



普通高等教育农业部“十二五”规划教材

植物生物技术 实验教程

Zhiwu Shengwu Jishu Shiyān Jiāochéng

郭仰东 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



普通高等教育农业部“十二五”规划教材

植物生物技术实验教程

郭仰东 主编

中国农业大学出版社

• 北京 •

内 容 简 介

本书是为配合讲授植物细胞组织培养、植物生物技术等课程而编写的。编写者来自国内多所高校,具有多年的相关领域教学和科研经历。在植物细胞组织培养和植物生物技术课程教学中,编者感到缺乏合适的实验指导类教材,实验讲解过程中颇感不便,为此编写了本书。本书包含十五章,涵盖植物细胞和组织培养,遗传转化,核酸、蛋白质的提取和纯化,电泳技术,目的基因的获得,载体构建技术以及分子标记技术等内容。可以作为农林和生物类各专业大学生的实验指导教材,也可作为研究生及从事植物细胞组织培养和植物生物技术研究应用的科技工作者的参考书。本书已入选第二批普通高等教育农业部“十二五”规划教材。

图书在版编目(CIP)数据

植物生物技术实验教程/郭仰东主编. —北京:中国农业大学出版社,2015.6
ISBN 978-7-5655-1204-9

I. ①植… II. ①郭… III. ①植物-生物工程-实验-高等学校-教材
IV. ①Q94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 070457 号

书 名 植物生物技术实验教程

作 者 郭仰东 主编

策划编辑 张秀环

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2015 年 6 月第 1 版 2015 年 6 月第 1 次印刷

规 格 787×980 16 开本 20.75 印张 381 千字

定 价 39.00 元

责任编辑 张秀环

责任校对 王晓凤

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编审人员

主 编 郭仰东(中国农业大学)

编 者 郭仰东 周立刚 翟 红(中国农业大学)

陈利萍(浙江大学)

张喜春 葛秀秀(北京农学院)

石 岭(内蒙古农业大学)

李家儒(武汉大学)

主 审 刘庆昌(中国农业大学)

前 言

本书是在 2009 年中国农业大学出版社出版的《植物细胞组织培养实验教程》基础上增加更多的植物生物技术相关的实验内容而编写的实验教程,是为配合讲授植物细胞组织培养、植物生物技术等课程编写的。编写者来自国内多所高校,具有多年的相关领域教学和科研经历。在植物细胞组织培养和植物生物技术课程教学工作中,我们感到缺乏合适的实验指导类教程,实验讲解过程中颇感不便。同时,缺乏合适的实验指导教程对学生开展实验和学习掌握相关知识也有很大影响。基于上述原因我们编写此书,本书包含十五章,涵盖植物细胞和组织培养,遗传转化,核酸、蛋白质的提取和纯化,电泳技术,目的基因的获得,载体构建技术以及分子标记技术等内容,可以作为农林和生物类各专业大中专学生的实验指导教程,也可作为从事植物细胞组织培养和植物生物技术研究 and 应用的科技工作者的参考书。鉴于本书属大中专学生专业基础课教程,同时也考虑到又能作为研究生、教师以及科研工作者的参考书,因此书中内容在着重考虑教程所要求的基础性、系统性与经典性的同时,兼顾知识和技术的前沿性和新颖性,尽量涉及新技术和新方法,使学生掌握前沿知识和新技术。内容编排上注重知识结构的合理性以及实验的衔接,使读者循序渐进地掌握知识与技能。

本书第一章(植物细胞组织培养的基本设备和技术),第五章(植物单倍体细胞培养),第十章(核酸、蛋白质的提取和纯化),第十一章(目的基因的获得),第十二章(载体构建技术),第十四章(电泳技术),第十五章(分子标记技术)和附录部分由中国农业大学郭仰东教授编写;第二章(植物组织器官培养)由北京农学院张喜春教授编写;第三章(植物离体快繁)由中国农业大学郭仰东教授和北京农学院张喜春教授编写;第四章(植物茎尖分生组织培养)由武汉大学李家儒教授和中国农业大学郭仰东教授编写;第六章(原生质体培养、融合与植株再生)由浙江大学陈利萍教授编写,其中实验五由中国农业大学翟红副教授编写;第七章(植物种质离体保存)由内蒙古农业大学石岭教授编写;第八章(植物人工种子)由北京农学院葛秀秀副教授和中国农业大学郭仰东教授编写;第九章(植物细胞培养与次生代谢)由中

