

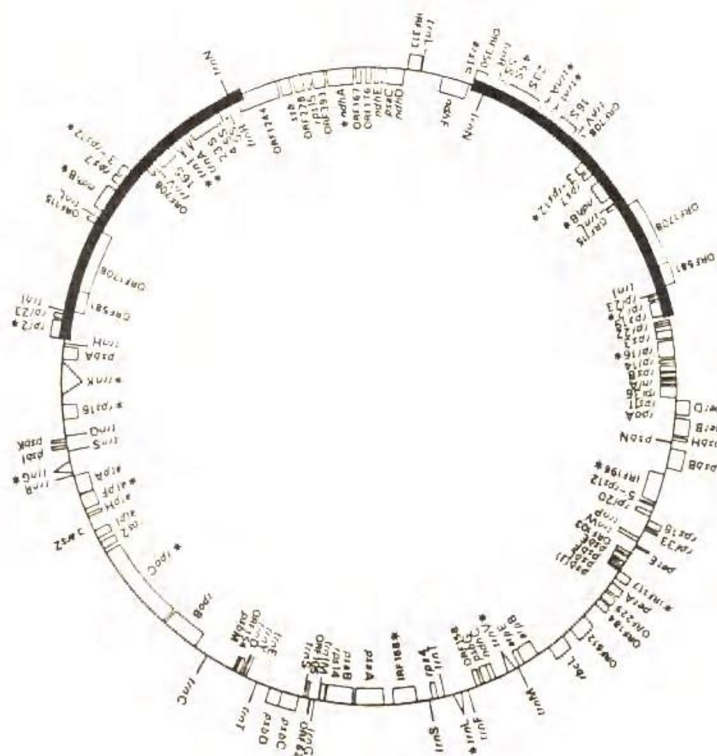
植物基因组：

构建、表达和调控

Plant Genomes: Organization

Expression and Control

赵微平



首都师范大学出版社

植物基因组：构建、表达和调控

Plant Genomes : Organization, Expression and Control

赵微平

W24/06

首都师范大学出版社

1996

442247

(京)新 208 号

北京市自然科学基金委员会资助出版

图书在版编目(CIP)数据

植物基因组:构建、表达和调控/赵微平编著. —北京

:首都师范大学出版社, 1996. 9

ISBN 7-81039-739-7

I. 植… II. 赵… III. 植物—基因组—研究 IV. Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (96) 第 11881 号

首都师范大学出版社

(北京西三环北路 105 号 邮政编码 100037)

协利达印刷厂印刷 全国新华书店经销

1996 年 9 月第 1 版 1996 年 9 月第 1 次印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 25.75

字数 630 千 印数 0,001—1,000 册

定价 38.70 元

目 录

1.	研究方法	1
1.1.	植物 DNA 分离的简易方法	1
1.2.	Southern 印迹和杂交方法	2
1.3.	细胞器 DNA 分离和 RFLP 分析	5
1.4.	基因组文库构建	7
1.5.	cDNA 文库构建	8
1.6.	PCR 技术	11
1.7.	多重随机扩增子图谱	13
1.8.	脉冲电场凝胶电泳	15
1.9.	随机克隆指纹分析作基因组形体图	18
1.10.	DNA 序列分析	28
2.	叶绿体基因组	36
2.1.	转录和翻译	38
2.1.1.	rRNA 基因	38
2.1.2.	tRNA 基因	40
2.1.3.	r-蛋白的基因	41
2.1.4.	RNA 聚合酶基因(rpoA、B、C)	42
2.2.	光合基因	
2.2.1.	rbcL(核酮糖 1,5-双磷酸羧化酶/加氧酶或 Rubisco 大亚基基因)	43
2.2.2.	光系统 II 基因(psbA、B、C、D、E、F、H、I)	45
2.2.3.	petA、B、D、E	48
2.2.4.	光系统 I 基因(psaA、B、C)	50
2.2.5.	ATP 合成酶基因(atpA、B、E、F、H、I)	51
2.2.6.	NADH 去氢酶基因	52
2.3.	质体 RNA 编改	53
3.	线粒体基因组	56
3.1.	RNA 基因	57
3.1.1.	rRNA 基因	57
3.1.2.	tRNA 基因	57
3.2.	蛋白质基因	59
3.2.1.	r-蛋白基因	59
3.2.2.	细胞色素氧化酶基因	61
3.2.3.	ATP 合成酶基因	62
3.2.4.	电压决定的阴离子通道基因	63

