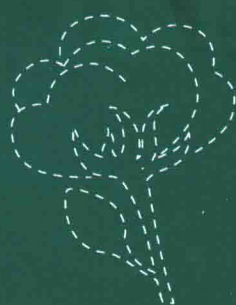




普通高等教育“十一五”国家级规划教材
普通高等教育“十三五”规划教材



LABORATORY GUIDE FOR PLANT
GENETIC ENGINEERING

植物基因工程 实验技术指南 (第二版)

王关林 方宏筠 主编



科学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

普通高等教育“十三五”规划教材

植物基因工程实验技术指南

(第二版)

王关林 方宏筠 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是新编写的系统阐述植物基因工程实验技术的学术专著，与本书编委会于2014年出版的《植物基因工程》理论书配套使用。全书共新增18章，新编写内容占全书的2/3以上。每个实验除详细叙述实验操作程序外，还设有实验解析：分析实验结果，指出关键技术，解释实验原理，从而培养实验者举一反三的创新能力，做到学以致用。同时本书还汇集了国内外近期研发的许多新成果、新技术，引入了最新的图表及近三年的文献，在附录中收集了植物基因工程实验相关的最新数据资料、目的基因结构功能及实验试剂等，以便使用。

本书是植物基因工程研究人员必备的实验手册，可作为植物基因工程研究的工具书，也可作为高等院校高年级生物技术专业本科生及硕士和博士研究生的实验参考教材。教师可根据教学大纲需要从中选择适当的实验内容灵活使用；也可作为学生参加课外科学研究活动、拓宽知识、激发兴趣、启蒙创新实践的实验指导书。

图书在版编目 (CIP) 数据

植物基因工程实验技术指南/王关林，方宏筠主编. —2版. —北京：科学出版社，2016

普通高等教育“十一五”国家级规划教材 普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-03-049161-9

I. ①植… II. ①王… ②方… III. ①植物基因工程-实验-高等学校-教材 IV. ①Q943.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 143474 号

责任编辑：席 慧 / 责任校对：张怡君

责任印制：赵 博 / 封面设计：铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年8月第 二 版 开本：890×1240 1/16

2016年8月第一次印刷 印张：23 1/2

字数：760 000

定价：69.00 元

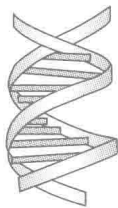
(如有印装质量问题，我社负责调换)

《植物基因工程实验技术指南》(第二版) 编委会名单

主 编 王关林 方宏筠
副 主 编 朱延明 王傲雪 那 杰 胡银岗 杜 娟 王旭静
吴亮其 何俊娜 孙晓丽 李 威 端木慧子

编 委 (按姓氏笔画排序)

王小芳	清华大学	吴亮其	中国科学院大学
王旭静	中国农业科学院	何俊娜	中国农业大学
王关林	辽宁师范大学	闵东红	西北农林科技大学
王傲雪	东北农业大学	张小红	西北农林科技大学
方宏筠	辽宁师范大学	陈 亮	西北农林科技大学
朱延明	东北农业大学	陈秀玲	东北农业大学
那 杰	辽宁师范大学	罗红梅	中国医学科学院
孙晓丽	黑龙江八一农垦大学	赵春晖	辽宁师范大学
杜 娟	北京大学	胡银岗	西北农林科技大学
李 威	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.	夏 然	中国科学院遗传与发育生物学研究所
李大力	南京理工大学	蒋 丹	辽宁出入境检验检疫局
		端木慧子	东北农业大学



前 言

生物进化伴随着基因变异的轨迹缓缓而进。有性杂交育种是生物进化的高级阶段，也是自然界存在的转基因过程，但其仍然有着极大的随机性。基因工程是按照人们的愿望进行严密的设计，通过基因操作，有目的地改造生物种性，培育出符合人们需求的新品种及生产所需的产品。基因工程技术的建立，为人类改造生物开辟了崭新的途径，预示着生物进化史从自然进化发展到了人类改造自然的科学顶峰时期。植物基因工程技术将使整个生物界发生重大变革，孕育着巨大的产业潜力，为此，受到人们极大的关注。尽管目前对转基因植物的安全性还有争论，但是科学家深信：植物基因工程是一项给人类带来福祉的伟大技术，也是为农业谱写文明新篇章的技术，更是有望于解决全球粮食危机的技术。基因农业网2014年10月发布了一张主题为“转基因安全性结论”的信息图，图中选取了18家全球性权威机构对转基因作物和转基因食品的安全性所做出的科学论断。这些权威机构包括9家国际组织和9家国家机构，如世界卫生组织（WHO）、欧盟委员会（EC）、联合国粮食及农业组织（FAO）、毒理学学会（SOT）、美国国家科学院（NAS）、美国医学会（AMA）、英国皇家医学会和法国科学院等。他们的结论都表达了一个中心观点，即已经顺利通过科学评价的转基因作物和食品与传统种植的植物及其所制成的食品同样安全。这对转基因技术的产业化具有重大的推动作用。农业生物科技新时代已经来临，全球农业生物育种和产业化发展已进入战略机遇期。我国是发展中的农业大国，对植物基因工程技术高度重视，2008年投巨资启动了“十一五”和“十二五”植物基因工程育种专项，已对17种转基因植物发放了商品化生产许可。2015年08月28日农业部答复政协提案指出：“上市转基因食品都安全”。在2016年的中央一号文件中对植物基因工程产业的发展要求指出“大胆研发，谨慎推广”，已成为中央为转基因农作物商用的最新定调。在解读中央一号文件中再一次提出，在农业生物技术领域不能落伍，一定要抢占农业转基因技术的制高点，这将有力地推动我国植物基因工程产业的发展。

