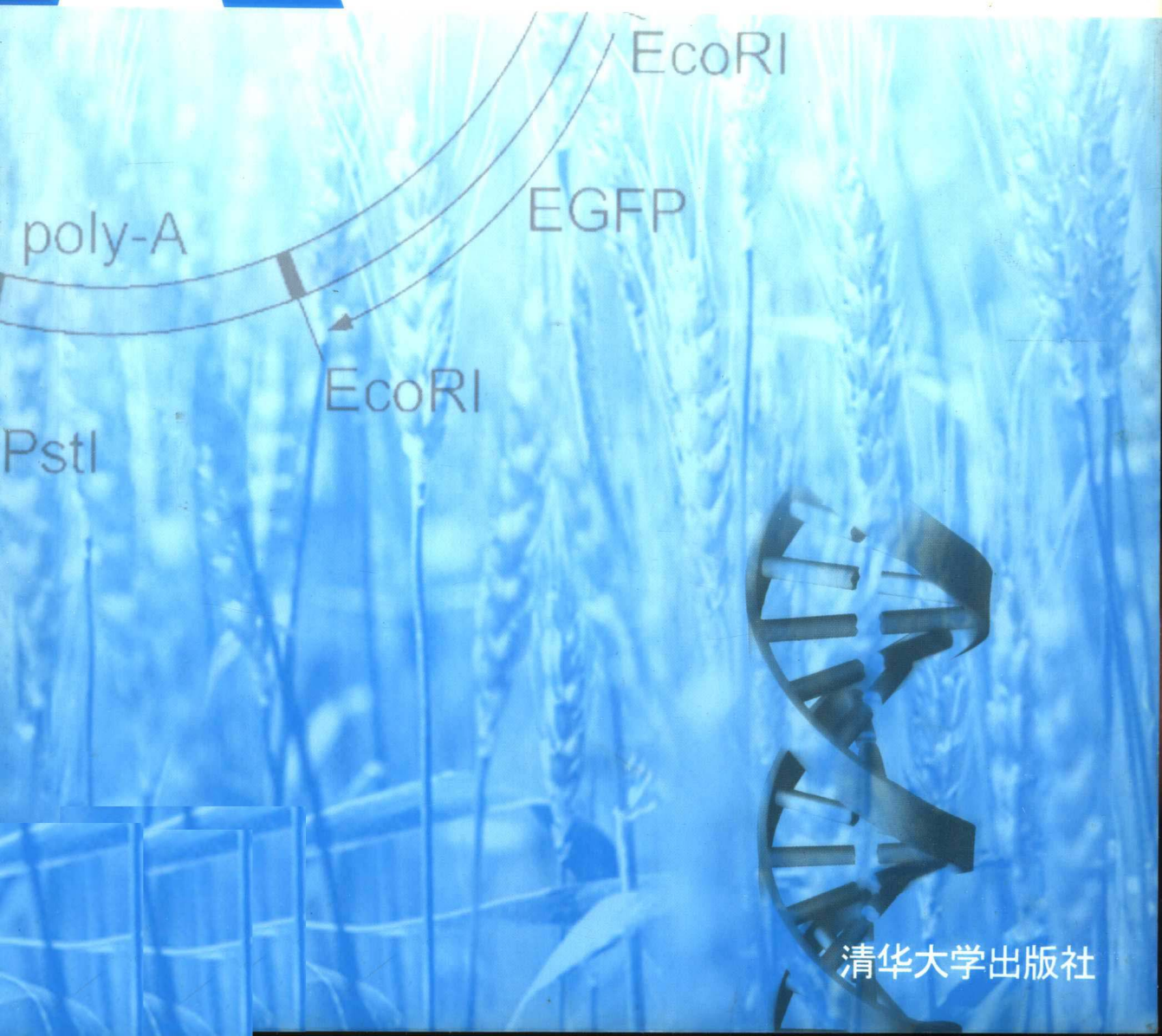


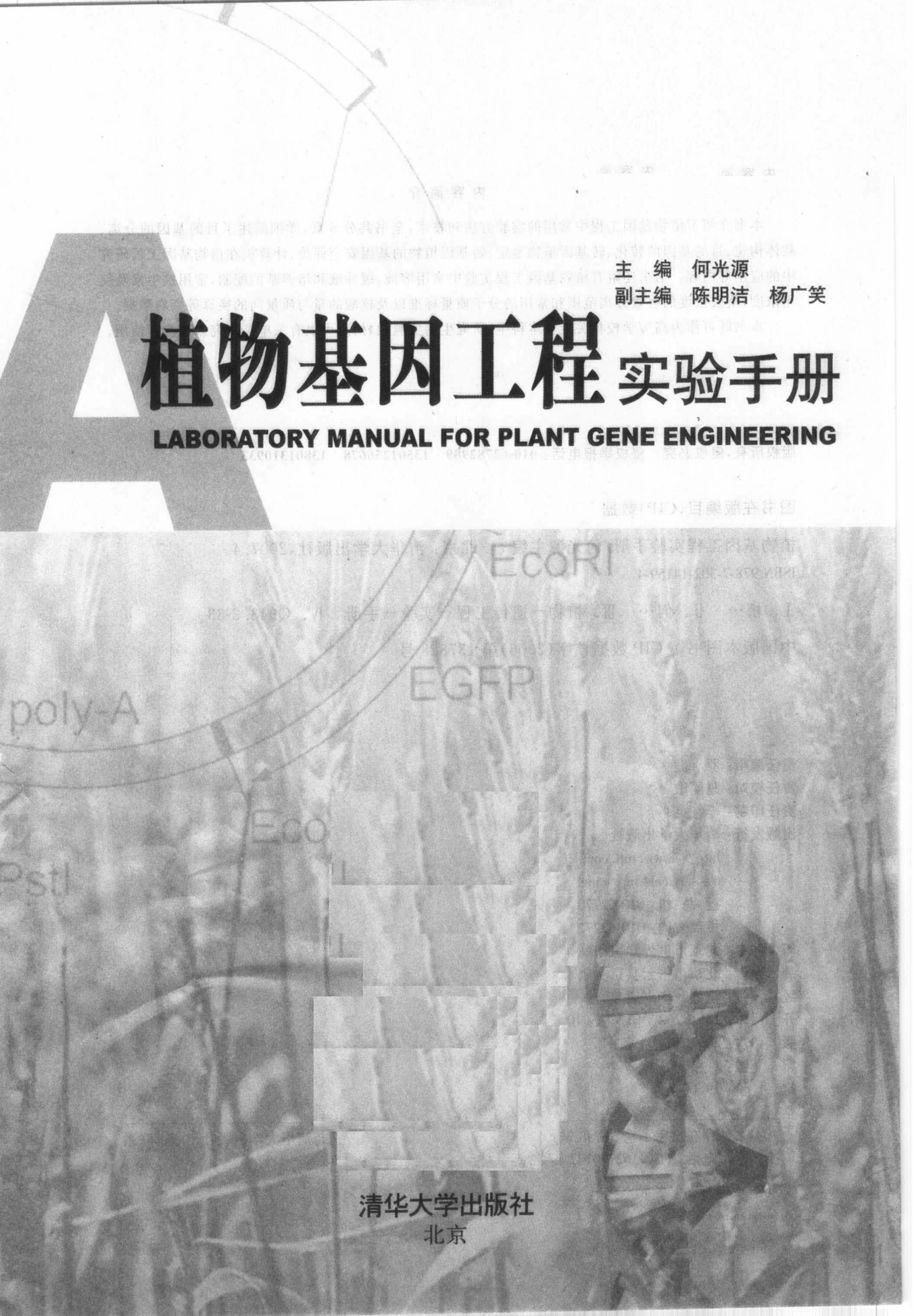
主 编 何光源
副主编 陈明洁 杨广笑

植物基因工程实验手册

LABORATORY MANUAL FOR PLANT GENE ENGINEERING



清华大学出版社



植物基因工程实验手册

LABORATORY MANUAL FOR PLANT GENE ENGINEERING

主 编 何光源
副主编 陈明洁 杨广笑

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本书介绍了植物基因工程中常用的实验方法和技术,全书共分6章,详细阐述了目的基因的分离、载体构建、目的基因的转化、转基因植物鉴定、转基因植物的基因安全评价、计算机在植物基因工程研究中的应用等内容。书末还附有植物基因工程实验中常用溶液、缓冲液和培养基的配制,常用抗生素及使用浓度,凝胶浓度的有效分离范围和常用的分子质量标准以及核酸的量与质量间的换算等资料数据。

本书既可作为高等学校相关专业本科生、研究生的实验教材,也可供有关单位研究人员参考使用。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13501256678 13801310933

图书在版编目(CIP)数据

植物基因工程实验手册/何光源主编. —北京:清华大学出版社,2007.4

ISBN 978-7-302-14159-4

I. 植… II. 何… III. 植物—遗传工程—实验—手册 IV. Q943.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 137828 号

责任编辑:罗 健

责任校对:赵丽敏

责任印制:李红英

