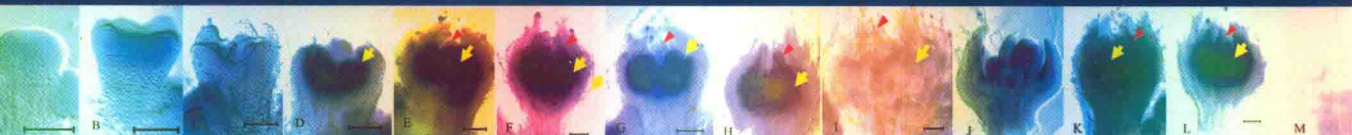


Experimental Technology of Plant
Developmental Biology

植物发育生物学 常用实验技术



王东辉 ©主编



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

植物发育生物学常用实验技术



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

植物发育生物学常用实验技术/王东辉主编. —北京: 北京大学出版社, 2017.5
ISBN 978-7-301-28202-1

I. ①植… II. ①王… III. ①植物—发育生物学—实验 IV. ①Q945.4—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 063213 号

- 书 名 植物发育生物学常用实验技术
ZHIWU FAYU SHENGWUXUE CHANGYONG SHIYAN JISHU
- 著作责任者 王东辉 主编
- 责任编辑 黄 炜
- 标准书号 ISBN 978-7-301-28202-1
- 出版发行 北京大学出版社
- 地 址 北京市海淀区成府路 205 号 100871
- 网 址 <http://www.pup.cn> 新浪微博: @北京大学出版社
- 电子信箱 zpup@pup.cn
- 电 话 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62754271
- 印 刷 者 三河市博文印刷有限公司
- 经 销 者 新华书店
- 720 毫米×980 毫米 16 开本 8.5 印张 彩插 3 180 千字
2017 年 5 月第 1 版 2017 年 5 月第 1 次印刷
- 定 价 20.00 元

