

# 农业生物技术的 原理与方法

编著人 叶承道 方光华 刘家森 编著



上海科学技术出版社

# 农业生物技术的原理与方法

褚启人 叶承道 编 著  
方光华 刘家森

上海科学技术出版社

(沪)新登字 108 号

**农业生物技术的原理与方法**

褚启人 叶承道 方光华 刘家森 编著

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路 450 号)

安徽休宁印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 25.5 字数 673,000

1994 年 3 月第 1 版 1994 年 3 月第 1 次印刷

印数 1-1500

ISBN7-5323-3181-4/S·345

定价:23.00 元

## 前 言

这本书的出版，一方面是作者内心的推动：七十年代末，作者就潜心翻译了《遗传的结构与功能》一书，目的是介绍当时国外分子生物学的研究进展，对学习分子生物学的热潮起了推波助澜的作用。时隔十年，生物技术已成为当今世界上高新技术的重要组成部分，它对品种改良、资源、能源、环境健康及产业调整起着作用，蕴藏着巨大的生命力。基因载体、基因表达及调控的研究已取得了长足的进展。很有必要再全面地介绍这一领域的研究近况。另一方面，是应读者的要求，需要有一本植物分子生物学手册，在进行实验时对技术的细节可备查阅。

本书分两大部分，第一部分为第一章至十二章，综述了植物分子生物学的最新研究进展，系统介绍了高等植物的基因转移载体，禾谷类作物外源基因直接导入及表达，农杆菌转染在植物分子生物学中的应用，植物基因的分子结构及其调控，细胞分裂素对大分子合成及基因表达的调控，植物基因表达的光调控，转座子的遗传操作，种子蛋白的基因工程，植物基因工程与农作物改良，限制性片段长度多态性在植物品种改良中的作用。

第二部分自十三章至二十二章，介绍了有关技术的最新实验方法。如用根癌农杆菌Ti质粒和发根农杆菌Ri质粒转化植物细胞，DNA介导基因转移法转化植物细胞的技术，植物的核酸分离方法，DNA酶切及Southern杂交分析技术，植物基因组成及其表达分析，大肠杆菌、质粒及噬菌体的遗传操作方法，RNA的制备与分析，构建重组DNA文库及重组DNA文库的筛选等。目的在于使读者对生物技术有个全面的了解。

限于篇幅，本书参考文献从略。

香港大地原产社赞助本书的出版，蒋君达、王五一、杨竹平、范惠琴、陈全庆、张建军、张智奇、王炜等同志参加了本书部分章节的写作，席佩君同志打印了初稿，顾福庆同志绘制了简图，在此一并致谢。

