

植物分子生物学——实验手册

Plant Molecular Biology — A Laboratory Manual

(英) Clark MS 主编 顾红雅 瞿礼嘉 主译 陈章良 主校



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

植物分子生物学 ——实验手册

Plant Molecular Biology — A Laboratory Manual

(英)Clark M S 主编

顾红雅 瞿礼嘉 主译
陈章良 主校



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

(京)112 号

图书在版编目(CIP)数据

植物分子生物学: 实验手册/(英)克拉克(Clark, M S)主编; 顾红雅, 瞿礼嘉主译. - 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 1998. 8

书名原文: Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual

ISBN 7-04-006894-X

I. 植… II. ①克… ②顾… ③瞿… III. 植物学: 分子生物学-实验-手册 IV. Q946-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 19570 号

图字: 01-97-1800 号

Originally published in English under the title

“Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual, edited by Melody S. Clark”

Copyright © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997

All Rights Reserved

*

高等教育出版社
施普林格出版社 出版

北京沙滩后街 55 号

邮政编码: 100009 传真: (010)64014048 电话: (010)64054588

新华书店总店北京发行所发行

北京外文印刷厂印装

*

开本 850 × 1168 1/16 印张 26.5 字数 630 000

1998 年 8 月第 1 版 1998 年 8 月第 1 次印刷

定价 38.50 元

©China Higher Education Press Beijing and
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998

版权所有, 不得翻印

内容简介

本手册涵盖了植物分子生物学技术、植物基因工程以及对植物进行相关的分子细胞遗传学分析等内容,每一章的开始都有一个对基本方法的介绍,随后详细讨论实验操作程序并带有详尽的疑难解答。

本书的第一部分主要介绍基本的分子生物学方法,如 DNA 提取,印迹转移,文库构建和 RNA 克隆;第二部分介绍的是分析方法,特别是 RAPD 和 RFLP;最后一部分包括多种不同的基因转移技术以及分子和细胞学分析技术。本手册对于初学者和有经验的研究人员都具有很高的使用价值。

封面说明

在同一株矮牵牛(*Petunia hybrida*)植株上开有紫色、白色以及紫白相嵌三种不同颜色的花,这是译者所在的实验室通过植物基因工程手段把查尔酮合酶(CHS)基因转入紫花矮牵牛后获得的结果;目前人们认为共抑制(cosuppression)是产生这种现象的根本原因。

译者序

《植物分子生物学——实验手册》中文版就要出版了,这是一件值得高兴的事情。首先要感谢高等教育出版社鼎力帮助买下版权,为中国的植物分子生物学界做了一件实事。

由英国剑桥大学 MS Clark 博士主编、42 位世界各国知名的学者联合编写的这本《植物分子生物学——实验手册》是 1997 年由德国施普林格出版社出版的,是目前有关植物分子生物学实验技术方面最新的参考书之一。正如 Clark 博士在原书前言中所说的那样,这本书包括了大量“最新的植物分子生物学实验技术”,从 DNA 操作和 RNA 技术到转基因方法和原位杂交,涉及范围广,同时也有很强的针对性和实用性;对于那些操作技术并不复杂,而所涉及的应用原理相对较复杂的内容(如 RAPD, RFLP 等),则采取了集中讲解原理的办法。这样做虽然对整体风格有一定的影响,但也显得错落有致,重点突出。

本书的翻译工作主要是由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室承担的。除了我们两位以外,参加翻译工作的还有郑宏红、胡苹、周北雁和李东辉四位年青人以及高等教育出版社的林金安、吴雪梅和孙素青;全部译稿最后由实验室主任陈章良教授亲自校阅审定。

我们注意到不同的章节之间由于作者的不同而在风格上有一定的差异,这也是一本由多人联合编写的书的特点,这种特点我们都尽量予以保留;而对文中的一些术语和名词我们则按照全国自然科学名词审定委员会公布的有关名词予以统一;对文中一些明显的笔误及一些编辑错误经查证后我们也一一作了更正。

