

- 5 Warner CW, Sadler TW, Twilis SA, et al Zinc amelioration of cadmium-induced teratogenesis *in vitro* *Teratology*, 1984; 30: 47.
- 6 崔山田, 李莲姬, 韩春姬, 等. 氧化锆对氧化镉引起的体外培养小鼠全胚胎毒性的拮抗作用. *癌变·畸变·突变*, 1995; 7(2): 74—80.
- 7 林光恒, 刘明星, 孙国琼. 阻遏诱变剂镉在海洋生物中传递的物质及作用机理的研究(I)褐藻酸钠. *癌变·畸变·突变*, 1996; 8(1): 1- 5.
- 8 Lin G, Song S, Tseng CK. Cadmium flux and genotoxicity in an experimental marine food chain. *Chin J Oceanol Limnol*, 1991; 4(9): 292- 299.
- 9 秦松, 林光恒. 化学诱变剂在实验海洋食物链中的流动及遗传毒性的检测. 1. 无机诱变剂(I)镉在褐指藻中的吸着与积累. *癌变·畸变·突变*, 1992; 4(4): 1—5.
- 10 林光恒, 秦松. 化学诱变剂在实验海洋食物链中的流动及遗传毒性的检测. 1. 无机诱变剂(II)镉从褐指藻向中国对虾以及中国对虾向欧氏六线鱼的传递. *癌变·畸变·突变*, 1991; 3(3): 1—5.
- 11 Ma TH. Tradescantia micronuclei(Trad-MCN) test for environment clastogens. In: *In vitro toxicity testing of environmental agents*(Koberet AR, et al eds) New York: Plenum, 1993: 141- 214.
- 12 郑集, 编著. 普通生物化学. 人民教育出版社, 1982: 262—298.
- 13 Singhai RL, Merali Z. Biochemical toxicity of cadmium. In Merinear LH ed. *Cadmium toxicity*. New York, Marcel Dekker Inc, 1979: 113- 214.
- 14 李永祺, 丁美丽, 编著. 海洋污染生物学. 海洋出版社, 1991: 343—386.

pS189/FLCIII—2 诱变检测系统的研究

易绍萱¹ 李大成² 周晓柳² 王浩² 傅继梁³

¹第三军医大学分子生物学教研室 重庆 630038 ²华西医科大学分子生物学教研室 成都 610044 ³第二军医大学生物学教研室 上海 200433

摘要 本文报道优选基于 SV 40 的短暂复制型穿梭质粒 pS189 和新生儿羊膜上皮细胞 FLCIII—2 亚克隆, 组成穿梭质粒/哺乳动物细胞诱变检测系统。该系统中 SupF 的自发突变型频率仅为 1.7×10^{-5} , 低于已报道的其它短暂复制型质粒和该质粒在其它细胞中复制时 SupF 基因的自发突变率。各种剂量的 MNG 的诱发突变频率随诱变剂剂量的增加而升高。MNG 对 FL 细胞毒性较大, 仅 $0.32 \mu\text{g}/\text{ml}$ 就可使 FL 几乎完全失去生长分裂形成克隆的能力, 但在短时期内对依赖于病毒复制起点的 DNA 复制效率影响不大, 突变频率却显著升高。突变质粒的限制性内切酶分析和靶基因的 PCR 分析等表明, 检出突变大多数为点突变或微小缺失, 该系统具有方便快捷检出点突变的能力, 可成为检测诱变剂、抗诱变剂作用强度和特性的分子检测系统。

关键词 穿梭质粒; 诱发突变; pS189

THE ESTABLISHMENT OF pS189/FLCIII—2 SYSTEM FOR MUTAGENESIS STUDY

Yi Shaoxuan¹, Li Dacheng², Wang Hao², Zhou Xiaoliu², Fu Jiliang³

Dept. of Molecular Biology, Third Military Medical College, Chongqing 630038; ²Dept. of

获国家八五攻关和美国 CMB 基金部分资助

Abstract A mutagenesis experimental system has been established for detecting mutagens and elucidation the mechanism of mutagenesis of DNA level in mammalian cells, using a SV 40 based transient replication shuttle vector plasmid (pS189) and a human amnion cell strain (FL). The mutant frequency of control in this system is only 1.7×10^{-5} . After treated with $0.32 \mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG, the induced mutant frequency increased significantly ($P < 0.05$). The mutants were analysed by the agrose gel electrophoresis, restriction enzyme analysis and PCR amplification of SupF gene. It is indicated that the majority of the SupF mutants induced by MNNG or EMS in the pS189/FLCIII—2 system may be point mutations.