3. 3.	线粒体 RNA 编改	65
3. 4.	细胞质雄性不育	65
4.	核基因组	69
4. 1.	核蛋白体基因和组蛋白基因	70
4. 1. 1.	rRNA 基因	70
4. 1. 2.	tRNA 基因	73
4. 1. 3.	编码蛋白质基因的特征	74
4. 1. 4.	r-蛋白质基因	77
4. 1. 5.	组蛋白基因	79
4. 2.	转录和翻译	83
4. 2. 1.	转录因子基因	83
4. 2. 2.	RNA 聚合酶 I 最大亚基的基因	83
4. 2. 3.	RNA 螺旋酶基因	84
4. 2. 4.	翻译起始因子基因	84
4. 2. 5.	延长因子基因	84
4. 2. 6.	核糖核酸酶基因	86
4. 2. 7.	腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因	88
4. 3.	细胞骨架	88
4. 3. 1.	微管蛋白基因	88
4. 3. 2.	肌动蛋白基因	90
4. 3. 3.	肌球蛋白基因	91
4. 3. 4.	运动蛋白相关的基因	92
4. 4.	膜蛋白	92
4. 4. 1.	ATP 酶基因	92
4. 4. 2.	H ⁺ /葡萄糖共运输载体基因	99
4. 4. 3.	腺嘌呤核苷酸传递体基因	100
4. 4. 4.	磷脂转移蛋白基因	101
4. 4. 5.	囊泡蛋白基因	101
4. 5.	细胞壁蛋白	101
4. 5. 1.	富脯氨酸蛋白基因	101
4. 5. 2.	富甘氨酸蛋白基因	102
4. 5. 3.	伸展蛋白基因	103
4. 5. 4.	木聚糖内-转糖基酶基因	105
4. 6.	光合基因	106
4. 6. 1.	被膜和类囊体膜蛋白基因	106
4. 6. 2.	rbcS(Rubisco 小亚基)基因	107
4. 6. 3.	Rubisco 大亚基 N-甲基转移酶基因	110
4. 6. 4.	cab(叶绿素 a/b 结合蛋白基因)	112
4. 6. 5.	四吡咯合成酶基因	119

4. 6. 6.	尿卟啉原脱羧酶基因.....	120
4. 6. 7.	叶绿素合成酶, 谷氨酸 1-半醛氨基转移酶基因.....	120
4. 6. 8.	NADPH-原无植基叶绿素氧化还原酶基因	122
4. 6. 9.	八氢番茄红素合成酶基因.....	123
4. 6. 10.	八氢番茄红素去饱和酶基因	124
4. 6. 11.	ζ -胡萝卜素去饱和酶基因	124
4. 6. 12.	含岩藻黄素, 叶绿素 a/c 的蛋白基因	125
4. 6. 13.	紫菀黄素合成基因	126
4. 6. 14.	PsaD、E、F、G、H 基因	127
4. 6. 15.	Pet 基因.....	129
4. 6. 16.	铁氧还蛋白基因	129
4. 6. 17.	PSII 亚基的基因	130
4. 6. 18.	atpC	131
4. 6. 19.	氧释放复合物 23kDa 多肽的基因	131
4. 6. 20.	氧释放复合物 33kDa 多肽的基因	131
4. 6. 21.	Fbp -4(叶绿体果糖-1,6-双磷酸酶基因)	134
4. 6. 22.	Prk -6(磷酸核酮糖激酶基因)	136
4. 6. 23.	Pgk1 -1 和 2-6(磷酸甘油酸激酶基因)	136
4. 6. 24.	甘油醛磷酸去氢酶(GAPDH)基因	136
4. 6. 25.	Pepc -7(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因)	138
4. 6. 26.	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因	140
4. 6. 27.	丙酮酸正磷酸二激酶基因	141
4. 6. 28.	景天酮糖-1,7-双磷酸酶基因	141
4. 6. 29.	硫氧还蛋白基因	142
4. 6. 30.	碳酸酐酶基因	142
4. 6. 31.	蔗糖运输载体基因	146
4. 6. 32.	叶绿体 RNA 结合蛋白基因	146
4. 7.	贮存蛋白基因.....	147
4. 7. 1.	小麦醇溶蛋白基因和麦谷蛋白基因.....	147
4. 7. 2.	小麦吡啶环蛋白基因.....	150
4. 7. 3.	大麦醇溶蛋白基因.....	151
4. 7. 4.	水稻醇溶蛋白基因.....	151
4. 7. 5.	玉米醇溶蛋白基因.....	152
4. 7. 6.	Opaque -2 有关的基因.....	155
4. 7. 7.	高粱醇溶蛋白基因.....	157
4. 7. 8.	豆球蛋白基因.....	158
4. 7. 9.	豌豆贮存蛋白基因.....	159
4. 7. 10.	蚕豆的豆球蛋白基因家族	160
4. 7. 11.	菜豆球蛋白基因	160