科技发展，人才为本。在20世纪90年代本书主编已出版了两部植物基因工程方面的专著，2008年承担编写“十一五”高等院校国家级规划教材《植物基因工程》的任务。该书是我国植物基因工程领域的第一本高等院校统编教材，于2009年由科学出版社出版后被中国科学院研究生院等多所大学遴选为本科高年级相关专业学生和研究生们的教科书，使用多年来多次得到好评。为紧跟生物科技大时代的发展，导入近期植物基因工程的创新成果，作者在已出版的专著和“十一五”国家级规划教材的基础上，汇集近代的新理论、新技术及其产业化进展，分别重新编写论述植物基因工程理论和实验技术指南。2014年已出版了系统论述植物基因工程理论的新作《植物基因工程》，2016年编写这部系统阐述植物基因工程实验技术的新作《植物基因工程实验技术指南》，使之与理论书配套形成完整的植物基因工程理论技术体系。

本书保持了专著和第一版教科书的特点：以植物基因工程的操作程序为主线循序展开，逐渐深入，系统阐述了植物基因工程的实验技术。全书共设8篇38章：第一篇核酸提取技术、第二篇基因分离克隆技术、第三篇DNA重组及载体构建技术、第四篇目的基因遗传转化技术、第五篇转基因植物的检测鉴定、第六篇转基因植物的生物学特性及表观遗传学检测、第七篇生物信息学技术在植物基因工程中的应用、第八篇转基因植物的安全性评价检测。本书新编的主要内容：一是在第一篇中单独设立第4章，介绍了各种核酸提取物浓度、纯度及其定量的检测新技术；二是在第二篇中汇集了近期国内外植物基因分离克隆的新技术，建立了新的技术体系；三是在第三篇中详细阐述了近年来研发的DNA重组及载体构建新技术，如正向负向选择克隆载体、转座子表达载体、不依赖基因序列和连接反应的克隆载体及目的基因定位整合表达载体等各种新载体的构建新技术；四是在第四篇中增加了第22章遗传转化新技术，详细介绍了叶绿体基因转化、基因敲除转化、基因编辑技术及其他遗传转化新技术；五是在第五篇中增加了第26章，介绍了当代转基因植物的检测新技术，如核酸生物传感器检测、侧向流动型免疫检测、

色谱检测及毛细管电泳检测等；六是新增编了三篇，即第六篇转基因植物的生物学特性及表观遗传学检测、第七篇生物信息学技术在植物基因工程中的应用及第八篇转基因植物的安全性评价检测，首次汇集引入了这些领域内大量的新成果和新技术，反映了当今的研究进展。全书共新增 18 章，新编写内容占全书的 2/3 以上。此外，本书紧紧围绕植物基因工程实验技术的主题内容，突出植物特点，与相关学科既减少重复，又融会贯通。同时本书还引入了国内外近期研发的许多新图表，列出了近三年的文献，力求图文并茂，内容丰富，生动活泼，既具有较高的专业水平，又深入浅出，通俗易懂。每个实验除了详细叙述操作程序外，还设有实验解析：分析实验结果，指出关键技术，解释实验原理，从而培养实验者举一反三的创新能力。在附录中收集了植物基因工程实验相关的最新数据资料、目的基因结构功能及实验试剂等，以便使用。

因此，本书是植物基因工程研究人员必备的实验手册，也可作为高等院校高年级生物技术专业本科生及硕士和博士研究生的实验参考教材。教师可根据教学大纲需要从中选择适当的实验内容灵活使用，也是学生参加课外科学研究活动，拓宽知识，激发兴趣，启蒙创新实践的实验指导书。

《植物基因工程实验技术指南》是一部系统阐述植物基因工程实验技术，科学性、实践性和操作性很强的实验性著作。为提高本书的质量和水平，主编邀请了中国科学院大学、中国科学院遗传与发育生物学研究所、中国农业科学院、中国医学科学院、北京大学、清华大学、中国农业大学等国内十几个知名单位教学科研一线的中青年博士、副教授以上学者参加编写，汇集了他们的渊博学识和真知灼见。此外，为使本书的实验技术更紧贴实际应用，第一版书邀请了日本的 TAKARA Biotech (Dalian) Co. Ltd. [宝生物工程（大连）股份有限公司] 参编，此次再版，本书又邀请了知名的生物工程公司 Sangon Biotech (Shanghai) Co. Ltd. [生工生物工程（上海）股份有限公司] 的博士、研发专家参加编写，把公司的实践经验融入实验技术。参编的 20 多位博士、专家、教授大多数是留学回国人员，他们查阅了大量的最新文献资料，汇集了国内外植物基因工程的创新技术，并结合他们多年来的科研教学经验编写本书，其中多位作者的编写工作是 2016 年在国外留学及科学研究时完成的，使本书具有较高的专业水平，能与国际接轨，也反映了当今该领域的研究进展。他们（含参编部分内容的作者）分别负责编写的章节是：第一篇方宏筠、赵春晖、吴亮其、李威；第二篇杜娟、夏然、何俊娜、王小芳、罗红梅、李威、张天柱；第三篇朱延明、王傲雪、孙晓丽、陈秀玲、陈宏宇；第四篇王关林、那杰、张小红；第五篇朱延明、王傲雪、孙晓丽、张珍珠；第六篇胡银岗、闵东红、张小红、陈亮；第七篇朱延明、端木慧子；第八篇王旭静、李大力、蒋丹；附录及中英文名词（缩略）对照表王傲雪、陈宏宇。

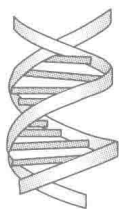
本书的科学性、正确性及可操作性是十分重要的，作者已全力为之。尽管本书集成了我国三大“科学院”（中国科学院、中国农业科学院、中国医学科学院）和北京大学、清华大学等知名大学实验室的实验技术及国外的实验技术，引入了近期国内外该领域的研究新技术，如基因编辑 CRISPR/Cas9 等，使本书既结合国内科研实际状况，又具有较高的专业水平，能与国际接轨。但是，由于植物基因工程实验具有基因型、生理性及环境性等高度专一的生命特性，而且书中列举的实验有一定的典型性、模式性和原理性，或是引用了研究者专一性科研中的实验操作，故读者在使用时要熟知实验原理、实验材料特性及操作条件，根据实际情况灵活应用。实验者可以根据实验目的、实验材料特性等实际情况，调整操作程序，设计新的实验方案。这也是本书的宗旨，为实验者的开拓创新，抛砖引玉。