国农业大学周立刚教授编写;第十三章(植物遗传转化)由中国农业大学翟红副教授和郭仰东教授编写;全书由郭仰东教授统稿。中国农业大学孙倩倩、曹芸运、张磊、王晋芳和张娜参加了部分内容的资料收集、整理和校对工作。本书承蒙中国农业大学刘庆昌教授审阅,在此表示感谢。

本书涉及内容较广,限于编者水平,书中不妥之处,敬请读者批评指正。

编 者

2014 年 12 月

目 录

第一章 植物细胞组织培养的基本设备和技术	1
实验一 植物组织培养所需基本设备仪器用具的认知及其使用方法介绍	3
实验二 植物离体培养的基本技术简介	8
实验三 MS 培养基的配制	12
第二章 植物组织器官培养	17
实验一 番茄离体根培养技术	19
实验二 菊花花器官培养技术	24
实验三 小麦胚培养技术	28
实验四 苹果胚乳培养技术	33
第三章 植物离体快繁	37
实验一 烟草微繁殖技术	39
实验二 蝴蝶兰的快繁技术	42
实验三 石刁柏茎段培养技术	45
实验四 香蕉快繁技术	49
第四章 植物茎尖分生组织培养	53
实验一 植物茎尖分生组织剥离和培养	55
实验二 草莓茎尖脱毒	59
实验三 马铃薯茎尖脱毒	62
第五章 植物单倍体细胞培养	65
实验一 甘蓝型油菜小孢子培养及植株再生	67
实验二 烟草花药培养及植株再生	71
实验三 水稻花药培养及植株再生	73
实验四 甜菜雌性单倍体的离体诱导	75
实验五 大麦小孢子培养及植株再生	78
第六章 原生质体培养、融合及植株再生	81
实验一 芥菜原生质体培养及植株再生	83
实验二 水稻原生质体培养及植株再生	87
实验三 石竹科植物细胞融合及植株再生	90

实验四 普通小麦和簇毛麦细胞融合及植株再生	93
实验五 烟草叶肉细胞原生质体的游离与融合	96
第七章 植物种质离体保存	99
实验一 苹果低温离体保存技术	101
实验二 马铃薯试管苗保存技术	104
实验三 大蒜茎尖玻璃化法超低温保存技术	107
第八章 植物人工种子	111
实验一 烟草人工种子制作	113
实验二 胡萝卜人工种子制作	118
第九章 植物细胞培养与次生代谢	121
实验一 烟草愈伤组织的诱导和培养	123
实验二 植物悬浮细胞系的建立	126
实验三 植物细胞生长量的测定	129
实验四 植物细胞活力的测定	135
实验五 植物细胞系的筛选与保存	139
实验六 植物培养物次生代谢产物的含量分析与分离纯化	142
实验七 植物细胞培养合成次生代谢产物的调节	144
实验八 植物细胞大规模培养生产次生代谢产物	147
第十章 核酸、蛋白质的提取和纯化	151
实验一 质粒 DNA 的提取以及纯化	153
实验二 水稻基因组 DNA 的提取和纯化	156
实验三 烟草叶片 RNA 的提取和纯化	159
实验四 小麦叶片总蛋白的提取	162
实验五 番茄果实的总蛋白的提取	165
实验六 拟南芥叶片的可溶性蛋白提取	168
第十一章 目的基因的获得	171
实验一 聚合酶链式反应(PCR)	173
实验二 烟草 <i>SGT1</i> 基因的 3'RACE 克隆	177
实验三 烟草 <i>SGT1</i> 基因的 5'RACE 克隆	182
实验四 月季染色体步移技术	187
第十二章 载体构建技术	191
实验一 大豆 <i>NAC</i> 克隆载体构建	193
实验二 黄瓜 <i>LOX2</i> 基因原核表达载体构建	196

实验三	番茄 <i>PIP</i> 亚细胞定位载体构建	199
第十三章	植物遗传转化	203
实验一	根癌农杆菌介导的烟草叶盘遗传转化	205
实验二	基因枪法转化小麦未成熟胚	210
实验三	花粉管通道法介导棉花基因转化	214
实验四	拟南芥的转化	217
实验五	黄瓜的转化	220
实验六	番茄的转化	222
第十四章	电泳技术	225
实验一	质粒的琼脂糖凝胶电泳检测	227
实验二	醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	231
实验三	聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分析小麦过氧化物酶同工酶	234
实验四	用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	240
实验五	蛋白质的双向凝胶电泳分离	245
第十五章	分子标记技术	251
实验一	RFLP 检测水稻亲本遗传多样性	253
实验二	小麦耐盐种质遗传多样性的 RAPD 分析	257
实验三	菠菜种质遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析	261
实验四	棉花耐盐性的 SSR 鉴定	266
实验五	拟南芥 SNP 遗传标记的检测	270
参考文献		273
附录		285
附录一	元素相对原子质量表	287
附录二	常用化合物相对分子质量表	291
附录三	常用英文缩写	293
附录四	植物组织培养常用培养基成分表	294
附录五	植物组织培养中经常使用的热不稳定物质	298
附录六	常用缓冲溶液的配制	299
附录七	常用酸碱摩尔浓度的近似配制表	303
附录八	培养基植物激素浓度换算表	304
附录九	常见植物生长调节物质及主要性质	305
附录十	温湿度换算表	306
附录十一	细胞筛孔径与目数换算表	309