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有, 侵权必究

举报电话: 010-62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

图书如有印装质量问题, 请与出版部联系, 电话: 010-62756370

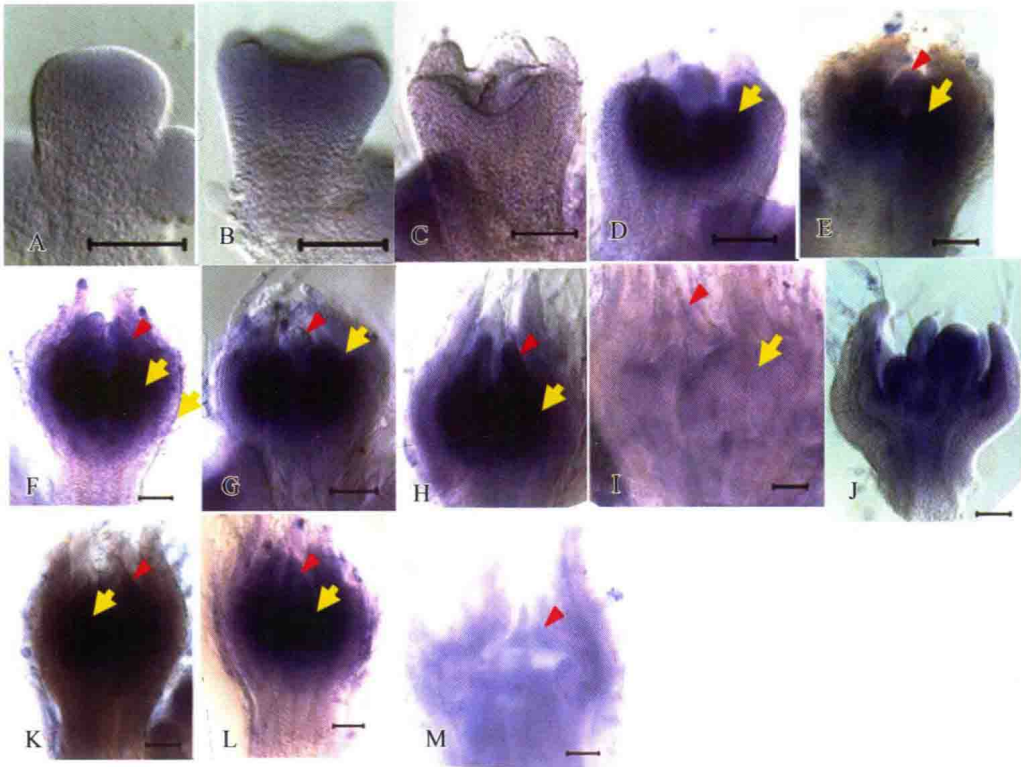


图 2-6-1 黄瓜各个时期雌雄花的整体原位杂交检测 CsMADS1 的表达模式

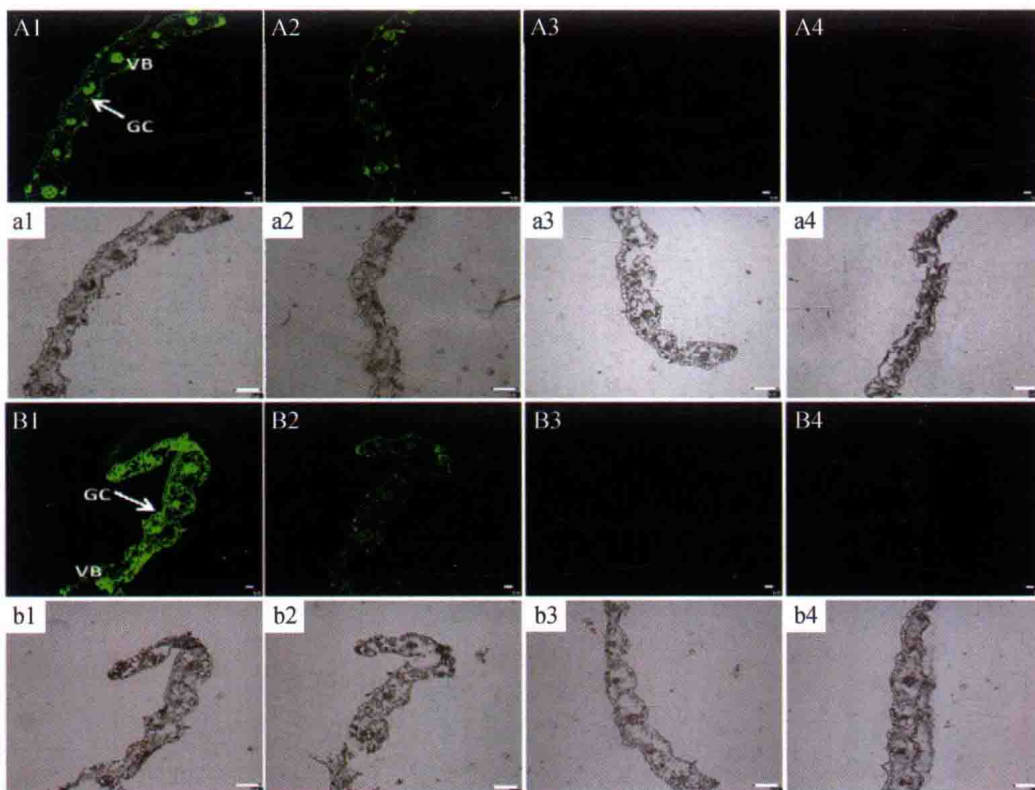