4.7.12.	油菜小蛋白和十字花科蛋白基因	160
4.7.13.	油体蛋白基因	161
4.7.14.	营养体贮存蛋白基因	163
4.7.15.	马铃薯蛋白基因	163
4.7.16.	甘薯块根贮存蛋白基因	164
4.7.17.	贮铁蛋白基因	165
4.8.	糖代谢基因.....	166
4.8.1.	α -淀粉酶基因	166
4.8.2.	β -淀粉酶基因	170
4.8.3.	淀粉磷酸化酶基因.....	171
4.8.4.	ADP 葡萄糖焦磷酸酶基因	171
4.8.5.	UDP 葡萄糖淀粉糖基转移酶基因	174
4.8.6.	淀粉分支酶基因.....	175
4.8.7.	蔗糖合成酶基因.....	175
4.8.8.	磷酸葡萄糖异构酶基因.....	176
4.8.9.	醛缩酶基因.....	176
4.8.10.	葡聚糖酶基因	177
4.8.11.	NADP-山梨糖-6-磷酸去氢酶基因	179
4.8.12.	甘露醇去氢酶基因	179
4.8.13.	酸性转化酶基因	180
4.8.14.	丙糖磷酸异构酶基因	181
4.8.15.	丙酮酸脱羧酶基因	182
4.8.16.	丙酮酸激酶基因	182
4.8.17.	乙醇脱氢酶基因	182
4.8.18.	乳酸脱氢酶基因	183
4.8.19.	需 NADH 的羟基丙酮酸还原酶基因	183
4.8.20.	柠檬酸合成酶基因	185
4.8.21.	乌头酸酶基因	185
4.8.22.	异柠檬酸去氢酶基因	187
4.8.23.	苹果酸合成酶基因	187
4.8.24.	需 NADP 的苹果酸酶基因	187
4.8.25.	异柠檬酸裂解酶基因	189
4.9.	氮代谢基因.....	190
4.9.1.	硝酸还原酶基因.....	190
4.9.2.	亚硝酸还原酶基因.....	193
4.9.3.	铁氧还蛋白-NADP ⁺ 氧化还原酶基因	194
4.9.4.	谷氨酰胺合成酶基因.....	195
4.9.5.	谷氨酸草酰乙酸转氨酶基因.....	198
4.9.6.	谷氨酸去氢酶基因.....	198

4.9.7.	谷氨酸脱羧酶基因	199
4.9.8.	天冬酰胺酶基因	199
4.9.9.	天冬氨酸转氨酶基因	199
4.9.10.	天冬氨酸激酶-高丝氨酸去氢酶基因	202
4.9.11.	丙氨酸氨基转移酶基因	203
4.9.12.	半胱氨酸合成酶基因	203
4.9.13.	精氨酸脱羧酶基因	203
4.9.14.	二氢吡啶二羧酸合成酶基因	204
4.9.15.	5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶基因	205
4.9.16.	色氨酸合成酶基因	205
4.9.17.	乙酰羟乙酸合成酶基因	205
4.9.18.	二硫化物异构酶基因	206
4.9.19.	谷胱甘肽S-转移酶基因	206
4.9.20.	根瘤蛋白基因	207
4.9.21.	豆血红蛋白基因	208
4.9.22.	羧肽酶基因	209
4.9.23.	内肽酶基因	209
4.9.24.	氨肽酶基因	209
4.9.25.	半胱氨酸蛋白酶基因	209
4.9.26.	类组织蛋白酶B基因	210
4.9.27.	硫醇蛋白酶基因	211
4.9.28.	天冬氨酸蛋白酶基因	211
4.9.29.	液泡加工酶基因和种子蛋白成熟	213
4.9.30.	酰胺磷酸核糖基转移酶基因	213
4.10.	脂肪代谢基因	213
4.10.1.	乙酰CoA羧化酶基因	214
4.10.2.	酰基载体蛋白基因	215
4.10.3.	烯酰乙酰载体蛋白基因	215
4.10.4.	去饱和酶基因	216
4.10.5.	细胞色素b ₅ 基因	218
4.10.6.	叶绿体 ω -3脂肪酸去饱和酶基因	218
4.10.7.	1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶基因	220
4.10.8.	脂类转运蛋白基因	221
4.10.9.	脂氧合酶基因	221
4.10.10.	酰基-CoA结合蛋白基因	221
4.11.	生长和发育	222
4.11.1.	植物光敏素基因	222
4.11.2.	生长素生物合成基因	228
4.11.3.	生长素结合蛋白基因	229

