



全国高技术重点图书·生物技术领域

植物分子生物学 及 生物技术的实用方法

[加拿大] B·R·格利克 主编
J·E·汤普森

METHODS
in
PLANT MOLECULAR
BIOLOGY
and
BIOTECHNOLOGY

重庆出版社 ▲

植物分子生物学及 生物技术的实用方法

[加拿大] B·R·格利克 J·E·汤普森 主编

李汝刚 张春义 等译 范云六 校

重 庆 出 版 社

1999 年·重庆

Authorized translation of the original English language edition
METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
by

Bernard R. Glick and John E. Thompson

本书根据美国 CRC 出版社 1993 年版译出

Copyright © 1993 by CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U. S. A.
Chinese language edition copyright © 1999 by Chongqing Publishing House
中文版专有出版权© 1999 重庆出版社

责任编辑 叶麟伟

封面设计 吴庆渝

技术设计 聂丹英

[加拿大] B·R·格利克 J·E·汤普森 主编

植物分子生物学及生物技术的实用方法

李汝刚 张春义 等译 范云六 校

重庆出版社出版、发行(重庆长江二路 205 号)

新华书店经销 重庆新华印刷厂印刷

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 20.75 插页: 5 字数: 450 千

1999 年 1 月第 1 版

1999 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 1 ~ 3 000

*

ISBN 7-5366-3863-9/Q·14

科技新书目 492—281

定价: 33.00 元

《全国高技术重点图书》
出版指导委员会

主 任：朱丽兰

副主任：刘 杲

卢鸣谷

总干事：罗见龙 梁祥丰

委 员：（以姓氏笔画为序）

王大中	王为珍	王守武	牛田佳	卢鸣谷	叶培大
刘 仁	刘 杲	朱丽兰	孙宝寅	师昌绪	任新民
杨牧之	杨嘉墀	陈芳允	陈能宽	张兆祺	张钰珍
张效祥	罗见龙	周炳琨	欧阳莲	赵忠贤	顾孝诚
谈德颜	龚 刚	梁祥丰			

《全国高技术重点图书·生物技术领域》
编审委员会

主任委员：顾孝诚

委 员：（以姓氏笔画为序）

陈受宜 邹承鲁 罗见龙 范云六 侯云德 曾建飞

中译本序

目前,植物分子生物学及生物技术的发展正呈现着令人鼓舞的势头,与之相应的技术手段也正在得以不断的更新和发展。鉴于目前国内还没有一本比较全面系统地介绍有关植物分子生物学和生物技术的技术性参考书籍,我们组织数位青年博士翻译了这本名为《植物分子生物学及生物技术的实用方法》的指导性实验工具书。原书每章的作者在各自的研究领域内都有着丰富的实践经验。该书特点鲜明:(1)以植物为研究对象,基础性和实用性强;(2)较全面系统地介绍了植物分子生物学研究技术的方方面面,并且还有对计算机技术应用的阐述。基于此,我乐于推荐此书,相信它的出版会对我国植物分子生物学和生物技术的发展起到推动作用。

范云六
分子生物学教授
中国工程院院士

译者的话

历时 1 年有余,这本《植物分子生物学及生物技术的实用方法》终于全部译完。为使读者更加清楚地理解本书的内容,我们愿意在此把翻译本书的目的、指导思想以及对译著的某些体会介绍给读者。

对于分子生物学和基因工程领域的研究者尤其是刚踏入这一领域的研究者来说,一本简单实用的指导性实验工具书无疑会使人受益匪浅,可以尽快地了解 and 掌握研究所需的各项实验技术和相关的基本原理;而对于已经从事这一领域工作的人来说,充分地吸收他人富有成效的技术方法会使工作如虎添翼,大大提高效率。目前,在国内使用最普遍的实验工具书是美国冷泉港实验室 Sambrook 等人编写的《分子克隆》(《Molecular Cloning》)中译本(金冬雁、黎孟枫等译,科学出版社 1995 年版),该书所涉及的研究对象主要以动物和微生物为主。尽管在分子生物学领域对于不同的研究对象来说,许多研究方法和研究手段都是共同的,但毕竟不同研究对象在方法学上还是有许多不同之处。为此,一本有效、实用、全面的系统阐述植物分子生物学研究方法的指导性工具书早已为广大植物分子生物学工作者所热切盼望。有鉴于此,我们组织翻译了这本《植物分子生物学及生物技术的实用方法》。