图 2-9-2 干旱胁迫和正常供水下小麦叶片中 IAA 和 ABA 的免疫组织化学定位

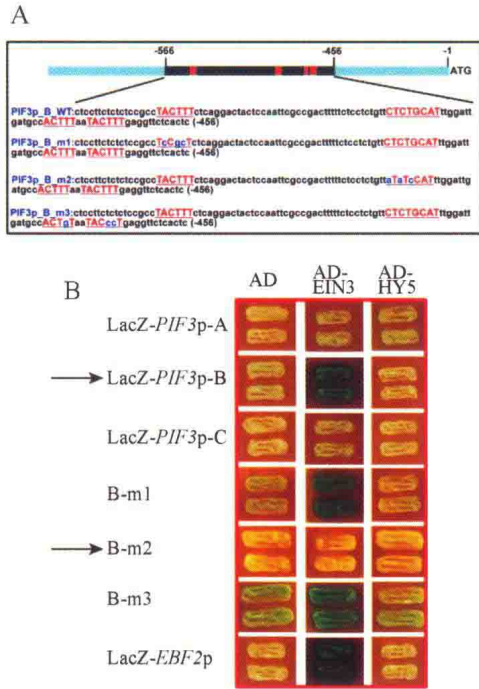


图 3-3-1 (A) 用作酵母单杂交的 PIF3 启动子区序列; (B) A 图中的序列用于酵母单杂交试验

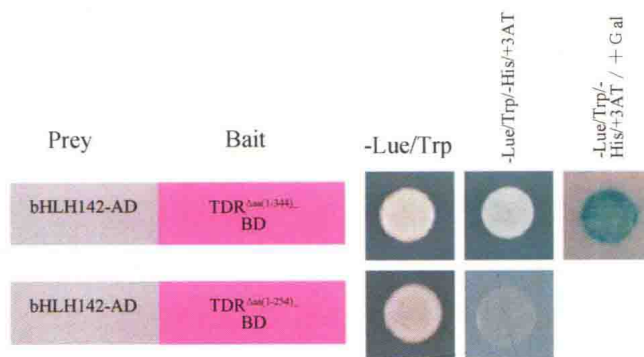


图 3-4-2 实验结果是水稻中的蛋白 bHLH142 和 TDR(部分截断以去除 TDR 蛋白的自激活)以及 bHLH142 与 EAT1(部分截断以去除 EAT1 蛋白的自激活)的酵母双杂交结果