Key words Shuttle Vector; Mutagenesis; pS189

在环境致癌因素中,绝大多数是通过诱发细胞生长分化过程中关键基因的结构改变,从而导致细胞恶性生长。检测环境中的诱变剂,阐明其作用机理,对肿瘤发生机理研究及防治有重要意义。穿梭质粒是既可以在细菌中增殖,又能在哺乳动物细胞中复制的一类重组DNA分子⁽¹⁾。利用穿梭质粒/哺乳动物细胞诱变检测系统,可以在哺乳动物细胞中作诱变处理,使穿梭质粒上的靶基因在哺乳动物细胞结构和诸多相关酶系作用的背景上发生突变,真实地反映哺乳动物细胞中诱变特性,然后提取纯化穿梭质粒,转化原核生物细胞,在原核细胞中筛选、扩增,得到大量的已发生功能改变的靶基因做DNA精细结构分析,获得遗传毒性物质引起哺乳动物细胞中DNA改变的强度和特性的资料,为在DNA一级结构水平上评价化学物的遗传毒性提供更为可靠的手段。

材料和方法

1. 材料: FL 细胞: 本室保存种; 穿梭质粒 pS189 及其指示菌 MBM 7070 由美国国立卫生研究院 Michael M. Seidman 教授赠送。EcoR I, BamH I, H and III, λ /EcoR I- Hind III, 华美生物公司产品; Dpn I, 100bp DNA ladder, DMEM 培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside), X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indoxyl β

-D-galactoside), GBCO 产品; 甲基磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate, EMS), 甲基硝基亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG), Fluka 产品; 二甲基亚硝酸胺 (Dimethylnitrosamine, DMN), 二乙基亚硝酸胺 (Diethylnitrosamine, DEN), Sigma 产品; BM-cycling, Boehringer 产品; PCR 试剂盒, Promega 产品

2. 方法: 按如下实验操作流程进行, 其中, 除特殊指明外, 有关细菌 DNA 常规方法参考 Sambrook⁽²⁾ 方法; 细胞亚克隆及生物学性状检测参考鄂征⁽³⁾ 方法。

实验流程如图。

结果和讨论

1. pZ189/pS189 穿梭质粒: pZ189/pS189 是基于 SV 40 的短暂复制型穿梭质粒。pZ189 于 1985 年由 Seidman 等⁽⁵⁾ 构建, 质粒大小 5.4Kb, 含有一源于 SV 40 的复制起始点 ori 和 T 抗原基因; 来源于 pBR 327 的细菌质粒复制顺序和氨苄青霉素抗性基因, 以及作为靶基因的大肠杆菌色氨酸 tRNA 琥珀突变抑制基因 SupF。pS189 是从 pZ189 中选择出的缺失突变体⁽⁶⁾, 质粒全长 5337bp, 它缺失了 pZ189 中位于 EcoR I 位点和氨苄青霉素抗性基因间 176bp 核苷酸顺序, 使 SupF 基因的缺失突变检出率较 pZ189 降低一半, 更

有利于点突变的检出。pZ189/pS189 具有短暂复制型质粒的质粒较小、实验周期短、实验设计灵活方便、在哺乳动物细胞中拷贝数大等优点,靶基因 SupF 全长仅 160bp,位于质粒在细菌中的复制和选择位点(pBR327ori 和 Amp)之间,使靶基因的自发突变频率较其他短暂复制型质粒大大降低,且便于对突变子作序列分析。我们选用 pS189 作为诱变检测系统的穿梭质粒。pS189 质粒 DNA 上有 1 个 EcoR I 切点,2 个 BamH I 切点,4 个

Hind III 切点,其片段大小分别为 EcoR I 5.3Kb; BamH I 3.0, 2.3Kb; Hind III 2.6, 1.2, 0.96, 0.53Kb。用碱裂法提取的质粒经酚:氯仿抽提, RNaseA 处理, NH₄Ac-乙醇沉淀后用限制性内切酶 EcoR I, BamH I, Hind III 酶切。λ/EcoR I-Hind III 作分子量标记, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查, 结果显示三种酶切片段数目和大小与根据酶切位点推算的完全相符。纯化质粒经紫外分光光度仪测定 O. D. 260/O. D. 280 约 1.7, 浓度约 1mg/ml。

