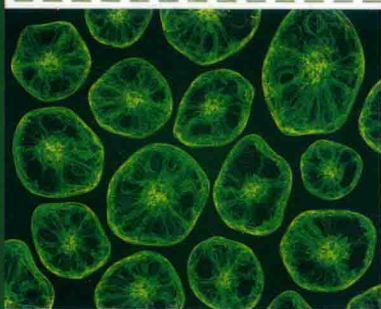




植物 分子生物学

技术及其应用

饶玉春 薛大伟 © 主编



植物分子生物学

技术及其应用

饶玉春 薛大伟 ◎ 主编



中国农业出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

植物分子生物学技术及其应用 / 饶玉春, 薛大伟主
编. —北京: 中国农业出版社, 2019. 5
ISBN 978-7-109-25392-6

I. ①植… II. ①饶… ②薛… III. ①植物学—分子
生物学 IV. ①Q946

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 059275 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 郭 科

北京中兴印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2019 年 5 月第 1 版 2019 年 5 月北京第 1 次印刷

开本: 700mm×1000mm 1/16 印张: 8.25

字数: 150 千字

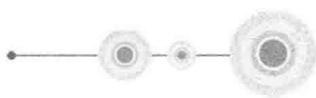
定价: 26.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主编：饶玉春 薛大伟

编委（按姓氏笔画排序）：

王跃星	方云霞	任德勇	孙京波	张 弦
张晓勤	林 晗	宗 宇	胡 江	饶玉春
徐 杰	徐 娜	薛大伟		



前言

分子生物学是生命科学发展过程中诞生的一门实验性极强的新兴学科。通过研究核酸等生物大分子功能、形态结构特征及其重要性和规律性，来阐明各种生命现象的分子本质。植物生长发育是内部基因和外部环境相互协调的结果，植物分子生物学能够从根本上揭示生长发育是如何被调节的。在实际应用方面，分子生物学是生物工程技术的重要理论基础，可为控制植物的生长、发育和生产力提供根本性的解决途径。

本书简明扼要地阐述了植物分子生物学基本原理及其相关的科研技术，主要包括两部分：第一部分基础篇，共 21 个实验，包括实验室常用分子生物学实验技术（如 DNA 提取、琼脂糖电泳等），以及分子生物学的一些基础性实验；第二部分应用篇，共 5 个实验，以基础篇的实验操作为基础，结合编者近 10 余年的研究报道，综合利用多种实验技术，对某一生物学现象进行深入研究和探讨。此外，还附有实验室一般溶液的配制、组织和细胞培养常用培养基的配制以及实验过程应当注意的细节。

本书主要由浙江师范大学、杭州师范大学、中国水稻研究所和江西农业大学教学、科研第一线的老师编写。编者根据自己多年的教学科研经验和学生实验情况，并参考了各兄弟院校的自编教材，将以前的实验进行了不同程度的改良与完善，使得实验的可操作性得到加强。该书编写还得到了浙江师范大学化学与生命科学学院和杭州师范大学生命与环境科学学院的支持与帮助。生物学相关的老师也提出许多宝贵的建议，在此表示衷心感谢。

本书文字简练，深入浅出，可供生物学相关专业的本科生、研究生作为实

验指导用书，亦可供广大生物科学相关教师、植物分子育种相关工作者及对植物分子生物学感兴趣的读者阅读参考。

虽然本书在内容上力求全面完整，但由于编者水平和能力有限，归纳成书后疏漏之处在所难免，殷切希望读者批评指正。

编 者

2019 年 3 月

目 录

前言

基 础 篇

实验一 植物 DNA 的提取及凝胶电泳分析	3
实验二 质粒 DNA 的制备和纯化	6
实验三 植物总 RNA 的提取	10
实验四 植物 mRNA 的分离与纯化	14
实验五 DNA 电泳技术	18
实验六 从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA (PCR 产物)	22
实验七 质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切	25
实验八 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	28
实验九 DNA 的连接	31
实验十 DNA 重组	33
实验十一 Southern Blot 分子杂交	36
实验十二 Northern Blot 分子杂交	44
实验十三 聚合酶链式反应 (PCR) 技术体外扩增 DNA	48
实验十四 反转录聚合酶链式反应	52
实验十五 实时荧光定量 PCR 技术	55
实验十六 SSR 标记技术	58
实验十七 植物总蛋白质的提取	63