本书原名是《Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology》,由加拿大沃特卢大学生物系教授 B·R·格利克博士和 J·E·汤普森博士主编,作者包括美国、加拿大、墨西哥、英国、以色列等国的 40 余名专家。原著共分为 21 章。每章都由对该领域熟悉并具有丰富经验的专家撰写,因而所介绍的实验方法具有很好的适用性,研究者可根据自己实验室的具体情况加以调整。本书在内容上充分反映了当代植物分子生物学和植物基因工程的最新进展,包括计算机科学在植物分子生物学研究中的具体应用(见第十五章和第十六章),体现了现代科学的发展特点。本书在风格上既注意提供各种研究方法的详细的实验步骤和注意事项,注重实用,使读者清楚明白每一个技术环节,又着重介绍每种技术方法的有关基本原理、背景知识和最新进展,目的是使读者不但知其然,而且知其所以然。同时,文中还提供了大量研究结果的照片(而不是示意图),这样就更能使读者对所阐述的问题有具体的理解和认识。译者以为,作为一部指导性书籍,本书充分体现了图文并茂、活泼生动、准确实用、理论结合实际的特点。

本书内容新颖,有一些名词术语在正式的中文出版物中从未出现过,而相当多的名词术语其中文译名又相当混乱,无可遵循。鉴于国内目前还没有权威性的英汉分子生物学和基因工程词典,我们在翻译时对文中出现的专有名词术语仔细斟酌,尽量准确体现其原意,

同时把其英文附于译文之后,以便读者参考。对厂商和商标我们不做翻译,保留其原来的英文名称。至于实验中用到的一些专门物品,我们则根据自己的理解进行翻译,如“Parafilm”译作“Parafilm 膜”,“Erlenmeyer”译作“三角瓶”,“Pasteur pipette”译作“巴斯德移液管”等。还有一些病原菌的拉丁名,我们遍查词典也没能查到其中文译名,只好在译文中保留。

由于分子生物学领域进展很快,原著对近一两年的研究进展没有写进书中,我们在翻译时则采用注解的方式进行了说明。原著的每一章后都有“感谢”部分,在译文中我们则把这部分删掉了。原著第二十、二十一章内容为固氮细菌,属细菌学范畴,在翻译时我们删去了该部分内容。另外,原著书末的名词附录部分,我们也没有将其译出。

本书的翻译工作由范云六教授领导,翻译小组的成员全部都是直接从事实验工作的年轻同志。翻译工作是在完成繁重的科研任务的同时利用业余时间进行的,每个人都承担了自己所译内容的计算机录入和初步排版工作。重庆出版社的同志为使本书顺利出版做了大量工作。在此我们向参加本书翻译与出版工作并付出艰苦劳动的同志们表示感谢。

本书的翻译工作自始至终得到了范云六教授的亲切指导,翻译完成后她还以其花甲之年对译稿进行了认真的审校并作序。她对科学的这种一丝不苟的严谨态度永远是我们这些年轻的科学工作者的学习典范。

由于本译著完成较匆忙,书中错误、疏漏在所难免,如蒙各位专家同行指正,则不胜感谢!