本书编写过程中承蒙贾士荣和林忠平两位资深教授及我国多位知名植物基因工程科学家的鼓励和支持，引用了国内外许多科学家的著作、文献及科研成果，特别得到科学出版社领导及责任编辑席慧的鼎力相助和指导。在此一并表示衷心感谢。为减少书的篇幅，避免每章间文献的重复，又便于读者拓展次级文献查阅及体现本书的新颖性，在每篇后列出了部分近期的参考文献，请被引用文献而未列出的国内外作者见谅。

作者深知编写这本实验性的新作任务艰巨、责任重大，故邀请了国内十几个知名单位教学科研一线的中青年博士、副教授以上学者共同编写。他们各负其责，科学严谨，倍加努力，但囿于作者科研教学工作繁忙，时间紧迫，书中难免存在疏漏和不足之处，竭诚希望广大读者不吝赐教，予以斧正，不胜感激。

王关林

2016 年 2 月于大连



目 录

前言

第一篇 核酸分离提取技术

第 1 章 微生物 DNA 提取技术	2
实验 1-1 大肠杆菌质粒 DNA 提取	2
1-1-1 质粒 DNA 小量常规提取法	2
1-1-2 质粒 DNA 小量试剂盒提取法	3
1-1-3 质粒 DNA 大量提取法	5
实验 1-2 农杆菌 Ti 质粒 DNA 提取	7
实验 1-3 农杆菌双元载体中 mini-Ti 质粒提取	7
实验 1-4 M13 噬菌体 DNA 提取	9
1-4-1 M13 噬菌体单链 DNA 提取	9
1-4-2 M13 噬菌体 RF DNA 提取	9
第 2 章 植物 DNA 提取	10
实验 2-1 植物细胞总 DNA 提取	10
2-1-1 可用于 PCR 的 DNA 微量制备	10
2-1-2 SDS 法	10
2-1-3 CTAB 法	11
2-1-4 高盐法提取多糖类植物总 DNA	11
2-1-5 食用油中提取 DNA 的方法	12
实验 2-2 植物核 DNA 提取	13
2-2-1 核 DNA 的大量提取法	13
2-2-2 核 DNA 微量提取法	14
2-2-3 核 DNA 柱式抽提试剂盒法	15
2-2-4 核 DNA 磁珠法抽提试剂盒法	15
实验 2-3 植物叶绿体 DNA 提取	17
2-3-1 密度梯度离心 DNase 处理法	17
2-3-2 高盐低 pH 方法提取叶绿体 DNA	18
2-3-3 多糖类植物叶绿体 DNA 分离提取	19
实验 2-4 植物线粒体 DNA 提取纯化	20
第 3 章 植物 RNA 提取技术	22
实验 3-1 植物总 RNA 提取	22
3-1-1 异硫氰酸胍法	22
3-1-2 苯酚法	22
3-1-3 LiCl 沉淀法	23
3-1-4 一步提取法	23
3-1-5 植物总 RNA 提取纯化试剂盒法	23

3-1-6 Fruit-mate™ for RNA purification 法	24
3-1-7 RNAiso for polysaccharide-rich plant tissue 法	25
3-1-8 TRIzol 法	26
实验 3-2 总 RNA 中 mRNA 的分离提取	27
3-2-1 层析法	27
3-2-2 poly (A) mRNA 提取纯化试剂盒法	27
3-2-3 Magosphere™ UltraPure mRNA purification Kit 法	28
实验 3-3 植物 microRNA 的提取分离	29
3-3-1 microRNA 提取试剂盒法	29
3-3-2 miRcute miRNA 提取分离试剂盒法	30
第 4 章 核酸提取物纯度、浓度及定量检测	32
实验 4-1 细菌 DNA 提取物纯度及浓度检测	32
4-1-1 分光光度 (紫外吸收) 法	32
4-1-2 琼脂糖凝胶电泳法	32
实验 4-2 植物 DNA 提取物纯度及浓度检测	33
4-2-1 分光光度 (紫外吸收) 法	33
4-2-2 琼脂糖凝胶电泳法	33
4-2-3 荧光光谱法	33
实验 4-3 植物 RNA 提取物纯度及浓度检测	34
4-3-1 分光光度 (紫外吸收) 法	34
4-3-2 琼脂糖凝胶电泳法	34
第一篇主要参考文献	36

第二篇 基因分离克隆技术

第 5 章 目的基因的 PCR 扩增技术	38
实验 5-1 cDNA 合成	38
5-1-1 AMV 法	38
5-1-2 M-MLV 法	38
5-1-3 第一链 cDNA 合成试剂盒法	39
实验 5-2 基因保守序列的 PCR 扩增	40