实验十八	SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量	66
实验十九	Western Blot 杂交技术	69
实验二十	拟南芥转基因株系的制备 (花芽转化法)	72
实验二十一	RNA 干扰	76

应 用 篇

实验二十二	转基因与常规杂交相结合改良植物耐性 (以耐盐水稻为例)	81
实验二十三	图位克隆技术	89
实验二十四	水稻钾相关基因的转录组分析	97
实验二十五	表达载体 (Ti 质粒) 的构建及遗传转化	105
实验二十六	基因枪瞬时转化及蛋白质亚细胞定位的观察技术	119

基 础 篇

Jichupian

实验一

植物 DNA 的提取及凝胶电泳分析

一、实验目的

了解真核生物基因组 DNA 提取的一般原理，掌握 CTAB 法提取植物 DNA 及琼脂糖凝胶电泳的方法。

二、实验原理

CTAB（十六烷基三乙基溴化铵）是一种去污剂，可溶解细胞膜。CTAB 能与核酸形成复合物，在高盐溶液（0.7mol/L NaCl）中是可溶的，当溶液盐浓度降至一定程度（0.3mol/L NaCl）时，复合物从溶液中沉淀，通过离心 CTAB-核酸复合物与蛋白质以及多糖类物质可分开。之后利用乙醇或异丙醇沉淀 DNA，使其形成纤维状絮团，而 CTAB 由于溶于乙醇或异丙醇被除去，最后离心沉淀收集得到 DNA。

琼脂糖凝胶电泳是分离鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中，DNA 分子的电泳迁移率与其分子质量的常用对数成反比。用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭（EB）染色，在紫外线下可以检测出至少 1~10ng 的 DNA 条带，从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。

三、材料、试剂和仪器

1. 材料 新鲜水稻叶片、标准分子质量 DNA。

2. 试剂 2×CTAB 缓冲液、氯仿/异戊醇（24 : 1）、液氮、70%乙醇、异丙醇、1×TAE 缓冲液、6×DNA 凝胶上样缓冲液、琼脂糖、10mg/mL 溴化乙锭（EB）、TE、ddH₂O。

3. 仪器 研钵、离心机、恒温水浴锅、制冰机、-20℃冰箱、微量移液器、电子天平、微波炉、水平电泳槽、电泳仪、凝胶成像系统等。

四、操作步骤

1. CTAB 法提取植物总 DNA

- (1) 取 2cm 新鲜烟草叶片于研钵中, 加入液氮研磨成碎粉状。
- (2) 迅速转移到加入了 600 μ L 2 $\times$ CTAB 提取液 (65 $^{\circ}$ C 预热) 的 1.5mL 离心管中, 缓慢振荡 30s, 放入 65 $^{\circ}$ C 振荡水浴锅中 40min。
- (3) 加入等体积氯仿/异戊醇, 缓慢振荡, 室温下 10 000r/min 离心 10min。
- (4) 取 500 μ L 上清液, 加入 2/3 体积的异丙醇, 缓慢颠倒混匀, 絮状沉淀为 DNA, -20 $^{\circ}$ C 放置 1h。
- (5) 12 000r/min 离心 10min, 去上清液, 加入 200 μ L 70%乙醇洗涤。
- (6) 12 000r/min 离心 5min, 去乙醇, 风干。
- (7) 用 30 μ L TE 或者 ddH₂O 溶解 DNA, 取 5 μ L 电泳, 剩余的置于 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

