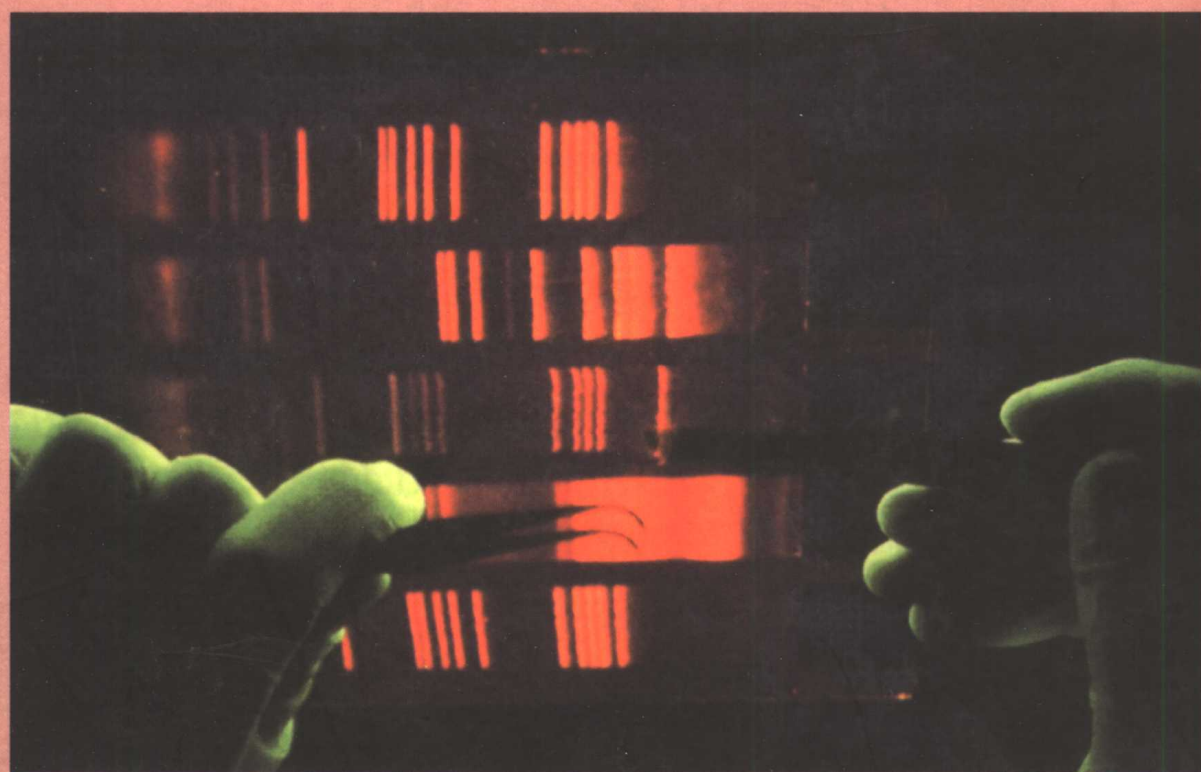


现代生物技术译丛

植物分子生物学实验指南

Methods in Plant Molecular Biology:
A Laboratory Course Manual



〔美〕 P. 马利加

D.F. 克莱森

W. 格瑞森姆

A.R. 卡什莫尔 A.R. 瓦尔纳

科学出版社

内 容 简 介

本书内容包括基因导入的物理、化学、生物方法,植物组织的蛋白质及RNA的检测与定位技术,基因组的足迹、脉冲电泳以及酵母染色体分析技术,叶绿体基因的转录活性测定及向叶绿体引入蛋白质技术,研究DNA/RNA与蛋白质相互作用的UV交联分析法、迁移率变动分析法、甲基化干扰法、原位杂交法以及研究DNA结合蛋白的磷酸化的实验技术等等。这些技术中的大多数是在国内中文版的植物分子生物学实验书中少见的,具有很高的参考和使用价值。

Pal Maliga, Daniel F. Klessig, Anthony R. Cashmore, Wilhelm Gruissem, Joseph E. Varner
Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995

图字 01-1999-2148

图书在版编目(CIP)数据

植物分子生物学实验指南/[美]马利加(Maliga, P.)等著;刘进元等译.
-北京:科学出版社,2000.2
(现代生物技术译丛)
ISBN 7-03-007777-6

I. 植… II. ①马… ②刘… 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(1999)第34625号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2000年2月第一次印刷 印张:19 插页:2
印数:1—3 000 字数:409 000

