

〔日〕内宫博文等 编著
孙崇荣 李育庆 译

植物基因工程技术

上海科学技术文献出版社



植物基因工程技术

内宫博文
〔日〕 田仲可昌 编著
杉浦昌弘
孙崇荣 译
李育庆

上海科学技术文献出版社

植物遺伝子工学マニュアル

内宮博文・田仲可昌・杉浦昌弘 編著

講談社サイエンティフィック

1984

植物基因工程技术

内宮博文

[日] 田仲可昌 編著

杉浦昌弘

孙崇荣 李育庆 译

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号)

新华书店经销 昆山亭林印刷厂印刷

*

开本: 787×1092 1/32 印张: 6.125 字数: 151,000

1987年9月第1版 1987年9月第1次印刷

印数: 1—3,000

书号: ISBN 7-80513-015-9/Q·01

定价: 3.20元

《科技新书目》149-310

序 言

地球上的人口年年不断增加,为了适应这种形势,充分提高粮食生产已是当务之急。近年来,生物工程取得了惊人的发展,其中特别是以植物为对象的基因工程,对未来的植物育种估计会成为一项崭新的技术和方法。虽然目前我们还不能十分明确地这样说,然而,孕育新技术的土壤往往都是模糊之中经过多年积累后才形成的。从这个意义上来说,在追求人工控制生物体遗传特性这一共同目标中,基因工程中有关的各项技术相信也一定会展现出它的应用前景。

最近,“基因操作指南”已由高木康敬编著出版(讲谈出版社),成为这一领域很多研究者必备的一本工具书。然而,对我们以植物为对象的工作者来说,平日深感植物材料的特殊性及其困难程度。在这一背景下,遂决定以植物基因工程工作者以及今后打算从事这方面工作的研究人员为对象,编辑这本以植物基因操作方法为主要内容的小书,非常幸运地得到不少研究工作者的协助,使它得以顺利出版。

本书内容有两方面:1)植物基因处理方法,2)植物细胞融合。从广义的“基因工程”来看,本书也包含有与基因工程相关的一些外围性技术。另外,作为一本实验操作技术,写作格式上分为〈准备〉,〈操作〉及〈注意点〉几个部分。不过在各实验中应用同一项技术时,个别之处也不一定沿用这一格式。这是一个发展很快的领域,时时都可能有新的方法或改良方法出现,本书挂一漏万之处一定颇多,务希鉴谅为荷。

我们还对使用本书的读者有一个要求，我们衷心期望读者以书中的标准方法为中心，自己能开发出更新的方法，或者对有关方法进行改进。在不少情况下，新的实验方法开发的结果，往往会导致新的发现。

我们期望本书除对植物分子生物学和分子及细胞育种工作者外，还能对更广大的读者有所裨益。

编 者

1984年4月

译 序

近年来,植物基因工程在国际上已经引起愈来愈多的重视。日本除了它的步伐较快外,有关研究单位及高等院校都尽可能地相互协调,通过各种形式的联合,从不同方面促进植物基因工程的发展。也正是在这种基础上,内宫博文、田仲可昌和杉浦昌弘得以有可能组织二十几位研究人员协力完成这本指导性的小书。因此,本书首先体现了方法比较新这一特点。同时更重要的是,这些都是执笔者自己正在运用的方法,是各实验室经验的总结,实际可行又具有自身的特点。另外本书叙述简明扼要,阅读之后更容易加深对各项方法原理的理解及其实际应用面的了解。正因为这些原因,我们深信这本小书不仅对实际从事植物分子及细胞生物学的人员来说很有必要,同时对高等院校的师生学习和广大基层工作者的提高也十分有参考价值,特将它译了出来。由于我们水平有限,译文错误及不足之处,请批评指正。原书刊印上明显的错误,已予更正,译文中不再一一注出。

