

# 植物发育生物学 实验指导

张 蕾 赵 洁 主编



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

# 植物发育生物学 实验指导

张 蕾 赵 洁 主编



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

植物发育生物学实验指导/张蕾,赵洁主编. —武汉:武汉大学出版社,2010. 10

ISBN 978-7-307-08237-3

I. 植… II. ①张… ②赵… III. 植物—发育生物学—实验  
IV. Q945.4-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第192589号

责任编辑:黄汉平      责任校对:王 建      版式设计:马 佳

---

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:cbs22@whu.edu.cn 网址:www.wdp.com.cn)

印刷:湖北恒泰印务有限公司

开本:880×1230 1/32 印张:7.875 字数:203千字 插页:1

版次:2010年10月第1版      2010年10月第1次印刷

ISBN 978-7-307-08237-3/Q·97      定价:16.00元

---

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

# 前 言

植物发育生物学以植物为研究对象，以细胞生物学、分子生物学、基因工程、细胞工程、显微技术等一系列实验技术为支撑；其研究对象从细胞、组织、器官到个体水平等不同层次，内容涉及植物开花、传粉、受精、胚胎发育及植株形成等不同发育阶段发生和发育的细胞和分子机理。在植物发育生物学研究中有两条重要的主线，一条是从经典（正向）遗传学角度出发探讨植物发育的机理；另一条是以反向遗传学为出发点进行研究。这两条主线仅仅是在研究的早期不同，即入手的方式不同：经典遗传学是从生物的性状或者是表型开始研究遗传物质如何调控生命的发生与发展规律。在植物发育生物学研究过程中，简单地讲，就是首先发现不同于正常植株的突变体，然后利用遗传学、分子生物学、生物化学等生物学技术研究该突变体出现异常的分子机理，即经典遗传学的出发点是获得突变体，并在此基础上进行研究。反向遗传学则是相对于经典遗传学而言的，是在获得生物体基因组序列的基础上，通过对靶基因进行加工和修饰，如定点突变、基因插入/缺失、基因置换等，再通过转基因的方法改变靶基因在植物中的表达，观察转基因植株的表型，进而研究植物基因的结构与功能。

在探索植物发育的分子机理时，研究者通常采用模式植物作为研究材料。原因其一是植物发育生物学的研究要求研究对象必须有较为清楚的遗传背景；其二是模式植物还具有一定的研究背景，在国内外的研究基础较好。有些模式植物的基因组测序工作已经完成

或者是接近完成，这为系统、详细和深入地研究植物发育的分子机理提供了良好的条件。在植物发育生物学研究中常用的模式植物有拟南芥、水稻、烟草和金鱼草等。拟南芥植株较小、染色体数目少、基因组测序已经完成以及植株形态简单，现已成为研究植物发育最常用的实验材料。水稻是重要的农作物，研究水稻的生长发育对于改良水稻品种、服务农业生产具有重要意义，同时水稻基因组序列测序工作已经完成，也为探讨水稻发育的分子机理打下了良好的分子基础。烟草一直是植物发育研究中的重要模式植物，尤其是在植物大小配子发育、受精和胚胎发育的研究中，烟草发挥了重要的作用，遗憾的是烟草基因组的全序列测序还未完成。金鱼草花器官结构具有特殊性（唇形目，总状花序，花冠筒状唇形，基部膨大成囊状，上唇直立，2裂，下唇3裂，花瓣展开外曲），在研究花器官发育中发挥了重要作用。

在本实验指导中将系统阐述植物发育生物学研究领域常用的实验方法和技术。为了探讨植物发生和发育的分子机理常常兼用经典遗传学和反向遗传学方法和技术；同时，生物化学等技术手段在研究中也是必不可少的，如为了研究蛋白质的相互作用，常常使用免疫共沉淀等技术；此外，细胞生物学也是研究植物发育的基本技术和手段。因此，植物发育生物学的研究综合了所有生物学的研究手段，包括遗传学、生物化学、分子生物学、细胞生物学等。本实验指导包括常用的实验方法和技术，期望对从事植物发育生物学研究的研究生、本科生和相关研究人员在理清实验思路、掌握实验方法和技巧上有所指导和帮助。