FL 细胞

BM-cycling 处理

亚克隆

pS189 质粒

转化受体菌 MBM 7070

挑选单菌落提取质粒并鉴定

碱裂法大量抽提 pS189 质粒, 纯化, 鉴定, 浓度测定

电穿孔转染 FLCIII-2 细胞

EM S, MNN G 各种剂量处理

Hirt⁽⁴⁾法提取 DNA, 纯化

Dpn I 内切酶切割未在细胞中复制的 pS189

转化 MBM 7070 菌

在含 Amp, X-gal, IPTG 平板上筛选转化子和突变子

突变子进一步确认

生长曲线 克隆形成率 支原体检测 染色体检测

FLCIII-2

EM S, MNN G, DMN, DEN 等四种诱变剂的毒性实验

Amp, X-gal IPTG 平板上进
行 SupF 功能鉴定

突变质粒电泳分
析

部分质粒 DNA
BamH I, Hind III 酶
切分析

PCR 鉴定 SupF
基因大小

2 FL 细胞: FL 细胞是新生儿羊膜上皮细胞, 1956 年由 Fogh 和 Lund 建株⁽⁷⁾, 八十年代中期引入国内。该细胞是人类非肿瘤性细胞系, 生物学背景较清楚, 特别适合于病毒繁殖。近年的研究发现, FL 细胞具有广泛的可诱导的药物代谢酶系⁽⁸⁾, 在体外实验中可以

代替鼠肝微粒体 S9 的作用, 将前致癌(突变)物代谢转变为终致癌(突变)物。穿梭质粒在人类细胞系中的自发突变率较在其他哺乳动物细胞如猴、狗、鼠等细胞中低⁽⁹⁾, 且用人类细胞系构建诱变检测系统能更真实地反映诱变剂对人体致癌作用的强度和机理, 因此, 我

们选用 FL 细胞作为诱变检测系统的哺乳动物细胞。本室保种的 FL 细胞, 经过长期传代冻存, 形态已不很均一, 细胞内含物较多, 培养过程中死细胞多, 克隆形成率仅为 20% 左右, 我们对该细胞进行了亚克隆筛选, 并对其生物学性状进行了常规检查。亚克隆前先用复合抗生素 BM - cyling 对细胞进行连续三个周期的常规除支原体处理⁽¹⁰⁾, 再经连续三次亚克隆, 所得到的亚克隆细胞系 FLC III—2, 细胞形态结构均一, 内含物明显减少, 细胞贴壁和折光性好, 克隆形成率提高至 90%。染色体呈异倍性, 数目变动于 40—80 条之间。支原体检查证实细胞无支原体污染, 生长曲线测定及曲线拟合显示其对数生长期群体倍增时间为 23.5 小时。

3 四种诱变剂 MNNG、EM S、DMN、DEN

毒性试验: 为了确定 FLC III—2 细胞对诱变剂的敏感性及其对 pS189/FLC III—系统诱变时的诱变剂剂量, 进行了四种诱变剂的毒性试验, 其中 MNNG、EM S 为直接诱变剂, DMN、DEN 是需经代谢活化才具有诱变活性的间接诱变剂。以诱变剂剂量为 X, 各剂量组对对照组的相对克隆形成率 (RCE, relative cloning efficiency) 为 Y, 通过计算机回归拟合, 其优选工作曲线参数列于表 1。根据 MNNG 和 EM S 的回归公式, 可计算相对克隆形成率在 50% 时诱变剂剂量分别为 0.1184 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 257.3762 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。4 种诱变剂对 FLC III—2 细胞均有一定的剂量反应关系, 可选择不同的毒性剂量作进一步的诱变强度和诱变的 DNA 序列特性分析。

Table 1. The Cytotoxicity Curve Parameter of Four Kind of Mutagens

Mutagen	MNNG	EM S	DMN	DEN
Regression equation	$Y = A \cdot E^{BX}$	$Y = A \cdot E^{BX}$	$Y = A + B \cdot \log(x)$	$Y = A + B \cdot \log(x)$
Factor (A)	116.7591	95.39369	67.52123	69.2869
Regression coefficient (B)	-12.19543	-2.509904E-3	-1.616845	-1.452769
Correlation Coefficient (R)	-0.9818696	-0.9764247	-0.8234951	-0.8871219
R. M. S Error (S)	12.69592	8.653564	14.84534	10.07324
F-test Result (F)	1.082746	1.906286	1.431397	2.468798

