

植物生物技术 原理与方法

李宝健 曾庆平 ● 湖南科学技术出版社



植物生物技术原理与方法

李宝健 曾庆平编

责任编辑：刘奇琰

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路3号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1980年10月第1版第1次印刷

开本：787×1092毫米 1/32 印张：15.875 插页：4 字数：412,000

印数：1—1,000

ISBN 7—5357—0774—2

Q·19 定价：7.80元

地科90—58

序

PREFACE

我国是一个农业大国，人口众多，应用最新的科学技术迅速发展农业是一个十分紧迫的任务。植物生物技术是基于分子遗传学、细胞生物学等近代理论而飞跃发展起来的一门包括 DNA 重组、细胞融合等系列技术的应用学科。它在利用基因重组实现定向远缘杂、交改良植物品种方面，提供了过去无法比拟的、巨大的潜力，是正在发展中的新兴前沿学科之一。通过植物生物技术的应用，结合基因资源的研究与常规育种技术，可望培育出一代崭新的丰产、高营养、高抗和多抗的农作物新类型和新品种，实现新的“绿色革命”。

此书着重介绍了植物基因工程、植物细胞工程和植物生物技术中的其它技术。作者从分子水平、细胞和亚细胞水平、组织和器官水平等层次上，讨论了植物生物技术的原理、方法及其应用潜力。这将对推动本学科的发展及人才培养起积极的作用。

李宝健教授早年曾留学苏联，长期从事植物遗传、细胞遗传及细胞化学、植物基因工程的研究和教学。80年代初，他应邀赴美进行学术交流期间，首次将电激法应用于植物细胞的遗传转化，取得了突破性进展。1986年回国后，他组建了中山大学生物工程研究中心，领导着他的研究小组更深入地开展植物生物技术领域的研究。

在此，我高兴地向读者推荐这一新书。

谈家桢

1990年2月11日于复旦大学

前 言

INTRODUCTION

植物生物技术是在植物细胞和亚细胞水平，尤其是在分子水平上对植物原有遗传性状进行修饰和改造的一项接近定向的分子育种技术。植物生物技术的核心是植物基因工程，它是直接从植物的遗传物质（DNA）入手，通过体外操作和基因重组实现遗传性状的修饰，利用重组体DNA技术将可能育成高光效、强固氮能力、营养平衡、广谱抗病虫和抗逆境的作物新品系和新品种。植物细胞工程则在改良遗传背景较复杂的性状上具有很大潜力，是植物生物技术中最有可能出现突破的研究领域。植物组织细胞培养在生物技术育种上起着承上启下的作用，它一方面为基因转移提供适当的受体细胞，另一方面又为植株再生和性状表现创造条件。与此同时，离体培养技术所取得的最新成就，又使它进入到植物生物技术中最有希望的研究领域。

目前，将各种外源基因导入到植物细胞中的技术已经建立并且日臻成熟，基因的整合与表达也已在许多植物中实现。近几年又对许多控制重要农艺性状的基因进行了分离和鉴定，估计今后将有更多全新的植物种问世。另一方面，目前对各种抗性细胞突变体（如抗病、抗盐碱、抗重金属离子、抗干旱、抗低温等）的筛选技术正在广为应用，使之成为利用种质资源筛选新型变异材料的一条新途径。同时，许多种内、种间、甚至属间的体细胞杂种都已通过细胞融合技术而获得，虽尚未在生产上应用，但将来对于转移个别重要的基因可能是极有价值的中间材料，并为克服远缘杂交不亲和性提供一条新途径。

本书分为基因工程篇、细胞工程篇、组织器官工程篇和实验方

法篇，详细介绍了植物生物技术的主要理论体系与技术基础，是将已有知识进行归纳而使之系统化的一个初步尝试。

在本书撰写过程中，得到了中山大学生物工程研究中心同事们的多方协助，湖南科学技术出版社的刘奇琰同志为本书的出版付出了辛勤的劳动，谨此一并致谢！

编著者

1989年12月于广州

目 录

CONTENTS

第一篇 植物基因工程——分子水平的植物生物技术 PLANT GENETIC ENGINEERING, PLANT BIOTECHNOLOGY AT THE MOLECULAR LEVEL