附录十二	离心机转数与离心力的列线图及公式	310
附录十三	计量单位前缀	312
附录十四	常用电泳缓冲液	313
附录十五	常用试剂母液的配制	314
附录十六	pH 计标准缓冲液的配制	316
附录十七	常用的抗生素	317
附录十八	核酸相对分子质量标准物	318
附录十九	蛋白质相对分子质量标准物	319

第一章

植物细胞组织培养 的基本设备和技术

实验一 植物组织培养所需基本设备仪器用具 的认知及其使用方法介绍

一、实验目的及意义

本实验主要介绍植物细胞组织培养中所需要的基本实验设备、仪器和其使用方法及植物离体培养的基本技术,包括器具的灭菌技术,培养基的配制及灭菌,外植体的前期处理和无菌操作技术。

二、实验内容

1. 基本设备的认知:

(1)无菌室。在植物细胞组织培养过程中,相对于微生物培养,植物培养周期比较长,短则1个月,长则可达几年的时间,因此,在操作和培养过程中,最重要的是防止污染,无菌设备非常重要。

无菌室主要用于植物材料的消毒、接种、培养物的继代转移等。这是植物组织培养中必需的设备,要求地面、天花板及四壁尽可能光洁、无尘,易于采取各种清洁和消毒措施。一般设内、外两间,外间小些为准备室(供操作人员更换工作服、工作帽、拖鞋,洗手及处理无菌培养的材料等)。内间稍大,供接种用。无菌室内应安有紫外灯,在操作前至少开灯20 min灭菌。同时室内应定期用甲醛和高锰酸钾蒸汽熏蒸(或用70%酒精或0.5%苯酚喷雾降尘和消毒)。

(2)超净工作台。超净工作台是为植物组织培养提供无菌操作环境,是最常用、最普及的无菌操作装置,和无菌室相比超净工作台既方便又舒适,无菌效果又好。超净工作台一般由鼓风机、过滤器、操作台、紫外光灯和照明灯等部分组成。通过内部小型电动机带动风扇,使空气先通过一个前置过滤器,滤掉大部分尘埃,再经过一个细致的高效过滤器,以将大于 $0.3\ \mu\text{m}$ 的颗粒滤掉,然后使过滤后的不带细菌、真菌的纯净空气以每分钟 $24\sim 30\ \text{m}$ 的流速,吹过工作台的操作面,此气流速度能避免坐在超净工作台旁的操作人员造成的轻微气流污染培养基。初次使用的超净工作台要在开启2 h后,再开始接种,以后每次开启 $10\sim 15\ \text{min}$ 即可操作。为了提高超净工作台的效率,超净工作台应放置在空气干净、地面无灰尘的地

方,以延长使用寿命,应定期检测超净工作台的无菌效果,方法如下:在机器处于工作状态时在操作区的四角及中心位置各放一个打开的营养琼脂平板,2 h后盖上盖并置 37℃ 培养箱中培养 24 h,计算出菌落数。平均每个平皿菌落数必须少于 0.5 个。并且,定期清洗和更换紫外灯和过滤装置。

2. 用具的认知:在植物组织培养过程中,需要使用到各种各样的用具。包括培养基配制用具、培养工具、接种工具等。在使用这些用具之前,先要了解它的基本用途,并学会它们的基本用法。其中部分用具在基础化学实验中已经接触过,在这里只作简单的介绍。

(1) 培养基配制用具。

1) 量筒,用来量取一定体积的液体。常用的规格有 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1 000 mL 等。

2) 刻度移液管,用来量取一定体积的液体,配合吸耳球使用。常用的规格有 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL 等。

3) 烧杯,用来盛放、溶解化学药剂等。常用的规格有 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 000 mL 等。