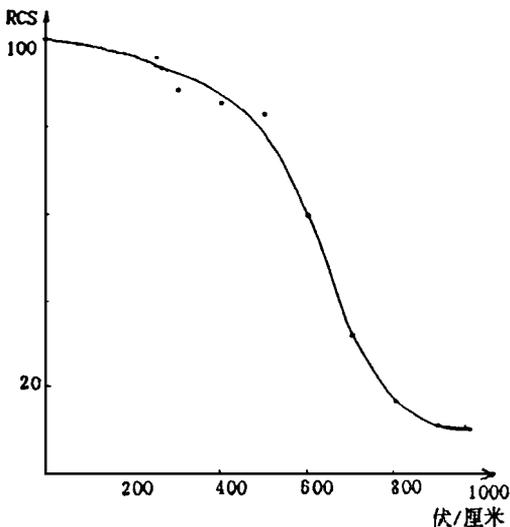


Figure 1. The Relationship Between the Field Strength and the Cell survival

4 pS189 电穿孔法转染 FLC III—2 细胞: 电穿孔法是一种通过瞬间放电的电场作用使细胞膜通透性发生短暂改变而将外源 DNA 导入细胞的方法。该法适用的细胞范围广, 转染效率高, 而对质粒 DNA 纯度要求不太严格, 操作简便, 快速, 条件易于控制, 实验数据重复性高, 是哺乳动物细胞转染中一种稳定可靠的方法⁽¹²⁾。按 GBCO 电穿孔仪操作手册, 在 300 μF , 低电阻恒定条件下, 对 FLC III—2 细胞进行了电击成活率实验, 细胞存活率与电场强度的关系如图 1 所示。选择细胞经电击后成活率为 50% 左右的电场强度转染, 此时转染效率最高。

5 限制性内切酶 Dpn I 对甲基化质粒的酶

切效率: 本实验采用大肠杆菌 MBM 7070 [F- LacZ (Am) CA 7020- LacY1, hsdR - hsdM + Δ(araABC - leu) 7679 galK rpΔ thi, 含有 dam+ 的基因型, dam+ 可使在细菌中复制的质粒DNA 发生甲基化。DpnI 识别位点为 5'—GmATC—3', 它可将甲基化 pS189 质粒切成 19 个大小不同的片断, 使之失去转化 MBM 7070 的能力。在哺乳动物细胞中复制后产生的子代质粒DNA 不含甲基化鸟嘌呤, 经 DpnI 处理后仍以完整形式存在, 转化 MBM 7070 菌可得到 Amp 抗性转化菌落。表 2 列出了质粒DNA 的 DpnI 酶切分析结果, 2 个单位的 DpnI 几乎可以使 5μg pS189 质粒DNA 完全失去转化 MBM 7070 的能力(转化菌落数小于 10); 不加细胞只加质粒经电穿孔转染及相应处理后, 所提细胞小分子DNA 中没有完整的 pS189 质粒; 加

入细胞和质粒但未经电击处理组提取的细胞小分子DNA 在 DpnI 酶切处理前转化 MBM 7070, 可得到抗性转化菌落, 而酶切处理后却无一菌落产生, 这可能是由于细胞表面具有吸附质粒DNA 的能力, 虽经多次换液漂洗仍不能清除, 但它不能自动进入细胞参与复制, 仍以甲基化形式存在, 经 DpnI 酶切处理后不能产生抗性菌落。该实验证明了从短暂复制型穿梭质粒系统中回收的细胞小分子DNA 在转化指示菌前经 DpnI 内切酶处理的必要性。我们选用足以使所有甲基化质粒失去转化活性的 DpnI 酶量处理从自发突变和诱发突变各组中回收的细胞小分子DNA, 以保证所有用于转化指示菌, 筛选突变子的质粒均是在 FL 细胞中复制过的, 以非甲基化形式存在的质粒。

Table 2 Dpn I Restriction Digests of pS189 Plasmid Recovered from FL Cell and E coli MBM 7070

DNA		DNA (ul)	DpnI (U)	Volume (ul)	MBM 7070 DNA (ul)	Clone Number (N)
Plasmid		10.0	2.0	20.0	2.0	< 500
DNA		5.0	2.0	20.0	2.0	< 50
(1μg/ul)		2.5	2.0	20.0	2.0	0
		1.0	2.0	20.0	2.0	0
		0.5	-	-	0.5	> 5000
Low	Hirt DNA	10.0	2.0	20.0	2.0	> 2000
Molecular	P+ C*	10.0	-	-	2.0	> 1000
Weight DNA	P+ C*	10.0	2.0	20.0	2.0	0
	P**	10.0	-	-	2.0	0