4.11.4.	对生长素反应的基因	229
4.11.5.	parB 基因	230
4.11.6.	赤霉素 20-氧化酶基因	231
4.11.7.	赤霉素调节的基因	231
4.11.8.	异戊烯基转移酶基因	233
4.11.9.	对细胞分裂素反应的基因	234
4.11.10.	对脱落酸反应的基因	235
4.11.11.	编码 1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶的基因	236
4.11.12.	S -腺苷基甲硫氨酸脱羧酶基因	241
4.11.13.	S -腺苷基甲硫氨酸合成酶基因	242
4.11.14.	茉莉酸诱导蛋白基因	243
4.11.15.	3-羟-3-甲基戊二酸-辅酶 A 还原酶基因	244
4.11.16.	Em 蛋白基因	245
4.11.17.	腺核苷酸激酶基因	246
4.11.18.	核苷二磷酸激酶基因	246
4.11.19.	GTP 酶基因	248
4.11.20.	蛋白质激酶基因	248
4.11.21.	蛋白质磷酸酶基因	252
4.11.22.	丝氨酸/苏氨酸激酶受体基因	255
4.11.23.	GTP 结合蛋白基因	255
4.11.24.	磷脂酰环己六醇专一的磷脂酶 C 基因	258
4.11.25.	调钙蛋白基因	259
4.11.26.	泛肽基因	261
4.11.27.	胚发生蛋白基因	263
4.11.28.	细胞周期调节基因	265
4.11.29.	周期蛋白基因	265
4.11.29.	S 期专一的基因	268
4.11.31.	雄性育性基因	269
4.11.32.	花粉专一性基因	269
4.11.33.	阿拉伯半乳聚糖-蛋白基因	270
4.11.34.	花同源异型基因	270
4.11.35.	同源异型盒基因	270
4.11.36.	二氢黄酮醇基因	271
4.11.37.	硫解酶基因	272
4.11.38.	转动酶基因	272
4.11.39.	肌动蛋白结合蛋白基因	273
4.11.40.	多聚半乳糖醛酸酶基因	273
4.11.41.	果胶酯酶基因	275
4.11.42.	根表皮专有基因	276

4.11.43.	休眠基因	277
4.12.	逆境与防御反应	277
4.12.1.	热激蛋白基因	277
4.12.2.	热激转录因子基因	282
4.12.3.	水分逆境调节基因	283
4.12.4.	调渗蛋白基因	286
4.12.5.	膨压反应基因	287
4.12.6.	盐胁迫基因	288
4.12.7.	寒冷诱导基因	291
4.12.8.	过氧化物酶基因	294
4.12.9.	抗坏血酸过氧化物酶基因	295
4.12.10.	过氧化氢酶基因	297
4.12.11.	超氧歧化酶基因	299
4.12.12.	甜菜碱醛脱氢酶基因	302
4.12.13.	多酚氧化酶基因	302
4.12.14.	苯丙氨酸-氨裂解酶基因	303
4.12.15.	类黄酮合成基因	305
4.12.16.	异黄酮还原酶基因	307
4.12.17.	查尔酮合成酶基因	307
4.12.18.	4-香豆酸:CoA 连接酶基因	310
4.12.19.	NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因	312
4.12.20.	1,2-二苯乙烯合成酶基因	312
4.12.21.	环二萜合成酶基因	312
4.12.22.	硫蛋白基因	313
4.11.23.	类富半胱氨酸金属蛋白基因	314
4.12.24.	肉桂醇去氢酶基因	315
4.12.25.	木素 O-甲基转移酶基因	316
4.12.26.	几丁质酶基因	317
4.12.27.	凝集素基因	317
3.12.28.	蛋白酶抑制蛋白基因	321
4.12.29.	系统肽基因	325
4.12.30.	韧皮部蛋白 PP2 基因	326
4.12.31.	羟基甾裂解酶基因	326
4.12.32.	黑芥子硫苷酸酶基因	327
4.12.33.	与防病有关的基因	328
4.12.34.	β -疫霉蛋白基因	329
4.12.35.	抗微生物多肽基因	329
4.12.36.	二氧合酶基因	331
5.	基因表达的调节	332