出版发行:清华大学出版社 地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

<http://www.tup.com.cn> 邮 编:100084

c-service@tup.tsinghua.edu.cn

社 总 机:010-62770175 邮购热线:010-62786544

投稿咨询:010-62772015 客户服务:010-62776969

印 刷 者:北京市世界知识印刷厂

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:10.5 字 数:237 千字

版 次:2007 年 4 月第 1 版 印 次:2007 年 4 月第 1 次印刷

印 数:1~3000

定 价:19.00 元

本书如存在文字不清、漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770177 转 3103 产品编号:008478-01

前

言

植物基因工程实验手册

基因工程技术自 20 世纪 70 年代末诞生以来,在医药、农业和食品科学领域得到了广泛的应用。人们利用最新生物技术以突破自然环境对传统粮食作物、食品及药品生产的限制,转基因植物的商业价值愈来愈被人们所重视。1983 年世界上第一例转基因植物——转基因烟草诞生。此后,应用植物基因工程技术培育的抗病毒、抗虫害、抗除草剂和品质获得改良的作物工程植株纷纷问世。目前已在逾 200 种植物中成功地获得了转基因植株,并有近 1000 例转基因植物获准进行田间试验,更有十余种转基因植物(如转基因棉花、大豆等)已进入商业化种植。植物基因工程技术在农业生产上的应用和发展,特别是近十年来转基因农作物在全世界的商业化推广种植,深刻影响了传统农业的生产方式和经济效益,在解决环境恶化、资源匮乏、效益衰减和粮食短缺等方面显示出巨大的作用。