定价:45.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换‘新欣’)

译者序

植物在吸进二氧化碳制造碳水化合物供人类利用的同时，放出氧气，支撑着人类的生命活动。在分子水平上了解植物生长发育、衰老病死等生命现象，从而能动地改造植物使之更好地为人类服务是人类永恒的研究主题。在有了一个很好的研究主题之后，获得一本反映当前世界先进水平、实用可行的实验指导书对研究者来说也是至关重要的。在科学出版社的组织下，我们翻译了这本由活跃在国际分子生物学研究中心——美国冷泉港实验室（Cold Spring Harbor Laboratory）的著名学者所编写的《植物分子生物学实验指南》，奉献给国内同行，以期对我国植物分子生物学研究的进一步深入做出贡献。

正如前言中指出的那样，本书涵盖了一系列植物科学前沿理论和分子生物学实验技术。所编入的许多实验如基因转录活性测定、核酸与蛋白质相互作用的 UV 交联分析、迁移率变动分析、甲基化干扰分析以及基因组的足迹、脉冲电泳和酵母人工染色体分析技术等等都是在现有中文分子生物学实验书中很难找到的内容；并且每个实验程序都配有注意事项和完整的参考文献，便于读者寻根求源深入了解每一个细节。当前我国植物分子生物学研究正在向基因调控和功能分析迈进，相信该书中文版的问世，会对这方面的研究有所启发和帮助。

在翻译过程中，我们力求既忠实于原文，又符合中文的规范表达，使译文通俗易懂；对文中的名词术语则按全国自然科学名词审定委员会审定的名词术语予以统一；对书中的一些明显笔误及某些编辑疏忽经查证后都做了一一更正。然而由于水平有限，经验不够，错误与缺点在所难免，敬请广大读者和专家指正赐教。

刘进元 吴庆余

1999 年 6 月于清华园

前 言

从1981年起,冷泉港实验室每年夏季都开设为期3周的植物分子与发育生物学课程,这本手册就是为该课程学员所编写的实验方法的选集。本书的作者都是曾多年承担该课程的教师,他们是:Pal Maliga (1989~1992), Joseph Varner (1989~1991), Wilhelm Gruissem (1989~1990), Daniel Klessig (1991~1992) 和 Anthony Cashmore (1992)。该课程最初由 Frederick Ausubel (1981~1982), John Bedbrook (1981~1982) 创建,以后由 Ian Sussex (1983~1988), Russel Malmberg (1983), Joachim Messing (1984~1988) 和 Rober Horsch (1984, 1986, 1987) 主持一直延续至今。从一开始起,该课程一直都得到国家科学基金的资助。

该课程内容涵盖了一系列植物科学前沿理论和分子生物学实验技术。在实验课上教授们演示了多种植物分子生物学领域最重要的实验方法,并手把手地传授给学员们。考虑到一些学员可能仅有有限的分子生物学的实验研究经历,为此我们准备了尽可能详细、可行的实验方案。本手册精选了每一个既详细阐明其主要操作过程,又最富有成功率的实验方案,这正好反映出本培训班的“实用、可行”的宗旨。

课程的每一实验方案都由教授该实验的教师亲自编写,结果是多年来教授相同实验的不同专家都分别编写了相似的实验方法,我们不得不对它们做出艰难的选择。在出现两个基本相同的实验程序时,我们选择了决定出版该手册当时正在承担实验指导的教师所编写的方案。这就是为何 Ken Keegstra, Chris Sommerville 和 Sue Gibson 编写的章节未编入本书的原因,虽然他们授课时所提出和修改的一些实验方法后来仍然被其他教师继续采用。我们愿借此机会感谢他们和全体其他特邀教师对该课程做出的贡献,感谢所有为培训新一代植物科学家做出奉献的教授们。还要感谢冷泉港实验室的同事们多年来对该课程的支持,当课程授课急需使用他们的仪器设备时,同事们自己的研究工作常常只好暂停下来。

还要感谢冷泉港实验室出版社的员工们,特别要感谢的是: Nancy Ford 和 John Inglis 一直没有忘记汇总实验手册的任务; Maryliz Dickerson, Dorothy Brown, Lee Martin 和 Joan Ebert 提供了出色的编辑和技术协助。还要感谢 Catriona Simpson, 她细致的编辑使本手册更易被掌握,她对本书的编辑工作付出了极大的耐心和支持。

