16细胞期胚胎中未发现细胞连接的存在,而在第7天的囊胚中已发现有细胞连接的存在<sup>[14]</sup>,本研究在三种培养系统条件下2-4细胞期均未发现细胞连接,主要是细胞间微绒毛的镶嵌。在8细胞期开始内部偶尔可见间隙连接,囊胚滋养层细胞间可见不连续的桥粒连接,而内细胞团细胞之间以细胞间的突起相连。这一结果与上述报道类似。

Boni等<sup>[15]</sup>发现体内受精胚胎的内细胞团中存在丰富的细胞连接,而本研究发现内细胞团细胞间只以少量的细胞突起相联系,表明本研究的体外培养系统可能影响了胚胎间细胞连接的建立。现有研究表明,体外受精胚胎的细胞连接显著减少<sup>[7,16,17]</sup>。Wrenzycki等<sup>[18]</sup>证实编码Cx43蛋白的基因在体内和体外受精胚胎的表达存在不同,而这种蛋白是囊胚期间细胞连接的形成所需要的。可见体外培养条件影响了相关基因的表达,从而导致IVF胚胎细胞连接的减少。

细胞连接在胚胎发育过程中起十分重要的作用。间隙连接是细胞间膜通道的复合体,它调节相邻细胞之间小的代谢物和离子的交换,从而协调代谢及电活动,间隙连接通讯是参与生长、细胞分化及胚胎发育过程的重要调控机制<sup>[19]</sup>。很多研究者报道,牛体外胚桑椹期紧缩不足。在体内,桑椹胚要经

过一个较长的紧缩期才形成囊胚,而体外胚这一时间明显缩短,囊胚腔过早形成,这种过早的形成囊胚腔,导致桑椹胚还没有来得及充分紧缩就进入囊胚期,其形态学上即表现细胞间连接不充分,这被认为是体内胚与体外胚的重要差别之一。

### 3. 细胞凋亡

通过本研究的观察发现,在 SOF + FCS 培养条件下,桑椹胚和囊胚期的胚胎存在凋亡小体。在 SOF + BSA 培养条件下的囊胚期胚胎也存在这种结构。但外 SOF + PVA 培养条件下,各发育阶段的胚胎中均未发现有凋亡小体的存在。在体内胚胎中,细胞死亡是一种正常现象<sup>[20]</sup>。细胞死亡最早在囊胚形成时可观察到,而且主要发生在内细胞团,胚胎发育中的细胞死亡可能是胚胎去除异常细胞及具有不适当发育潜能的细胞的一条途径。本研究的结果可能是由于 IVF 胚胎在 SOF + PVA 培养系统内细胞死亡比率较低,所以没有观察到而造成的。但这一现象可以表明体外培养系统中添加的血清成分会促进胚胎细胞产生凋亡。

细胞死亡包括胞质空泡化、核及 DNA 碎片化、细胞凋亡等,在本研究 SOF + BSA 培养系统桑椹期的一样品外围细胞中见到退化的空泡化细胞,这很可能是细胞死亡的一种表现。细胞凋亡产生的一个很重要的原因是染色体异常,此外不适宜的培养条件以及过量的氧自由基都会导致胚胎体外发育受阻。本研究观察到的囊胚期多处凋亡小体均位于内细胞团中,在滋养层未发现凋亡小体,这与体内胚的情况一致。但是在 SOF + FCS 培养系统内桑椹胚期就出现了凋亡小体,这进一步证明血清成分可以促进细胞凋亡的产生。这种高比率出现的凋亡小体可能是体外培养造成胚胎发育异常的表现,可能会直接导致胚胎移植后妊娠率低、流产率高、胎儿发育异常。

### 4. 微绒毛

Fair 等<sup>[17]</sup>对体外不同培养系统下得到的囊胚与体内囊胚进行比较发现,体内囊胚卵周隙狭窄、微绒毛丛集且连续分布、细胞连接网广泛分布;而体外来源的囊胚卵周隙明显大于体内胚,微绒毛稀疏,细胞连接少。在牛体内胚胎中,滋养层细胞表面的微绒毛是细胞分化的重要特征,正常发育的微绒毛可以促进胚胎对营养物质的吸收。本研究发现,在

SOF + FCS 和 SOF + BSA 培养系统内的囊胚其滋养层细胞表面的微绒毛发育良好,成直立状;而在 SOF + PVA 培养系统内的囊胚滋养层细胞表面的微绒毛成倒伏状,发育状况不良。这一结果表明培养系统中的血清成分对于促进胚胎细胞的分化有重要作用。

从上述研究结果可以看出,培养系统中血清和 BSA 的添加既有对胚胎发育有利的一面,也有影响胚胎发育的一面,因此有关方面的研究还需进一步深入,真正搞清对胚胎发育过程起作用的物质种类,才有可能进一步完善体外培养系统。