随着分子生物学理论和实验技术的不断发展,植物基因工程的实验方法和技术也在不断地革新。为适应植物基因工程研究日益发展的形势,满足国内从事植物基因工程研究者的需要,本手册在参考了国内外大量有关专著、实验手册和原始研究论文的基础上,结合作者多年来在国内外从事相关领域研究以及指导研究生学习和科研过程中的心得和经验,尽可能详尽地介绍近年来发展起来的植物基因工程研究的新方法、新技术。手册中大多数操作方法均是我们实验室经常使用的方法,并由在科研第一线工作的教师 and 研究生整理和撰写。我们的初衷是使本书尽可能涵盖植物基因工程中常用的实验方法和技术,并力求做到理论结合实践,用通俗易懂的语言介绍植物基因工程的实验技术,借以开拓读者的思路,提供新的方法。

本手册共分 6 章。第 1 章为目的基因的分离,包括植物组织 DNA、RNA 的提取以及目的基因的 PCR 扩增和克隆技术。第 2 章为载体构建,介绍了扩增体系建立、植物遗传转化载体构建、组织特异性表达载体的构建等方法。第 3 章为目的基因的转化,包括了农杆菌转化法、基因枪转化法、电穿孔法以及 PEG 介导的基因转化法。第 4 章为转基因植物的鉴定,包括标记基因的检测、目的基因的整合鉴定、基因的表达分析等内容。第 5 章为转基因植物的基因安全评价,介绍了转基因小麦环境释放中花粉介导的基因漂移检测、土壤微生物群落的检测、转基因食品的毒理学评价。第 6 章简要介绍了计算机在植物基因工程研究中的应用。书末还附有植物基因工程实验中常用溶液、缓冲液和培养基的配制,常用抗生素的配制及使用浓度,凝胶浓

度的有效分离范围和常用的相对分子质量标准以及核酸的量与质量间的换算等资料和数据。

参加本手册资料收集整理和编写工作的人员有：何光源、陈明洁、杨广笑、刘勇、何勇刚、汪越胜、罗立廷、李洋、丁莉萍、丛玲、陈冷、陈鹏、刘慧娟、李从强、张平、崔翠菊、苗英杰和刘璐。

植物基因工程技术的发展日新月异。虽然作者希望本书尽可能全面地介绍最新的植物基因工程研究技术,但限于时间和精力,错误和不妥之处在所难免,恳请同行专家和读者不吝赐教。

编 者

2006 年 10 月

第 1 章 目的基因的分离

1

1.1 植物组织 DNA 的提取	1
1.1.1 植物组织总 DNA 的提取	2
1.1.2 植物细胞核 DNA 的提取	6
1.1.3 植物细胞叶绿体 DNA 的提取	7
1.1.4 植物细胞线粒体 DNA 的提取	10
1.2 植物组织 RNA 的提取	12
1.2.1 植物组织总 RNA 的提取	12
1.2.2 mRNA 的分离纯化	14
1.3 目的基因的 PCR 扩增	18
1.3.1 mRNA 差别显示技术	19
1.3.2 抑制性扣除杂交技术	23
1.3.3 保守序列 PCR 克隆技术	27
参考文献	29

第 2 章 载体构建

31

2.1 扩增体系建立	31
2.1.1 大肠杆菌质粒 DNA 的提取	31
2.1.2 DNA 的限制性内切酶消化	34
2.1.3 DNA 片段的纯化回收	35
2.1.4 目的基因与载体的连接	37
2.1.5 重组质粒 DNA 转化大肠杆菌	39
2.1.6 重组质粒细胞菌落的鉴定	43
2.2 植物遗传转化载体构建	44
2.2.1 根瘤农杆菌 Ti 质粒 DNA 的提取	44
2.2.2 Ti 质粒转化载体的构建	46
2.2.3 发根农杆菌 Ri 质粒 DNA 的提取	47
2.3 组织特异性表达载体的构建	48

2.3.1 组织特异性启动子与质粒 DNA 的酶切及回收	48
2.3.2 组织特异性启动子与载体 DNA 片段的连接	50
参考文献	50

第 3 章 目的基因的转化 51

3.1 农杆菌转化法	51
3.1.1 烟草农杆菌叶盘转化	52
3.1.2 拟南芥花序浸润转化	55
3.1.3 水稻愈伤组织农杆菌转化	56
3.1.4 发根农杆菌转化	58
3.2 基因枪转化法	59
3.2.1 小麦幼胚基因枪转化	60
3.2.2 叶绿体遗传转化	62
3.3 电穿孔法	66
3.4 PEG 介导的基因转化法	68
参考文献	71