5. 1.	DNA 甲基化	332
5. 2.	转录水平上的调节	332
5. 3.	转录因子	335
5. 4.	光调节基因	340
5. 5.	转录后调节	341
5. 6.	前-mRNA 拼接	341
5. 7.	mRNA 稳定性	342
5. 8.	翻译控制	343
5. 9.	植物和器官发育与基因表达	343
5. 10.	控制开花时间或花器官发育的调节基因	344
5. 11.	果实成熟与基因表达	348
5. 12.	生物钟控制植物基因的表达	351
5. 13.	核定位信号结合蛋白	351
5. 14.	植物在营养物缺乏时基因表达的变化	352
5. 14. 1.	糖饥饿时的基因表达	352
5. 14. 2.	氨基酸饥饿时基因的表达	353
5. 15.	DNA 拓扑学状态和转录	353
附录:分子克隆载体和限制内切酶		355
参考文献		365

植物的生长发育是植物体(主要是细胞)在多种代谢和生理过程基础上所发生的基因在时间上和空间上表达的综合现象,它涉及到遗传信息的贮存和传递、多种多样酶和物质的合成和分解、生理功能的相互协调、激素调控、细胞分化和形态建成等等。各种类型细胞结构上的可见差异性和重要的代谢特征都是由蛋白质和酶存在的独特样式所决定的,而蛋白质的合成又取决于核酸的存在和变化,所以研究基因的分子生物学对最后弄清植物生长发育的机理具有重大的意义。在细胞内,DNA 是染色质的主要成分,而染色质又是细胞核的主要组份。基因则是染色体上的具有一定位座的遗传单位,是 DNA 分子一定长度的核苷酸序列。在植物细胞内,一般存在有三个染色体组或基因组(Genomes),也就是叶绿体基因组、线粒体和核基因组。关于基因组的研究,近年来发展很快,主要是由于研究方法不断改进,新技术不断出现,因而使许多生物学问题在分子水平上得到解释。

1. 研究方法

1.1. 植物 DNA 分离的简易方法 (依 Kidwell 和 Osborn,1992)

植物 DNA 限制片段分析中的关键步骤是从植物组织纯化足够量的完好的 DNA。纯的 DNA 应该是无污染的。例如,多糖能引起电泳时 DNA 片段迁移率的变化,从而导致错误解释基因型中间 DNA 片段的差别。较好的提取缓冲液均含有溴化十六烷基三甲基铵 (CTAB),而且降低 NaCl 浓度,多糖溶于低浓度 NaCl 中而被排除。

所用的溶液:

DNA 提取缓冲液: 0.7M NaCl, 50mM Tris - HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0, 1%CTAB, 0.1% β -巯基乙醇。

TE 缓冲液: 10mM Tris - HCl pH7.5, 1mM EDTA pH8.0。

10% CTAB: 10% CTAB, 0.7M NaCl。

1% CTAB: 1% CTAB, 50mM Tris - HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0。

分离程序:

1. 收集健壮植物的幼叶数克,置液氮中冷冻后贮于 -20°C 下。
2. 在室温条件下研磨 250 — 300mg 冷冻的组织成粉末状,然后转移至 15 — 50ml 的聚丙烯离心管内。
3. 添加 5 — 10ml DNA 提取液(大约每 30 — 50mg 组织加 1ml),轻轻混匀使组织悬浮。
4. 在 $55 - 60^{\circ}\text{C}$ 下保温 60 分钟,时而摇动一下。
5. 添加等量的氯仿/异戊醇(24:1)并轻微摇混。在 20°C 1000 — 5000g 下离心 30 — 50 分钟。
6. 利用大口径的移液管将水相(上相)移至 50ml 刻度试管内,添加 2.5 体积的乙醇(-20°C)或 0.6 — 1 体积的异丙醇(-20°C)摇混至 DNA 沉淀。
7. 依沉淀 DNA 的条件,选择漂洗、干燥和再溶解样本的方法。
 - A. 如果要观察长股的 DNA,则:
 1. 利用弯曲的细玻璃棒钩出 DNA。
 2. 在含有 10 — 20ml 75%乙醇, 10mM 乙酸铵溶液的 50ml 刻度试管内漂洗 DNA。在室温条