* P+ C: Cell+ Plasmid DNA, NO Electroporation, Others as That of Hirt DNA

** P: Plasmid DNA, NO Cell, Others as That of Hirt DNA

6 MNG, EMS 对 pS189/FLC III—2 细胞的诱变试验: 电穿孔转染细胞后 24 小时换液, 然后分别加入 0, 0.02, 0.04, 0.16, 0.32μg/ml 培养液的 MNG, 作用 3 小时后弃诱变剂, 继续培养 24 小时后提取纯化细胞中小分子DNA, DpnI 处理后转化- 70 冷冻

保存的 MBM 7070 感受态菌。大肠杆菌 MBM 7070 是 β- 半乳糖苷酶琥珀突变菌株, 在含 X- gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上形成白色菌落; 当转入一个琥珀突变抑制基因 SupF 功能完整的质粒时, 细菌则可分解乳糖类似物 X- gal, 形成蓝色菌落; 当 SupF 发生

突变受损时,MBM 7070 中发生琥珀突变的 LacZ 基因不能被翻译,只能在 X-gal, IPTG, Amp 的平板上形成带质粒的白色菌落。计数MNG 各剂量组转化菌落数和白色菌落数,其中白色菌落数是经三次点种均确认为白色的菌落数,结果列于表3。图3显示了MNG 诱发 pS189/FLCIII—2 系统中 SupF 基因的突变频率与MNG 对 FL 细胞毒性的关系。随着诱变剂对细胞的毒性增加,该系统诱发突变检出频率升高,且有线性关系。以 0, 50, 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{m l}$ EMS 处

理 pS189/FLCIII—2 系统,回收细胞小分子 DNA 经 DpnI 酶切处理后转化 MBM 7070,结果显示:随着 EMS 毒性剂量的升高,各组间转化效率与 MNG 组结果相似(图表略)。这提示,FL 细胞经高剂量的诱变剂处理后,会使细胞不可逆地失去分裂增殖形成克隆的能力,但在短时期内不会使细胞致死,对细胞内依赖于病毒复制起点的短暂复制型质粒 DNA 的复制效率影响不大,但靶基因的突变率却明显升高,这有利于诱变剂的检出和诱变特异性分析。

Table 3 The Mutation Frequency of SupF Gene in pS189 After Treated with MNG to pS189/FLCIII- 2

Dose ($\mu\text{g}/\text{ul}$)	Transfo mant Number	White Clone Number	Mutant Frequency	χ^2 - Test Probability
0	112181	2	1.7×10^{-5}	
0.02	37736	2	5.3×10^{-5}	> 0.05
0.04	23032	1	4.3×10^{-5}	> 0.05
0.16	158598	13	8.2×10^{-5}	< 0.05
0.32	91688	12	1.3×10^{-4}	< 0.005

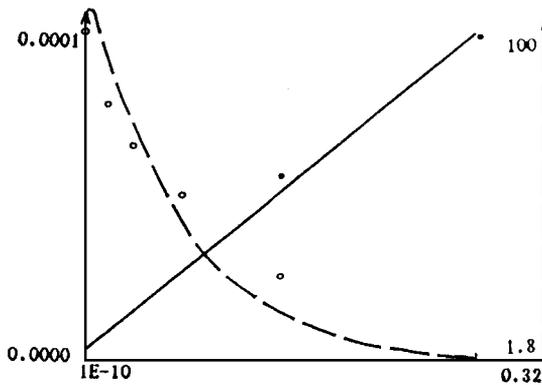


Figure 2 The Relationship Between MNG Induced Mutation Frequency of SupF Geng in pS189 (So lid Line) and the Cytotoxicity of FL Cell Line

Regression Analysis: $Y = A + BX$ $A = 3.110624E-05$ $B = 3.153126E-04$ $R = 0.9702623$ $S = 1.215929E-06$ $S_b = 3.372381E-06$

7 突变子分析

7.1 琼脂糖凝胶电泳:所有经 SupF 功能鉴定为白色菌落的突变子,均经碱裂法快速抽提质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳检查:所有突