第 4 章 转基因植物的鉴定 73

4.1 标记基因的检测	73
4.1.1 <i>gus</i> 基因检测	74
4.1.2 <i>bar</i> 基因的检测	80
4.1.3 GFP 的检测	83
4.2 目的基因的整合鉴定	83
4.2.1 Southern 印迹杂交	83
4.2.2 RT-PCR	96
4.2.3 Northern 杂交	98
4.2.4 荧光原位杂交 (FISH)	107
4.3 基因的表达分析	112
4.3.1 SDS-PAGE 分析	112
4.3.2 Western 印迹	114
参考文献	116

第 5 章 转基因植物的基因安全评价 117

5.1 转基因小麦环境释放中花粉介导的基因漂移检测	117
5.2 土壤微生物群落的检测	120
5.3 转基因食品的毒理学评价	122

5.3.1 急性毒性试验	123
5.3.2 微核实验	124
5.3.3 30天和90天喂养试验	125
5.3.4 慢性毒性和致癌试验	127
参考文献	128

第6章

计算机在植物基因工程研究中的应用

131

6.1 生物学相关软件	131
6.1.1 Primer	131
6.1.2 RasMol 2.6	135
6.1.3 DNASTar	137
6.1.4 进化树的软件	139
6.2 生物学实用网站	142
参考文献	144

附录

145

附录1 主要溶液(母液)及缓冲液的配制	145
附录2 常用培养基的配制	150
附录3 常用抗生素的配制及使用浓度	152
附录4 凝胶浓度的有效分离范围	152
附录5 常用的相对分子质量标准	153
附录6 核酸的量与质量间的换算	156

目的基因的分离

基

因是染色体上具有一定座位的遗传单位,是 DNA 分子中一定长度的核苷酸序列。植物的生长发育是在多种代谢和生理过程基础上所发生的基因在时空上特异表达的综合现象,开发和分离潜在的各种有价值的基因并深入研究其表达调控机制,对作物品种的改良具有重要意义。分离作物重要农艺性状的功能基因,并利用转基因技术进行分子育种。随着转基因技术的日益深化,缺乏有益目的基因已成为利用转基因技术培育理想转基因植物的限制因子之一。为此,科学家们从一开始就十分重视目的基因分离技术的研究,植物基因分离也成为当今生物技术研究热点之一。至今,已建立起多种行之有效的植物基因分离方法。这些方法的广泛应用,不但加深了人们对植物基因组结构与功能的了解,更重要的是极大地推动了转基因植物研究的深入和完善。

所有植物基因分离方法都是依据基因的基本特性创建的,基因的特性可从中心法则中得到启示。依据基因的座位、转录和转译,基因的特性可以分为:基因的序列——DNA、基因的转录产物——mRNA、基因的转译产物——蛋白质、基因的功能和基因在基因组中的位置。每种分离方法至少利用了以上基本特性中的一种,从而产生了各种各样的分离方法。每种方法都有其适用的范围和特点。在具体工作中可以根据自己的研究对象选择合适的基因分离方法。在此,主要介绍几种目前常用的基因分离方法。

1.1 植物组织 DNA 的提取

DNA 是遗传信息的载体,是最重要的生物信息分子,是分子生物学研究的主要对象,因此 DNA 的提取被视为基因工程实验技术中的最重要、最基本的操作。

在植物基因工程研究中,获得高质量的基因组 DNA 是获得目的基因、进行基因克隆、目的基因的遗传转化、转基因植物的分子检测等后续工作的前提和保证,因此其重要性毋庸置疑。

高质量 DNA 应该满足如下要求:①结构完整;②无其他大分子成

分的污染(蛋白质、多糖及 RNA 等);③提取样品中不含有对酶有抑制作用的有机溶剂及高浓度的金属离子。

分子生物学实验技术发展到今天,已有众多的 DNA 提取方法。这些方法各不相同,针对不同的实验材料行之有效,因此在实际应用时,只有根据实验需要,选择合适的方法,设计合理的实验方案,才能达到事半功倍的效果。

1.1.1 植物组织总 DNA 的提取

这里主要介绍两种本实验室长期使用的植物组织总 DNA 的提取方法——CTAB (Cetyltrimethyl ammonium-bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)法和 Promega 法,所用材料是小麦叶片。CTAB 方法的特点是制备的 DNA 纯度高、结构完整,适合于基因分离、Southern Blot 分析等;Promega 法的特点是快速简便,适于 PCR 扩增检测。这两种方法的共同特点是都采用了 CTAB 这种阳离子表面活性剂。

1. CTAB 提取法

仪器设备

- (1) 研钵、研杵、剪刀、镊子(用洗涤剂清洁,高压灭菌并烘干;—20℃放置)。
- (2) 玻璃钩(用洗液浸泡后清洗,高压灭菌,烘干)。
- (3) 10 mL 样品管、2 mL 离心管、1 mL 枪头、200 μ L 枪头(高压灭菌,烘干)。
- (4) 电泳槽、梳子(清洁晾干)。
- (5) 水浴锅、涡旋仪、离心机、移液枪等。

实验试剂

(1) CTAB 缓冲液(20 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB)。

配制方法:称取 EDTA 7.44 g、Tris 12.1 g 和 NaCl 81.8 g,溶于 800 mL 灭菌蒸馏水,用 HCl 调 pH 至 8.0,加入 CTAB 20 g,加热至 60℃使之溶解。用灭菌蒸馏水定容至 1000 mL,在 37℃条件下保存。