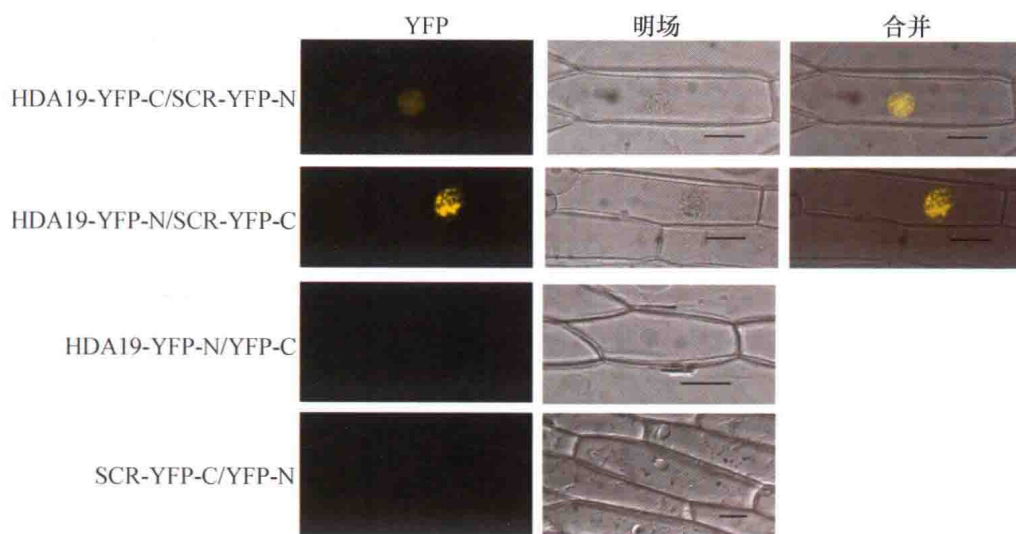


图 3-6-1 BFC 验证 HDA19 和 SCR 蛋白之间的相互作用

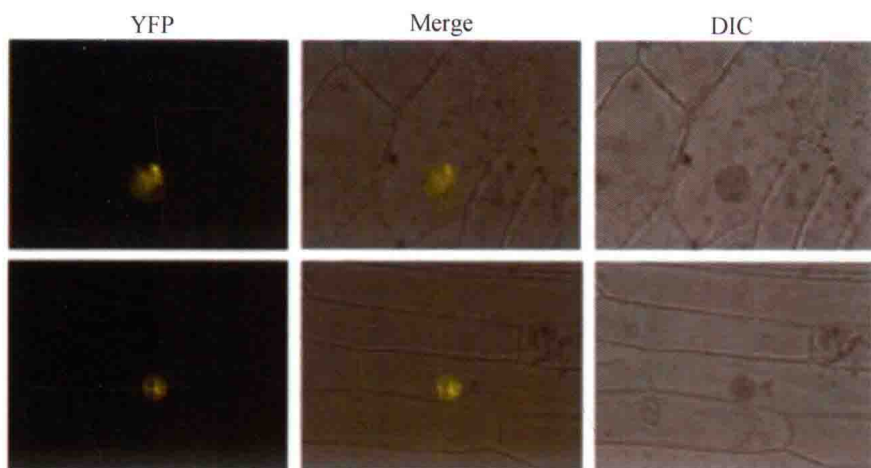


图 4-5-1 通过基因枪介导转化法将一个在细胞核表达的基因注射进洋葱表皮的结果

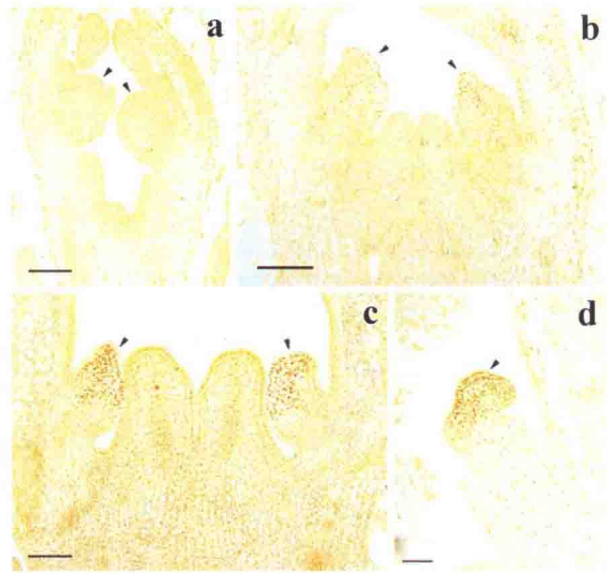


图 4-6-1 利用 DAB 染色方法检测黄瓜雌花雄蕊中的 DNA 片段化

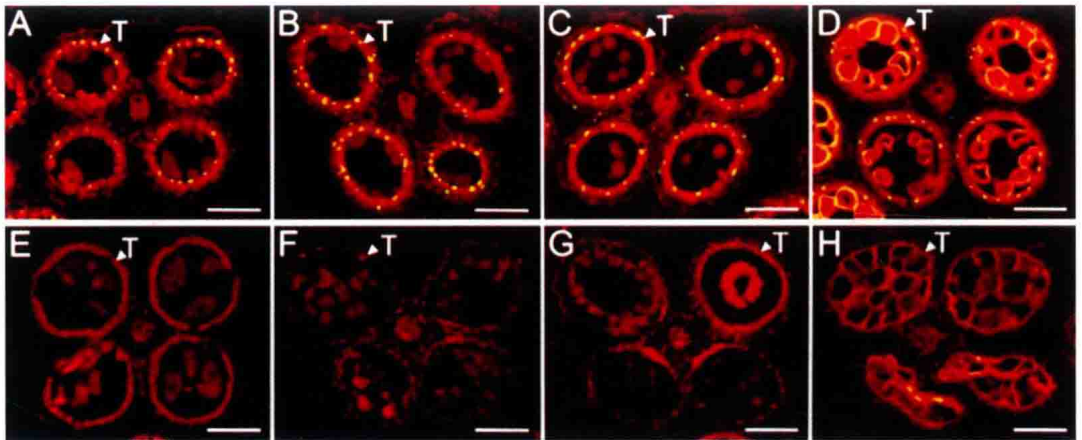


图 4-6-2 利用荧光检测野生型水稻和 *tdr* 突变体中的 DNA 片段化

序 一

植物发育生物学是一门实验科学,其实验技术和方法的建立是研究植物形态、结构和功能的必备工具。随着分子和细胞生物学的发展及其技术的应用,各学科的交叉和渗透,极大地丰富了植物学实验技术的内容,也促进了植物科学的快速发展。

我们的实验室多年来一直在从事植物发育生物学的研究。本书即以研究生在进行植物发育生物学研究过程中需要使用的实验技术为主体,系统地介绍相关的植物分子生物学和细胞生物学的基本研究技术与方法。全书共分为四章:第一章介绍植物形态观察常用的实验技术:石蜡切片制作、半薄切片和电镜切片的制作等;第二章着重阐述分子生物学相关的检测实验:包括定量检测基因表达量的 qRT-PCR、检测基因表达模式的切片原位杂交和整体原位杂交、蛋白的免疫定位和激素的免疫定位等技术;第三章为植物发育生物学常用的多种互作检测技术:涉及蛋白-蛋白、基因-蛋白互作相关的凝胶阻滞电泳、双分子荧光互补技术及酵母双杂交等技术;第四章阐述了转基因和突变体中常用的检测方法。