李汝刚 张春义

1997 年 3 月

于中国农业科学院生物技术研究中心

目 录

中译本序

译者的话

前 言

第一章 利用重组 DNA 技术对植物进行遗传修饰	(1)
第一节 引言	(1)
第二节 植物遗传转化	(1)
一、DNA 转移方法	(1)
二、转化植物的种类	(3)
第三节 转基因植物获得的性状	(3)
一、抗昆虫性	(3)
二、抗病毒性	(4)
三、抗除草剂	(4)
四、抗逆性	(5)
五、种子储存蛋白的改良	(6)
六、果实成熟期的改变	(7)
七、改变花卉及观赏植物	(7)
八、细胞质雄性不育及自交不亲和	(7)
第四节 未来的发展方向	(8)
参考文献	(8)
第二章 以拟南芥菜为例产生和分析植物突变体	(12)
第一节 引言	(12)
第二节 突变体的类型	(12)
第三节 诱变	(14)
一、诱变剂的选择	(15)
二、诱变剂量	(16)
三、样板程序	(17)
四、 M_1 代种子库的利用：独立性和不育或致死突变	(17)
第四节 突变体筛选和选择	(21)

一、生化突变体·····	(21)
二、发育突变体·····	(22)
第五节 二次诱变·····	(23)
一、单一座位上的复等位基因·····	(23)
二、回复突变子和抑制子·····	(24)
第六节 突变体分析·····	(24)
一、多次回交·····	(24)
二、遗传作图·····	(25)
三、剂量分析·····	(25)
四、嵌合性和细胞自主性·····	(25)
五、多基因座位和上位性·····	(26)
第七节 结论·····	(28)
参考文献·····	(28)
第三章 DNA 序列组成及基因拷贝数的测定 ·····	(30)
第一节 引言·····	(30)
第二节 基因组 DNA 序列组成的测定·····	(30)
一、DNA 提取·····	(30)
二、打断 DNA 及其分子量大小的检测·····	(31)
三、DNA 复性·····	(31)
四、数据分析·····	(32)
五、散置序列模式的检测·····	(32)
六、重复 DNA 序列的大小分布·····	(32)
七、基因组中 GC 含量的测定·····	(33)
八、 <i>Cot</i> 曲线的分光光度法测定·····	(33)
九、复性 DNA 样品中双链 DNA 的测定·····	(33)
第三节 基因组中编码序列和非编码序列拷贝数的确定·····	(34)
一、多基因家族的测定·····	(34)
二、基因拷贝数的确定·····	(35)
三、散置重复 DNA 序列拷贝数的确定·····	(35)
参考文献·····	(36)
第四章 植物 DNA 的提取和鉴定 ·····	(38)
第一节 引言·····	(38)
第二节 CTAB 法分离总 DNA·····	(39)
第三节 叶绿体 DNA 的分离·····	(42)
一、程序 I: 高盐提取方案·····	(42)

二、程序Ⅱ：蔗糖梯度方案·····	(43)
三、程序Ⅲ：氯化铯密度梯度方案·····	(43)
第四节 DNA 滤膜杂交分析·····	(44)
一、DNA 转移·····	(45)
二、与固定在滤膜上的核酸杂交·····	(46)
三、除去结合的探针重新进行杂交·····	(47)
参考文献·····	(47)
第五章 植物 mRNA 的分离和鉴定·····	(49)
第一节 引言·····	(49)
第二节 方法·····	(50)
一、核糖核酸酶的失活或去除·····	(50)
二、总 RNA 的分离·····	(51)
三、多聚核糖体的分离·····	(53)
四、从总 RNA 或多聚核糖体 RNA 中 分离带多聚腺苷酸尾的 poly(A) ⁺ RNA·····	(55)
五、Northern Blot 杂交·····	(58)
第三节 讨论·····	(62)
参考文献·····	(64)
第六章 向植物中导入外源基因的方法·····	(66)
第一节 引言·····	(66)
第二节 农杆菌天然基因转移系统·····	(66)
一、菌株和载体·····	(68)
二、选择标记和报告基因·····	(69)
三、农杆菌介导的叶盘转化·····	(70)
(一)一般的步骤、培养基配制和生长条件·····	(70)
(二)外植体来源和消毒·····	(71)
(三)叶盘的制备及农杆菌的感染·····	(74)
(四)卡那霉素抗性芽的切割和生根·····	(74)
(五)转化的鉴定和 T-DNA 拷贝数与结构的分析·····	(75)
第三节 直接基因转移·····	(76)
一、微弹介导的转化·····	(77)
(一)无菌颗粒和 DNA 的准备·····	(77)
(二)轰击植物组织·····	(79)
第四节 转化的植物·····	(79)
参考文献·····	(82)