(2) 1 mol/L DTT。

配制方法:将 15.42 g DTT 溶于 100 mL 灭菌蒸馏水中,分装,在—20℃条件下保存。

(3) 氯仿—正辛醇(24:1)溶液。

配制方法:量取氯仿 96 mL 和正辛醇 4 mL,置于棕色瓶中,放置于排毒柜中。

(4) 75%乙醇:0.2 mol/L NaAc。

配制方法:量取 95%乙醇 790 mL,称取 NaAc 16.4 g,灭菌蒸馏水定容至 1000 mL。

(5) 10×RNase 缓冲液(10 mmol/L Tris, 15 mmol/L NaCl, pH 7.5)。

配制方法: 称取 Tris 0.6055 g、NaCl 0.4383 g, 用 HCl 调 pH 至 7.5, 用灭菌蒸馏水定容至 50 mL。

(6) RNase 溶液(10 mg/mL)。

配制方法: 称取 50 mg RNase, 加入 0.5 mL 10×RNase 缓冲液, 用灭菌蒸馏水定容至 5 mL, 100℃煮沸, 分装, 在-20℃条件下保存。

(7) 100×TE 缓冲液(1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA)。

配制方法: 称取 Tris 12.11 g、Na₂EDTA 3.722 g, 溶于 80 mL 灭菌蒸馏水, 用 HCl 调 pH 至 8.0, 用灭菌蒸馏水定容至 100 mL, 高压灭菌(1.034×10⁵ Pa, 20 min), 在 4℃条件下保存, 用时 100 倍稀释。

(8) 10×TBE 缓冲液。

配制方法: 称取 Tris 108 g、硼酸 55 g、Na₂EDTA 7.44 g, 溶于 800 mL 灭菌蒸馏水, 用 HCl 调 pH 至 8.0, 用灭菌蒸馏水定容至 1000 mL。

(9) EB 溶液。

配制方法: 称取 EB 1.0 g, 溶于 10 mL 灭菌蒸馏水, 搅拌溶解过夜, 在 4℃条件下避光保存。

(10) 0.6%琼脂糖凝胶。

配制方法: 称取琼脂糖 0.6 g, 置于 100 mL 0.5×TBE 缓冲液中煮沸溶解。

(11) DNA 分子标准物(DNA marker, 以下统一简称 DNA marker)。

(12) 上样缓冲液>Loading buffer)。

(13) 液氮。

(14) 95%乙醇(在-20℃条件下放置)。

实验步骤

(1) 用 75%乙醇棉球消毒小麦叶片, 剪取叶片(约 10 mm²), 放入 10 mL 样品管中, 在液氮中保存; 水浴温度调至 65℃; 在 2 mL 离心管内加入 100 μL 氯仿—正辛醇(24:1)溶液。

(2) 在含有液氮的研钵内轻轻碾碎冷冻的叶片样品, 在室温条件下放置至碾碎样品开始融化时, 加入 1 mL CTAB 提取缓冲液(含 25 mmol/L DTT)。

(3) 用镊子尽可能刮下研钵和研杵上的样品, 将碾碎样品加入含氯仿—正辛醇溶液的离心管中, 在 65℃条件下温育 30 min, 然后在室温条件下放置 15 min。

(4) 每管内加入 1 mL 氯仿—正辛醇溶液, 至总体积约 2 mL 时混匀, 以 13 000 r/min 转速离心约 7 min。

(5) 用除去尖端的移液枪头小心地将上层水相移至另一离心管内, 再加入约 1 mL 95%乙醇(-20℃), 至终体积至 2 mL, 样品在-20℃条件下放置 20 min 或在 4℃条件下放置 1 h。可能在界面见到 DNA。然后在室温条件下放置至少 5 min。

(6) 缓慢倒置离心管以混合缓冲液和乙醇并收集 DNA。使 DNA 缠绕在玻璃

钩上。混匀时必须缓慢,如果太剧烈,DNA链会断开。为了最大量地收集DNA,收集时缓慢摇动离心管并旋转钩子。干燥时钩子须编号以免混淆。

(7) 用75%乙醇:0.2 mol/L NaAc溶液洗涤DNA 10 min。期间将钩子间或提起并放下。钩子于空气中倒置约5 min,至DNA呈晶体状。

(8) 钩子浸入离心管内(内含50~200 μ L TE缓冲液,pH 7.4~8.0,体积视DNA量而定)。DNA重悬应该迅速,建议钩子于离心管内放置15 min,然后混匀以便DNA溶解。为更好重悬,TE缓冲液可加热至65℃。