编者

2010年10月

# 目 录

实验室安全守则	1
<b>第一部分 植物发育相关突变体和转基因植株的获得及初步分析</b>	<b>3</b>
<b>第一节 利用化学方法获得植物突变体及功能基因的克隆</b>	<b>4</b>
实验一 EMS 诱变获得植物突变体库	4
实验二 图位克隆技术	7
实验三 TILLING 技术	11
<b>第二节 利用农杆菌介导的植物转基因技术</b>	<b>15</b>
实验四 农杆菌培养、感受态细胞准备和质粒转化	20
实验五 农杆菌介导的拟南芥转基因方法	24
实验六 农杆菌介导的烟草转基因方法	32
实验七 农杆菌介导的水稻转基因方法	35
<b>第三节 拟南芥 T-DNA 插入突变体的获得和鉴定</b>	<b>40</b>
实验八 拟南芥 T-DNA 插入突变体库的获得	43
实验九 拟南芥 T-DNA 插入突变体的筛选——植株表型分析和鉴定	45
实验十 T-DNA 插入位点基因的克隆和鉴定——Tail-PCR	51
实验十一 T-DNA 插入突变体纯合体的鉴定	61

实验十二 T-DNA 插入突变体的互补实验 .....	65
第四节 多基因突变体的获得 .....	67
实验十三 拟南芥杂交技术 .....	68
第五节 目的基因 RNAi 及过量表达转基因植株的获得 ..	71
实验十四 RNAi 原理及基本步骤 .....	71
实验十五 过量表达的原理及基本步骤 .....	75
实验十六 拟南芥 RNAi 及过量表达转基因 植株的获得 .....	78
第二部分 植物发育相关突变体及转基因植株的验证和分析 ..	80
第一节 转基因植株 DNA 水平的鉴定 .....	80
实验十七 PCR 方法验证外源基因转入植株 .....	81
实验十八 Southern 杂交验证转基因植株中外源基因的 拷贝数 .....	83
第二节 转基因植株 mRNA 水平的鉴定 .....	92
实验十九 Northern 杂交分析基因的表达 .....	92
实验二十 RT-PCR 方法分析基因的表达 .....	99
实验二十一 Real-time PCR 方法分析基因的表达 ..	105
实验二十二 mRNA 原位杂交技术 .....	111
第三节 转基因植株蛋白质水平的鉴定 .....	120
实验二十三 转基因植株蛋白质水平的检测 (Western blot) .....	121
实验二十四 植物组织免疫酶和免疫荧光技术 .....	125
第三部分 生物信息学方法及其他常用分子生物学技术 .....	128
第一节 生物信息学方法 .....	128
第二节 启动子分析 .....	134
实验二十五 启动子序列的克隆——染色体	

	步移法·····	134
实验二十六	启动子和 GUS 融合转基因植株的 染色分析·····	139
实验二十七	DR5::GUS 融合转基因植株的 染色分析·····	143
第三节	定点突变获得突变体的方法·····	144
实验二十八	利用 QuikChange Site-directed Mutagenesis 试剂盒获得定点突变基因·····	145
第四节	蛋白质亚细胞定位技术——基因枪法·····	149
实验二十九	基因枪法转化洋葱表皮细胞·····	149
第五节	DNA 和蛋白质互作研究方法·····	153
实验三十	CHIP 技术·····	161
第六节	蛋白质相互作用的研究方法·····	166
实验三十一	酵母双杂交技术·····	172
实验三十二	免疫共沉淀技术·····	177
<b>第四部分</b>	<b>植物组织培养技术·····</b>	<b>182</b>
实验三十三	植物培养基的配制·····	182
实验三十四	烟草无菌苗的培养·····	192
实验三十五	水稻种子愈伤组织的培养和 幼苗的再生·····	195
<b>第五部分</b>	<b>植物发育生物学研究中常用的细胞学方法·····</b>	<b>201</b>
实验三十六	植物组织石蜡切片技术·····	201
实验三十七	植物组织冰冻切片技术·····	207
实验三十八	烟草小孢子发育过程的观察·····	211
实验三十九	拟南芥花粉表型的分析·····	220
实验四十	烟草大孢子发育过程的观察·····	227