编 者

(吴庆余译 唐莉校)

编 著 者 名 录

- Bell, Callum J., Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia. *Present Address:* Division of Genetics, Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania
- Carrasco, Pedro, Department of Plant Biology, University of California, Berkeley. *Present Address:* Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, Spain
- Cashmore, Anthony R., Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia
- Cutt, John R., Schering-Plough Research, Kenilworth, New Jersey
- Deng, Xing-Wang, Department of Plant Biology, University of California, Berkeley. *Present Address:* Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut
- Dixon, David C., U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center, New Orleans, Louisiana
- Dunn, Patrick J., Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia
- Ecker, Joseph R., Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia
- Gruissem, Wilhelm, Department of Plant Biology, University of California, Berkeley
- Hajdukiewicz, Peter, Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway
- Klessig, Daniel F., Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway
- Klimczak, Leszek J., Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia
- Lamppa, Gayle K., Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Illinois
- Lu, Meiqing, Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia
- Lucas, William J., Section of Plant Biology/DBS, University of California, Davis
- Maliga, Pal, Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway
- Manzara, Thianda, Laboratory for Molecular Biology, Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago
- Matalana, Emilia, Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia. *Present Address:* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universitat de Valencia, Spain

McCarty, Donald R., Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville

Morgan, Michael K., Plant Gene Expression Center, U.S. Department of Agriculture and University of California at Berkeley, Albany

Ow, David W., Plant Gene Expression Center, U.S. Department of Agriculture and University of California at Berkeley, Albany

Rosenkrans, Leonard, Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville

Schindler, Ulrike, Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia. *Present Address:* Tularik, Inc., South San Francisco, California

Schuster, Gadi, Department of Plant Biology, University of California, Berkeley. *Present Address:* Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Stark, Kenneth, Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia. *Present Address:* Pennsylvania College of Optometry, Philadelphia

Svab, Zora, Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway

van der Schoot, Chris, Section of Plant Biology/DBS, University of California, Davis. *Present address:* Agrotechnological Research Institute (ATO-DLO), Wageningen, The Netherlands

Varner, Joseph E., Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri

Vasil, Indra K., Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville

Vasil, Vimla, Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville

Ye, Zheng-Hua, Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri

目 录

译者序

前 言

编著者名录

第一章

聚乙二醇介导的烟草叶肉原生质体的转化：一个研究 Cre 与 *lox* 重组的实验 … (1)

Michael K. Morgan 和 David W. Ow

1. 导论 … (1)
2. 原生质体的制备 … (7)
3. 聚乙二醇介导的转化 … (8)
4. 荧光酶分析 … (9)
5. 培养基的配制 … (10)
6. 试剂的配制 … (11)

第二章

利用在玉米原生质体内的瞬时表达对一个植物转录因子进行功能分析 … (13)

Leonard Rosenkrans, Vimla Vasil, Indra K. Vasil 和 Donald R. McCarty

1. 导论 … (13)
2. 玉米悬浮培养细胞的维持培养 … (16)
3. 原生质体的制备 … (16)
4. 电击实验 … (17)
5. β -葡糖苷酸酶 (GUS) 的荧光测定 … (19)
6. 培养基的制备 … (20)
7. 试剂的配制 … (22)

第三章

用基因枪转化法将抗药基因导入烟草细胞 … (24)

Pal Maliga

1. 导论 … (24)
2. 待转化烟草 XD 细胞的制备 … (30)
3. 外被 DNA 钨粉微粒的制备 … (30)
4. 用 PDS-1000/He 型基因枪转化法将 DNA 导入烟草 XD 细胞 … (31)
5. β -葡糖苷酸酶 (GUS) 瞬时表达分析 … (32)
6. 抗卡那霉素细胞系的选择 … (33)
7. 培养基的制备 … (34)
8. 试剂的配制 … (35)

第四章

烟叶盘片和农杆菌 pPZP 二元载体共培养构建转基因烟草植株 … (37)