(9) 每100 μ L DNA加入2.5 μ L RNase A,37℃温育至少30 min。

(10) 0.6%琼脂糖电泳检测DNA浓度。所制备的DNA于4℃保存。

操作要点

(1) 样品碾碎前研钵、研杵要用液氮彻底冷却,以防温度较高使得DNA降解。

(2) 氯仿-正辛醇溶液与CTAB提取缓冲液必须充分混匀,成均一悬液,以使氯仿与蛋白质充分接触。

(3) 取出上层水相时,必须用去尖端的移液枪头,务必小心,避免界面蛋白质和底部有机相叶绿素的污染,以免基因组DNA剪切。

(4) 样品置于-20℃乙醇中沉淀后,应该在室温条件下放置至少5 min,因为很多DNA在此时沉淀。

(5) RNase储液必须预先煮沸以除去其中可能污染的DNase,避免DNase降解基因组DNA。

2. Promega提取法

本方法的主要试剂由Promega公司提供,故而得此名。

仪器设备

(1) 小研杵和剪刀(用洗涤剂清洁,高压灭菌,烘干,-20℃放置)。

(2) 10 mL样品管、1.5 mL离心管、1 mL枪头、200 μ L枪头(灭菌、烘干)。

(3) 电泳槽、梳子(清洁晾干)。

(4) 水浴锅、涡旋仪、离心机、移液枪等。

实验试剂

(1) 核裂解液。

(2) 蛋白质沉淀溶液。

(3) RNase溶液(10 mg/mL)。

- (4) 100×TE 缓冲液(1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA)。
- (5) 10×TBE 缓冲液。
- (6) EB 溶液。
- (7) 0.6% 琼脂糖凝胶。
- (8) λ DNA 标记。
- (9) 上样缓冲液。
- (10) 液氮。
- (11) 95% 乙醇(在-20℃条件下放置)。

实验步骤

(1) 用液氮冷冻叶片材料,在小离心管内用研杵碾成粉末,碾碎后将约 40 mg 粉末转至离心管中,加入 600 μ L 核裂解液,涡旋 1~3 s 以湿润组织,然后在 65℃ 条件下温育 15 min。

(2) 加入 3 μ L RNase 至细胞裂解物中,倒置离心管约 2~5 次以混匀样品。混合物在 37℃ 条件下温育 15 min。进行下一步之前样品需放置 5 min 使之冷却至室温。

(3) 加入 200 μ L 蛋白质沉淀溶液,高速涡旋 20 s。以 13 000 r/min 转速离心 3 min。蛋白质应形成致密沉淀,若上清液依然浑浊,重复离心直至澄清。

(4) 小心取出含 DNA 的上清液,转至另一含 600 μ L 异丙醇的 1.5 mL 离心管中,蛋白质留于沉淀中;轻轻倒置离心管,混匀溶液,直至 DNA 形成肉眼可见的絮状物。

(5) 在室温条件下以 13 000 r/min 转速离心 1 min,小心弃去上清液。加入 600 μ L 70% 乙醇,轻轻倒置离心管数次以洗涤 DNA。在室温条件下以 13 000 r/min 转速离心 1 min,小心吸出乙醇,离心管倒置于吸水纸上,空气干燥 15 min。

(6) 加入 100 μ L TE,在 65℃ 条件下温育 1 h 以使 DNA 溶解,间或轻轻敲击离心管使溶液混匀,亦可在室温或 4℃ 条件下温育过夜使 DNA 溶解,2~8℃ 保存。

(7) 用已知量未经酶切的 λ DNA 作标记,通过定量凝胶电泳测定 DNA 产量。在 65℃ 条件下加热 DNA 10 min。

取出 1 μ L 样品,加入 9 μ L TE 缓冲液、2 μ L 样品缓冲液。进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,标记泳道上分别加入 50 ng、100 ng、250 ng 和 500 ng 未经酶切的 λ DNA(溶于 TE)。将 DNA 的染色强度与已知量 λ DNA 进行比较,即可估计上样量,从而计算出大致产量。

操作要点

(1) 离心管和小研杵使用之前均需用液氮预冷,避免材料融化,因为 DNA 降解很快;

(2) 仍然有部分含蛋白质的上清液留于原管中,弃之,以免污染 DNA 溶液;

(3) DNA 沉淀很松散,必须小心操作以免丢失。

1.1.2 植物细胞核 DNA 的提取

植物细胞的大部分 DNA 存在于细胞核内,并与组蛋白稳定结合组成染色体,控制着大部分性状,起着主导作用。所以有必要掌握从高等植物组织中提取细胞核高质量 DNA 的方法,分离核 DNA 用于建立高等植物基因文库、Southern blotting 等相关研究。

本方法采用液氮冷冻后破碎植物细胞壁,在冰冻条件下可部分抑制 DNase 的活性,以保护 DNA 不被破坏。破碎的细胞悬浮于裂解液中,其中的 SDS 使核膜破裂;EDTA 螯合二价金属离子,以抑制 DNase 的活性;蛋白酶 K 除抑制 DNase 外还使 DNA 与染色质蛋白质解离,以便分离较纯的 DNA,同时,60℃保温也可抑制 DNase 的活性,并使溶液黏度下降。再经酚和氯仿/异戊醇抽提裂解物以除去蛋白质,进一步用氯化锂(LiCl)沉淀大分子 RNA,并用透析法除去低相对分子质量杂质,即可得到较纯的 DNA,其大小适于 Southern blotting 和用 λ 噬菌体构建基因组 DNA 文库等。