限于水平，不当之处在所难免，望读者不吝赐教。

作 者

1993年1月于上海

# 目 录

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 第一章 植物分子生物学浅说.....        | 1  |
| 一、核基因组.....               | 3  |
| 二、核基因的表达.....             | 6  |
| 三、转录.....                 | 7  |
| 四、RNA的加工.....             | 9  |
| 五、转译.....                 | 11 |
| 六、转译后的修饰和包装.....          | 13 |
| 七、发育过程中基因表达的调控.....       | 15 |
| 八、叶绿体的生物合成.....           | 17 |
| 九、线粒体基因组.....             | 22 |
| 十、结论.....                 | 24 |
| 第二章 高等植物的基因转移载体.....      | 25 |
| 一、农杆菌的生物学及致瘤特性.....       | 25 |
| 二、冠瘿瘤诱导及DNA转移的分子生物学.....  | 27 |
| 三、转移DNA (T-DNA) 区.....    | 29 |
| 四、致病区 (Vir).....          | 32 |
| 五、T-DNA转移的机理.....         | 34 |
| 六、转化初期的分子动向.....          | 34 |
| 七、T-DNA加工.....            | 36 |
| 八、T-DNA与植物DNA连接点序列分析..... | 38 |
| 九、T-DNA在植物基因组内定位和结构.....  | 39 |
| 十、农杆菌质粒作为转化载体.....        | 39 |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 十一、非致瘤Ti质粒载体的基本组分              | 39        |
| 十二、非致瘤植物转化载体                   | 40        |
| 十三、顺向载体 (cis)                  | 40        |
| 十四、反向载体 (Trans)                | 42        |
| 十五、特殊用途的转化载体                   | 48        |
| 十六、农杆菌Ti质粒载体系统的选用              | 50        |
| 十七、顺向型与反向型载体比较                 | 50        |
| 十八、Vir 基因、25bp 重复序列和寄主范围       | 51        |
| 十九、鉴别转化植物细胞的可选择和可筛选标记基因        | 53        |
| 二十、外源基因克隆到植物转化载体               | 53        |
| 二十一、农杆菌载体的应用                   | 56        |
| <b>第三章 禾谷类作物外源基因的直接导入及表达</b>   | <b>58</b> |
| 一、聚乙二醇法 (PEG)                  | 60        |
| 二、电穿孔法 (electroporation)       | 61        |
| 三、注射法 (injection)              | 63        |
| 四、粒子轰击法 (particle bombardment) | 64        |
| <b>第四章 农杆菌转染在植物分子生物学中的应用</b>   | <b>67</b> |
| 一、农转染                          | 67        |
| 二、农转染方法和优点                     | 69        |
| 三、农转染法的应用潜力                    | 72        |
| 四、前景                           | 77        |
| <b>第五章 植物基因的分子结构及其调控</b>       | <b>78</b> |
| 一、一级结构上的因子                     | 78        |
| 二、一级结构的分析                      | 80        |
| 三、基因的功能组成                      | 81        |
| 四、利用电脑分析分子结构                   | 82        |
| 五、CaMV 35S启动子的研究进展             | 83        |
| 六、组织特异性基因的调控                   | 85        |
| 七、种子蛋白基因的调控                    | 86        |

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 八、其他组织特异性基因的调控          | 88  |
| 九、贮藏蛋白基因                | 89  |
| 十、光诱导基因                 | 91  |
| 十一、环境胁迫诱导基因调控           | 96  |
| 十二、激素对基因表达的调控           | 100 |
| 第六章 细胞分裂素对大分子合成及基因表达的调控 | 102 |
| 一、细胞分裂素的活性形式            | 102 |
| 二、细胞分裂素对大分子合成的调控        | 103 |
| 三、细胞分裂素调控基因表达的复杂性       | 105 |
| 四、两种激素调控的基因表达           | 107 |
| 五、细胞分裂素促进光调控基因的表达       | 108 |
| 六、细胞分裂素结合分子             | 109 |
| 七、结论                    | 110 |
| 第七章 植物基因表达的光调控          | 112 |
| 一、光对rRNA基因表达的影响         | 114 |
| 二、光对转录丰盛度的影响            | 118 |
| 三、白光及光敏色素对核功能的调控        | 121 |
| 四、结论                    | 143 |
| 第八章 叶绿体基因组的遗传操作         | 144 |
| 一、由农杆菌诱导的叶绿体转化          | 145 |
| 二、叶绿体基因组                | 146 |
| 三、外源基因导入质体              | 150 |
| 四、外源基因整入叶绿体DNA          | 152 |
| 五、质体的自主复制               | 153 |
| 六、叶绿体转化的选择性标记           | 156 |
| 七、展望                    | 157 |
| 八、烟草叶绿体基因的表达与调控         | 157 |
| 第九章 植物基因的分选工具：转座子       | 171 |
| 一、成功的植物转座子标记            | 171 |