实验四十一	拟南芥胚珠透明技术——胚胎发育过程的观察.....	230
实验四十二	烟草胚胎分离技术及胚胎发育过程的观察.....	233
缩写词	.....	238
参考文献	.....	241

# 实验室安全守则

## 一般规定

1. 在实验室内请穿着实验服，避免穿拖鞋。
2. 在实验室内禁止吸烟、饮食、嬉戏，实验桌上勿堆放书包、衣服及杂物等。
3. 所有实验仪器、耗材、药品以及实验材料等均不得带出实验室。
4. 保持实验室环境卫生。打翻任何药品试剂及器皿时，请随即清理。
5. 实验前了解实验目的和内容，掌握实验原理、操作规程和注意事项。实验进行中有任何状况或疑问，随时提问，与指导教师沟通。详细记录实验结果和数据，严禁抄袭。
6. 严格按照操作规程正确使用仪器。
7. 实验完毕，确定关闭仪器和电源、水龙头和酒精灯等。

## 药品

1. 量取或配制挥发性、腐蚀性、有毒溶剂（如甲醇、丙酮、醋酸、氯仿、盐酸、硫酸、 $\beta$ -巯基乙醇、酚等），必须在通风橱中进行，取用完后随即盖好瓶盖。
2. 注意戴手套和口罩取用有毒或致癌药剂，例如丙烯酰胺（神经毒）、溴化乙锭（突变剂）、SDS、秋水仙素等。
3. 接触到病原材料或细菌，应迅速消毒。所有被污染的物品，

在丢弃或重复使用前必须先灭菌，固体培养基和有毒试剂不得倒入水槽或下水道中，应分门别类分装，集中并安全处理。

## 仪器

1. 使用仪器前应先了解其性能、配置及正确操作方法，严禁拆卸零配件及附件，不得擅自调整仪器参数。

2. 使用离心机时，调整离心管重量平衡，两两对称，锁紧离心机转陀，盖紧机盖。冷冻离心机于开机状态时，应保持离心槽低温并避免结霜。

3. 实验时严禁用潮湿、带汗的手去操作电器，电器设备外壳均应接地。不慎发生触电事故时，应立即切断电源开关，对触电者立即采取急救措施。

4. 超净工作台内的有机溶剂及易燃物（如甲醇、乙醇、乙醚、瓦斯等）应远离火苗。酒精或乙醚等着火时，应立即使用泡沫灭火剂或湿毛巾覆盖，禁用水冲洗。

# 第一部分 植物发育相关突变体和转基因植株的获得及初步分析

经典遗传学从生物性状、表型到遗传物质来研究生命的发生与发展规律。19世纪奥地利的牧师孟德尔（G. Mendel, 1822—1884年）是经典遗传学的创始人或奠基人，被称为经典遗传学之父。相比于分子遗传学，经典遗传学的优越性在于它直接将基因与生物学功能对应起来。

在植物发育生物学研究中通常是先获得一定的突变体，之后再研究其分子机理。获得植物突变体的方法有以下几种：第一种方法是在自然界中寻找自然突变的植株，此法是最简单的方式，但是这种方法获得的突变体由于没有清楚的遗传背景，对于植物发育生物学研究的作用不大；第二种方法是通过物理方法或化学方法进行诱变获得突变体；第三种方法是通过生物学的方法和手段获得植物的突变体，该方法是植物发育生物学研究领域使用较多的方法。

较为常用的物理诱变方法是 $\alpha$ 射线、 $\beta$ 射线、 $\gamma$ 射线、X射线和中子流等诱变。斯德勒于1928年首先证实了X射线对玉米和大麦有诱变效应。科学家常常利用宇宙飞船将植物种子带入太空进行辐射，其目的也是获得突变体。诱变处理的材料包括种子、花粉、子房、合子和胚细胞、营养器官以及离体培养中的细胞和组织。物理诱变方法处理材料包括外照射和内照射。外照射指的是被照射的种子或植株所受的辐射来自外部某一辐射源，如钴源、X射线源