Zora Svab, Peter Hajdukiewicz 和 Pal Maliga

1. 导论	(37)
2. 利用三亲杂交将 pPZP 二元载体导入农杆菌	(43)
3. 烟叶盘片和农杆菌的共培养及抗性芽的鉴定	(45)
4. β -葡糖醛酸酶 (GUS) 的组织化学鉴定	(47)
5. 转基因烟草幼苗中具有抗生素抗性表型植株的测试	(48)
6. 培养基的配制	(50)
7. 试剂的配制	(52)
第五章	
组织印迹法检测植物组织中的蛋白质和 RNA	(53)
Joseph E. Varner 和 Zheng-Hua Ye	
1. 导论	(53)
2. 组织印迹的 Western 杂交	(56)
3. 组织印迹的 Northern 杂交	(57)
4. 试剂的配制	(59)
第六章	
固定和包埋植物组织中蛋白质的免疫定位	(62)
David C. Dixon 和 Daniel F. Klessig	
1. 导论	(62)
2. 植物组织的甲醛固定和包埋	(66)
3. 包埋植物组织的切片和封固	(68)
4. 免疫染色	(69)
5. 试剂的配制	(71)
第七章	
用于检测植物组织 RNA 的原位杂交法	(73)
David C. Dixon, John R. Cutt 和 Daniel F. Klessig	
1. 导论	(73)
2. 组织切片制备	(79)
3. RNA 探针的合成	(80)
4. 组织的预杂交处理	(84)
5. 杂交	(85)
6. 杂交后洗涤	(86)
7. 放射自显影	(87)
8. 染色	(88)
9. 试剂的配制	(89)
第八章	
向离体叶绿体内引入蛋白质	(92)
Gayle K. Lamppa	
1. 导论	(92)
2. 体外转录	(98)

3. 在兔网织红细胞裂解液中进行体外翻译	(100)
4. 叶绿体的提取	(101)
5. 叶绿体中蛋白的引入	(103)
6. 引入产物的 SDS-PAGE 分析	(105)
7. SDS-聚丙烯酰胺凝胶的放射自显影处理	(107)
8. 膜组分和内腔可溶性组分中放射性标记蛋白的量化	(108)
9. 完整叶绿体的快速提取	(108)
10. 试剂的配制	(109)
第九章	
显微注射与植物顶端组织发育模式的研究	(113)
Chris van der Schoot 和 William J. Lucas	
1. 导论	(113)
2. 组织制备	(119)
3. 显微注射与染料偶联实验	(120)
4. 试剂的配制	(122)
第十章	
叶绿体连缀转录：叶绿体基因转录活性的测定	(124)
Xing-Wang Deng 和 William Gruissem	
1. 导论	(124)
2. 从菠菜中分离完整的叶绿体	(127)
3. 连缀转录	(129)
4. 通过杂交定量连缀转录水平	(131)
5. 试剂的配制	(132)
第十一章	
叶绿体 RNA 的体外加工与用紫外交联分析 RNA-蛋白质的相互作用	(136)
Gadi Schuster 和 Wilhelm Gruissem	
1. 导论	(136)
2. RNA 的合成	(140)
3. 叶绿体 mRNA 3'末端的体外加工	(142)
4. 蛋白质与 RNA 的交联	(144)
5. 试剂的配制	(147)
第十二章	
与 DNA 结合蛋白相作用的启动子序列的鉴定	(152)
Thianda Manzara 和 Wilhelm Gruissem	
1. 导论	(152)
2. 番茄子叶细胞核的分离提取	(158)
3. 核抽提物的制备	(159)
4. DNA 片段的标记	(160)
5. 迁移率变动分析法	(163)

6. DNase I 足迹分析法	(165)
7. 试剂的配制	(168)
第十三章	
测定蛋白质与 DNA 结合位点的电泳迁移率变动分析法	(172)
Ulrike Schindler 和 Anthony R. Cashmore	
1. 导论	(172)
2. 放射性标记 DNA 探针的制备	(178)
3. 蛋白质与 DNA 结合反应	(180)
4. 非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备	(181)
5. 试剂的配制	(182)
第十四章	
甲基化干扰法鉴定与蛋白结合的 DNA 位点	(185)
Ulrike Schindler 和 Anthony R. Cashmore	
1. 导论	(185)
2. 放射性标记 DNA 探针的制备	(190)
3. 甲基化反应	(190)
4. 蛋白/DNA 结合反应	(191)
5. 放射性标记 DNA 带的洗脱	(193)
6. DNA 片段的切割和变性 PAGE 分析	(194)
7. 试剂的配制	(196)
第十五章	
用原位筛选法分离编码序列特异性 DNA 结合蛋白的 cDNA	(198)
Ulrike Schindler 和 Anthony R. Cashmore	
1. 导论	(198)
2. 放射性标记 DNA 探针的制备	(204)
3. 大肠杆菌感受态细胞的制备	(204)
4. 大肠杆菌的感染和蛋白合成的诱导	(204)
5. 变性、复性和封闭	(206)
6. 结合反应	(207)
7. 阳性噬菌斑的鉴定	(207)
8. 第二和第三轮筛选	(208)
9. 培养基的配制	(209)
10. 试剂的配制	(210)
第十六章	
DNA 结合蛋白的磷酸化研究	(212)
Leszek J. Klimeczak 和 Anthony R. Cashmore	
1. 导论	(212)
2. 磷酸化化学计量的确定及磷蛋白形成动力学的测定	(216)
3. 用放射性标记的磷蛋白和非标记的 DNA 探针进行迁移率变动分析：磷酸化	