现今生命科学的实验技术日新月异,任何一个人,乃至一个实验室要掌握所有的重要技术已近乎不可能,每个人在研究中都有自己常用的技术,也常经历过实验的失败,在实验过程中积累的经验对于新手往往至关重要。本书有以下特点:编写人员大部分为王东辉老师所在的课题组中从事植物发育生物学研究的、已经毕业或在读的博士研究生,所写的实验技术和方法均是他们在科研工作中常用的实验技术,每个实验都有他们在科研过程中积累的精华,正是这些在科研过程中日积月累的小窍门成就了实验的最终成功。特别是王东辉老师,她在原位杂交技术方面经验丰富,并在此基础上与实验室其他人一起发展了植物的整体原位杂交实验技术,针对这两门技术在不到 2 年的时间内已经培训了接近 50 名研究生和科研人员,还有北师大、河南师范大学、中医科学院中药资源中心等大学和科研院所的老师和学生。

本书既可作为生命科学类本、专科生的高级植物发育生物学的实验教材,亦可作为植物发育生物学相关专业研究生和科研人员的科研参考书。

许智宏

2016 年 11 月 22 日于北大燕园

序 二

王东辉老师 1994 年毕业于国内著名的北京师范大学。毕业后,即考取北京大学生命科学学院吴光耀老师的硕士研究生。恰逢赵进东老师回国组建实验室,吴老师为支持年轻人成长,将王东辉转入赵进东老师名下,成为赵老师的学生。硕士毕业后,先是留校在植物生理教研室工作,2001 年转入许智宏老师实验室读在职博士研究生。由于我作为许老师的助手,负责实验室日常的研究工作和其他事务,王东辉的博士论文也就成为我负责管理的“黄瓜单性花发育机制”研究课题的一部分。

在王东辉做博士论文期间,是我们实验室对黄瓜单性花发育机制研究最困惑的阶段。长期以来,黄瓜单性花的形成机制,被认为是植物性别分化/决定的研究系统。北京大学生物系的曹宗巽先生从 20 世纪 50 年代辞去美国大学教职回国之后,就一直以黄瓜为材料开展营养和生殖现象的研究。在 60 年代发展了茎尖培养体系,在三角瓶中研究激素对黄瓜单性花发育的影响,取得很多有趣的结果,并因此在“文革”期间受到不公平的批判。1996 年,许智宏老师在担任中国科学院分管生物和外事的副院长期间,为了推动国内植物生物学的发展,根据国际上植物发育生物学方兴未艾的形势,在国内组织了“攀登计划”项目(后转为 973 计划)。以植物有性生殖为中心,一方面支持国内比较有基础、成体系的研究工作,另一方面扶持刚回国的年轻人。曹先生的黄瓜单性花工作因在当时被认为涉及植物性别分化这样一个基本的科学问题,同时又有长期的工作基础而在被支持之列。我在 1998 年进入北京大学生命科学学院工作之后,受许老师的委托,协助曹先生开展黄瓜单性花发育机制的研究。并在 2000 年曹先生最后一个研究生毕业、且在其 80 高龄实质性退休之后,承担起黄瓜单性花发育机制研究课题的管理工作。

在王东辉进入实验室开始其博士论文工作之前,我们已经完成了黄瓜单性花发育过程的形态学描述,确定单性花在形态学上源自雌、雄蕊原基出现之后,某一类原基发育的停滞;发现停滞发育的原基,无论是雄花的心皮还是雌花的雄蕊,都具有生理上的活性;在雌花雄蕊中观察到的花药原基特异性的 DNA 损伤。在这种情况下,王东辉的博士论文工作从何入手? 最初的策略,是以分离导致雌花雄蕊特异 DNA 损伤的 DNA 酶为切入点。她在最初的工作中,的确发现了在雌花雄蕊 DNA 损伤出现的时期,有组织特异性的 DNA 酶的酶活。可是,当时的质谱技术还不足以检测相关电泳条带中蛋白组分。因此,这一思路无法继续向前推进。在尝试分离与 DNA 损伤相关的雄蕊特异细胞凋亡组分的过程中,王东辉独辟蹊径地以黄瓜原生质体为系统,检测了乙烯对细胞凋亡的影响。她在这个工作中的首创性和在实验设计上的周到,给我留下深刻的印象。在她发现乙烯可以诱导黄瓜原生质体的 DNA 损