仪器设备

- (1) 小研杵和剪刀(用洗涤剂清洁、高压灭菌、烘干, -20℃放置)。
- (2) 10 mL 样品管、1.5 mL 离心管、1 mL 枪头、200 μ L 枪头(灭菌、烘干)。
- (3) 电泳槽、梳子(清洁晾干)。
- (4) 水浴锅、涡旋仪、离心机、移液枪等。

实验试剂

- (1) 裂解缓冲液: 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0, 0.5% SDS。
- (2) 5 mg/mL 蛋白酶 K。
- (3) 1 mol/L Tris(不加 HCl)。
- (4) 10 mol/L LiCl。
- (5) 饱和酚。
- (6) 氯仿: 异戊醇(24:1)。
- (7) 无水乙醇。
- (8) TE 缓冲液。

实验步骤

- (1) 取新鲜幼叶 5 g, 剪成 1 cm 左右于液氮中速冻后, 立即在液氮中研磨成粉

末,尽可能粉碎。

(2) 待液氮蒸发,向粉末中加 20 mL 的预冷裂解缓冲液,轻轻搅匀,用 1 mol/L Tris 调溶液 pH 8.0,加 5 mg/mL 蛋白酶 K 约 2 mL,在 60℃ 条件下放置 5 min,在 37℃ 条件下放置过夜。

(3) 将上述裂解液移入离心管,在 4℃ 条件下以 10 000 r/min 转速离心 10 min,用剪去尖头的枪头将黏稠的上清液移入三角瓶中。

(4) 加等体积的饱和酚于三角瓶中,轻轻旋转,使水相与酚充分混合,室温下缓缓摇动 30 min。

(5) 将混合液移入离心管,在 4℃ 条件下以 10 000 r/min 转速离心 20 min,将上层水相仔细地吸出,注意不要吸出中间的蛋白质层。

(6) 先用酚-氯仿-异戊醇,再用氯仿:异戊醇(24:1)按第(4)和第(5)步骤各重复抽提一次,最后一次可用 50 mL 离心管在室温条件下以 4000 r/min 转速离心 20 min,如中间层仍有白色,则须再重复第(6)步。

(7) 取出水相,加入 LiCl 使终浓度为 2 mol/L,冰冻 1 h 后,在 4℃ 条件下以 10 000 r/min 转速离心 10 min,除去相对分子质量高的 RNA 沉淀。

(8) 将上清液转入新离心管中,加 2 倍体积的预冷无水乙醇,0℃ 下放置 1 h,以 4000 r/min 转速离心 5 min,得到的 DNA 沉淀用 70% 乙醇洗涤两次,离心收回沉淀,并将管底少量的乙醇于室温挥发干净,但不让沉淀彻底干燥,否则沉淀不易溶解。

(9) 将 DNA 沉淀溶于 TE 缓冲液中,在 4℃ 条件下保存。

(10) 应用这种方法所得的 DNA 分子都大于 50 kb,可用于酶切和 Southern blotting 分析。

操作要点

(1) 为了防止 DNase 的混入,所用试剂和实验器具等必须消毒灭菌,操作时应戴上手套。

(2) 为得到大的 DNA 片段,操作中应尽量避免强烈振摇、迅速搅拌和细口吸管的急速吸进放出等操作。

(3) 得到的 DNA 样品中含有小分子 RNA 和核苷酸,可通过琼脂糖凝胶电泳分离进一步纯化 DNA。

1.1.3 植物细胞叶绿体 DNA 的提取

在真核生物中,除核基因组外,还存在细胞质基因组,即线粒体基因组和绿色植物中的叶绿体基因组。叶绿体基因组和线粒体基因组 DNA 均为环状分子,它们的大小随物种的不同而有所变化。高等植物的叶绿体 DNA(cpDNA)在 120~160 kb 之间,现已发现的最大叶绿体 DNA 达到 217 kb。

细胞器基因组在遗传方式、基因组大小与结构、基因编码容量、基因表达与调控等方面均不同于核基因组,而叶绿体、线粒体的基因组又各具特点。核、质基因在功能上的相互协调,是细胞进行生命活动的重要基础,因此,研究细胞器基因组的结构与功能具有重要意义。在所有细胞器基因组的研究中,分离到纯化的细胞器 DNA 是极为关键的。

本实验首先是制备植物新鲜组织匀浆、过滤,分离出完整的叶绿体,然后通过蔗糖密度梯度离心,把叶绿体与其他亚细胞结构分离开来。完整叶绿体经蛋白酶 K 酶解后,再通过酚—氯仿抽提获得高纯度的叶绿体 DNA。

仪器设备

- (1) 搅拌机、冷冻离心机、笔刷、恒温水浴锅、真空干燥仪、尼龙筛(50 μm 和 20 μm)。
- (2) 甩平式转头的超速离心机和配套的离心管、微型离心机(1.5 mL 管)。
- (3) 各种规格的离心管(用于酚抽提,灭菌、烘干,使用前预冷)。