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 三、玉米转座子在其他植物中的活性·····           | 173 |
| 二、激活剂[Ac]是一种简单的转座子·····         | 174 |
| 四、改建Ac转座子以优化异源植物的转座子标记·····     | 176 |
| 五、转座子插入突变体的鉴定·····              | 179 |
| 第十章 种子蛋白的基因工程·····              | 182 |
| 一、贮藏蛋白的特性·····                  | 183 |
| 二、编码贮藏蛋白的cDNA的制备·····           | 185 |
| 第十一章 植物基因工程与农作物改良·····          | 227 |
| 一、抗除草剂的植物基因工程·····              | 227 |
| 二、抗病毒的植物基因工程·····               | 232 |
| 三、抗虫的植物基因工程·····                | 235 |
| 第十二章 限制性片段长度多态性在植物品种改良中的作用····· | 238 |
| 一、RFLP的概念·····                  | 239 |
| 二、RFLP—基因定位的有用工具·····           | 240 |
| 三、作物RFLP及遗传图谱的构建·····           | 242 |
| 四、RFLP的应用·····                  | 243 |
| 五、利用RFLP进行QTL定位的基本原理·····       | 246 |
| 第十三章 植物分子生物学操作技术·····           | 251 |
| 一、大肠杆菌和农杆菌的培养和贮存·····           | 252 |
| 二、从大肠杆菌制备大量质粒·····              | 255 |
| 三、适用于连接的DNA酶切片段制备和纯化·····       | 260 |
| 四、DNA片段连接到植物转化载体·····           | 265 |
| 五、重组质粒经转化导入大肠杆菌·····            | 270 |
| 六、少量快速制备大肠杆菌质粒DNA·····          | 275 |
| 七、通过限制性酶切和琼脂糖凝胶电泳分析微量DNA·····   | 278 |
| 八、重组质粒接合到农杆菌·····               | 279 |
| 九、从根癌农杆菌分离总核酸·····              | 281 |
| 十、限制性酶酶解农杆菌总DNA·····            | 287 |

## 第十四章 用根癌农杆菌的Ti质粒和发根农杆菌的Ri质粒转

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 化双子叶植物细胞                  | 288 |
| 一、概说                      | 288 |
| 二、使用野生型致瘤的农杆菌和发根农杆菌转化     | 301 |
| 三、用非致瘤性Ti质粒载体转化大的异质外植体    | 312 |
| 四、直接再生转化植株：烟草叶圆片的转化       | 313 |
| 五、经愈伤组织再生转化植株：亚麻苗外植体的转化   | 322 |
| 六、小的同质外植体的转化              | 331 |
| 七、烟草叶片原生质体的分离             | 332 |
| 八、烟草叶肉原生质体的培养             | 337 |
| 九、通过与农杆菌共培养转化原生质体         | 339 |
| 十、胡萝卜悬浮细胞的转化              | 347 |
| 第十五章 外源基因 DNA 直接转入植物细胞的技术 | 368 |
| 一、农杆菌转化系统的局限性             | 368 |
| 二、以分离的载体 DNA 转化植物原生质体     | 369 |
| 三、用 DNA 媒介基因转移法转化原生质体的进展  | 370 |
| 四、DNA 媒介基因转移载体            | 372 |
| 五、DMGT载体的瞬间表达             | 372 |
| 六、供稳定转化用的DMGT载体           | 373 |
| 七、用DMGT载体转化完整的细胞组织        | 374 |
| 八、微注射技术                   | 374 |
| 九、微注射和微粒载体导入法             | 374 |
| 十、聚乙二醇刺激外源 DNA 摄入原生质体     | 375 |
| 十一、PEG刺激 DNA 摄入到原生质体      | 376 |
| 十二、从原生质体里提取 DNA 进行斑点印迹    | 378 |
| 十三、电穿孔法进行原生质体转化           | 384 |
| 十四、用于瞬间表达的最适电穿孔法          | 387 |
| 十五、微注射法用于植物细胞转化           | 390 |
| 十六、微注射法转化植物细胞             | 390 |