译 者

1986年2月

目 录

序言

译序

I 植物基因处理方法

第一章 DNA的抽提方法	(3)
1.1 核 DNA	(3)
1.1.1 花椰菜总 DNA 的抽提	(3)
1.1.2 从菠菜叶片抽提核 DNA	(6)
1.2 叶绿体 DNA	(9)
1.2.1 叶绿体的分离	(9)
1.2.2 叶绿体 DNA 的抽提	(12)
1.3 线粒体 DNA——甜菜线粒体 DNA 的抽提	(15)
1.4 病毒 DNA 的抽提方法	(18)
1.4.1 从精制病毒粒子中抽提 DNA	(18)
1.4.2 从感染叶片直接抽提病毒 DNA 的方法	(23)
第二章 基因的检测	(25)
2.1 限制酶	(25)
2.2 凝胶电泳	(26)
2.3 Southern 转移杂交	(27)
2.3.1 Southern 转移	(27)
2.3.2 用 RNA 作探针的杂交	(30)

2.3.3	用 DNA 作探针的杂交	(32)
第三章	使用 cDNA 进行克隆	(35)
3.1	mRNA 的制备	(35)
3.1.1	用 SDS-酚法抽提总 RNA	(35)
3.1.2	poly(A) ⁺ RNA 的分离	(37)
3.2	无细胞蛋白质合成	(39)
3.2.1	麦胚抽提液的制备	(39)
3.2.2	翻译反应	(41)
3.3	用质粒载体建立 cDNA 库	(43)
3.3.1	单链 cDNA 的合成与模板 mRNA 的碱 水解	(45)
3.3.2	在单链 cDNA 的 3'OH 末端加上 dC 的 同聚物	(47)
3.3.3	双链 cDNA 的制成	(48)
3.3.4	对双链 cDNA 末端加工以插入质粒	(50)
3.3.5	与 <i>pst</i> I 切口 3' 末端加有 oligo dG 的 pBR322 退火	(51)
3.3.6	转化	(52)
3.3.7	cDNA 克隆的筛选	(53)
第四章	用 Charon 30 进行克隆——基因组 DNA 的 基因库	(58)
4.1	包装抽提液的制备	(58)
4.2	Charon30 载体 DNA 及基因组 DNA 片段的 制备	(61)
4.3	包装与基因库的扩增	(62)
第五章	特定基因的克隆	(65)
5.1	rRNA 基因	(65)

5.1.1	制备含有蚕豆 rDNA 的 <i>Eco</i> RI 片段的 DNA 组分	(66)
5.1.2	pBR325 的 <i>Eco</i> RI 酶解与碱性磷酸酯酶处理	(67)
5.1.3	蚕豆核 DNA 的 <i>Eco</i> RI 片段与载体的结合	(68)
5.1.4	大肠杆菌的转化	(69)
5.1.5	用菌落杂交法选择带有 rDNA 片段的重组子	(70)
5.2	tRNA 基因	(72)
5.2.1	tRNA 基因的克隆	(72)
5.2.2	tRNA 基因的确定	(74)
5.3	重复性 DNA	(76)
5.3.1	蚕豆核 DNA 用 <i>Bam</i> HI 处理形成片段后,通过琼脂糖凝胶电泳分离重复序列并从胶中进行回收	(76)
5.3.2	蚕豆核 DNA 的 <i>Bam</i> HI 重复序列与 pBR322 的结合,以及对大肠杆菌 HB101 的转化	(77)
5.3.3	重组质粒中含有重复序列的验证	(78)
5.3.4	用 2 种限制酶浓缩重复 DNA 序列(蚕豆 <i>Fok</i> I 重复序列的例子)	(79)
5.4	叶绿体蛋白质	(81)
5.4.1	转录起点和终点的决定; S_1 作图法	(81)
5.4.2	转录产物的检测;Northern 杂交	(84)
5.5	植物 <i>ars</i>	(86)
5.5.1	酵母的转化	(87)