蛋白与 DNA 的结合	(219)
4. 用非标记的磷蛋白和放射性标记的 DNA 探针进行迁移率变动分析：磷酸化	
蛋白与 DNA 的结合	(220)
5. 生化计算举例	(223)
6. 试剂的配制	(224)
第十七章	
用连接介导 PCR 进行体内基因组足迹分析：比较在黑暗和光照条件下生长的番	
茄幼苗的 <i>RbcS3B</i> 启动子活性	(227)
Pedro Carrasco 和 Wilhelm Gruissem	
1. 导论	(227)
2. 番茄幼苗子叶的 DMS 处理	(232)
3. 基因组 DNA 的小量制备	(232)
4. 基因组 DNA 的体外甲基化	(234)
5. 用哌啶进行甲基化 DNA 的化学裂解	(235)
6. 第一链的合成	(235)
7. 接头-引物连接反应	(236)
8. PCR 扩增	(237)
9. DNA 的标记和最终 PCR 循环	(238)
10. 凝胶序列分析	(240)
11. 预期结果	(241)
12. 试剂的配制	(241)
第十八章	
脉冲场凝胶电泳和酵母人工染色体解析拟南芥基因组	(245)
Callum J. Bell, Emilia Matallana, Patrick J. Dunn, Meiqing Lu, Kenneth Stark 和 Joseph R. Ecker	
1. 导论	(245)
2. 酵母 DNA 的微量制备	(252)
3. 大肠杆菌质粒拯救法制备 YAC 插入片段的末端序列	(253)
4. 用反向 PCR 回收 YAC 插入片段末端序列	(256)
5. 用 PCR 筛选 YAC 文库的序列标志位点	(260)
6. 筛选用于菌落杂交的 YAC 文库	(263)
7. 用琼脂糖包埋法制备酵母大分子量 DNA	(267)
8. 钳位均匀电场电泳分析 YACs	(268)
9. 杂交筛选 YAC 文库	(269)
10. 培养基的配制	(271)
11. 试剂的配制	(272)
附录 1 转基因植物试验规则	(277)
附录 2 材料来源和设备供应商	(278)
索引	(283)

第一章 聚乙二醇介导的烟草叶肉原生质体的转化： 一个研究 Cre 与 *lox* 重组的实验

1. 导 论

本章介绍了核酸转化植物叶肉原生质体及分析所编码蛋白瞬时表达的实验程序。虽然在多数情况下应用稳定转化材料可能更好些，但向植物原生质体瞬时导入外源大分子，可以更快地对被导入材料的生物学活性进行分析。瞬时检测手段具有易操作性，例如可利于鉴定启动子区的顺式作用调节序列（参见 Ebert et al. 1987; Ellis et al. 1987; Ow et al. 1987），比较不同启动子间的转录强度（见 Fromm et al. 1985; Boston et al. 1987; Hauptmann et al. 1987），以及研究环境因子对基因表达的影响（见 Howard et al. 1987; Marcotte et al. 1988）。在 RNA 分子转化细胞的实验中，瞬时检测方法在确定信使 RNA 和病毒 RNA 的有效成熟、稳定性和翻译的顺式调控方面已取得了显著的进展（参见 Callis et al. 1987; Gallie et al. 1989）。最近在进行转录因子分析的实验中，蛋白质已被瞬时导入到植物细胞中（Katagiri and Chua 1992）。本章将在对转基因植物中 DNA 分子的生物学活性的检测进行介绍的同时，为大家提供一个稳定转化和瞬时导入相结合的应用范例。