5-2-1 一般的 PCR 方法	40	6-2-5 cDNA 合成	65
5-2-2 PCR 酶试剂盒法	40	6-2-6 纯化 cDNA (Affymetrix GeneChip	
5-2-3 PCR 反应要素	41	Sample Cleanup Module)	66
5-2-4 PCR 反应条件: 温度、时间和循环次数		6-2-7 cRNA 合成和纯化 (GeneChip IVT	
.....	42	Labeling Kit)	66
5-2-5 常用 PCR 反应试剂盒	43	6-2-8 纯化 cRNA 的定量检测	67
实验 5-3 反转录 PCR (RT-PCR) 扩增技术		6-2-9 片段化 cRNA	67
.....	44	实验 6-3 芯片杂交	67
5-3-1 植物总 RNA 提取	44	实验 6-4 芯片图像处理	68
5-3-2 反转录 PCR (RT-PCR) 扩增	44	实验 6-5 芯片数据预处理	69
5-3-3 一步法反转录 PCR (RT-PCR) 试剂		实验 6-6 芯片差异表达基因分析	69
盒法	45	实验 6-7 全基因克隆	69
实验 5-4 PCR 扩增产物的克隆	46	第 7 章 插入突变分离克隆目的基因	71
5-4-1 平末端连接	46	实验 7-1 T-DNA 标签法	71
5-4-2 TA 克隆	52	7-1-1 T-DNA 载体的构建	71
实验 5-5 反向 PCR (Reverse-PCR)	55	7-1-2 对转化后代进行表型分析	71
实验 5-6 实时荧光定量 PCR	55	7-1-3 对突变体进行遗传分析	71
5-6-1 样品 RNA 的抽提	55	7-1-4 PCR 法分离 T-DNA 插入位点的侧翼	
5-6-2 RNA 质量检测	56	序列	71
5-6-3 样品 cDNA 合成	56	7-1-5 证实 T-DNA 的插入导致表型的变异 ...	71
5-6-4 梯度稀释的标准品及待测样品的管家		实验 7-2 转座子标签法	71
基因 (β -actin) 实时定量 PCR	56	7-2-1 农杆菌介导法把转座子导入目标生物体	
5-6-5 制备用于绘制梯度稀释标准曲线的 DNA			72
模板	57	7-2-2 转座子的初步定位	72
5-6-6 待测样品的待测基因实时定量 PCR ...	57	7-2-3 转座子插入突变的鉴定及分离	72
5-6-7 实时定量 PCR 引物	57	7-2-4 转座子在目标生物体内的活动性能检测	
5-6-8 电泳	57		72
5-6-9 实时荧光定量 PCR 试剂盒法	57	7-2-5 分离克隆目的基因	72
实验 5-7 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE)		实验 7-3 sAc/Ds 双系统法	72
.....	59	7-3-1 sAc 的转化植株和 Ds 的转化植株的获得	
5-7-1 总 RNA 的提取	59		72
5-7-2 反转录 PCR	59	7-3-2 转化株杂交, 挑选杂合 sAc 和 Ds 的子	
5-7-3 RACE 方法扩增 3'端	59	一代植株	73
5-7-4 RACE 方法扩增 5'端	60	7-3-3 Ds 在 sAc 产生的转位酶帮助下转座,	
第 6 章 基因芯片技术分离目的基因	63	产生表型突变株	73
实验 6-1 制备芯片	63	7-3-4 建立对应于变异株的基因文库或 cDNA	
6-1-1 基片的制备	63	文库	73
6-1-2 点样探针的制备	64	7-3-5 筛选对应的基因克隆并了解该基因的	
6-1-3 基因芯片点样	64	特征	73
实验 6-2 样品制备	65	7-3-6 回复突变株的获得	73
6-2-1 植物 RNA 提取	65	第 8 章 图位克隆目的基因	74
6-2-2 检测提取的 RNA	65	实验 8-1 构建遗传作图群体	74
6-2-3 纯化总 RNA (Qiagen 的 RNeasy Mini Kit 或		实验 8-2 筛选连锁分子标记	74
Micro Kit)	65	实验 8-3 突变基因的染色体初步定位	75
6-2-4 纯化总 RNA 的定量检测	65	实验 8-4 基因精细定位	75

实验 8-5 构建基因组文库	76	第 11 章 功能蛋白组技术分离目的基因	102
实验 8-6 利用分子标记筛选基因组文库 ...	76	实验 11-1 用于双向电泳分析的植物总蛋白	
实验 8-7 PCR 扩增测序寻找突变位点	76	提取及浓度测定	102
实验 8-8 基因组高通量测序寻找突变位点 ...	76	11-1-1 酚法提取植物总蛋白	102
实验 8-9 验证克隆基因的正确性	77	11-1-2 三氯乙酸沉淀法提取植物总蛋白 ...	103
第 9 章 基因文库技术分离目的基因	78	11-1-3 植物总蛋白提取试剂盒法	103
实验 9-1 cDNA 文库构建	78	11-1-4 Bradford 法测定蛋白质浓度	105
实验 9-2 BAC 文库构建	80	11-1-5 蛋白质浓度测定试剂盒法	105
实验 9-3 YAC 文库构建	85	实验 11-2 双向电泳分离目的蛋白	109
实验 9-4 TAC 文库构建	89	11-2-1 IPG 胶条的水合和等电聚焦	109
第 10 章 差异表达基因的分离技术	92	11-2-2 IPG 胶条的平衡	111
实验 10-1 差别杂交与扣除杂交	92	11-2-3 SDS-PAGE 电泳	111
10-1-1 原代目的基因培养	92	实验 11-3 双向电泳凝胶染色	111
10-1-2 总 RNA 提取	92	11-3-1 考马斯亮蓝染色法	111
10-1-3 层析法分离提纯目的基因	92	11-3-2 SYPRO Ruby 染色法	112
10-1-4 制取 cDNA 探针	92	11-3-3 硝酸银 (AgNO ₃) 染色法	112
10-1-5 cDNA 扣除文库的构建	92	11-3-4 考马斯亮蓝蛋白质染色试剂盒法 ...	113
10-1-6 cDNA 扣除文库的扩增及初步鉴定 ...	94	实验 11-4 用于质谱分析的多肽样品制备 ...	113
实验 10-2 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR)		第 12 章 酵母双杂交系统分离克隆目的基因	
.....	94		116
10-2-1 总 RNA 提取	94	实验 12-1 双杂交文库构建及筛选	116
10-2-2 RNA 样品中微量 DNA 的去除	94	实验 12-2 酵母双杂交文库筛选目的基因	117
10-2-3 建立反转录归类反应体系	95	12-2-1 通过酵母配对来筛选目的基因	117
10-2-4 PCR 选择扩增	95	12-2-2 通过共转化的方法筛选目的基因 ...	119
10-2-5 差别条带的回收	95	实验 12-3 分析阳性相互作用	120
10-2-6 回收条带的 PCR 扩增	95	12-3-1 营养缺陷型/报告基因表达/3AT 方法	
10-2-7 扩增产物的纯化	96	重测表型	120
实验 10-3 代表性差异 (RAD) 和抑制性		12-3-2 酵母双杂交相互作用基因的最终获得	
扣除杂交 (SSH)	96		121
10-3-1 总 RNA 提取	96	第二篇主要参考文献	123
10-3-2 磁性球珠分离 mRNA	96		
10-3-3 抑制消减杂交文库的构建	96		
10-3-4 载体的连接及转化	98		
10-3-5 插入片段长度的蓝白斑筛选与鉴定 ...	98		
10-3-6 菌体的培养与保存	99		
10-3-7 序列分析和序列提交	99		
实验 10-4 交互扣除 RNA 差别显示技术			
(RSDD)	99		
10-4-1 扣除杂交	99		
10-4-2 差异显示	99		
10-4-3 表达分析	100		
实验 10-5 随机引物 PCR 的 RNA 指纹法 ...	100		
10-5-1 RNA 的提取和制备	100		
10-5-2 总 RNA 的 DNase 处理	100		
10-5-3 反转录及 PCR 扩增	100		
10-5-4 差异片段回收及克隆测序	101		