伤、乙烯信号相关组分出现基因表达改变之后,又结合实验室当时在其他课题中做的原基特异基因表达分析的方法,发现在黄瓜 6 期之后的雌花雄蕊原基中出现了乙烯受体 *CsETR1* 表达的下调。这一发现不仅为解释过去人们发现的外施乙烯可以促进雌花数量的现象提供了一个分子证据;而且还说明,“乙烯促雌”表象之下,我们所能找到的分子证据,首先是“乙烯抑雄”;更重要的是,为实验室有关黄瓜单性花的研究,尤其是雌花雄蕊发育停滞的分子机制研究提供了一个重要的支点。实验室后来发现的 DNA 酶 *CsCaN* 在转录水平的乙烯诱导和影响雄蕊发育的 B 类基因 *CsAP3* 对 *CsETR1* 的转录调控,都是以王东辉的工作为基础的。不仅如此,这些工作结合对其他植物单性花分子机制的研究结果分析让我最终意识到,单性花是一种促进异交机制,而不是性别分化机制。这一观点向在本领域存在了 80 多年的有关单性花发育机制是植物性别分化机制的观点提出了认真的挑战。

2005 年王东辉博士毕业后,就和我一起分担许老师实验室日常事务的管理工作。我负责研究课题的发展和学生培养,而她负责实验室经费、材料、设备物资等管理。实验室在她的管理下,井井有条。她因此而深得同学的喜爱。我可以一两个月不在实验室而不会影响大家的工作。可是如果她三天不在实验室,那实验室就要开始乱套了。不仅如此,她还发挥自己在做实验方面的天赋,除指导学生学一些实验技术外,而且在很多关键时刻挺身而出,亲自上阵为大家排忧解难,尤其在很多同学束手无策、谈虎色变的原位杂交实验技术方面独树一帜,很多基因的表达模式到她手上都可以做出漂亮的结果,被大家誉为“仙人掌”。从 2015 年暑假以来,应大家的要求,她开设了植物原位杂交技术课程,先后训练了 46 位同学,受到学院老师和同学的欢迎。

基于过去 20 多年在不同特点实验室以及不同特点的课题中摸爬滚打的历练中所积累的经验,以及对当前植物发育生物学研究中所用技术的复杂性和多样性所带来的研究生迫切需要实验指导的体会,王东辉老师撰写了《植物发育生物学常用实验技术》一书。书中所有的实验她都有第一手的经验,很多图都引自我们实验室过去的实验结果。相信这本书对从事植物发育生物学研究的研究生或者青年教师都具有重要的参考价值。

在与王东辉老师共同协助许老师管理实验室的十多年经历中,我深刻体会到,科学研究作为一种社会行为,和人类其他社会行为一样,早已从一种基于个人兴趣的个体行为,发展成为一种基于团队成员分工协同的社会行为。我曾经分析过,探索性研究工作大致可以分为以下几个环节:选择问题(包括读文献、与同行的不同形式交流等)、制定方案,寻找资源、实施方案、总结分享。在当今社会的主流实验室中,实施方案的环节极少有实验室负责人亲力亲为的,多由研究生或者博士后承担。实验室负责人通常负责上述 5 个环节中的另外 4 个。可是,研究资源争取到之后,怎么管理才能最有效地服务于方案实施? 应对研究经费的管理部门的各种检查算不算研究工作的一部分,如果作为实验室负责人的科学家无力承担,谁来承担? 现代生物学研究早已进入以问题为导向的工作模式,为了回答问题,会随时选择不同的技术,那么这种技术层面的探索和关联常常超出实验室负责人的学识范围,而让研究

生来重新学习常常在时间上也不允许,怎么办?显然,研究资源的管理需要专门的能力和经历;应对各种检查,也需不断跟踪和理解日新月异的管理规章;对相关实验技术的了解与关联,也需要专门的经验。作为实验室负责人的科学家也是人,一天也只不过拥有 24 小时的时间。现代科学研究所要处理的信息量显然已经达到了儒勒·凡尔纳撰写《海底两万里》时所设想的尼莫船长恐怕也无法处理的范围。