变子菌落中均有质粒 DNA 存在,且除自发突变第 2 号突变子质粒大小发生改变外,其余质粒 DNA 大小均未明显改变,2 号突变子电泳迁移率减慢,可能是发生了 DNA 大段

插入或插排,这与以前报道的穿梭质粒中自发突变主要是缺失、重排和大段插入相符⁽¹²⁾。

7.2 部分质粒的限制性内切酶分析:对 0.32 $\mu\text{g}/\text{m}$ MNN G 诱变组的 BamH I 酶切分析表明,每个质粒上的两个 BamH I 位点未发生改变,各酶切片段大小也与正常质粒相同;对 0.16 $\mu\text{g}/\text{m}$ MNN G 诱变组的 13 个质粒的 Hind III 酶切分析发现,只有一个突变子 Hind III 切点有改变,其余 12 个突变子共 48 个 Hind III 酶切位点均未发生点突变。

7.3 SupF 基因的 PCR 分析:为了进一步确定突变子突变类型,用本室自行设计的扩增 180bp SupF 基因的一对引物(1# 5'GCGCGTCA TTTGA TA TGA TG; 2# 3'CTGACGCTCAAA TTCTTTCG),对所有突变子 SupF 基因进行了 PCR 分析,其中,自发突变 2 号突变子 SupF 基因扩增出两条带,这可能是同时发生了重组和点突变所致,这与前面质粒电泳迁移率减慢和 SupF 功能丧失一致,因为在穿梭质粒系统中,不损伤靶基因功能的重组子是不能被筛选出的。在 0.16 $\mu\text{g}/\text{m}$ IMNNG 诱发突变组,7 号突变子 SupF 基因已发生部分缺失,而在 0.32 $\mu\text{g}/\text{m}$ IMNNG 诱变组,第 7 号突变子则未扩增出 SupF 基因片段,这可解释为质粒 DNA 上发生了涉及 PCR 引物结合位点的小段缺失或点突变所致,因为该质粒电泳迁移率无明显改变。其它突变子均扩增出 180bp 片段,各突变子核苷酸序列特异性分析正在进行之

中。

参考文献

- 1 Mulligan RC, Berg P. Expression of a bacterial gene in mammalian cells *Science*, 1980; 209: 1422
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning* 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 鄂征 组织培养技术 第二版 北京:人民卫生出版社, 1989: 151—153, 195—197, 236—237.
- 4 Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture *J Mol Biol*, 1967; 26: 365
- 5 Seidman MM, Kathleen Dixon, Abdur Razzaque, et al A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells *Gene*, 1985; 38: 233
- 6 Seidman MM. The development of transient SV 40-based shuttle vectors for mutagenesis studies: problems and solutions *Mutat Res*, 1989; 220: 55
- 7 Fogh J, Lund RO. Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amnion membrane *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957; 94: 532
- 8 Yu Yingnian, Zhang Xiaosan, Liu Shuqiu, et al Induction of cytochrome P450 isozymes in human amnion FL cells and its application to the biological detection of mutagens *Chin Med Sci J*, 1991; 6(4): 226
- 9 Lebkowski JS, DuB ridge RB, Antel EA, et al Transfected DNA is mutated in monkey, mouse and human cells *Mol Cell Biol*, 1984; 4: 1951
- 10 Toneguzzo F, Hayday AC, Keating A, et al Electric field-mediated DNA transfer transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells *Mol Cell Biol*, 1986; 6: 703
- 11 彭文珍, 李大成, 齐晶, 等 用 BM-cycling 消除细胞培养物中支原体的实验技术 *遗传与疾病*, 1989; 6(2): 96

《化学物致突变致癌检测技术》一书即将出版

同济医科大学秦椿华主编,北京医科大学江泉观教授作序的《化学物致突变致癌检测技术》一书将于 1996 年 6 月出版,全书约 30 万字。内容包括遗传毒理学现代基础理论,实验基础篇(介绍实验室必备知识、实验动物技术、细胞培养技术、转基因小鼠制备及分子杂交等分子生物学基本技术),检测技术篇(包括“毒理学评价程序”国家标准中的

检测方法及其发展前途的新技术,如复制期 DNA 合成试验、单细胞凝胶电泳、DNA 加合物检测、多聚酶链反应和转基因动物突变试验)和突变研究数据处理篇。本书侧重操作方法,是毒理学研究者的重要试验参考书。

(武汉生物制品研究所 黄仕和 邮编 430060)