第三篇 DNA 重组及载体构建技术

第 13 章 目的基因克隆载体构建	126
实验 13-1 目的基因 PCR 扩增	126
实验 13-2 目的基因插入 T 载体	126
实验 13-3 目的基因与克隆载体的限制性	
酶切及回收	127
13-3-1 平末端的限制性内切核酸酶单酶切 ...	127
13-3-2 黏性末端的限制性内切核酸酶单酶切	
.....	128
13-3-3 限制性内切核酸酶双酶切	128
13-3-4 试剂盒法回收酶切产物	129
13-3-5 采用乙醇沉淀法进行酶切产物的回收	
.....	130

第四篇 目的基因遗传转化技术

第 19 章 发根农杆菌 Ri 及病毒质粒介导

转化目的基因 180

实验 19-1 发根农杆菌整体植株接种及离体器官共培养诱发毛状根 180

实验 19-2 毛状根的离体培养及植株再生 ... 180

实验 19-3 发根农杆菌介导的目的基因转化 181

实验 19-4 病毒介导外源基因转化 182

19-4-1 病毒接种法 182

19-4-2 农感染型质粒介导法 (agroinfection) 182

第 20 章 直接导入法转化目的基因 183

实验 20-1 基因枪转化外源基因 183

实验 20-2 PEG 介导基因转化 184

实验 20-3 电激诱导基因转化 185

实验 20-4 显微注射导入外源基因 186

实验 20-5 激光转化外源基因 186

实验 20-6 超声波转化外源基因 187

20-6-1 烟草叶片超声波转化 187

20-6-2 玉米幼胚愈伤组织超声波转化 188

实验 20-7 脂质体转化外源基因 188

20-7-1 自制转化脂法 189

20-7-2 使用商品转化脂方法 189

第 21 章 种质系统介导转化目的基因 191

实验 21-1 花粉粒媒体介导外源基因转化 ... 191

21-1-1 花粉粒与 DNA 混合授粉法 191

21-1-2 花粉培养法 191

21-1-3 柱头切除法 191

21-1-4 花粉粒转化法 191

实验 21-2 子房注射导入外源基因 192

实验 21-3 穗鞘腔浸泡导入外源基因 192

实验 21-4 种子浸泡导入外源基因 192

第 22 章 遗传转化新技术 194

实验 22-1 叶绿体基因转化 194

实验 22-2 基因敲除转化 195

22-2-1 RNA 干扰转化 195

22-2-2 siRNA 的设计及转染真核细胞 199

实验 22-3 基因编辑及其遗传转化技术 ... 201

22-3-1 基因组定点编辑技术概述 201

22-3-2 CRISPR/Cas 系统的作用机制 202

22-3-3 CRISPR/Cas 系统的类型及其特性 ... 202

22-3-4 CRISPR/Cas 系统的基本操作程序 ... 203

22-3-5 CRISPR/Cas 系统的功能及其应用 ... 204

22-3-6 CRISPR/Cas 的遗传转化系统及其实验 205

第四篇主要参考文献 217

第五篇 转基因植物的检测鉴定

第 23 章 标记基因及报告基因表达检测 220

实验 23-1 冠瘿碱检测 220

23-1-1 胭脂碱、章鱼碱检测 220

23-1-2 农杆菌、甘露碱检测 221

实验 23-2 NPT-II 活性检测 221

23-2-1 点渍法 222

23-2-2 纸层析法 223

23-2-3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法 223

实验 23-3 GUS 活性检测 224

23-3-1 组织化学染色法 225

23-3-2 荧光测定法 225

23-3-3 比色测定法 228

实验 23-4 Cat 活性检测 228

23-4-1 DTNB 比色法 228

23-4-2 薄层层析法 229

23-4-3 试剂盒法 230

实验 23-5 Pat 活性检测 231

23-5-1 DTNB 比色法 231

23-5-2 薄层层析法 232

实验 23-6 Dhfr 活性检测 232

实验 23-7 萤光素酶活性检测 232

23-7-1 光自显影定性检测 233

23-7-2 光分析定量检测 233

第 24 章 外源基因整合及其特性的检测鉴定

..... 235

实验 24-1 转基因植物的 Southern 杂交检测

..... 235

24-1-1 用作探针的核酸片段的制备 235

24-1-2 ³²P 同位素标记探针的制备、纯化及效率检测 235