聚乙二醇介导的转化

将 DNA 转入植物细胞有很多方法（参见 Potrykus 1991 的综述）。其中的聚乙二醇（PEG）介导的转化常用于建立稳定转化和基因的瞬时表达研究（Krens et al. 1982, Paszkowski et al. 1984; Shillito et al. 1985）。PEG-介导的转化具有一些优点。首先，在达到最大的基因瞬时表达条件时，被转化细胞的存活率和细胞分裂速率很高（Negrutiu et al. 1990）；其次，PEG-介导的转化所用的材料和仪器较常规和便宜；最后，进一步的研究证明这种简单可靠的方法广泛适用于各种可制备原生质体的植物和组织。这里，本操作方法是研究烟草（*Nicotiana tabacum*）叶肉原生质体基因组中已转入基因结构内的位点特异重组而设计的。

实验设计

本实验的目的在于检测转化 DNA 所引起的烟草基因组的重组事件。作用于特异位点的重组酶是一个分子量为 38.5 的噬菌体 P1 *cre*（control of recombination，由“重组控制”一词的第一二个字母组成——译者注）基因的表达产物，它催化 *lox*（locus of cross [x] over）位点处 34 个碱基序列间的重组。正如早先指出的那样，这种特异性位点重组系统能介导植物细胞 DNA 的切除、倒位和共整合（Dale and Ow 1990, 1991; Odell et al. 1990）。本实验中重组酶的作用目标是由农杆菌（*Agrobacterium*）介导转化并稳定地整合进烟草基因组的一段 DNA-pED32（Dale and Ow 1990）。这一结构由一个花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子（35S）和萤火虫荧光酶的 cDNA（*luc*）和胭脂碱合酶的多聚腺苷酸区

(*nos3'*) 的融合片段 (*luc-nos3'*) 组成。但 *luc-nos3'* 片段与 35S 启动子方向相反 (如图 1.1 所示)。这一片段的一侧与 *lox* 位点在一端相接, 但方向是相反的。*luc* cDNA 的转录则需要通过在 *lox* 序列相邻片段的重组即 *luc-nos3'* 倒位。而倒位所必需的重组酶则由 pMM23——35S-*cre-nos3'* 结构中的 *cre* 基因的瞬时表达来提供。这一个嵌合 *cre* 基因除了其原核的核糖体结合位点被移去外, 与早先的 pED23 (Dale and Ow 1990) 是相同的。由 pMM23 所产生的 Cre 重组酶必须进入到植物细胞核中去催化特异部位的反转, 这种倒位能够根据荧光酶的活性 (光产量) 来评定。DNA 转化效率能够用一个 *luc* 表达质粒如 pDO432 (阳性对照) 来评估 (Ow et al. 1986)。近期的有关于 *luc* 标记基因的综述参见 Millar et al. (1992)。