### 参 考 文 献

- [1] Linder G. M. et al., 1983, *Theriogenology*, **20**: 407 - 416.
- [2] Hardy K. et al., 1989, *Development*, **107**: 597 - 604.
- [3] Brackett B. C. et al., 1980, *Biol. Reprod.*, **23**: 189 - 205.
- [4] Mohr L. R. et al., 1981, *Bio. Reprod.*, **26**: 787 - 790.
- [5] Betteridge K. J., 1988, *Theriogenology*, **29**: 155 - 187.
- [6] Crosier A. E. et al., 2000, *Bio. Reprod.*, **62**: 1459 - 1465.
- [7] Abe H. et al., 1999, *Mol. Reprod. Dev.*, **53**: 325 - 335.
- [8] Abe H. et al., 2002, *Mol. Reprod. Dev.*, **61**: 57 - 66.
- [9] Laurincik J. et al., 1996, *Mol. Reprod. Dev.*, **43**: 62 - 69.
- [10] Laurincik J. et al., 1998, *Mol. Reprod. Dev.*, **50**: 192 - 199.
- [11] 旭日干等, 1989, 内蒙古大学学报(自然科学版), **20**: 407 - 414.
- [12] 刘东军等, 2001, 内蒙古大学学报(自然科学版), **32**: 324 - 326.
- [13] Sata R. et al., 1999, *J. Reprod. Dev.*, **45**: 97 - 103.
- [14] Linares T. et al., 1981, *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.*, **12**: 212 - 226.
- [15] Boni R. et al., 1999, *Biol. Reprod.*, **61**: 1050 - 1055.
- [16] Prather R. S. et al., 1993, *Theriogenology*, **39**: 561 - 567.
- [17] Fair T. et al., 2001, *Mol. Reprod. Dev.*, **58**: 186 - 195.
- [18] Wrenzycki C. et al., 1999, *Mol. Reprod. Dev.*, **53**: 8 - 18.
- [19] De Haan R. 1994, *Zygote*, **2**: 183 - 188.
- [20] Enders AC. et al., 1982, *Biol. Reprod.*, **26**: 353 - 366.

## EFFECTS OF FCS AND BSA ON ULTRASTRUCTURE OF IN VITRO PRODUCED BOVINE EMBRYOS

LIU Dong Jun\* YANG Dong Shan\* Qi Mu Ge\*\* BOU Shor Gan\*

(\* Key Laboratory of Education Ministry of China for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology, NeiMongol University, Huhhot 010021 \*\* Electron Microscope Center of NeiMongol Medicine College, Huhhot 010059)

**ABSTRACT** Bovine IVF embryos were cultured in SOF + FCS, SOF + BSA and SOF + PVA respectively. The embryos at 2-cell, 4-cell, 8-cell stage embryos, morulae and blastocysts from each culture system were collected and prepared for observation in transmission electron microscope, so that to understand the effects of the supplement of serum or BSA or not in culture system on the ultrastructure of embryos. It was observed that many lipid droplets existed in the cytoplasm of embryos cultured in every system at whole developmental stage, and the results indicated that the accumulation of cytoplasmic lipid droplets was mainly caused by the in vitro culture condition. The supplement of serum in culture system did not further promoted the accumulation of lipid droplets, on the contrary could avoided the integration of many droplets to bigger ones. There was no significant difference on cell junction of embryos cultured in different system. Apoptotic bodies were observed in morulae and blastocysts in the embryos cultured in SOF + FCS and SOF + BSA, this result showed that the apoptosis in embryo cells was mainly caused by the composition in serum. The development of microvilllis on the surface of embryo could be affected with the lacking of serum or BSA in the culture system.

**Key words:** Bovine IVF embryos Ultrastructure Development

### 实验技术

## 应用滤纸吸附-PCR 法和改进的亚克隆方法快速筛选 克隆甜橙细胞壁酸性转化酶基因(CS-CWI)\*\*\*

安新民\* 徐昌杰\* 张上隆\* 陶俊\*\* 陈俊伟\*

(\* 浙江大学华家池校区园艺系 杭州 310029 \*\* 扬州大学园艺系 扬州 225009)

**摘要** 根据 GenBank 中已知的植物细胞壁转化酶基因的保守区序列设计一对 PCR 引物, 分别以滤纸(吸附有甜橙基因组噬菌体文库 LB 平板的噬菌体)和 Top agarose(滤纸吸附后的 LB 平板)的 SM 洗脱液为模板, 仅通过 7 次 PCR 就快速、准确、经济地筛选出 CSCWI 阳性克隆。提取该阳性克隆的 DNA 并进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 通过 PCR 方法鉴定阳性酶切条带并回收, 利用 Taq DNA 聚合酶的聚合活性和 3' 末端转移酶活性, 改变该片段使其含有 3' 腺苷酸(A)突出末端, 与 pUCm-T 载体实现了高效连接。阳性噬菌斑克隆及阳性条带的正确性得到测序的验证, 表明滤纸吸附-PCR 法和改进的亚克隆方法可正确和高效地应用于 PCR 筛选文库和亚克隆。

**关键词:** 滤纸吸附 PCR 筛选文库 亚克隆

传统的文库筛选方法是利用合适的放射性或非放射性标记的 DNA 探针, 通过噬菌斑原位杂交筛选出阳性噬菌体, 存在操作繁琐、工作量大、需时较长、费用较高、易产生杂交背景干扰、易得到假阳性克隆等缺点, 使用同位素标记的探针还有放射污染之嫌。应用 PCR 法筛选文库偶见于近期文献<sup>[1-5]</sup>, 本研究在此基础上采用滤纸吸附法, 解决了筛选过程中难以获得阳性克隆单噬菌斑的问题并极大地提

高了筛选效率, 成功地从甜橙基因组 DNA 文库中筛选出细胞壁转化酶基因。采用滤纸吸附-PCR 法筛选文库具有快速、简便、灵敏、准确、特异性强并且较为经济等优点。

本文 2002 年 3 月 4 日收到, 3 月 25 日接受。

\*\* 国家自然科学基金重点项目(批准号: 39730340, 30170648)资助。

E-mail: anxinmin@sohu.com