|                                                |     |
|------------------------------------------------|-----|
| 第十六章 植物的核酸分离技术.....                            | 400 |
| 一、植物核酸的分离.....                                 | 400 |
| 二、从干冻植物材料中制备总 DNA .....                        | 402 |
| 三、从新鲜植物材料中分离 DNA .....                         | 410 |
| 四、核 DNA 分离.....                                | 414 |
| 五、叶绿体和线粒体 DNA 的分离.....                         | 418 |
| 六、用二苯胺测定核酸粗提液中的 DNA 浓度.....                    | 422 |
| 七、植物总 RNA 的制备.....                             | 424 |
| 八、多聚(腺苷) mRNA 的制备.....                         | 429 |
| 第十七章 DNA 酶切除及Southern杂交分析.....                 | 434 |
| 一、DNA 的限制性酶解 .....                             | 434 |
| 二、以琼脂糖凝胶电泳分离 DNA .....                         | 437 |
| 三、Southern 印迹分步分离的 DNA 限制酶切<br>片段.....         | 443 |
| 四、杂交Southern印迹的 DNA.....                       | 448 |
| 五、以寡聚核苷酸标记技术制备杂交探针.....                        | 452 |
| 第十八章 植物基因组及其表达分析.....                          | 458 |
| 一、概说.....                                      | 458 |
| 二、以Southern印迹法分析 T-DNA 的组成.....                | 464 |
| 三、以 Northern 印迹法分析基因表达.....                    | 476 |
| 四、以Cab报告基因证明环境及器官特异性对基因表达的<br>调控.....          | 482 |
| 五、以新霉素磷酸转移酶、II(NPT-II)为报告蛋白研究<br>过渡肽序列的作用..... | 490 |
| 六、从烟草植株中分离完整的叶绿体.....                          | 493 |
| 七、NPT-II 的原位检测.....                            | 495 |
| 八、NPT-II 的Western印迹分析.....                     | 504 |
| 九、以报告酶编码序列组建融合基因: GUS 基因融合系<br>统.....          | 509 |

|                                           |            |
|-------------------------------------------|------------|
| 十、检测转化植物组织中的胭脂碱.....                      | 520        |
| <b>第十九章 大肠杆菌、质粒载体及噬菌体.....</b>            | <b>531</b> |
| 一、大肠杆菌.....                               | 535        |
| 二、质粒载体.....                               | 559        |
| 三、噬菌体.....                                | 587        |
| <b>第二十章 RNA 的制备与分析 .....</b>              | <b>630</b> |
| 一、由真核和原核细胞制备 RNA .....                    | 630        |
| 二、由组织培养细胞制备胞质 RNA .....                   | 631        |
| 三、由组织培养细胞制备胞质 RNA (简要方法).....             | 634        |
| 四、胍盐方法制备总的 RNA .....                      | 637        |
| 五、用苯酚/ SDS 法制备植物 RNA .....                | 642        |
| 六、细菌 RNA 制备.....                          | 646        |
| 七、多聚腺苷 RNA 制备(基本方法).....                  | 650        |
| 八、RNA 结构分析和合成 .....                       | 653        |
| 九、制备单链末端标记探针和mRNA的S1分析(辅助方<br>法) .....    | 659        |
| 十、mRNA 定量 S1 分析的控制 .....                  | 663        |
| 十一、RNA 酶保护分析(基本方法).....                   | 668        |
| 十二、核苷酸酶保护分析.....                          | 671        |
| 十三、引物延伸(基本方法).....                        | 676        |
| 十四、通过Northern 杂交分析RNA.....                | 680        |
| 十五、新转录RNA的鉴定: 哺乳动物细胞核脱落转录(基本<br>方法) ..... | 689        |
| <b>第二十一章 构建重组 DNA 文库.....</b>             | <b>699</b> |
| 一、重组 DNA 文库的概况.....                       | 699        |
| 二、由基因组DNA制备插入DNA.....                     | 705        |
| 三、由mRNA制备插入DNA 片段.....                    | 719        |
| 四、基因组DNA和cDNA 文库的构建.....                  | 739        |
| 五、转化或包装文库的扩增.....                         | 748        |

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| 第二十二章 重组 DNA 文库的筛选           | 754 |
| 一、制备文库平板并向滤膜转移               | 756 |
| 二、制备噬菌体文库平板并向滤膜转移            | 756 |
| 三、制备平板及转移质粒和装配质粒文库           | 761 |
| 四、与放射性探针杂交                   | 764 |
| 五、用人工合成的寡聚核苷酸作探针             | 772 |
| 六、噬菌体、装配型质粒和质粒克隆的纯化          | 778 |
| 七、纯化质粒及粘粒克隆                  | 781 |
| 八、抗体筛选                       | 782 |
| 九、免疫筛选入噬菌斑中的融合蛋白质            | 783 |
| 十、用抗体筛选入 $\lambda$ gt11 表达文库 | 783 |
| 十一、抗体筛选前用 IPTG 诱导融合蛋白表达      | 786 |
| 十二、cDNA 插入序列在噬菌体入载体间的转移      | 789 |
| 十三、杂交选择及转译的免疫筛选              | 793 |