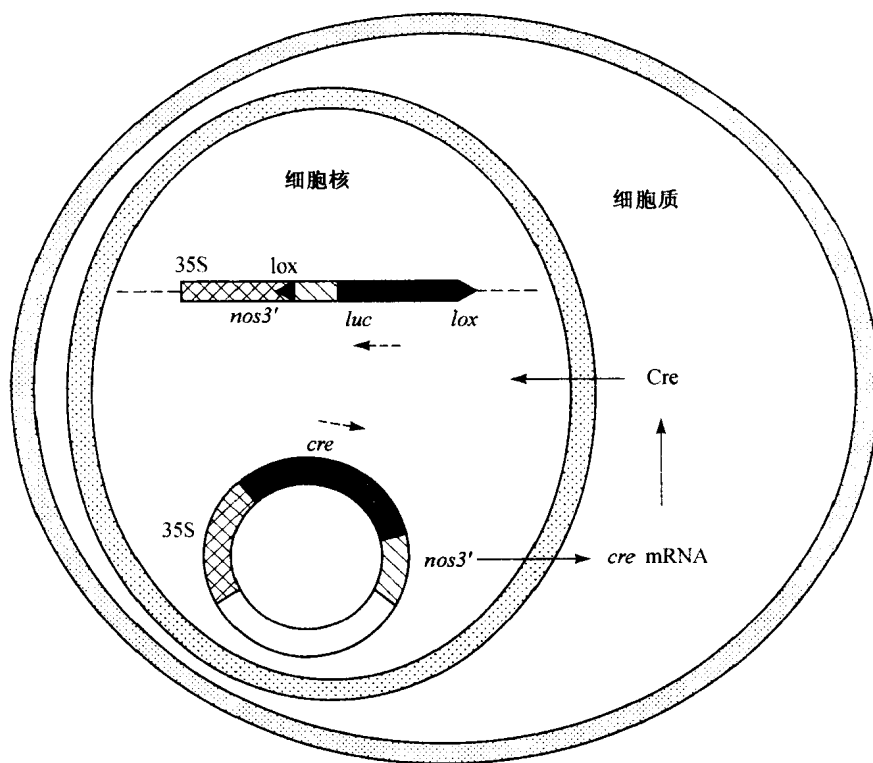


图 1.1 在植物基因组中 Cre 介导的 *cre* 基因 DNA 特异部位倒位。由转化 DNA 表达的 Cre 重组酶快速作用于已整合的能产生荧光酶活性 *luc* 基因的编码区域

表 1.1 显示了一个典型实验的数据, 在未加入 *cre* 表达质粒的情况下, 来自两个独立转基因烟草株系 (nt35.9 和 nt35.10) 的叶片叶肉原生质体, 由于整合的是反向的荧光酶基因结构, 几乎没有荧光酶的产生。这些数值仅比提取缓冲液本底水平或者没有转基因的野生型烟草的原生质体检测值高 3~4 倍。若在转化液中加入 *cre* 表达质粒, 其荧光酶的活性增加了 100 多倍, 表明 Cre 重组酶能够穿入植物细胞核并催化植物染色体 DNA 重组。这一实验原本是打算在进行稳定转化实验之前来检测原核蛋白进入核的能力 (Dale and Ow 1991), 那么既然实验证明这种分析方法是有效的, 将来也可能应用这种瞬时测定方法来分析在离体条件下改造了的非 *cre* 编码序列。

表 1.1 Cre 诱导的植物染色体 DNA 倒位

转基因的 <i>luc</i> 植株	转化 DNA ¹	光单位 ²	相对活性
nt35.9	载体	820	1
nt35.9	载体 + 10 μ g pMM23	1.14×10^5	139
nt35.10	载体	1190	1
nt35.10	载体 + 10 μ g pMM23	1.57×10^5	132

¹ 用 100 μ g 小牛胸腺 DNA 载体和 10 μ g pMM23 表示转化约 2×10^6 个原生质体。

² 转化 26 小时后制备提取液，每次提取都用荧光酶提取缓冲液调至 1ml 的总体积。将 100 μ l 提取液与 100 μ l 的荧光酶反应缓冲液混合，然后加入 100 μ l 0.5mmol/L 的 D-荧光素，以集成的方式作 30 秒光发射的计数，取 3 次读数的平均值，空白（只有提取缓冲液）的基线数为 279 光单位。

操作方法对其他系统的应用

为了使这里介绍的操作方法适用于其他系统，有必要改变一些操作步骤。

- 植物组织取材和原生质体制备方法可能会影响转化过程（Negrutiu et al. 1987, 1990）。有的学者提出，在分离原生质体操作中，用温和的条件进行较长时间（如过夜）的细胞壁消化，转化实验的结果会更好（Negrutiu et al. 1990）。关于原生质体分离方法的改进，请参见 Potrykus 和 Shillito（1986）的文献。
- 一些研究者指出，热激处理可以增加某些系统的瞬时表达水平（Oliveiria et al. 1991），但在另一些系统中却降低了表达水平（Negrutiu et al. 1990）。可以分别采取简短的热处理和不用热处理进行转化试验。
- 当 DNA 被用于转化过程，质粒模板的拓扑结构（环状与线状 DNA 比例）也会影响表达水平（Ballas et al. 1988），如果质粒是线性的，在远离基因 3'端的位点断裂会增强基因的表达水平（Negrutiu et al. 1990）。
- 慎重调制 PEG 溶液中的二价阳离子是另一项具有不同效果的试验。Negrutiu（1990）提出，用 Ca^{2+} 取代 Mg^{2+} 可产生更高的瞬时表达水平，二价离子的浓度在 5 ~ 15mmol/L 范围可使细胞的存活与 DNA 吸收达到很好的平衡。
- 最后应该试验不同 PEG 的浓度和处理时间，另外 PEG 来源和分子量也是重要的，对较脆弱的原生质体的制备应用分子量高达 4000 或者甚至高达 8000 的 PEG 最合适（Negrutiu et al. 1987）。

致 谢

我们感谢 R. Shillito 和 H. Albert 为本章提出的有价值的建议。

参 考 文 献

- Ballas, N., N. Zakai, D. Friedberg, and A. Loyter. 1988. Linear forms of plasmid DNA are superior to supercoiled structures as active templates for gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **11**: 517-527.
- Boston, R.S., M.R. Becwar, R.D. Ryan, P.B. Goldsbrough, B.A. Larkins, and T.K.