没有人否认上述的趋势与问题,可是从管理层面上,似乎也没有人在制度上找到一种合适的方法支持这种分工协同,从而让日趋复杂的研究工作更加有效地运行。近年,在与国际接轨的方针指导下,我们国家在实验室组织管理构架上照搬了美国的系统,选择了 PI 制,即由一个教授带一批学生。可是在研究资源配置、经费使用监管和技术设备分享等其他管理方面,并没有引进美国的系统。因此对当下的 PI 而言,不得不花费大量时间应对尚未被“美国化”的管理环节。实在应付不了,只好用研究经费(很多情况下根本没有足够的经费用于此项支出)聘用临时人员参与管理。由于这些临时人员既没有条件也没有义务了解实验室工作的总体情况,常常无法真正融入实验室团队之中,成为团队分工协同的要素之一。在非研究环节的管理尚未被“美国化”的期间,为什么实验方案的实施可以让研究生或博士后来分担,而实验室的资源和技术管理不能由与 PI 共进退的专职人员来分担呢?

以我们实验室这些年的经验来看,王东辉老师在我们团队运行中发挥了不可或缺的作用。我对她在实验室发展中所作的贡献由衷地感激。可是,她的工作却无法得到应有的认可和尊重。这在我看来,不仅对她不公平,而且反映了我们管理部门观念的陈旧、短视与偏见。客观地讲,经过研究生训练的年轻人未必都适合做 PI,有些人就是特别适合做实验室的管理人员。一方面,随着科学研究社会化而出现实验室团队分工协同,出现专职实验室管理人员的需求;另一方面,花费了如此之多的社会资源培养出来的博士中有特别适合从事这一工作的人,现在却因为现行管理体制而无法安心地在这类岗位上工作,不得不流失去做完全不相干的其他工作,或者是因为各种原因留在现行体制内忍气吞声、朝不保夕地做“小媳妇”。为什么不能通过制度的调整,或者用一个时髦的名词,改革,让实际存在的人力资源有效地配置到急需的分工协同岗位上,让纳税人提供的宝贵的研究资源得到更加有效的利用呢?

本来,给一本书做序,无非是为作者评功摆好,希望吸引更多潜在读者的关注。而且,一般写序之人,也多为德高望重或位高权重者。我作为一个和王东辉老师共事多年的普通同事,在业界按现行标准,不过是一个边缘化的平头百姓,为王老师这本非常有分量的书做序,实在有点名不副实,或者狗尾续貂。但一本书有个序,对读者多少总会有所帮助。于是借此机会写点儿真话,希望帮助潜在的读者更好地了解作者;希望以王老师的经历,唤起管理者对研究团队管理体制改革的关注与行动;希望向那些正在实验室管理者或者助理岗位上受到不公正的对待却仍然默默奉献的同行们,表达我由衷的敬意。同时还希望向那些有志于以实验室管理者的角色成为研究团队的一员,参与科学研究的年轻人表达我的个人观点,即

这样的工作具有不可替代的重要性,这是科学作为一种职业发展的必然。如同在其他的工作岗位上一样,只要每个人对自己所选择的职业保有一份敬畏之心,全力以赴地以自己的聪明才智创造性地为这一岗位所占有的资源增值,使自己的工作具有不可替代性,一定能在所在团队的科学探索中作出自己不可或缺贡献的同时,得到同事的认可与尊重。期待我的态度能得到读者的共鸣,从而更加珍惜并更好地使用这本书。

白书农

2016年11月

编者说明

本书由王东辉老师主编,参与编写人员有:安丰英,房昱含,郑亚风,王雅萍,蔺亚男,许聪,申立平,宋巍等。具体分工如下:

北大生命科学学院安丰英老师在酵母单杂、CoIP 和蛋白 Western 方面经验丰富,她编写了这三个方面的实验方案;博士后申立平因为在研究过程中大量的使用 CHIP 实验技术,她编写了 CHIP 实验一节;博士研究生房昱含参与了扫描电镜实验的编写;博士研究生王雅萍编写了 Southern 和 Northern 实验;博士研究生蔺亚男长期使用酵母双杂交实验来验证蛋白之间的互作,所以她负责了这个实验的方案;博士研究生郑亚风长期致力于研究 IAA 对植物生殖细胞发育的影响,对激素定位有独特的研究方法;宋巍同学则负责了石蜡切片和透射电镜实验方案;其他实验则由王东辉老师负责完成。