1 植物基因工程的策略

Plant Genetic Engineering Strategy

§ 1.1 植物基因克隆策略 5

§ 1.2 植物基因表达策略 13

2 植物基因克隆技术要素

Technical Elements of Plant Gene Cloning

§ 2.1 植物基因克隆载体 20

§ 2.2 植物基因克隆的工具酶 34

§ 2.3 凝胶电泳技术 43

§ 2.4 杂交探针制备与放射自显影术 50

§ 2.5 工程细菌的培养、纯化与保藏技术 55

3 植物基因文库的构建与cDNA克隆

Plant Gene Library Construction and cDNA Cloning

- § 3.1 基因文库的构建 60
- § 3.2 cDNA克隆的制备 66
- § 3.3 重组DNA分子导入宿主细胞 77
- § 3.4 重组体的鉴定与克隆基因检测 83

4 植物来源的基因和各种有用的异源基因

Plant-derived Genes and Vastly Useful Heterogeneous Genes

- § 4.1 植物基因组概况 95
- § 4.2 植物来源的克隆基因 116
- § 4.3 各种来源的有用基因 136

5 植物基因工程载体

Vectors for Plant Genetic Engineering

- § 5.1 根癌农杆菌与植物的相互关系 142
- § 5.2 Ti质粒的改造与载体构建 156
- § 5.3 常用的植物基因工程载体简介 168
- § 5.4 潜在植物基因工程载体 177

6 植物受体细胞系统与基因转化

Plant Recipient Cell Systems and Gene Transfer

- § 6.1 植物受体细胞系统概述 185
- § 6.2 根癌农杆菌介导的基因转化 190
- § 6.3 DNA直接导入和媒体介导的基因转化 201
- § 6.4 病毒介导的基因转化 218

7 外源基因在植物转化细胞中的表达与转基因植物的鉴定

**Expression of Foreign Genes in Transformed plant
Cells and Identification of Transgenic Plants**

§ 7.1 外源基因在植物细胞中的表达 229

§ 7.2 启动子与外源基因表达 231

§ 7.3 转化细胞和转基因植物的鉴定 245

**第二篇 植物细胞工程——细胞及亚细胞水平的植物生物
技术**

**PLANT CELLULAR ENGINEERING,
PLANT BIOTECHNOLOGY AT THE
CELLULAR AND SUBCELLULAR
LEVELS**

8 植物的突变细胞系及其利用

Plant Mutational Cell Lines and Their Utilization

§ 8.1 植物突变细胞系的概念及类型 256

§ 8.2 突变细胞系的实验和选择步骤 267

§ 8.3 农业上有应用潜力的突变系的选择和利用 276

9 植物细胞大量培养及次生代谢物的生产

**Mass Culture of Plant Cells and Production of Seco-
ndary Metabolites**

§ 9.1 利用植物大量培养细胞生产次生代谢物的意
义 285

§ 9.2 产生次生代谢物的植物细胞的特征 288

§ 9.3 应用植物培养细胞生产次生代谢物的要素 291

10 原生质体融合与体细胞杂种

Protoplast Fusion and Somatic Hybrids

- § 10.1 原生质体融合与体细胞杂种的意义及原理 302
- § 10.2 杂种细胞的确定和选择 305
- § 10.3 杂种细胞的发展动态 308
- § 10.4 体细胞杂种植株形成的原理 309
- § 10.5 原生质体融合实验的方法和步骤 311
- § 10.6 体细胞杂交及杂种植物的遗传和利用 313
- § 10.7 体细胞杂种植株事例 316
- § 10.8 亚细胞水平的遗传操作 320

第三篇 其他的植物生物技术

SOME RELATED PLANT BIOTECHNOLOGY

11 植物细胞组织培养技术与植物生物技术

Relationship Between Plant Cell-Tissue Culture Techniques and Plant Biotechnology

- § 11.1 花药培养 326
- § 11.2 子房培养和孤雌生殖 333
- § 11.3 离体胚培养、胚珠培养和胚乳培养 334
- § 11.4 试管授粉和受精技术 339