实验试剂

- (1) 缓冲液 A(提取缓冲液): 各成分的终浓度为 0.3 mol/L 山梨醇、50 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L EDTA、0.1% 牛血清白蛋白 BSA, BSA 于使用前加入。
- (2) 缓冲液 B(裂解缓冲液): 0.5% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L EDTA, 质量浓度为 0.1% 蛋白酶 K, pH 8.0, 蛋白酶 K 用前加入, 由于缓冲液 B 在室温下会出现沉淀, 因此, 使用前可先将缓冲液加热。
- (3) TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris、5 mmol/L Na_2EDTA , pH 7.5。
- (4) 蔗糖梯度: 60%、45%、20% 的蔗糖溶液, 溶于缓冲液 A。
- (5) 酚(TE 缓冲液饱和, pH 8.0)。
- (6) 99% 和 70% 的乙醇。
- (7) 3 mol/L 乙酸钠。

实验步骤

以下操作除特别指明外均在 4℃ 条件下进行, 将搅拌器和离心管预冷, 使用冷藏的缓冲液并在冰筒中操作。

- (1) 准备 750 mL 缓冲液 A, 使用前于 500 mL 缓冲液中加入 BSA。
- (2) 准备 25~30 g 完整正常的嫩叶, 在提取之前可将植株置于黑暗中培养 25 h 左右以降低淀粉含量。为防材料已被感染或弄脏, 可先用 6% 次氯酸钠处理 5 min, 然后用蒸馏水漂洗 2~3 次。
- (3) 除去叶片中的叶脉, 称重。取约 20 g 的植物材料, 将叶片切成 1 cm^2 大小的碎片, 将 10 g 碎片置于含有 BSA 的约 250 mL 的缓冲液 A 中(注意: 只有匀浆时使

用的缓冲液 A 中加入 BSA), 在搅拌器中高速匀浆, 每次约 10 s, 重复 3 次。

(4) 用 50 μm 的尼龙筛过滤提取物。在含 BSA 的 250 mL 缓冲液 A 中对所剩的碎片再次匀浆和过滤。不能通过 50 μm 尼龙筛的匀浆物可集中起来再匀浆, 每次 10 s, 重复 2 次, 再过滤。

(5) 用 20 μm 的尼龙筛对提取物进行第二次过滤。

(6) 提取液以 3000 r/min 转速离心 10 min。

(7) 用软笔刷轻轻将沉淀重悬于 30 mL 不含 BSA 的缓冲液 A 中, 再离心。这时绿色沉淀的底部可见白色淀粉, 应尽量避免重悬起淀粉。根据淀粉含量, 可以重复该重悬步骤 4~5 次。

(8) 在重悬的同时, 制备蔗糖梯度。分级梯度液底层为 3.5 mL 60% 的蔗糖溶液, 中间为 3.5 mL 45% 的蔗糖溶液, 顶层为 3.5 mL 20% 的蔗糖溶液, 不同梯度层要轻轻混匀, 得到扩散中间相。可以用一个长的巴氏吸管小心地在层间上下搅动几次(巴氏吸管的末端开口应封上)。

(9) 小心将沉淀物重悬于总体积 5 mL 的缓冲液 A 中, 将悬液分别加入有分级梯度液的 5 个小管中, 梯度平衡后置于水平转头上以 26 000 r/min 转速在 4℃ 条件下离心 1 h。

(10) 将位于 20%~45% 蔗糖溶液中间层的叶绿体带用宽口移液管转至 50 mL 的离心管中。

(11) 缓慢加入 3 倍体积的缓冲液 A(防止叶绿体破裂)。开始时逐滴加入并轻轻搅拌(全部加完约 15 min)。以 5000 r/min 转速离心 5 min, 收集叶绿体。

(12) 小心将沉淀重悬于 3 mL 缓冲液 A 中, 加入 1/5 体积的缓冲液 B(用前加入蛋白酶 K), 并在 50℃ 条件下保温 15 min, 使叶绿体裂解。

(13) 在室温条件下抽提叶绿体 DNA 两次。加入等体积的酚(TE 饱和), 颠倒小管数次混匀。在室温条件下以 5000 r/min 转速离心 10 min, 使两相分离。收集上层溶液, 再用等体积的酚-氯仿(1:1)抽提一次。

(14) 将 DNA 溶液(水相)转至一个离心管中, 加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积的 99% 乙醇, 在 -20℃ 条件下沉淀 DNA(过夜)。

(15) 在 4℃ 条件下, 以 10 000 r/min 转速离心 15 min, 收集 DNA, 弃上清液, 真空抽干沉淀(注意不要过度抽干沉淀)。将 DNA 溶于 400 μL TE 缓冲液, 此步骤可能需要几个小时, 应在冰上操作。

(16) 把 DNA 转至离心管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积的 99% 乙醇, 在 -20℃ 条件下沉淀(过夜)。

(17) 在微型离心机上, 在 4℃ 条件下, 以 13 000 r/min 转速离心 15 min, 收集 DNA。

(18) 弃去上清液, 用 20% 乙醇洗涤沉淀, 再离心, 重复洗涤一次, 离心, 真空抽干沉淀。

(19) 将沉淀溶于 100 μL TE 缓冲液中, 在 -20℃ 或 4℃ 条件下保存。DNA 产量一般可达 10~100 μg 。