4) 容量瓶,用来配制标准溶液。常用的规格有 100 mL, 500 mL, 1 000 mL 等。

5) 吸管,用来吸取液体,调节培养基的 pH 及配制标准溶液定容时使用。

6) 玻璃棒,溶解化学药剂时搅拌用。

(2) 培养用具。

1) 三角瓶,是植物组织培养中最常用的培养容器,适合进行各种培养,如固体培养或液体培养,大规模培养或一般少量培养。常用的规格有 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL 等。

2) 培养皿,在无菌材料分离、细胞培养中常用。常用的规格有直径 3 cm, 6 cm, 9 cm, 12 cm 等。

3) 广口培养瓶,常用于试管苗大量繁殖及作为较大植物材料的培养瓶,常用规格为 200~500 mL。

4) 试管,植物组织培养中常用的一种玻璃器皿,适合少量培养基及测试各种不同配方时使用。

5) 封口材料,培养容器的瓶口需要封口,以防止培养基失水干燥并杜绝污染,并且要保持一定的通气功能。常用的封口材料有:棉花塞、铝箔、耐高温透明塑料纸、专用盖、蜡膜等。实验室常用铝膜和聚丙烯膜。

(3) 接种工具。

1) 酒精灯,用于金属和玻璃接种工具的灼烧灭菌。

2) 手持喷雾器,盛装 70% 酒精,用于操作台面、接种器材、外植体和操作人员

手部等的表面灭菌。

- 3) 工具皿, 即灭过菌的普通空白培养皿, 用于存放灭过菌的外植体。
- 4) 载玻片, 切断、剥离植物材料用。
- 5) 解剖刀, 用来切割植物材料。
- 6) 剪刀, 适于剪取外植体材料。
- 7) 镊子, 用于解剖、分离、转移外植体和培养物。
- 8) 解剖针, 用来分离植物材料, 剥取植物茎尖。

3. 小型器具和仪器的认知: 植物组织培养过程中, 还需要使用一些小型器具及仪器。

(1) 天平。称量化学试剂用。常用的有以下几种:

- 1) 药物天平, 用来称量大量元素、琼脂、蔗糖等。称量精密度为 0.1 g。
 - 2) 分析天平, 用于称量微量元素、植物激素及微量附加物。精度为 0.000 1 g。
- 放置天平地方要平衡, 要保持清洁干燥, 避免接触腐蚀性药品和水汽。

(2) 酸度计。培养基配制时测定和调整培养基的 pH 用。酸度计在使用前, 要调节温度到当时的室温, 再用 pH 标准液 (pH 7.0 或 pH 4.0) 校正后, 蒸馏水充分洗净, 才能进行 pH 的测定与调整。测定培养基 pH 时, 应注意搅拌均匀后再测。国内常用 pH 为 4.0~7.0 的精密试纸来代替酸度计。

(3) 磁力加热搅拌器。溶解化学试剂时搅拌用。

(4) 分注器。用来分装培养基时用。

(5) 移液枪。配制培养基时添加各种母液及吸取定量植物生长调节物质溶液时用。常用的规格为 10 μm , 50 μm , 100 μm , 200 μm , 500 μm , 1 mL, 5 mL 等。吸取液体时, 移液器保持竖直状态, 将枪头插入液面 2~3 mm。用大拇指将按钮按下至第一停点, 然后慢慢松开按钮回原点。接着将按钮按至第一停点排出液体, 稍停片刻继续按按钮至第二停点吹出残余的液体, 最后松开按钮。即吸的时候按到第一挡, 打的时候一定要打到底, 也就是第二挡。当移液器枪头里有液体时, 切勿将移液器水平放置或倒置, 以免液体倒流腐蚀活塞弹簧。使用完毕, 恢复至最大量程, 使弹簧处于松弛状态以保护弹簧, 延长移液枪的使用寿命。

(6) 过滤灭菌器。用于加热易分解、丧失活性的生化试剂的灭菌。常用规格为直径 0.20~0.45 μm 的硝酸纤维素膜过滤, 当溶液通过滤膜后, 细菌和真菌的孢子等因大于滤膜直径而被阻。在需要过滤灭菌的液体量大时, 常使用抽滤装置; 液量小时, 可用医用注射器。使用前对其进行高压灭菌, 将滤膜安放在注射器的靠近针管处, 将待过滤的液体装入注射器, 缓慢推压注射器活塞杆, 溶液压出滤膜, 从针管压出的溶液就是无菌溶液。