12 快速无性繁殖、人工种子的研制及种质保藏

Rapid Clonal Propagation, Artificial Seed Preparation and Germplasm Conservation

- § 12.1 植物的快速繁殖技术 345
- § 12.2 人工种子的研制 356
- § 12.3 应用生物技术储藏种质的方法 362

第四篇 技术与方法

TECHNIQUES & METHODS

- 实验一 Ti质粒的制备与鉴定 368
- 附I Ti质粒DNA的微量制备 371
- 附II Eckhardt凝胶分析 372
- 实验二 中介载体的构建 373
- 附I 琼脂糖凝胶中DNA的洗脱 378
- 附II *E. coli* (K514r⁻m⁺) 的转化 379
- 附III 重组DNA克隆的快速检测 380
- 实验三 突变型Ti质粒结构的鉴定 381
- 附I 用缺口转译法制备探针 384
- 附II 从根癌农杆菌单菌落制备Southern印迹杂交用DNA 385
- 实验四 广谱中介载体导入根癌农杆菌 386
- 实验五 在Ti质粒中引入抗生素抗性标记基因 389
- 实验六 通过pBR322衍生载体的直接动员将非选择性 DNA 导入T区段 390
- 实验七 共整合载体与双元载体的比较 392
- 附I 用质粒DNA直接转化根癌农杆菌 398
- 实验八 含Tn5衍生质粒的工程菌的构建 398
- 实验九 冠瘿瘤与发状根的诱发 402
- 实验十 冠瘿瘤与发状根的高体培养及植株再生 405
- 实验十一 共培养法 407
- 实验十二 叶盘法 409
- 实验十三 活体接种与共感染法 411
- 实验十四 直接基因转移法——PEG诱导法 413
- 实验十五 电激法 415
- 附I 电场强度和脉冲频度对DNA吸收的影响 417
- 实验十六 圆球体法 420

实验十七	脂质体法	422
实验十八	显微注射法	424
实验十九	植物转化组织中冠瘿碱的检测	426
附I	用坂口试剂检测胭脂碱和章鱼碱	431
实验二十	NPTII、CAT与DHFR的检测	432
实验廿一	T-DNA在植物细胞中的转录及其与cDNA 探针的杂交	437
附I	植物总RNA的制备	441
附II	植物poly(A) ⁺ RNA的制备	442
实验廿二	植物培养细胞中核的分离与分离核的转录	443
实验廿三	转基因植物中外源基因转录的“开关”鉴定及杂交验证	446
实验廿四	病毒RNA转染原生质体的免疫学检测法	452
附I	简易抗体染色法	454
实验廿五	用Southern印迹杂交检测病毒DNA复制	455
附I	Sonthern印迹杂交用植物DNA的微量制备	457
附II	植物大片段DNA的分离	458
实验廿六	在叶绿体中导入核编码蛋白质	460
附I	植物叶绿体和线粒体DNA的分离	464
实验廿七	原生质体融合与核质杂种及胞质杂种的选择	466
实验廿八	融合产物的鉴定与体细胞杂种	469
实验廿九	体细胞杂种与胞质杂种的鉴定	470
实验三十	植物原生质体的电融合	473
实验卅一	植物突变体的分离与鉴定	474
实验卅二	植物组织细胞的冷冻保藏	476
实验卅三	植物组织的去病毒培养	478
实验卅四	高产次生代谢物细胞系的选择	480
实验卅五	悬浮细胞的同步化培养	480

附录 (APPENDIX)

1. 植物基本培养基 484
 2. 遗传密码和氨基酸代号 485
 3. 典型基因的结构和有关术语 486
 4. 大肠杆菌遗传学命名规则 487
- 缩略词 (ABBREVIATION) 489

第一篇

植物基因工程： 分子水平的植物生物技术

植物基因工程属于植物生物技术的范畴，它是在分子水平上对基因进行体外操作与重组的一项专门技术。它应用基因工程的普遍原理和通用技术，以植物细胞为对象，通过外源基因的转移、整合、表达和传代，对植物的遗传物质进行修饰、更新和改造，进而改良植物的遗传性状或获得有用的基因产品。