2. 琼脂糖凝胶电泳

- (1) 胶液的制备 称取 1g 琼脂糖, 置于 200mL 锥形瓶中, 加入 100mL 1 $\times$ TAE 缓冲液, 即为 1%琼脂糖胶液。
- (2) 加热 将胶液放入微波炉中 (或电炉上) 加热至琼脂糖全部溶化, 取出摇匀。
- (3) 胶板的制备 将有机玻璃胶槽两端分别用橡皮膏紧密封住。将封好的胶槽置于水平支持物上, 上样品梳子。向冷却至 40~50 $^{\circ}$ C 的琼脂糖胶液中加入溴化乙锭 (EB) 溶液, 使其终浓度为 0.5 μ g/mL。将冷却后的胶液倒入封好的胶槽中, 20~30min 后凝固。
- (4) 加样 取 5 μ L 提取的植物 DNA 溶液与 1 μ L 6 $\times$ DNA 凝胶上样缓冲液混匀, 用微量移液枪小心加入样品槽中。
- (5) 电泳 恒电压 80~110V, 电流控制在 40mA 以上, 电泳 30min。
- (6) 观察和拍照 利用凝胶成像系统观察拍照, 操作方法参看该仪器的说明。

五、注意事项

- (1) 大量提取液氮研磨时, 应当快速转移, 减少 DNA 的降解。
- (2) 裂解液要预热, 以抑制 DNase (DNA 酶), 加速蛋白质变性, 促进

DNA 溶解。

(3) 各操作步骤要轻柔，尽量减少 DNA 的人为降解。

(4) 取上清液时，不应贪多，以防非核酸类成分干扰。

(5) 异丙醇要预冷，以减少 DNA 的降解，促进 DNA 与蛋白质等的分相及 DNA 沉淀。

(6) 溴化乙锭 (EB) 是强诱变剂，具有致癌性，要求在整个操作过程中必须戴一次性手套。

六、思考题

1. 影响 DNA 提取质量的关键性步骤有哪几步？

2. DNA 电泳拖尾现象有几种可能性？应当如何操作才能减少该现象的发生？

碱裂解法提取质粒 DNA 的原理：根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性 DNA 在拓扑学上的差异来分离。在 pH12.0~12.6 的碱性环境中，细菌的线性大分子质量染色体 DNA 变性分开，而共价闭环的质粒 DNA 虽然变性但仍处于拓扑缠绕状态。将 pH 调至中性并有高盐存在及低温的条件下，大部分染色体 DNA、大分子质量的 RNA 和蛋白质在去污剂 SDS（十二烷基硫酸钠）的作用下形成沉淀，而质粒 DNA 仍然为可溶状态。通过离心，可除去大部分细胞碎片、染色体 DNA、RNA 及蛋白质，质粒 DNA 尚在上清液中，然后用酚、氯仿抽提进一步纯化质粒 DNA，用异丙醇或乙醇沉淀质粒 DNA。

三、材料、试剂和仪器

1. 材料 含有质粒 DNA 的大肠杆菌 XL1 - Blue。

2. 试剂 异丙醇、70%乙醇、50×TAE 缓冲液、6×DNA 上样缓冲液、琼脂糖、10mg/mL 溴化乙锭（EB）、LB 固体培养基、LB 液体培养基、Wizard®少量 DNA 纯化树脂、氨苄青霉素（Amp）、TE、水、溶液 I、溶液 II、溶液 III。

溶液 I：50mmol/L 葡萄糖溶液、25mmol/L Tris - HCl（pH8.0）、10mmol/L EDTA（乙二胺四乙酸，pH8.0）。

溶液 II：0.2mol/L NaOH、1%SDS。

溶液 III：5mol/L 乙酸钾。

3. 仪器 离心机、控温摇床、制冰机、微量移液器、电子天平、凝胶水平电泳槽、电泳仪等。

四、操作步骤

1. 细菌培养和收集 将含有质粒的 *E. coli* 菌种接种在 LB 固体培养基（含 50μg/mL Amp）中，37℃ 培养 12~24h。用无菌牙签挑取单菌落接种到 5mL LB 液体培养基（含 50μg/mL Amp）中，37℃ 振荡培养约 12h 至对数生长后期。