在整个翻译过程中,我们力求使译文既忠实于原著,又采用规范的中文,通俗易懂,贴近读者。由于各种原因,对这个译稿我们仍有不满意之处,也难免出现这样或那样的疏漏,因此恳请国内外的同行朋友能提出宝贵意见,以便互相讨论共同提高。

顾红雅 瞿礼嘉

1998 年 8 月于燕园

前 言

编写这本手册的宗旨在于我们想要涵盖各种最新的植物分子生物学技术。但是众所周知,对任何一本手册而言其使用者的范围都很广,操作经验和水平各异。因此,我们在这本手册中加入了大量的分子生物学基本技术,以使初学者不必四处查阅课本就可以着手进行每个主要的实验。

这本手册分为三个部分:

第一部分:分子生物学基本技术

这一部分介绍的是分子生物学技术的背景知识,同时,这一部分的存在也减少了以后章节中可能出现的重复内容(对于第 1 章里包括的方法来说,更是如此)。每个作者都提供了最为详尽的方法,但他们往往忽略了其中有些方法应当在早一些的章节里讲述。就拿 DNA 提取方法来说吧,每个人都给出了一个略有不同的“变种”!我的观点是,给出一个标准程序,同时附上疑难解答,这比起在每一章都读到一个不同版本的程序,读者在感觉上要清楚得多;而且,这样做对于基本技术的阐述也会更加深入(因此我善意地使用了“删除”键,在此谨向各位作者致歉!)

RNA 的方法学在第 3 章讲述,内容包括从 RNA 的提取, northern 杂交等基本技术,到 cDNA 文库的构建。同时,本章还详细介绍了更为复杂的筛选克隆技术:差异显示技术,逆转录 PCR 技术和减法杂交技术,以及用这些技术来帮助克隆特异的 RNA,这已日益成为在研究新的基因以及发育调控表达的基因时需要考虑的重要环节。

DNA 克隆技术与克隆的鉴定在一起介绍(第 2 章和第 4 章)。这些技术不单单可用于植物,而且它们对于日后进行更为复杂的生物技术的分析也同样非常重要。利用这两章所包括的内容,读者不需要再参考更多的教科书,就可以顺利地实验进行策划并予以实施。

第二部分:植物 DNA 的鉴定

这一部分的内容主要是有关在细胞器和基因组水平上对植物基因组进行整体分析。这不仅对于特异基因的定位和分离而言非常重要,而且对于在进行 DNA 操作之

前对植物种进行广泛的基因组鉴定也尤为重要。

各种作图方法和技术(RFLP 和 RAPD)都在这一部分予以深入的讨论,讨论的重点放在实验材料的初选及其潜在的局限性上。同时,还详细地阐述了对 RFLP 的分析方法和统计参数,迄今为止,RFLP 仍然是植物基因组作图的最常用的方法。

第三部分:基因工程——方法和分析

最后一部分讲述的是,“传统意义上”所谓的植物生物技术或基因操作究竟为何物。

第 8 章介绍基因导入技术,不仅包括了单个基因水平上的农杆菌介导转化,电击转化或基因枪转化,还包括了更为“随机”的融合技术。融合技术的应用是由作物本身决定的,即该作物的组织培养和再生体系发展得如何,手头有什么样的基因序列以及在野生种与栽培种之间是否存在杂交障碍。

随后的章节讨论的是对转化植株的分子鉴定。采用的鉴定方法因不同的转化系统,如是单个基因和报告基因体系还是体细胞融合,而有所差异。如果是前者,则采用 Southern 杂交,GUS 和 LUC 检测;如果是后者,则需要采取基因组水平上的鉴定方法,因为与受体细胞融合会在全部或部分供体细胞中诱发大量的基因组断裂。

最后几章主要介绍原位杂交技术,现在大家都认为这项技术对于现代分子生物学而言是不可或缺的,它已越来越多地与其他领域结合在了一起。例如,虽然克隆一个基因非常重要,但是要对该基因的功能以及环境影响有一个全面的认识,就需要对该基因进行物理定位。这一部分的另一个重点放在了小染色体的操作上,因为大家都知道这样一个事实,即绝大多数的作物类植物(除了谷类作物),其经济价值似乎往往与其染色体的大小成反比!人们逐渐可以对这些作物的细胞分裂前中期进行分析时,人类遗传学领域发展起来的一些技术,如与伸展的染色质丝的杂交技术,也很快就可以应用于植物了。当然,这一技术对于一般的植物分子生物学实验室来说可能太专业了,因此它也超出了本书的范围。

谨祝各位好运!