植物基因工程在农作物改良上具有巨大的潜力。但从历史上来看，植物基因工程起步较晚，基础理论研究薄弱，实际应用也不多，特别是远远落后于微生物基因工程。这一方面是因为微生物取材方便，培养容易，研究起来比较简单；另一方面是因为高等植物要比微生物（如细菌）复杂得多。无论从生物进化水平，还是从遗传信息量与遗传方式上比较，高等植物都远比细菌高级，前者的分工更精细，分化更完善，功能更复杂。因此，人们对植物的分子遗传背景不如对微生物那样了解，对植物中许多控制重要经济性状的基因尚未进行深入细致地研究。尽管近年来这方面的研究已得到加强，但分离和鉴定出来并具有基因工程价值的植物基因仍为数不多。并且，因为长期未能找到象在细菌、酵母和动物细胞中广泛应用的质粒或病毒（包括噬菌体）载体，同时又缺乏将外源基因有效地引入植物细胞中去并使之正常表达的方法，使得基因工程在植物改良上的应用一度停滞不前。

七十年代中后期，随着根癌农杆菌Ti质粒的应用以及相应的植物遗传转化方法的建立，植物基因工程的发展日新月异。特别是1978年以来，从第1株转基因植物育成到八十年代中后期，抗虫、抗除草剂和耐病毒病的基因在植物细胞中成功地实现高效表达，植物基因工程在农业上应用的前景极为诱人。同时，由于植物基因工程的飞速发展，吸引了大批科学家投入到这方面的研究中来，使得这一领域与其它基因工程研究的差距不断缩短，并反过来起一定的指导作用。

植物基因工程有其独到的优势。大多数植物细胞的“全能性”(totipotence)都能在现有的离体培养条件下发挥出来，也就是说，只要条件适当，植物的每个细胞几乎都能重新长出完整植株，这是哺乳动物细胞所不能比拟的；其次，植物基因工程不会象动物或人类基因工程那样遇到较多的社会、伦理、道德等问题。

植物基因工程在作物育种上具有以下特点：

①植物基因工程是深入到细胞水平（包括细胞核和细胞器），特别是从基因水平入手来改造植物的遗传本性的。

②植物基因工程能使人类长期梦想的目标——定向改造植物遗传性状得以实现。可以说，遗传育种研究越是接近分子水平，对生物体的改造就越是接近定向性。

③植物基因工程大大地扩展了育种的范围，打破了物种之间杂交的障碍。由于高等生物的细胞和原生质体与低等生物（如细菌）的原生质体（又称圆球体）均能实现“细胞”水平的杂交或融合，并且所有生物的基因都具有基本相同的遗传密码，因此有可能将上至高等生物，下至低等生物的丰富的基因重组在一起，从而大大扩展物种杂交的范围和物种变异频率，由此增强人类支配自然界的能力。

④现在提出来的植物基因工程是在细胞遗传学、细胞生物学，尤其是分子遗传学的发展基础上建立起来的，它有着极其丰富的理论基础。

⑤近代基因工程的发展是以一系列重要的技术革新为基础

的，其中包括限制性内切核酸酶、连接酶和其它工具酶的发现和应用，以及一些尖端技术，如DNA的序列分析和人工合成，基因克隆和基因扩增，逆转录、分子杂交、核酸、蛋白质各类数据的计算机软件设计和处理等，已在植物基因工程研究中得到越来越广泛地应用。为了配合以上的研究，各种精密仪器也大显身手，包括DNA合成仪和测序仪、超高速离心机、高压气液相色谱仪、高分辨率电子显微镜、X光衍射仪、激光扫描仪、生物传感器和生物反应器、液闪和分光光度计等。

1

植物基因工程的策略

植物基因工程作为一项“工程技术”，在“施工”前同样需要精心设计的“蓝图”。这个蓝图必须反映出从获得一个基因到使得这个基因在植物细胞中表达的整个技术路线，这就是植物基因工程的策略（图1—1）。