等。该方法操作简便，而且可以处理大量的植物材料。内照射指的是将辐射源引入生物体组织和细胞内进行照射的一种方法。该种方法的缺点是放射性元素在生物体内分布不均匀，而且随着放射性元素不断衰变，其辐射效果逐渐减弱。

本部分主要对植物发育生物学研究中应用较多的化学诱变方法和生物学诱变方法进行介绍。

## 第一节 利用化学方法获得植物突变体及功能基因的克隆

1943年约克斯首次使用化学诱变剂用乌来糖（脲烷）诱发了月见草、百合和风铃草的染色体畸变。化学诱变方法中常用的诱变剂是某些亚硝酸盐、烷化剂、碱基类似物、抗生素等化学药物。烷化剂带有一个或多个活泼的烷基，可转移到其他分子上，置换碱基中的氧原子。叠氮化钠可使复制中的DNA的碱基发生替换，是目前诱变率高而安全的一种诱变剂。碱基类似物与DNA碱基的化学构成相类似，能与DNA结合，导致错误配对，发生碱基置换，从而产生突变。化学诱变剂常常采用的处理方法包括浸渍、滴液、注射、涂抹和熏蒸法等，处理的实验材料为芽条、叶、花序和种子，一般不采用根作为处理对象。利用化学诱变剂处理获得植物突变体时，诱变剂的浓度、处理的时间、温度以及pH值等都对结果有很大的影响。利用化学诱变剂获得突变体的优点是诱发突变率较高、对处理材料损伤较轻，但是缺点是重复性较差，并且有致癌的危险。

### 实验一 EMS 诱变获得植物突变体库

#### 【实验目的】

1. 掌握利用EMS获得拟南芥突变体的原理和操作方法。

## 2. 掌握拟南芥种植和管理的方法。

### 【实验原理】

甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 是一种可改变 DNA 结构的烷化剂, 它与 DNA 中的磷酸嘌呤和嘧啶作用, 使之产生突变。烷化剂具有一个或多个活性烷基, 这些烷基能被转移到其他分子上置换氢原子, 发生烷化作用。烷基化位点主要发生在 G (鸟嘌呤) 的 N7 位置上, N7 烷基化后成为带一个正电荷的季胺基团。这个季胺基团可促进第一位氨基上氢解离, 使 G 不再与 C 配对而是与 T 配对, 从而造成 G-C 碱基对转换为 A-T 碱基对, 引起点突变。利用这一原理获得的点突变是 EMS 诱变过程中获得最多的点突变类型。此外, 还有少部分的 G : C 对可以变为任何碱基对 G : C、C : G、A : T、T : A, 既有转换又有颠换。此外, EMS 也可与核苷结构中的磷酸基反应, 形成酯类而将核苷酸从磷酸基与糖基之间切断, 产生染色体的缺失。

EMS 诱变技术的优点是突变频率高、容易获得饱和突变、筛选工作量少 (1 位点/2000 ~ 5000M<sup>2</sup> 代植株); 同时具有基因突变的多种效应, 如功能完全缺失和部分缺失、功能的数量性变化以及功能的组成性表达等; 可以获得双突变。缺点是需要利用图位克隆技术鉴定突变基因, 并且需多次回交 (一般 5 ~ 10 次) 清除背景。

### 【实验材料】

拟南芥种子。

### 【实验器材】

500ml 带盖子玻璃瓶。

### 【药品试剂】

0.2% ~0.4% EMS 溶液, 1mol/L NaOH 和双蒸水 (ddH<sub>2</sub>O)。

### 【实验方法】

1. 取 50000 ~ 100000 粒拟南芥种子 (1 ~ 2g) 在水中浸泡过夜。
2. 用 0.2% ~0.4% EMS 溶液浸泡种子 10 ~ 20 小时。
3. 倒掉 EMS 溶液; 用 1mol/L NaOH 处理残留 EMS 溶液。
4. 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗种子 20 次; 此时拟南芥种子标记为 M1 代。
5. 播种 M1 种子。
6. 单株或混合株收获 M2 代种子用于突变体筛选。