2. 质粒 DNA 的少量快速提取（碱法）

（1）取 1.5mL 培养液倒入 1.5mL EP 管中，12 000r/min 离心 30s，弃上清液，倒置片刻，使液体流尽。

（2）在菌体沉淀中加入 300μL 溶液 I，剧烈振荡使菌体充分重悬。

（3）加入新配制的溶液 II 300μL，盖紧管口，立即将离心管缓慢颠倒数次

直到溶液变清亮。

(4) 加入 300 μ L 预冷的溶液Ⅲ，盖紧管口，缓缓颠倒离心管数次直到白色沉淀充分形成，冰浴 5min，12 000r/min 离心 15min。

(5) 吸取 800 μ L 上清液移入干净 EP 管中，加入 400 μ L 异丙醇，振荡混匀，12 000r/min 离心 15min。

(6) 弃上清液，加入 200 μ L 70% 乙醇洗涤沉淀一次，12 000r/min 离心 5min。

(7) 弃上清液，将管倒置于卫生纸上使液体流尽，真空干燥 10min 或室温干燥。

(8) 将沉淀溶于 20 μ L 水中，取 2 μ L 电泳检测，剩余的于 -20℃ 保存。

3. 纯化：Wizard® 少量 DNA 纯化 Promega 公司的 Wizard® 少量 DNA 纯化系统可快速有效地抽提质粒 DNA，整个过程只需 15min。提取的质粒可直接用于 DNA 测序、酶切分析和体外转录等。

该系统中所含试剂和柱子可以用于 50 次 1~3mL 质粒培养液的分离和纯化，包括 10mL 细胞悬浮液，10mL 细胞裂解液，10mL 中和液，50mL Wizard® 少量 DNA 纯化树脂，50mL 柱洗液（使用前加 95% 乙醇至 120mL）和 50 支 Wizard® 微型柱。

(1) 1~3mL 过夜培养细胞液于 4℃ 下 12 000r/min 离心 1~2min。

(2) 去上清液，将沉淀中的菌体细胞悬浮于 200 μ L 细胞悬浮液中，充分混合，并移入 EP 管中。

(3) 加 200 μ L 细胞裂解液，颠倒离心管数次，直到溶液变清亮。

(4) 加 200 μ L 中和液，颠倒离心管数次。

(5) 4℃ 下 12 000r/min 离心 5min，取上清液于新的 EP 管中。

(6) 加 1mL Wizard® 少量 DNA 纯化树脂，颠倒混匀。

(7) 取一次性注射器，取出注塞，并使注射筒与 Wizard® 微型柱连接，用移液枪将上述混合液加入注射筒中，用注塞轻推，使混合物进入微型柱。

(8) 将注射器与微型柱分开，取出注塞，再将注射筒与微型柱相连，加入 2mL 柱洗液，并用注塞轻推，使柱洗液进入微型柱。

(9) 取出微型柱置于 EP 管中，离心 2min 以除去微型柱中的柱洗液。

(10) 将微型柱放入一个新 EP 管中，加 50 μ L TE（或水）于微型柱中，静置 1min 后 4℃ 下 12 000r/min 离心 20s。

(11) 丢弃微型柱，将 EP 管中的质粒 DNA 储于 4℃ 或 -20℃ 冰箱中。

五、注意事项

- (1) 提取过程尽量保持低温。
- (2) 如提取后发现蛋白质较多,可用酚/氯仿抽提去除蛋白质。
- (3) 沉淀 DNA 通常用冰乙醇,低温条件下放置时间稍长可使 DNA 沉淀完全。
- (4) 树脂使用前应充分混匀,如有结晶,可将树脂用 25~37℃ 水浴处理 10min。
- (5) 系统所提供的柱子洗脱液,在使用之前按 1:1 比例加入 95%乙醇。
- (6) 纯化树脂必须混匀后再用。

六、思考题

1. 在实验过程中,加入的 EDTA、SDS 分别起什么作用?
2. 质粒在提取后电泳发现有很多条带,请解释原因。