植物基因工程实际上是由“基因克隆”与“基因表达”两个密不可分，但却相对独立的环节所组成的，必先有基因克隆，后

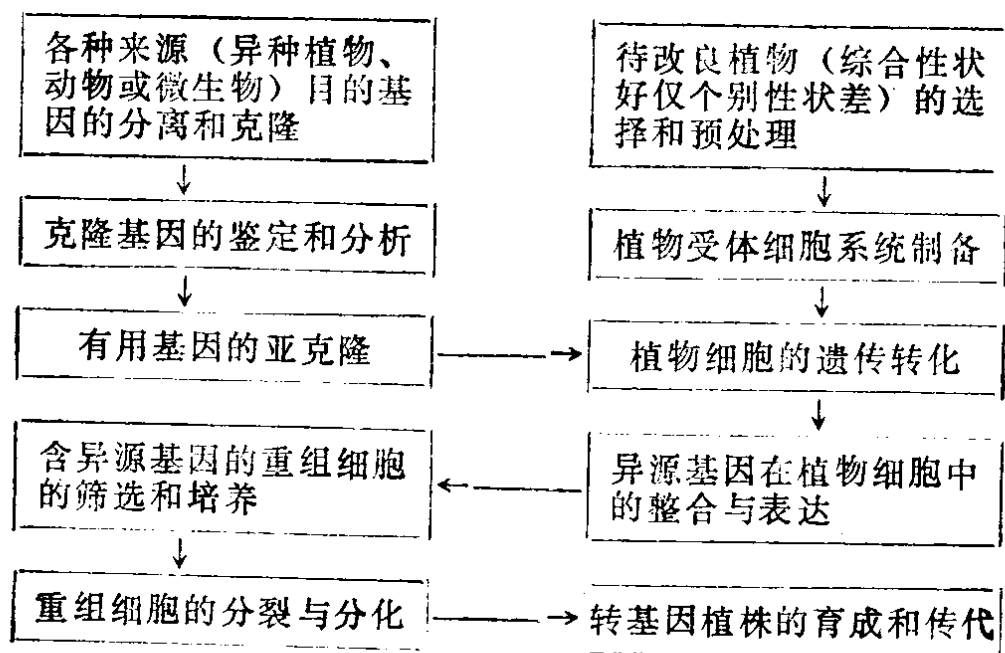


图1—1 植物基因工程的策略

才有基因表达。基因克隆的全过程都是在大肠杆菌中完成的，而以改良遗传性状为目的的基因表达则发生在植物细胞中，彼此由基因克隆载体和基因表达载体相联系。因此，一般称基因克隆为“上游工程”或“前期工程”，基因表达为“下游工程”或“后期工程”。

§ 1.1 植物基因克隆策略

生物体的内在统一性（相似的核酸结构、密码组成和基因表达系统）使基因工程原理和方法也具有普遍的意义。换言之，生物系统内部的相似性，赋予了基因工程以可能性。因此，与常规基因克隆相比，植物基因克隆的技术路线基本不需要作大的变动。这里所讲的植物基因克隆策略，原则上也适用于其它生物。

一、获得目的基因的途径

目前，基因的直接分离和基因的人工合成是获得目的基因的主要途径。随着基因合成仪的问世和 DNA 测序的快速化、准确化，预计人工合成的基因将得到广泛应用。人工方法合成引物、聚合接头和寡核苷酸探针的技术，目前尚不能为其它方法所代替。迄今已完成全序列测定并具有应用价值的植物基因并不多，除非只使用一些来自微生物或动物细胞的业已分离的有用基因。因此，由植物基因组直接分离基因的方法，在相当长时间内可能仍然是获得目的基因的重要途径，而其中又以植物基因组克隆为主。

所谓基因组克隆（genomic cloning）是指将某种细胞的整个基因组DNA按一定的长短要求划分成若干个片段，并将这些片段与适当的载体进行体外重组，再引入到相应的宿主细胞中繁殖和扩增，从而形成一组含有重组DNA分子的克隆群体。理论上，这种群体是包含在整个基因组DNA中的全部基因和全部DNA序列的总汇，特称为“基因组文库”（genomic library）或简称“基因文库”（gene library）。按机率原则，该克隆群体只有达到一定