Melody S. Clark

1996 年 1 月于剑桥

目 录

第一部分 分子生物学基本技术

1	基因组 DNA 的分离, Southern 印迹和杂交	
1. 1	基因组总 DNA 的分离	3
1. 1. 1	导 论	3
1. 1. 2	提取程序的原理	4
1. 1. 3	CTAB 法分离总基因组 DNA	4
1. 1. 4	CTAB 法微量分离 DNA	6
1. 1. 5	Dellaporta, Wood 和 Hicks(1983)法分离总基因组 DNA	7
1. 1. 6	从分离的细胞核中提取 DNA	9
1. 1. 7	氯化铯密度梯度离心法纯化 DNA	10
1. 1. 8	DNA 浓度、纯度和质量的估测	11
	参考文献	11
1. 2	Southern 印迹	13
1. 2. 1	导 论	13
1. 2. 2	分离总基因组 DNA	13
1. 2. 3	基因组 DNA 的限制性内切酶酶解和微型凝胶电泳检测	13
1. 2. 4	DNA 的琼脂糖凝胶电泳及向尼龙膜的转移	16
	参考文献	20
1. 3	使用放射性标记的探针进行杂交	21
1. 3. 1	导 论	21
1. 3. 2	标记探针	22
1. 3. 3	纯化探针	24
1. 3. 4	杂交程序	26
1. 3. 5	膜的探针剥离(filter stripping)	30
	参考文献	31
1. 4	Southern 印迹的非同位素检测方法	32

1. 4. 1	导 论	32
1. 4. 2	提取总的基因组 DNA	32
1. 4. 3	DNA 的限制性内切酶酶解和 Southern 印迹	33
1. 4. 4	PCR-地高辛法标记探针	33
1. 4. 5	杂交、洗膜和显影以及探针的去除	37
	参考文献	40

2 基因组 DNA 的克隆及文库构建

2. 1	PCR 技术在植物分子生物学中的应用	43
2. 1. 1	导 论	43
2. 1. 2	DNA 扩增程序	46
2. 1. 3	PCR 优化	48
2. 1. 4	克 隆	49
2. 1. 5	PCR 技术在克隆以外的其他方面的应用	53
	参考文献	57
2. 2	质粒文库	60
2. 2. 1	导 论	60
2. 2. 2	分离 DNA	61
2. 2. 3	基因组 DNA 和质粒的限制性内切酶酶解	61
2. 2. 4	接入质粒载体	63
2. 2. 5	感受细胞的制备	64
2. 2. 6	转化方法	66
2. 2. 7	菌落分析	68
2. 2. 8	文库/质粒的保存	72
	参考文献	72
2. 3	λ 基因组克隆(Lambda genomic cloning)	75
2. 3. 1	导 论	75
2. 3. 2	使用置换型载体 λ 2001 构建 λ 基因组文库的操作方法	78
2. 3. 3	λ 2001 文库的滴度测定	86
2. 3. 4	λ 2001 基因组文库的扩增	86
2. 3. 5	文库铺板进行扩增或杂交筛选	87