5.5.2	从酵母转化子中抽提总 DNA	(90)
5.6	大豆球蛋白 A ₃ B ₄ 中间亚基 cDNA 的克隆	(93)
第六章	RNA 病毒及类病毒的克隆	(99)
6.1	TMV(普通株)的制备	(99)
6.2	TMV-RNA 的制备	(100)
6.3	HSV 的纯化	(101)
6.4	TMV-RNA 上添加 poly(A)	(103)
6.5	HSV 上添加 poly(A)	(104)
6.6	用冈山—Berg 法克隆 HSV cDNA	(105)
6.6.1	用载体引物合成 cDNA	(106)
6.6.2	加上 oligo dC 链	(107)
6.6.3	用 <i>Hind</i> III 切断	(107)
6.6.4	用 DNA 连接物环化	(107)
6.6.5	用缺口转移将 RNA 链换成 DNA 链	(108)
6.6.6	转化	(108)
6.7	TMV cDNA 的克隆	(109)
6.7.1	TMV cDNA 的合成	(110)
6.7.2	用碱性蔗糖密度梯度离心分级 cDNA	(111)
6.7.3	cDNA 上添加 oligo dC	(111)
6.7.4	用载体引物合成双链 DNA	(111)
6.7.5	用连接酶将 DNA 环化和转化	(112)
第七章	Ti 质粒的检测及制备	(113)
7.1	Ti 质粒的检测方法	(113)
7.2	Ti 质粒的制备方法	(115)
第八章	DNA 碱基顺序测定法	(119)
8.1	酶法	(119)
8.1.1	待测 DNA 的克隆	(119)

8.1.2	单链 DNA 的制备	(122)
8.1.3	聚合酶反应	(124)
8.2	化学法 (Maxam—Gilbert)	(127)
8.2.1	DNA 5' 端标记	(127)
8.2.2	标记 DNA 片段用丙烯酰胺凝胶电泳进行 分离	(129)
8.2.3	碱基专一性反应	(131)
8.2.4	应用凝胶电泳确定碱基顺序	(134)
第九章	RNA 碱基顺序测定法	(137)
第十章	应用 DABITC 方法测定蛋白质的一级结构	(142)

II 细胞融合

第十一章	融合方法及杂种的形成	(149)
11.1	PEG—Ca 法	(149)
11.2	葡聚糖法	(152)
11.3	烟草属杂种的育成	(154)
第十二章	形成变异的方法	(157)
12.1	铝抗性植株的育种	(157)
12.2	营养缺陷型变异株的形成	(163)
12.2.1	用诱变剂处理原生质体	(163)
12.2.2	营养缺陷型植株的鉴定	(165)
第十三章	杂种的鉴定方法	(168)
13.1	组分 I 蛋白	(168)
13.1.1	烟草组分 I 蛋白的结晶及其抗体的制备	(168)
13.1.2	组分 I 蛋白样品的制备	(170)
13.1.3	等电聚焦电泳	(172)

13.1.4 组分 I 蛋白的 Western 转移法	(174)
13.2 核糖体 RNA 基因(rDNA).....	(176)
13.3 染色体原位杂交法	(178)
本书所用缩写或简称	(183)

I. 植物基因处理方法

1911

第一章 DNA 的抽提方法

1.1 核 DNA

一个基因有几千个碱基对，为了在限制性内切酶作用时得到特定的 DNA 断片，必须尽可能制备出高分子量的 DNA 样品。不过，植物组织中有很多多糖及酚类物质，它们会混杂在 DNA 级分中，除此之外，还会混入水解酶，因此，高分子 DNA 的制备不是一件容易的事。制备 DNA 的难易程度，不仅取决于植物的种类，还因组织部位、生长阶段、生理条件等情况而显著不同，所以，对植物材料来说，选用芽、胚、叶、根或愈伤组织（培养细胞）等何种为宜，必须认真加以考虑。

其次，在制备核 DNA 时，能够分离出细胞核虽然是必要条件，但由于细胞质 DNA 通常只占核 DNA 的 5% 以下，实际上这种程度的混入大多没有干扰。另一方面，妨碍 DNA 抽提的多酚类等物质是存在于离心上清液中，因此如果以粗核制品为开始材料，虽然 DNA 收得率会有所降低，却可得到远为优良的样品。所以说，在制备核 DNA 时，与其对细胞核进行精制，还不如进行充分洗涤以除去上清液来得重要。