目 录

| | |
|--------------------------------------|------|
| 第一章 形态观察常用技术方法 | (1) |
| 1-1 植物组织石蜡切片的制作 | (1) |
| 1-2 植物材料半薄切片 | (5) |
| 1-3 透射电子显微镜样品的制备 | (9) |
| 1-4 扫描电子显微镜样品制备及观察 | (15) |
| 第二章 分子水平的检测技术 | (25) |
| 2-1 植物总 RNA 的提取及逆转录 | (25) |
| 2-2 全转录组扩增及目的基因表达水平定量检测 | (28) |
| 2-3 Southern 杂交 | (31) |
| 2-4 Northern 杂交 | (37) |
| 2-5 原位杂交 | (42) |
| 2-6 整体原位杂交 | (48) |
| 2-7 蛋白质印迹法(免疫印迹试验) | (53) |
| 2-8 蛋白免疫定位 | (57) |
| 2-9 ABA 及 IAA 免疫定位实验 | (61) |
| 第三章 蛋白-蛋白、蛋白-基因之间的互作检测技术 | (66) |
| 3-1 染色质免疫共沉淀(ChIP) | (66) |
| 3-2 GST-pull down 技术分析植物蛋白相互作用 | (71) |
| 3-3 酵母单杂交 | (76) |
| 3-4 酵母双杂交 | (79) |
| 3-5 凝胶阻滞实验 EMSA | (83) |
| 3-6 双分子荧光互补技术 | (90) |
| 3-7 Co-IP 检测体内蛋白相互作用 | (95) |
| 第四章 转基因植株及突变体植株的指标检测 | (99) |
| 4-1 T-DNA 插入突变体基因型的鉴定方法 | (99) |

| | | |
|-----|-----------------------------------|-------|
| 4-2 | PEG 介导的拟南芥和水稻叶肉细胞原生质体转化 | (102) |
| 4-3 | 植物发育研究中常用的染色方法 | (106) |
| 4-4 | 拟南芥转基因技术 | (109) |
| 4-5 | 基因枪介导转化法 | (112) |
| 4-6 | 石蜡切片植物组织中 DNA 片段化的 TUNEL 检测 | (116) |
| 4-7 | 体外磷酸化实验 | (120) |

第一章 形态观察常用技术方法

1-1 植物组织石蜡切片的制作

【实验目的】

1. 掌握植物组织石蜡切片的制样方法；
2. 学习观察光学显微镜下的细胞形态与结构。

【实验原理】

石蜡切片是生物形态学观察中应用最广泛的技术,样品经过固定后,用乙醇逐级脱水,再用二甲苯取代乙醇进行透明,最后通过浸蜡使样品最终包埋到纯石蜡里,经简单修块后即可进行切片。切出带有样品的蜡带经过后续的脱蜡、复水、染色后,即可使用光学显微镜观察。如果想要长期保存,还可以制成永久切片。

石蜡切片虽然步骤较为烦琐,但原理简单,切片厚度较薄,并且可以连续切片,因此,一直是植物细胞形态学常用的方法。通常良好的制样与染色方法再加上高分辨率的光学显微镜,可以观察到细胞许多细微的结构。

【试剂与器材】

一、试剂

1. 固定液:

(1) FAA 固定液: 乙醇 50 mL,冰醋酸 5 mL,37%甲醛溶液(市售福尔马林)10 mL,用水定容至 100 mL。Triton X-100 50 μ L,加入 Triton X-100 可以增加渗透性,可根据自己的材料决定是否添加。

(2) 卡诺氏(Carnoy's)固定液: 无水乙醇与冰醋酸以 3:1 配制,现配现用。

2. 染液:

(1) 1%甲苯胺蓝染液: 甲苯胺蓝 1 g,溶于 100 mL 水。

(2) 1%番红染液: 番红 1 g,溶于 100 mL 80%乙醇。

(3) 0.5%固绿染液: 固绿 0.5 g,溶于 100 mL 95%乙醇。

(4) 0.5%伊红染液: 伊红 0.5 g,溶于 100 mL 95%乙醇。