2. 3. 6	制备噬菌斑杂交用膜	87
2. 3. 7	阳性噬菌体的分离和高滴度贮存液的构建	88
2. 3. 8	杂交阳性噬菌体的 DNA 制备	89
	参考文献	91
2. 4	粘粒文库	92
2. 4. 1	导 论	92
2. 4. 2	克隆策略	92
2. 4. 3	文库的构建	94
2. 4. 4	有关粘粒文库筛选和重组粘粒克隆分析的建议	99
	参考文献	100
2. 5	酵母人工染色体(YAC)文库	102
2. 5. 1	导 论	102
2. 5. 2	植物中百万碱基级大片段 DNA 的制备	104
2. 5. 3	载体的制备	108
2. 5. 4	对基因组 DNA 进行 <i>EcoRI</i> 部分酶解以及通过 PFGE 对 <i>EcoRI</i> 片段进行大小选择	109
2. 5. 5	连接和转化样品的制备	110
2. 5. 6	酵母原生质体转化	111
2. 5. 7	酵母人工染色体克隆的制备和 PFGE 分析	113
2. 5. 8	YAC 文库的保存和筛选	114
	参考文献	115
3	RNA 的提取、克隆和减法杂交	
3. 1	从植物细胞中分离和分析信使 RNA 以及 cDNA 的克隆	119
3. 1. 1	导 论	119
3. 1. 2	RNA 的分离	122
3. 1. 3	mRNA 的纯化	126
3. 1. 4	RNA 的分析	128
3. 1. 5	失控转录	132
3. 1. 6	特定 mRNA 的 5'和 3'端的作图	136
3. 1. 7	cDNA 的合成	138

3. 1. 8	特异 mRNA 的定量(定量 RT-PCR)	140
3. 1. 9	cDNA 的克隆	143
3. 1. 10	一种克隆差异表达的 cDNA 的新方法: 差异显示逆转酶-聚合酶链式反应(DDRT-PCR)	148
	参考文献	153
3. 2	不同 mRNA 的减法杂交	157
3. 2. 1	引 言	157
3. 2. 2	RNA 的制备	158
3. 2. 3	加尾的第一链 cDNA 的合成	158
3. 2. 4	代表性 cDNA 库的扩增	160
3. 2. 5	杂 交	162
3. 2. 6	减 法	163
3. 2. 7	再扩增	164
3. 2. 8	进一步杂交/减法循环	164
3. 2. 9	相减后的 cDNA 分析	164
3. 2. 10	克隆构建减法文库	169
3. 2. 11	结 论	171
	参考文献	171
4	克隆的鉴定	
4. 1	DNA 测序	174
4. 1. 1	引 言	174
4. 1. 2	嵌套不定向缺失产物的生成	178
4. 1. 3	质粒 DNA 的测序	185
	参考文献	198
4. 2	克隆基因的表达	200
4. 2. 1	导 论	200
4. 2. 2	载体构建和蛋白表达	201
4. 2. 3	蛋白纯化	203
4. 2. 4	Western 印迹	208
	参考文献	211

第二部分 植物 DNA 的鉴定

5 细胞器 DNA 的分离

5.1	导 论	217
5.2	叶绿体和线粒体 DNA 的分离	222
5.2.1	叶绿体 DNA 的分离	222
5.2.2	线粒体 DNA 的分离	225
	参考文献	229

6 RAPD 分析:基因组的鉴定、特征标记及作图

6.1	导 论	236
6.2	遗传指纹作图	237
6.2.1	方 法	238
6.2.2	遗传关系分析	242
6.3	遗传连锁图谱的建立	244
6.3.1	总体作图策略	244
6.3.2	有目标的方法	245
6.4	应用前景	251
	参考文献	252

7 植物核基因组 RFLP 作图:

实验设计,连锁图的建立和 QTL 作图

7.1	导 论	259
7.2	实验设计	261
7.2.1	纯合性与杂合性亲本	261
7.2.2	选择一个分离群体	262
7.3	RFLP 探针的产生与选择	265
7.3.1	cDNA 探针	265
7.3.2	基因组 DNA 探针	265
7.3.3	从其他作图群体中获得探针	265
7.4	RFLP 分析的实验室程序	266

7.5	连锁图谱的构建	266
7.5.1	单位点分离分析	267
7.5.2	检测位点间的连锁	269
7.5.3	重组频率和图距的估测	274
7.5.4	组建连锁群	276
7.5.5	位点排序	276
7.5.6	图谱构建时对偏离一般假设的敏感性	278
7.6	数量性状位点作图	280
7.6.1	标记组的方差分析	281
7.6.2	区间作图法	285
7.6.3	多个 QTL 方法	290
7.6.4	上位性	291
7.6.5	多效性作用	292
7.7	总 结	292
	参考文献	293