(7) 电炉或微波炉等加热器具。用于加热溶解生化试剂和配制固体培养基时,

加热溶解琼脂。

(8)血球计数板。用于植物细胞计数。血球计数板是一块特制厚玻片。玻片上由4道槽构成三个平台,中间的平台分成两半,其中两侧平台比中间平台高0.1 mm。中间的平台又被一分为二,在每一半上各刻有一个计数室,每个计数室划分为9个大方格,每个大方格的面积为 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}=1\text{ mm}^2$,深度为0.1 mm,盖上盖片后容积为 0.1 mm^3 。中央的一个大方格又用双线划分为25个中方格。每个中方格又用单线划分为16个小方格,共计400个小方格,原生质体的计数即可在中央的这个大方格内进行。

计数方法:

1)在显微镜下检查计数板上的计数室是否干净,若沾有污物,须用酒精棉轻轻擦洗,用蒸馏水冲洗,再用吸水纸吸干。

2)将盖玻片盖在计数室的上面。将悬浮在培养基中的原生质体悬浮液滴在盖玻片一侧边缘,使它沿着盖玻片和计数板间的缝隙渗入计数室,直到充满计数室为止。

3)计数时要使显微镜载物台保持水平。依次逐个计数中央大方格内25个中方格里的原生质体,然后根据下式求出每毫升中的原生质体数。

4) 1 mL 悬浮液中的原生质体数 $=1$ 个大方格悬浮液(0.1 mm^3)中的原生质体数($\times$) $10\times 1\,000$ 。

5)血球计数板使用后,用自来水冲洗,切勿用硬物洗刷,洗后自行晾干或用吹风机吹干,或用95%的乙醇、无水乙醇、丙酮等有机溶剂脱水使其干燥。

(9)烘箱。用于烘干洗过的器皿和对玻璃器皿进行干热消毒。

(10)高压蒸汽灭菌锅。是植物组织培养中最基本的设备之一,用于培养基、蒸馏水和各种用具的高温灭菌消毒等。

(11)低速台式离心机。分离、洗涤培养细胞(团)及原生质体时用,一般转速为 $2\,000\sim 4\,000\text{ r/min}$ 。

(12)摇床。用来进行细胞悬浮培养。根据振荡方式分为水平往复式和回旋式两种,振荡速度因培养材料和培养目的不同而不同,一般为 100 r/min 左右。

(13)实体解剖镜。多用于剥离植物茎尖。

(14)倒置显微镜。用于观察、记录外植体及悬浮培养物(细胞团、原生质体等)的生长情况。可以和相机配合使用,拍照记录分化生长过程。

(15)荧光显微镜。以紫外线为光源,用以照射被检物体,使之发出荧光,然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置。荧光显微镜用于研究细胞内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等。

(16)流式细胞仪。用于检测细胞等生物粒子的理化及生物学特性(细胞大小、

DNA/RNA 含量、细胞表面抗原表达等)。在植物组织细胞培养中,多用于研究在单倍体培养、花药培养、细胞融合中鉴定细胞的倍性变异情况。

(17)冰箱。长期贮存培养基母液、生化试剂及低温处理材料时用。一般家庭用冰箱即可。

(18)培养箱。少量植物材料的培养。有条件的话,还可采用全自动的调温、调湿、控光的人工气候箱来进行植物组织培养和试管苗快繁。

(19)培养室。培养室是将接种到试管、三角瓶等的培养材料进行培养生长的场所,要满足植物生长繁殖所需的温度、光照、湿度和气体等条件。培养室要经常保持干净,定期进行消毒、清洗,进出时要更换衣、帽、鞋等,以免将尘土、病菌带入室内。

培养室内需要配置大量的培养架,用以放置培养容器,增大空间的利用效率。培养架上每层要安装玻璃板,可使各层培养物都能接受到更多的散射光照。日光灯一般安放在培养物的上方或侧面,控制光强为 $40\sim 55\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,能够满足大部分植物的光照需求。最好用自动计时器控制光照时间。

培养室温度一般要求在 $20\sim 30^\circ\text{C}$,具体温度的设置要依植物材料不同而定。为使温度恒定和均匀,培养室内应配有空调或带有控温仪的加热装置(如电炉、热风机等)及空气调节装置(如风扇等),可以使空气更好地流动。培养室的相对湿度应保持在 $70\%\sim 80\%$ 。

三、提示注意

(1)在老师的带领下,认识和熟悉各种设备和仪器。一些大型仪器,如高压灭菌锅、超净工作台在老师示范其用法后,才可以自己动手操作。

(2)按照各种设备和仪器的用途进行分类,有利于记忆其用途,较快地掌握本实验的内容。

四、思考题

(1)建立一个小型的组培室需要哪些仪器和设备?

(2)简述超净工作台的使用原理、使用中的注意事项及日常检修方法。