第七章 植物转化载体	(88)
第一节 引言	(88)
一、关于植物转化的一般考虑.....	(88)
第二节 生物性转化载体	(89)
一、农杆菌介导的转移.....	(89)
二、农杆菌载体系统.....	(90)
(一)共整合载体.....	(91)
(二)二元载体系统.....	(93)
第三节 物理转化载体	(94)
一、细胞转化.....	(94)
二、细胞器转化.....	(95)
第四节 选择标记和报告基因	(97)
一、遗传选择标记.....	(97)
二、生化标记.....	(98)
第五节 影响基因表达的序列	(99)
一、5'调控序列.....	(99)
(一)组成型启动子.....	(99)
(二)诱导型启动子.....	(100)
(三)组织特异性/发育调控的启动子.....	(101)
二、其他 5'调控序列.....	(102)
三、3'调控序列.....	(102)
(一)转录终止序列.....	(102)
四、内含子/外显子的影响.....	(103)
五、影响基因最佳表达的其他因素.....	(103)
六、亚细胞定位序列.....	(103)
第六节 新方法	(104)
一、生物转化.....	(104)
二、改进的直接吸收转化策略.....	(104)
参考文献	(105)
第八章 λ 克隆文库的构建	(118)
第一节 引言	(118)
第二节 λ 载体	(119)
一、 λ 置换型载体和基因组 DNA 的克隆.....	(119)
二、cDNA 克隆及其载体.....	(125)
第三节 利用 λ 载体构建基因组文库	(126)

一、用于克隆的植物基因组 DNA 的纯化	(126)
二、部分消化及分离合适大小的 DNA 片段	(128)
三、 λ 载体臂和筛选基因组片段的连接	(130)
第四节 植物 cDNA 的制备	(132)
一、cDNA 的合成	(132)
二、接头的连接反应及 cDNA 和 λ 载体臂的连接反应	(134)
第五节 重组 λ 分子的体外包装	(135)
第六节 λ 克隆文库的筛选	(136)
第七节 λ 克隆文库的扩增和储存	(140)
参考文献	(141)
第九章 基因在植物细胞中的瞬时表达分析	(144)
第一节 引言	(144)
第二节 原生质体制备	(144)
一、烟草叶片原生质体的分离	(145)
二、原生质体计数和活力测定	(145)
第三节 DNA 转染	(146)
一、PEG 法	(146)
二、电击法	(147)
第四节 报告基因的测定	(149)
一、GUS 测定	(149)
参考文献	(150)
第十章 植物转录启动子、增强子及终止子的分离和鉴定技术	(152)
第一节 引言	(152)
第二节 调控区的分离	(153)
一、用 cDNA 克隆方法分离调控区	(153)
二、从基因组克隆中分离调控区	(154)
三、示踪法分离启动子区	(154)
第三节 启动子和增强子元件的鉴定	(154)
一、缺失分析	(155)
二、寡聚核苷酸介导的突变	(156)
三、结合因子	(157)
第四节 终止子元件的特征	(159)
第五节 报告基因	(159)
第六节 瞬间表达分析	(160)
第七节 稳定转化的分析	(160)