### 【注意事项】

1. 诱变剂都有程度不同的毒性, 有的是潜在的致癌剂, 因此在处理时避免与皮肤接触或吸入气体, 一般多在具有通风管及密闭条件的超净台上戴乳胶手套进行操作。

2. 影响诱变效果的因素包括: 诱变剂的理化特性、被处理材料的遗传类型及生理状态、诱变剂的浓度和处理时间、处理的温度、诱变剂溶液 pH 值及缓冲液的作用。

3. 用 EMS 处理种子之后, 一定要用大量的水将残余在种子表面的 EMS 清洗干净。

### 【思考题】

1. EMS 诱变获得植物突变体的原理。
2. 利用 EMS 进行诱变时应注意的事项。

## 实验二 图位克隆技术

### 【实验目的】

1. 掌握图位克隆技术的原理和操作步骤。
2. 利用图位克隆技术克隆 EMS 诱变突变体中的效应基因。

### 【实验原理】

利用物理方法或化学方法获得的植物突变体中突变的碱基位点是随机的，并且没有任何标记用于筛选突变基因，因此，需要使用图位克隆技术对突变基因进行克隆。

图位克隆 (map-based cloning) 又称定位克隆 (positional cloning)，由剑桥大学的 Alan Coulson 在 1986 年首先提出。其基本原理是功能基因在基因组中具有相对较为稳定的基因座，通过对分离群体的遗传连锁分析将待分离的目的基因定位到染色体的某个具体位置上，再利用分子标记技术对目的基因进行精细定位，利用与目的基因紧密连锁的分子标记筛选 DNA 文库，然后通过构建高密度的分子连锁图谱，不断缩小候选区域进而克隆该基因。即通过分析突变位点与已知分子标记的连锁关系来确定突变表型的遗传基础。

利用图位克隆技术克隆基因无需预先知道基因的 DNA 顺序以及其表达产物的有关信息，但是需要一个根据目的基因建立起来的遗传分离群体。

图位克隆技术主要包括以下 4 个步骤：

1. 目的基因的初步定位。在目的基因的初步定位中首先要筛选与目标基因连锁的分子标记。利用目标基因的近等基因系或分离群体进行连锁分析，筛选出目标基因所在局部区域的分子标记。与此同时，构建并筛选含有大插入片段的基因组文库。常用的载体有



cosmid、酵母人工染色体（YAC）以及 P1, BAC, PAC 等几种以细菌为寄主的载体系统。然后用与目标基因连锁的分子标记为探针筛选基因组文库，获得阳性克隆。以阳性克隆的末端作为探针，筛选基因组文库，并进行染色体步行，直到获得具有目标基因两侧分子标记的大片段跨叠群。

分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记，是 DNA 水平遗传标记技术。确切地说分子标记就是一个特异的 DNA 片段或能够检出的等位基因，对其有效利用即可达到图位克隆基因之目的。常用的有基于分子杂交技术的限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism, RFLP）、基于 PCR 技术的随机扩增多态性 DNA RAPD 标记（random amplified polymorphism DNA, RAPD）和简单序列长度多态性（simple sequence length polymorphisms, SSLPs）、基于限制性酶切和 PCR 技术的扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism, AFLP）及后来发展的基于芯片技术的核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）等。利用这些标记技术结合使用近等基因系分析可以快速将目的基因定位在某个染色体的一定区域。

2. 目的基因区域的精细作图。通过整合已有的遗传图谱和寻找新的分子标记，提高目的基因附近区域遗传图谱和物理图谱的密度。

3. 目的基因的精细定位和染色体登陆。利用侧翼分子标记分析和混合样品作图精确定位目的基因，然后以目标基因两侧分子标记为探针，通过染色体登陆获得含目标基因的阳性克隆。

4. 外显子的分离和鉴定。阳性克隆中可能含有多个候选基因。用筛选 cDNA 文库、外显子捕捉和 cDNA 直选法等技术找到候选基因，再进行共分离、时空表达特点和同源性比较等分析确定目标基因。当然，最直接的证明是进行功能互补实验。

功能互补实验是将该基因从基因组上克隆下来，然后构建到转