件和不时旋动情况下保温 20 分钟。重复漂洗 2—3 次。

3. 置 DNA 于无菌的 1.5ml Eppendorf 管(微型离心管)的一侧, 空气干燥 10—20 分钟。从管底利用吸管吸出乙醇。DNA 也可在玻璃钩上直接干燥。

4. 加 200—800 μ l 无菌的 TE 缓冲液溶解 DNA。测定 DNA 浓度调至 0.5—0.7 μ g/ μ l。

B. 如果 DNA 钩不出来:

1. 1000g 离心样本 5 分钟。慢慢倾倒出上清液, 然后使沉淀物空气干燥 5 分钟。

2. 使沉淀物重悬于 1—5ml 0.5M NaCl 并用乙醇(2.5 体积, -20°C)重沉淀。钩出沉淀物, 漂洗, 空气干燥并溶解(重复 A 的步骤)。

3. 如果 DNA 依然不能钩出:

a) 在 1000 $\times$ g 下离心 5 分钟。不触动沉淀物, 倾倒出上层清液。

b) 在室温和不时摇动条件下以 10—20 ml 75%乙醇, 10 ml 乙酸铵溶液漂洗沉淀物 10 分钟。重复漂洗 2—3 次直到沉淀物变成白色。可以在室温和此溶液中过夜, 以便从沉淀物中进一步排除污染物。

c) 1000 $\times$ g 离心 5 分钟。倒出上清液并使沉淀物空气干燥。沉淀物可以在倒置的离心管中气干 30—60 分钟或经冷冻干燥 5—10 分钟。

d) 使 DNA 溶入 200—400 ml 的 TE 缓冲液中并移至有刻度的 1.5 ml Eppendorf 管内, 在 1300 g 下离心 10 分钟并测定 DNA 的浓度。

为了获取高纯 DNA, 可以加入 CTAB 沉淀程序, 具体作法如下:

6a. 利用大口径移液管移出水相并置于 50ml 刻度离心管内, 添加 1/10 体积 10%CTAB 溶液并轻轻摇动。

7a. 添加等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 轻轻摇动, 在 20°C 1 000—5 000 g 离心 20 分钟。

8a. 将水相移至 50ml 聚丙烯离心管内, 添加等体积的 1%CTAB 溶液, 混摇。室温下保温 30 分钟(在低温时 CTAB 将沉淀)。

9a. 用这种方法沉淀 DNA 不必再钩出、离心和随后的漂洗, 干燥以及使沉淀物重悬浮均采用 B 程序。

1.2. Southern 印迹和杂交法 (依 Bernatzky 和 Schilling, 1992)

Southern 印迹法和杂交法是 RFLP 分析中的主要技术。整个程序包括有有限制性内切酶裂解 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 将片段从凝胶转移至能结合核酸的膜上, 以放射性标记的 DNA 序列(探针)进行杂交, 最后作放射自显影。

所用的溶液:

凝胶运载缓冲液: 7.0ml 甘油, 0.5ml 10 $\times$ 中性电泳缓冲液(NEB), 0.1ml 20%SDS, 0.8ml 0.25M EDTA, 0.2ml 10 mg/ml 溴酚蓝, 1.4ml H_2O , 最后体积为 10ml。

10 $\times$ NEB: 1210.0g Tris(Sigma 7—9), 33.6g EDTA(二钠盐) 170.1g 乙酸钠 $\cdot$ 3 H_2O , 最后体积为 10 升。

溴化乙锭: 1.0g 溴化乙锭, 100ml H_2O , 摇动数小时以溶解。注意戴手套操作, 溴化乙锭为突变剂。

10 $\times$ 酸印迹液(中和液): 2.5M HCl。

5 $\times$ 碱印迹液(变性液): 2.0M NaOH。

20×SSC: 3.0M NaCl, 0.3M 柠檬酸钠, pH7.0。

10×随机引物标记缓冲液: 900mM HEPES pH6.6, 100mM MgCl₂, 20mM 二硫苏糖醇。

dATP、dGTP、dTTP: 单独配制 15mM 溶于无菌水中的三种 dNTP 溶液, 用 150mM Trizma [三(羟甲基)氨基甲烷]碱调成中性。混合等量的 dNTP, 整份为 100μl, 贮于冰冷处, 以利用于放射性的 dCTP 的标记。