# 第一章 植物分子生物学浅说

现代农业生物技术涉及许多领域，借助于重组DNA技术，该学科在近二十年已获得重大的进展。农业生物技术与传统技术相结合，在基因工程、细胞工程、酶工程及发酵工程的研究领域有了新的突破。农业生物技术的主要研究对象是农作物，当然也包括某些动物、食用菌、真菌和细菌。植物分子生物学的发展，为作物品种改良、抗病抗虫、抵御不良环境及充分利用光能打下了基础。

农业生物技术在我国的研究和利用，七十年代集中于植物的细胞工程。我国应用花粉培养和各种组织培养技术，成功地培育了多种农作物新品种，如水稻、小麦、玉米、烟草和各种果树、蔬菜品种。利用植物离体培养成功地获得了水稻和小麦的染色体非整倍体(胡含等，1980；褚启人，等1985)，为植物染色体工程的研究打下理论基础。八十年代，随着基因工程技术的发展和完善，人们对基因的结构与功能、基因的载体、受体植株的基因表达有了新的认识，我国在植物基因工程的研究也取得了长足的进展(褚启人等，1991)。

本章将介绍植物分子生物学的一些背景知识，七十年代末期的研究可参阅Smith—Keary所著的《遗传的结构与功能》一书(褚启人译，上海科学技术出版社，1980)。

植物的发育要经过很多步骤，每一步都是特定基因表达的结果。蛋白质直接决定细胞结构和功能，它是基因表达的最终产物。然而，光的数量和质量、营养供应、病原和共生生物等各种环境因素对基因表达起到修饰作用。由于植物细胞并不只有一个染色体组，它有三个相互作用的基因组(图1-1)，因此，情况比较复杂。当许多细胞在一起时，其遗传则变得更加错综复杂。除了核染色体组外，整个遗传系

统还与质体和线粒体相关。然而，这些细胞器并不能合成其所需的蛋白质，核染色体组对于细胞器形成具有重要作用。

人们对植物染色体组结构和表达的了解，主要是应用了重组DNA技术或基因克隆技术。将DNA序列克隆到细菌细胞中去，复制并产生大量DNA供分析，这样，就可分离特定DNA片段，并分析它的特性。

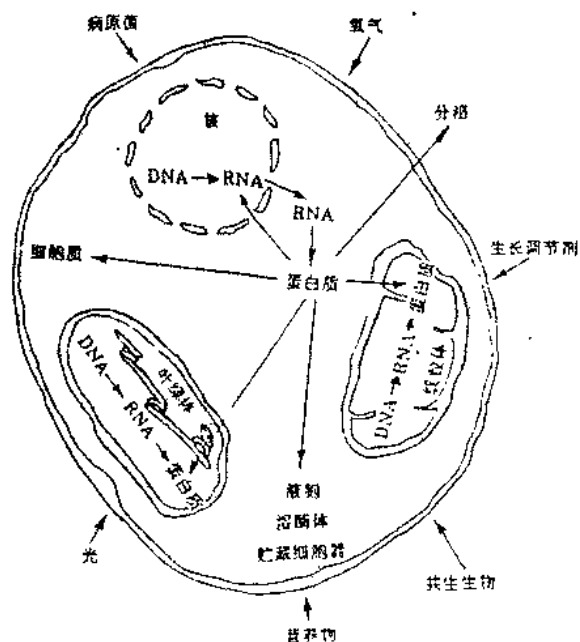


图1·1 基因组互作

在细胞分化形成某个成熟组织的发育过程中，三个植物基因组的相互作用。环境条件和细胞所处的条件对三个植物基因组的表达具有修饰作用。

DNA技术不仅提供了有关基因结构和表达的许多知识,而且为专性操作的遗传物质在不同物种间的转移提供了途径。迄今为止,大多数成功的基因转化实验,是从真核生物转化到原核生物、不同原核生物与单细胞真核生物(如酵母)之间的转化。将基因转化到高等生物的例子却很少,这种尝试要求我们付出艰巨的努力。遗传操作最终会使人类操纵农作物和重要工业植物,使它们更能符合人类的需要。