24-1-3 生物素标记探针的制备、纯化及效率检测 238

24-1-4 地高辛标记探针的制备、纯化及效率检测 239

24-1-5 植物基因组 DNA 的大量提取及纯化 240

24-1-6 植物基因组 DNA 的限制性酶切及纯化 241

24-1-7 酶切产物的电泳及转移用膜和凝胶的准备 241

24-1-8 转膜及固定 242

24-1-9 探针杂交及信号检测 242

实验 24-2 外源基因整合的 PCR-Southern

杂交检测 243

实验 24-3 外源基因整合的拷贝数检测 ... 243

24-3-1	利用 Southern blot 检测转基因植物 中外源基因的拷贝数	243
24-3-2	利用 real-time PCR 检测转基因植物 中外源基因的拷贝数	244
24-3-3	利用原位杂交检测转基因植物中外源 基因的拷贝数	245
实验 24-4	外源基因整合位点检测	246
24-4-1	反向 PCR 检测外源基因整合位点 ..	246
24-4-2	交错式热不对称 PCR 检测外源基因 整合位点	247
第 25 章	外源基因表达的检测鉴定	249
实验 25-1	外源基因表达的 Northern 杂交 检测	249
25-1-1	植物总 RNA 提取	249
25-1-2	杂交探针制备	249
25-1-3	Northern 杂交	250
实验 25-2	外源基因表达的 RT-PCR 检测 ..	251
实验 25-3	外源基因表达的 mRNA 原位杂交	251
实验 25-4	外源基因表达的 ELISA 检测	253
实验 25-5	外源基因表达的 Western 杂交检测	254
第 26 章	转基因植物检测新技术	256
实验 26-1	生物传感器	256
26-1-1	表面等离子共振生物传感器	256
26-1-2	压电式晶体管生物传感器	258
26-1-3	电化学发光 PCR 方法	260
实验 26-2	侧向流动型免疫检测	261
实验 26-3	转基因植物表达产物色谱检测 ..	263
实验 26-4	转基因植物毛细管电泳检测 ..	263
第五篇	主要参考文献	265

第六篇 转基因植物的生物学特性 及表现遗传学检测

第 27 章	转基因植物的遗传特性检测	268
实验 27-1	转基因植物的 (非) 孟德尔遗 传规律检测	268
实验 27-2	转基因植物的纯 (嵌) 合性检测	268
实验 27-3	转基因植物的遗传稳定性检测	269
第 28 章	转基因植物目的性状检测及其生理 生化指标分析	271
实验 28-1	转基因植物目的性状及其变异 检测	271
28-1-1	转基因植物目的性状检测	271

28-1-2	转基因植物变异性状检测	272
实验 28-2	抗逆转基因植物目的性状的生理 指标分析	273
28-2-1	叶片相对含水量 (RWC) 测定	273
28-2-2	叶片相对电导率测定	274
28-2-3	叶绿素含量测定	274
28-2-4	净光合速率 (Pn)、蒸腾速率 (Tr) 及 水分利用效率测定 (WUE)	274
实验 28-3	抗逆转基因植物生化指标检测与 分析	275
28-3-1	可溶性蛋白含量测定	275
28-3-2	游离脯氨酸含量测定	276
28-3-3	脱落酸 (ABA) 含量测定	276
28-3-4	丙二醛 (MDA) 含量测定	277
28-3-5	植物逆境保护酶 (SOD、CAT、POD) 活性测定	278
实验 28-4	抗逆转基因植物目标性状鉴定与 评价	280
28-4-1	转基因植物的抗旱性鉴定	280
28-4-2	转基因植物的耐盐性鉴定	281
28-4-3	转基因植物耐寒性鉴定	282
28-4-4	转基因植物耐热性鉴定	284
第 29 章	转基因植物的遗传多样性检测	285
实验 29-1	转基因植物的 RFLP 检测	285
实验 29-2	转基因植物的 RAPD 检测	286
实验 29-3	转基因植物的 SSR 检测	287
第 30 章	转基因植物的表现遗传学检测	289
实验 30-1	转基因植物染色质的免疫沉淀 实验	289
实验 30-2	转基因植物的甲基化敏感扩增 多态性 (MSAP)	290
实验 30-3	转基因植物 DNA 甲基化改变 的变性梯度胶电泳检测	291
第六篇	主要参考文献	293

第七篇 生物信息学技术在植物 基因工程中的应用

第 31 章	基因分离克隆中的生物信息学技术	296
实验 31-1	基因 PCR 引物设计及评价	296
实验 31-2	基因电子克隆中的 BLAST 比对 搜索	299
实验 31-3	基因电子延伸中的序列拼接组装	303
31-3-1	使用 CAP3 进行序列拼接组装	303