参考文献	(161)
第十一章 应爪蟾卵母细胞检测植物基因表达	(163)
第一节 引言	(163)
第二节 爪蟾卵母细胞显微注射系统的建立	(165)
一、爪蟾卵母细胞的生物	(165)
二、爪蟾的饲养	(166)
三、卵母细胞的分离	(166)
四、显微注射的设备	(168)
第三节 RNA 显微注射	(168)
一、背景	(168)
二、RNA 的制备	(169)
三、RNA 显微注射方法	(169)
四、卵母细胞的放射性标记	(169)
五、可溶性蛋白提取物的制备	(170)
第四节 DNA 显微注射	(170)
一、背景	(170)
二、DNA 显微注射方法	(170)
三、卵母细胞 RNA 的分离	(171)
第五节 爪蟾卵母细胞在植物基因表达研究方面的其他应用	(172)
参考文献	(173)
第十二章 植物组织中特异性 mRNA 的原位定位	(175)
第一节 引言	(175)
第二节 实验中需考虑的事项	(175)
一、组织制备	(176)
二、载玻片的预处理	(176)
三、杂交	(176)
(一) 探针类型	(176)
(二) 标记的选择	(179)
(三) 杂交条件	(179)
(四) 漂洗条件	(180)
四、杂交的检测	(180)
第三节 组织制备的实验方法	(180)
一、所需设备和溶液	(180)
二、植物材料的固定	(181)
三、脱水	(182)
四、渗透	(182)
五、包埋	(182)

六、切片	(183)
七、注意事项	(183)
第四节 用 ^{35}S 标记的 RNA 探针杂交的实验方法	(184)
一、前言	(184)
二、RNA 探针的制备	(184)
(一) 所需设备和溶液	(184)
(二) 线性化	(185)
(三) 硫标记的转录物的制备	(186)
(四) 过柱纯化	(186)
(五) RNA 转录物的水解	(187)
三、用 ^{35}S 标记的 RNA 探针探测组织切片	(188)
(一) 所需设备和溶液	(188)
(二) 载玻片的预处理	(189)
(三) 组织切片的杂交	(190)
四、显微镜载玻片的放射自显影	(192)
(一) 所需设备和溶液	(192)
(二) 包被载玻片	(193)
(三) 乳胶显影	(193)
五、放射自显影的载玻片的染色	(193)
(一) 所需设备和溶液	(193)
(二) 染色	(193)
第五节 用地高辛标记的探针的杂交实验方法	(194)
一、探针的制备	(194)
(一) 所需设备和溶液	(194)
(二) DNA 模板的线性化	(194)
(三) 用 Genius TM RNA-标记试剂盒制备地高辛标记的探针	(194)
二、杂交	(195)
(一) 所需设备和溶液	(195)
(二) 载玻片的制备	(195)
(三) 预杂交	(195)
(四) 杂交	(195)
(五) 漂洗	(195)
三、用 Genius TM 核酸检测试剂盒进行免疫反应	(195)
(一) 所需设备和溶液	(195)
(二) 方法	(196)
第六节 附录	(197)

一、多聚-L-赖氨酸包被的载玻片的制备	(197)
二、DEPC 处理玻璃和塑料器皿	(197)
三、溶液	(197)
(一)一般溶液	(197)
(二)放射性杂交所用的溶液	(198)
(三)非放射性杂交所需溶液	(199)
参考文献	(200)

第十三章 植物中蛋白质表达的免疫学检测方法 (203)

第一节 引言 (203)

第二节 抗体的产生 (204)

一、蛋白质的纯化	(204)
二、免疫	(205)
三、采血、血清制备和储存	(206)
四、抗体纯化	(207)
五、多克隆和单克隆抗体	(207)

第三节 Western 印迹 (208)

一、Western 印迹概述	(208)
二、电转移	(209)
三、封闭暴露的位点	(210)
四、第一抗体结合	(210)
五、用酶联第二抗体进行检测	(210)
六、抗体标记的检测及底物的加入	(211)
七、常规方法的一些改进	(211)
(一)电转膜	(211)
(二)缓冲液	(212)
(三)检测系统	(212)
(四)分子量的确定	(212)
(五)封闭溶液	(213)
(六)半干电转移	(213)