1.1.1 花椰菜总 DNA 的抽提

〈准备〉

① 溶液 A: 50 mM Tris-HCl (pH8), 10 mM EDTA, 5 mM β -巯基乙醇, 0.5% (重量/容积) SDS。

② 1M Tris(不加盐酸)。

③ 10 mg/ml 蛋白酶-E。

④ 10 M 氯化锂。

⑤ 饱和酚溶液：用 50 mM Tris-HCl(pH8)溶液饱和，并加入 0.2% (重量/容积)8-羟基喹啉。

⑥ 酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)。

⑦ 氯仿：异戊醇(24:1)。

⑧ 异丙醇。

⑨ 70% 乙醇。

⑩ 溶液 B：10 mM Tris-HCl(pH8)，1 mM EDTA。

〈操作〉

① 花椰菜(可由市场购得，但必须新鲜。冬季的花椰菜糖分较多)的白色上端部组织，用剪刀剪成 2~3mm 大小，取 5g 材料用液氮冻结，在液氮中用搅切器(应用最高速度，30 秒钟，两次)或研钵研磨使其充分粉碎。

② 将粉末放入 50 ml 的烧杯中，一面用玻棒慢慢搅拌，一面使其溶于 20 ml 溶液 A 中。将 pH 变成 6 左右时的溶液用 1M Tris 调整到 8 后，加入 10 mg/ml 的蛋白酶 E 1 ml，于 60°C 放置 5 min，37°C 放置过夜。

③ 反应物移入离心管，于 4°C、10,000 r/min 离心 10 min，用粗头吸管将粘稠的上清液移入三角瓶。

④ 添加等体积的饱和酚溶液，于旋转瓶中(或低速搅拌)使水和酚两相在正好混合的状态下，室温下缓缓搅和 30 min。

⑤ 将混合液移入聚乙烯离心管，于 4°C、10,000 r/min 离心 20 min。用粗头大滴管将上层水溶液仔细地取出，放入三角烧瓶内，注意不要混入中层蛋白质。

⑥ 先用酚-氯仿-异戊醇，再用氯仿-异戊醇按〈操作〉④，⑤

各重复1次。这时，可应用50 ml 玻璃离心管，以3,000 r/min 离心20 min。如果仍旧出现有白色的中间层，须再重复这一操作。

⑦ 取出水层，加入氯化锂使成2 M。使冰冷1 h后，于4°C、10,000 r/min 离心10 min，除去高分子RNA沉淀。

⑧ 将上清液放入离心管，添加等容积的异丙醇，使冰冷1 h。于4,000 r/min 离心5 min，得到的DNA沉淀用70%乙醇离心洗涤2次。

⑨ 将DNA沉淀分散于溶液B中，保存于4°C。应用这种方法，可以得到比 λ DNA(49 kbp*)大的样品。经Eco RI完全水解，可发现3.8, 2.0, 1.2 kbp的区带能够与rRNA进行Southern转移杂交。收得率为1~1.5 mg (用260 nm紫外吸收法测定)。

〈注意点〉

① 如果组织磨碎得不充分，DNA的收得率会显著降低。同时，这一步必须在低温条件下尽快进行。

② 为了防止DNA分解酶的混入，所有应用的试剂及实验器具等物必须消毒灭菌。操作时须戴上聚乙烯手套。

③ 操作中注意不要施加强大的剪切作用力。搅拌和分散时要避免强烈振摇，也要避免用细口吸管急速地吸进吸出。

④ 得到的样品中，含有tRNA等小分子RNA和核苷酸，但琼脂糖凝胶电泳时，它们移动较快，和溴酚蓝速度相当，所以可与DNA片段分开。在2M醋酸铵存在下用乙醇沉淀得到的DNA中虽然不混有核苷酸，由于铵离子是多核苷酸激酶的强抑制剂，该DNA样品这时不可用作这种酶的底物。

* bp——碱基对。