31-3-2 使用 DNAMAN 进行序列拼接组装 303

第 32 章 基因结构和功能分析中的生物信息学技术 307

实验 32-1 基因多序列比对分析 307

实验 32-2 基因的分子进化分析 307

实验 32-3 基因的完整性分析 310

实验 32-4 基因中 motif 的识别与分析 ... 313

第 33 章 基因表达分析中的生物信息学技术 316

实验 33-1 基因表达仓库 (GEO) 中数据的获得 316

实验 33-2 差异表达基因的筛选 316

实验 33-3 差异表达基因的聚类分析 321

第 34 章 蛋白质结构功能分析中的生物信息学技术 324

实验 34-1 蛋白质结构与功能数据库检索 324

实验 34-2 蛋白质二级结构预测 325

实验 34-3 蛋白质三级结构预测 327

第七篇主要参考文献 330

第八篇 转基因植物的安全性评价检测

第 35 章 转基因植物的环境安全性评价 332

实验 35-1 转基因植物的生存竞争性实验 332

实验 35-2 转基因植物的杂草性实验 332

实验 35-3 转基因植物对靶标生物的影响 333

实验 35-4 转基因植物基因飘流检测 334

第 36 章 转基因植物对土壤微生物群落的影响 335

实验 36-1 转基因植物对根圈细菌种群生态的影响 335

36-1-1 稀释平板计数法 335

36-1-2 Biolog ECO 平板法 335

实验 36-2 转基因植物对土壤微生物群落多样性的影响 336

实验 36-3 转基因植物外源基因在土壤微生物中漂移检测 337

第 37 章 转基因植物的营养学及过敏性检测 338

实验 37-1 转基因植物的营养学检测 338

37-1-1 转基因大豆油成分分析检测 338

37-1-2 转基因玉米胰蛋白酶抑制剂抗营养因子的安全性分析 339

实验 37-2 转基因植物表达蛋白的模拟胃肠道消化检测 340

实验 37-3 转基因植物中外源蛋白的过敏性分析 343

第 38 章 转基因植物的毒理学检测 345

实验 38-1 转基因植物的急性毒性试验 ... 345

实验 38-2 转基因植物的慢性毒性试验 ... 345

实验 38-3 转基因植物的细胞毒性试验 ... 347

第八篇主要参考文献 348

中英文名词缩写对照 349

附 录

附录 1 主要溶液及缓冲液的配制 352

1-1 质粒提取试剂 352

1-2 DNA 提取溶液 352

1-3 电泳溶液 352

1-4 酵母转化试剂 352

1-5 分子杂交试剂 352

1-6 蛋白质电泳试剂 353

1-7 磷酸盐缓冲液 353

1-8 Tris-HCl 缓冲液 354

附录 2 常用培养基的配制 354

2-1 大肠杆菌 LB 培养基 354

2-2 蓝白斑筛选培养基 354

2-3 酵母 YPD 培养基 354

2-4 酵母 SC-U 基本培养基 354

2-5 酵母 SC-U 诱导培养基 354

2-6 农杆菌培养基 354

附录 3 常用抗生素的配制及使用浓度 355

3-1 卡那霉素 355

3-2 氨苄西林 355

3-3 潮霉素 355

3-4 头孢菌素类 355

附录 4 常用相对分子质量标准 355

附录 5 常用的测量单位及摩尔数与重量间的换算 356

5-1 常用的测量单位 356

5-2 摩尔数与重量间的换算 356

附录 6 DNA 片段分子质量及其量与质量的换算 356

附录 7 凝胶浓度的有效分离范围 357

7-1 不同浓度琼脂糖凝胶的分离范围 357

7-2 不同浓度 SDS-PAGE 胶的分离范围 ... 357

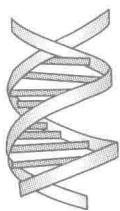
附录 8 转基因植物主要目的基因、表达蛋白和目的性状 357

8-1	目的性状为抗病菌类基因	357	8-12	目的性状为筛选类基因	358
8-2	目的性状为抗虫类基因	357	附录 9	植物基因组大小及拷贝数计算方法	358
8-3	目的性状为抗除草剂类基因	357	9-1	基因 DNA 定量测定	358
8-4	目的性状为品质改良类基因	357	9-2	常见植物的基因组大小和质量	358
8-5	目的性状为抗旱类基因	358	附录 10	我国转基因生物安全管理法规	360
8-6	目的性状为抗盐碱类基因	358	10-1	我国转基因生物安全管理机构	360
8-7	目的性状为抗低温类基因	358	10-2	我国转基因生物安全管理法规	360
8-8	目的性状为养分高效利用类基因	358	附录 11	植物基因工程实验守则	360
8-9	目的性状为次生代谢类基因	358	附录 12	植物基因工程实验报告的基本内容和 要求	361
8-10	目的性状为生物反应器类基因	358			
8-11	目的性状为雄性不育类基因	358			

核酸分离提取技术

核酸是生命的遗传物质，包括 DNA 和 RNA。DNA 是遗传信息的载体，也是最重要的生物信息分子。RNA 也是一种遗传物质，其主要是 DNA 转录的表达信息分子。因此，核酸的分离提取被视为基因工程实验技术中最重要、最基本的操作。在植物基因工程研究中，获得高质量的 DNA 和 RNA 是进行目的基因分离克隆、基因转化及转基因植物检测等后续工作的前提和保证，故其重要性毋庸置疑。

高质量 DNA 提取物需要满足如下要求：DNA 结构完整；无蛋白质、多糖及 RNA 等其他大分子污染；提取的 DNA 中不含对酶有抑制作用的有机溶剂及高浓度的金属离子。经过几十年的研究，DNA 的提取已有众多方法。不同方法适用于不同的实验材料和实验目的。本篇分别阐述微生物和植物中 DNA 和 RNA 提取技术及其注意事项。



第 1 章

微生物 DNA 提取技术

实验 1-1 大肠杆菌质粒 DNA 提取

【实验目的】

植物基因工程分离克隆的目的 DNA 都要与大肠杆菌中的质粒 DNA 重组, 构建克隆载体、中间载体及表达载体等, 并保存在大肠杆菌中。为此, 大肠杆菌质粒 DNA 提取技术是分子生物学和植物基因工程的基础技术。从大肠杆菌中提取的质粒 DNA 可用于载体构建、基因分离、目的片段亚克隆、重组体鉴定等分子操作, 也可供植物基因转化使用, 如花粉管导入、子房注射、基因枪等直接导入法。根据提取量可分为小量提取法和大量提取法, 但是这两种方法的基本实验材料和实验试剂有一定的共同性和差异性。

【实验材料】

含所需质粒 DNA 的大肠杆菌。

1-1-1 质粒 DNA 小量常规提取法

【实验试剂】

(1) STE: 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)。高压蒸汽灭菌后于 4℃ 储存。

(2) 溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0), 高压蒸汽灭菌 15min, 于 4℃ 储存。

(3) 溶液 II: 0.2mol/L NaOH, 1% SDS (新鲜配制)。

(4) 溶液 III: 5mol/L KAc 60ml, 冰醋酸 11.5ml, dH₂O 28.5ml (pH4.8)。也可以按 KAc 29.4g, 冰醋酸 11.5ml, 加蒸馏水至 100ml 配制。

注: 实验中的常规试剂, 如 Tris-HCl (pH8.0), 平衡酚、酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿/异戊醇 (24:1)、水饱和乙醚、无水乙醇、70%乙醇、异丙醇、3mol/L 乙酸钠、10mol/L 乙醇胺、RNase、TE、TAE、TBE 等及常用培养基如 LB、YEB 等配方见附录, 不在此赘述。

【实验操作】

(1) 从 LB 平板上挑取单菌落, 接种于 5ml 附

加相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃ 条件下 250r/min 振荡培养过夜 (至对数生长后期)。

(2) 取 1.2~1.5ml 菌液移至 1.5ml 无菌 Eppendorf 管中, 12 000r/min 离心 30s, 弃去上清液, 必要时可再离心 30s, 弃去上清液。