- Hodges. 1987. Expression from heterologous promoters in electroporated carrot protoplasts. *Plant Physiol.* **83**: 742-746.
- Callis, J., M. Fromm, and V. Walbot. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**: 1183-1200.
- Dale, E.C. and D.W. Ow. 1990. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* **91**: 79-85.
- . 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 10558-10562.
- Ebert, P.R., S.B. Ha, and G. An. 1987. Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 5745-5749.
- Ellis, J.G., D.J. Llewellyn, J.C. Walker, E.S. Dennis, and W.J. Peacock. 1987. The *ocs* element: A 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. *EMBO J.* **6**: 3203-3208.
- Fromm, M., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5824-5828.
- Gallie, D.R., W.J. Lucas, and V. Walbot. 1989. Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* **1**: 301-311.
- Hauptmann, R.M., P.O. Akins, V. Vasil, Z. Tabaeiuzadeh, S.G. Rogers, R.B. Horsch, I.K. Vasil, and R.T. Fraley. 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Cell Rep.* **6**: 265-270.
- Howard, E.A., J.C. Walker, E.S. Dennis, and W.J. Peacock. 1987. Regulated expression of an alcohol dehydrogenase 1 chimeric gene introduced into maize protoplasts. *Planta* **170**: 535-540.
- Katagiri, F. and N.-H. Chua. 1992. Plant transcription factors: Present knowledge and future challenges. *Trends Genet.* **8**: 22-27.
- Krens, F.A., L. Molendijk, G.J. Wullems, and R.A. Schilperoort. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**: 72-74.
- Marcotte, W.R., Jr., C.C. Bayley, and R.S. Quatrano. 1988. Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* **335**: 454-457.
- Millar, A.J., S.R. Short, K. Hiratsuka, N.-H. Chua, and S.A. Kay. 1992. Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **10**: 324-337.
- Negrutiu, I., R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini, and F. Sala. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **8**: 363-373.
- Negrutiu, I., J. Dewulf, M. Pietrzak, J. Botterman, E. Rietveld, E.M. Wurzer-Figurelli, D. Ye, and M. Jacobs. 1990. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. II. Transient expression vs. stable transformation—Analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. *Physiol. Plant* **79**: 197-205.
- Odell, J., P.G. Caimi, B. Sauer, and S.H. Russell. 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 369-378.
- Oliveiria, M.M., J. Barroso, and M.S.S. Pais. 1991. Direct gene transfer into *Actinidia deliciosa* protoplasts: Analysis of transient expression of the CAT gene using TLC autoradiography and a GC-MS-based method. *Plant Mol. Biol.* **17**: 235-242.
- Ow, D.W., J.D. Jacobs, and S.H. Howell. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by the use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 4870-4874.

- Ow, D.W., K.V. Wood, M. DeLuca, J.R. de Wet, D.R. Helinski, and S.H. Howell. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856–859.
- Paszkowski, J., R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn, and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**: 2717–2722.
- Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 205–255
- Potrykus, I. and R.D. Shillito. 1986. Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol.* **118**: 549–578.
- Shillito, R.D. and M.W. Saul. 1988. Protoplast isolation and transformation. In *Plant molecular biology: A practical approach* (ed. C.H. Shaw), pp. 161–186. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Shillito, R.D., M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller, and I. Potrykus. 1985. High efficiency gene transfer to plants. *Biotechnology* **3**: 1099–1103.

• 时间表

聚乙二醇介导的烟草叶肉原生质体的转化

步 骤	需要时间
原生质体的制备	
从种子开始烟草植株的培育	5 ~ 7 周
酶解缓冲液的制备	1 小时
用于制备原生质体的叶片处理	1 小时
叶片酶解、保温过夜	14 ~ 18 小时
继续酶解叶梗（如果必要）	1 ~ 3 小时
收集和清洗原生质体	2 小时
用聚乙二醇进行的转化	
原生质体计数与转化样品的制备	1 小时
转化	1 小时
收集原生质体并悬浮于 K_3AM 液中	30 分钟
培养原生质体用于瞬间表达分析	16 ~ 24 小时
收集并冻融原生质体裂解液	1 小时
荧光酶活测定	
分析荧光酶活性来定量转化效果	1 小时