第三部分 基因工程——方法和分析

8 植物基因转化

8.1	导 论	305
8.2	农杆菌介导的基因转化	307
8.2.1	通过根瘤农杆菌转化烟草	308
8.2.2	通过根瘤农杆菌转化番茄	310
8.3	直接基因转化	312
8.3.1	水稻原生质体的直接基因转化	312
8.3.2	基因枪法	316
8.4	原生质体融合	319
8.4.1	化学融合	320
8.4.2	电融合	321
	参考文献	323

9 转基因植物的分子生物学鉴定

9.1	导 论	326
9.2	选择性标记基因	326
9.3	转化体的分子鉴定	329
9.3.1	对 Southern 分析的结果进行解释	329
9.4	报告基因的表达分析	330
9.4.1	<i>gusA</i> (β -葡糖醛酸糖苷酶基因)用作报告基因	330
9.4.2	GUS 活性的组织化学定位	332
9.4.3	<i>luc</i> (萤火虫萤光素酶基因)作为报告基因	334
	参考文献	336

10 体细胞杂种的分子鉴定

10.1	导 论	338
10.2	体细胞杂种的一般性鉴定	339
10.3	体细胞杂种的分子鉴定	339
10.3.1	核基因组	339
10.3.2	细胞器基因组	345
	参考文献	347

11 转基因植物的细胞学鉴定： 荧光原位杂交(FISH)定位低拷贝及重复的 DNA 序列

11.1	导 论	353
11.2	ISH 检测低拷贝序列操作程序的优化	354
11.2.1	染色体制备	354
11.2.2	高分裂中期指数	354
11.2.3	探针类型	354
11.2.4	标记物的选择	354
11.2.5	标记方法的选择	355
11.2.6	检测系统的选择	355
11.2.7	低拷贝信号的成像	356
11.2.8	多重标记和再杂交	356

11. 3	显示荧光 ISH 信号	356
11. 4	染色体制备	357
11. 5	探针制备	357
11. 5. 1	从凝胶中提纯 DNA	357
11. 5. 2	切口平移法标记 DNA	357
11. 6	原位杂交的操作程序	358
	参考文献	368
12	体细胞杂种的细胞学特性： 用基因组原位杂交 (GISH) 检测基因组来源	
12. 1	导 论	371
12. 2	优化 GISH 条件用以区分基因组	372
12. 2. 1	标记方法的选择	372
12. 2. 2	总 DNA 作为探针进行原位杂交	372
12. 2. 3	探针的穿透性/目标的可接近性	372
12. 2. 4	严紧度	373
12. 2. 5	封闭 DNA	373
12. 2. 6	检测系统的选择	373
12. 2. 7	观察和记录结果	374
12. 3	细胞制备物	374
12. 3. 1	预处理和固定(要点 1,2 和 7)	376
12. 3. 2	根尖压片制备染色体样品	377
12. 3. 3	酶解制备染色体样品(要点 5)	377
12. 3. 4	减数分裂染色体的制备(要点 6~8)	378
12. 4	探针制备	379
12. 4. 1	总 DNA 的分离	381
12. 4. 2	用切口平移法进行总 DNA 的生物素标记(要点 3,4)	381
12. 4. 3	用点杂交检查生物素的掺入	382
12. 5	基因组原位杂交	383
12. 6	显微镜技术和照相技术	386
	参考文献	387

11 和 12 的补充	具小染色体的植物种的原位杂交	391
A. 1	导 论	391
A. 2	用蚜栖菌素(Aphidicolin)处理获取前中期染色体	392
A. 2. 1	蚜栖菌素处理番茄根尖细胞同步化	393
A. 2. 2	染色体压片	394
A. 3	原位杂交	395
	参考文献	395
附 录	重要植物种的核基因组大小	398

第一部分

分子生物学基本技术