第四节 免疫分析及筛选实验 (214)

一、概述	(214)
二、酶联免疫吸附实验	(214)
(一)竞争性抗原捕获	(215)
(二)双抗体三明治及抗体捕获	(215)
(三)抗体捕获及间接测定	(216)
三、斑点印迹和狭线印迹	(216)

参考文献	(217)
第十四章 植物蛋白的原位免疫细胞化学定位	(220)
第一节 引言	(220)
第二节 植物蛋白的免疫细胞化学标记:原则、一般技术和局限性	(221)
一、植物细胞蛋白免疫细胞化学的原则	(221)
二、组织处理	(222)
(一) 标准的固定方法	(222)
(二) 微波固定法	(223)
(三) 包埋方法	(223)
三、抗体探针的制备及检测	(223)
四、后包埋标记技术	(224)
(一) 胶体金	(224)
(二) 金标记蛋白 A	(224)
(三) 金标记的二级抗体	(225)
(四) 标记方法	(225)
五、用于蛋白原位定位的其他抗体方法	(225)
第三节 植物组织中特异性蛋白的免疫细胞化学定位	(226)
一、小麦胚溶菌酶的原位定位	(226)
二、受镰刀菌感染的番茄根组织中蔗糖酶的原位定位	(226)
三、病原相关蛋白的原位定位	(227)
(一) 几丁质酶和 β -1,3-葡萄糖苷酶的金标记免疫定位	(227)
(二) PR-1 蛋白的免疫金定位	(229)
四、不同植物组织中富含羟脯氨酸的糖蛋白的原位定位	(230)
五、植物组织中其他蛋白的原位定位	(231)
第四节 结论和展望	(233)
参考文献	(233)
第十五章 分子生物学计算机软件的获取	(237)
第一节 准备	(237)
第二节 通过电子函件获取软件	(238)
第三节 通过匿名 FTP 获取软件	(240)
第四节 通过“蜗牛”邮寄获取软件	(241)
第五节 求助于 ARCHIE	(242)
第六节 保持消息灵通	(243)
第十六章 序列相似性查找、多重序列对比和分子树构建	(245)
第一节 引言	(245)
第二节 序列相似性查找	(245)

第三节 多重序列对比·····	(253)
第四节 分子树构建过程·····	(257)
一、使用多重序列对比进行距离矩阵分子树构建·····	(257)
二、同时对比和构建系统发育树·····	(258)
三、吝啬法构建分子树·····	(258)
第五节 注意事项·····	(259)
参考文献·····	(260)
第十七章 植物 DNA 作图 ·····	(261)
第一节 引言·····	(261)
一、基于 RFLP 的 DNA 作图·····	(261)
二、基于 PCR 的 DNA 作图·····	(261)
第二节 程序·····	(262)
一、基于 RFLP 的 DNA 作图·····	(262)
(一)探针制备·····	(262)
(二)用于 RFLP 分析的植物 DNA 制备·····	(264)
(三) RFLP 分析·····	(267)
二、基于 PCR 的 DNA 作图·····	(269)
(一)亲本和分离群体的 DNA 提取·····	(269)
(二) PCR-RAPD 反应·····	(272)
(三)电泳分析扩增产物及筛选有用引物·····	(274)
(四)分离分析和遗传作图·····	(274)
第三节 结论·····	(274)
参考文献·····	(274)
第十八章 随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析 ·····	(277)
第一节 引言·····	(277)
第二节 聚合酶链式反应标记·····	(278)
一、扩增序列多态性(ASPs)·····	(278)
二、半随机引物·····	(278)
三、随机引物·····	(278)
第三节 RAPD 方法学·····	(280)
一、DNA 提取·····	(280)
二、扩增方法·····	(281)
三、凝胶电泳分离扩增产物·····	(284)
第四节 RAPD 分析·····	(287)
一、DNA 分群·····	(287)
二、连锁·····	(288)