诚然,在考虑这些想法的可能性之前,首先必须对植物基因的功能及其与环境刺激因素的互作,有个清楚的了解。本章将综述植物分子生物学的现状以及研究问题的方法。

## 一、核基因组

无论是根据DNA的微微克量,还是根据被编码基因的数目,植物细胞中核基因组是最大的。核DNA与组蛋白及非组蛋白一起,包装在染色体中,它们对基因表达具有重要的作用。通过疏水力和静电力,它们聚集在一起形成染色质。DNA编码遗传信息,蛋白质控制DNA包装和调节DNA转录的有效性。虽然真核生物染色质结构已相当清楚(Magl, 1982),但各种蛋白质对染色体结构及基因控制的作用尚需进一步阐明。

发育的基本过程是核遗传物质的复制。DNA在有丝分裂过程中均等分配。每个子细胞含DNA与母细胞完全一致。没有有丝分裂过程,也就不存在生长。在细胞周期的S期,合成组蛋白,复制DNA。虽然对复制过程的认识仍有很多分歧,但一般认为复制始于DNA的很多位点,而且是一双向过程(Bagant, 1982)。从一个复制起点合成的一段DNA,称为一个复制子(replicon),复制后,当细胞进入G<sub>2</sub>阶段时,复制子组装成染色质,为有丝分裂作好准备。有丝分裂后的阶段称为G<sub>1</sub>期,在这期间,合成复制所需的成分和酶,为S期作准备。对于特定的物种,S、G<sub>2</sub>和M期所经历的时间相互稳定,而G<sub>1</sub>期则随细胞所处的环境条件变化很大。一般来说,DNA复制开始时,有丝分裂已完成,但在高度分化的组织中也有例外。在已分化的

组织中，细胞周期可能处于不同阶段，DNA往往发生变化，导致其全能性的丧失。现在还不清楚，这是由于DNA发生严重变化引起的，还是由于某些基因进入了不能表达的状态所引起的。在分化的细胞中，尚未发现特定活性基因有扩增现象。

植物细胞含有大量DNA，物种之间，细胞的DNA含量差别很大(表1·1)，细胞DNA含量最小的是拟南芥菜(0·5Pg/ 单倍体染色体组)。

表1·1 一些植物物种核染色体组的大小

| 物 种                                 | 微克DNA/ 单倍体染色体组 |
|-------------------------------------|----------------|
| 拟南芥菜( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) | 0.5            |
| 绿豆 ( <i>Vigna radiata</i> )         | 0.53           |
| 烟草 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )     | 2.0            |
| 红花菜豆( <i>Phaseolus coccineus</i> )  | 3.5            |
| 小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> )     | 5.1            |
| 黑麦 ( <i>Secale cereale</i> )        | 8.4            |
| 蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> )            | 26.0           |
| 洋葱 ( <i>Allium cepa</i> )           | 33.5           |
| 槲寄生 ( <i>Viscum coloratum</i> )     | 107.0          |

某些寄主 (Loranthaceae) 的含量则达10Pg/ 单倍体染色体组以上 (Nagl 等, 1983)。即使最小的植物染色体组也比果蝇(*Drosophila melanogaster*)的染色体组大五倍。对于生长过程合成所有蛋白质的需要量来说，DNA含量要超出很多；那么，这些多余的DNA起什么作用呢？目前已采用许多不同的方法进行组型分析，包括DNA复性动力学检查，及利用分子克隆进行各别序列的详尽分析等方法。

复性动力学分析的基础是：当双链DNA失活成两条单链DNA时，在一定适宜的温度和离子环境下，两条单链将退火，重新结合在一起。这个过程是随机碰撞的结果。因此，各种不同序列的起始浓度决定了重退火的速率。在序列的群体中，含量高的重退火比含量低的