(3) 加入 1ml STE 溶液, 涡旋振荡重悬菌体。12 000r/min 离心 30s, 弃去上清液, 用无菌吸水纸条吸去管壁上的液滴。

(4) 重复 (3) 操作 1 次。

(5) 向离心管内加入 100μl 冰冷的溶液 I, 涡旋振荡悬浮菌体。

(6) 加入 200μl 新配制的溶液 II, 迅速盖严离心管盖, 快速颠倒 (千万不要振荡) 离心管 5 次, 室温放置 5min。

(7) 向离心管中加入 150μl 溶液 III, 颠倒离心管 10 次, 置冰水浴中 5~10min, 12 000r/min 离心 10min。

(8) 将上清液转入 1.5ml 无菌 Eppendorf 管中, 加入 1/10 体积 RNase, 37℃ 保温 1h 至过夜。

(9) 分别用 1 倍体积的 Tris 平衡酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次, 每次抽提后均于 12 000r/min 离心 5min, 仔细吸取上层水相。

(10) 将氯仿抽提后的上层水相转入无菌 Eppendorf 管, 加入 1 倍体积的水饱和乙醚, 颠倒混匀, 12 000r/min 离心 5min。取下层水相, 转入无菌 Eppendorf 管中, 打开离心管盖, 置 68℃ 水浴 5min, 以除去残留的乙醚。

(11) 冷却至室温, 加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 放置 30min (或加入 2/3 体积异丙醇, 混匀, 立即离心)。

(12) 4℃ 下 12 000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用无菌吸水纸条吸去管壁上的液滴。

(13) 用 500μl 70% 乙醇洗沉淀 1~3 次, 空气中干燥。

(14) 加入适量 (10~20μl) TE 溶解质粒 DNA。电泳检测纯度, 紫外吸收法测定含量 (详见第 4 章)。

【实验解析】

(1) 本法可获高拷贝数质粒 DNA 1μg。所提

质粒 DNA 无需纯化可直接用于限制性酶切、载体构建、目的片段亚克隆、Southern 印迹等。

(2) 对所提质粒 DNA 的质量要求不是十分严格时, 粗提中的步骤 (3)、(4) 可省去。

(3) “实验操作”的步骤 (8) 后可直接进行限制酶消化, 所提质粒可以切开。

(4) 抽提中的“实验操作”的步骤 (10) 可以省去。

(5) 为节约提取的操作时间, 可在最后所提的质粒 DNA 样品溶液中加入 1/20 体积的 10mg/ml 的 RNase, 混匀后于 -4°C 保存, 在保存过程中样品中的 RNA 被逐渐降解。也可以在步骤 (5) 后加入 RNase, 然后进行菌体裂解。

(6) 从 10ml 菌液中提取时使用量如下: 200 μl 溶液 I、400 μl 溶液 II、300 μl 溶液 III。

(7) 提取大于 15kb 的大质粒请使用去污剂法。

1-1-2 质粒 DNA 小量试剂盒提取法

1-1-2-1 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒法

【实验试剂】

SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 [生物工程 (上海) 股份有限公司], 产品编号 B518191; buffer P1, buffer P2, buffer P3, buffer DW1, wash solution, elution buffer, RNase A, VisualLyse。

【实验操作】

(1) 目标菌株培养。在含合适抗生素的培养基中接种目标菌株, 于 37°C 摇床充分振荡培养 12~16h。

(2) 菌体收集。

①对于高拷贝质粒, 取 1.5~5ml 菌液, 于室温, 8000g 离心 2min 收集菌体, 倒尽或吸干培养基。对于高拷贝质粒, 从 5ml 过夜菌液中通常可以获得超过 20 μg 质粒 DNA, 不推荐使用更大的菌液量。

②对于低拷贝质粒, 如果使用更多的菌液, 则同一个样品分多管收集, 每管不超过 5ml, 分别裂解, 合并同一个样品的各管裂解液通过同一个吸附柱来获得更高的得率。

(3) 菌体重悬。

①在菌体沉淀中加入 250 μl buffer P1 (buffer P1 首次使用时请按说明书加入 RNase A), 吸打或振荡至彻底悬浮菌体。

②如果使用 VisualLyse, 则在加入 250 μl buffer P1 后再加入 1 μl VisualLyse, 振荡混匀。

VisualLyse 需在临用前加入, 直接加入 buffer P1 中出现浑浊为正常现象。

(4) 菌体裂解。

①加入 250 μl buffer P2, 立即温和颠倒离心管 5~10 次混匀, 室温静置 2~4min。裂解时间与菌量相关, 菌量多则适当延长时间, 最长不能超过 5min。

②如果使用了 VisualLyse, 则溶液呈现均匀的蓝色表示混匀良好, 如果出现白色团块, 则提示菌体可能过量, 宜选用更少的菌液重新开始。

(5) 中和。

①加入 350 μl buffer P3, 立即温和颠倒离心管 5~10 次充分混匀。

②加入 buffer P3 后, 离心管中会立即出现大量白色絮状沉淀, 如果使用了 VisualLyse, 则溶液由蓝色重新变为无色, 有蓝色残留提示混匀不彻底, 继续混合至蓝色全部消失。

③如果起始菌液较多, 混匀后室温静置 2min 以彻底去除 RNA。

(6) 于离心机最大转速 ($\geq 12\,000g$) 离心 5~10min, 将上清全部小心移入吸附柱, 9000g 离心 30s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

(7) 在吸附柱中加入 500 μl 去蛋白液 buffer DW1, 9000g 离心 30s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

(8) 向吸附柱中加入 500 μl wash solution (首次使用前请按说明书加 4 倍体积的无水乙醇), 9000g 离心 30s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

(9) 重复步骤 (8) 一次。

(10) 将空吸附柱和收集管放入离心机, 9000g 离心 1min。

(11) 在吸附膜中央加入 50~100 μl elution buffer, 室温静置 1~2min, 9000g 离心 1min。将所得到的质粒 DNA 溶液置于 -20°C 保存或用于后续实验。

【实验解析】

1) 未提质粒或质粒得率较低

(1) 大肠杆菌老化。请涂布平板培养后, 重新挑选单菌落进行液体培养。

(2) 菌体中无质粒。有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在, 经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如, 柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定, 因此不要频繁转接, 每次接种时应接种单菌落。另外, 检查筛选用抗生素的使用浓度是否正确。