葡聚糖 G50 — 80: 取 5g 葡聚糖 G50 — 80 溶于 100ml 1%SDS, 25mM EDTA(柱缓冲液)中过夜。

柱染料: 溶 20mg 蓝葡聚糖于 1ml 柱缓冲液中, 加 25μl 10mg/ml 溴酚蓝贮液。

10×Denhardt 液: 10g 聚蔗糖(Ficoll, Sigma, type400 — DL), 10g 聚乙烯吡咯烷酮(Sigma, PVP — 40), 10g 牛血清白蛋白, 500ml H₂O。贮于冰箱内。

杂交缓冲液: 490ml 重蒸馏水, 250ml 20×SSC, 50ml 1.0M 磷酸钠 pH7.2, 10ml 0.25M EDTA, 50ml 100×Denhardt 液, 30ml 20% SDS(W/V), 100ml 50%(W/V)高分子量葡聚糖硫酸酯, 贮于冰箱内。

鱼精 DNA: 溶 DNA 于水中(5mg/ml), 摇动。超声处理使 DNA 切变成为 500 — 1000bp, 取 10ml 加热至沸 10 分钟, 迅速在冰上冷却并贮于冰箱内。

DNA 的限制酶降解

通常用 DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI 以及 XbaI 作为降解酶。每微克 DNA 用 3 — 10 单位的酶。反应时间从几小时到过夜。事先应作些预备实验确定酶单位和反应条件(如利用 λ — DNA 在 1 小时 1μg 时所需的酶量)。最适的反应温度为 37℃。DNA 量可依基因组大小控制在 1 — 10μg 之间。

1. 置 2μgDNA 于 Eppendorf 管内加水至 26μl 体积。
2. 加 3μl 相应的缓冲液(贮液×10), 摇混。
3. 从冰箱内取出的酶置于冰冷条件下, 添加 1μl (10 U/μl)酶至 DNA 溶液中, 摇混。
4. 在适温条件下置 3 小时或过夜。
5. 用 5μl 运载凝胶的缓冲液终止反应。

降解的 DNA 最好立刻跑胶。

凝胶电泳

1. 2.7g 琼脂糖添加 300ml 中性电泳缓冲液(NEB)配制 0.9%的凝胶。注意保持胶浓度不变, 最好用微波炉加热。

2. 在灌胶前为了避免塑料凝胶铸形盘变形, 琼脂糖应冷至 65℃。

3. 许多凝胶塑料盘末端是开着的, 需用胶条封好以防止泄漏。倾倒琼脂糖溶液于盘中, 慢慢地置能引起凹形成的梳子于点样处。要避免梳齿旁的琼脂糖高于凝胶的表面, 否则将使 DNA 样本形成条纹。

4. 固化胶至少 30 分钟。小心地抽出梳子。

5. 在塑料盘中的凝胶置于电泳装置中。倾倒足够的 NEB 至装置内, 使缓冲液刚好达到凝胶的表面, 但不覆盖凝胶。

6. 利用微量移液管将降解后的 DNA 加于胶的点样孔内, 并以 NEB 使每个点样孔添满。在大约 45V, 75mA 条件下跑 20 分钟左右使样本进入凝胶, 或者是所有的溴酚蓝离开点样孔进入凝胶为止。

7. 盖上电泳盘盖, 防止凝胶在跑电泳时干化。注意避免在点样孔内形成气泡。

8. 大约跑 16 小时,或染料前沿达 12cm 处为止。

9. 在含有 100 μ g 溴化乙锭水溶液(每升蒸馏水加一滴 10mg/ml 溴化乙锭贮液)的盘内给凝胶染色(当接触溴化乙锭时要戴手套)。凝胶染色 15 分钟后在蒸馏水中漂洗凝胶,然后再在蒸馏水中脱色 15 分钟。用薄的有机玻璃板托着凝胶,操作和转移很容易。

10. 戴上防紫外线眼镜或面罩在短波紫外线下观察凝胶,以鉴定 DNA 是否降解,凝胶跑的是否合适(主要取决于酶)。高重复序列(如核 DNA 和叶绿体 DNA)可以看到不连续的带。如果需要进行照相。

印迹

1. 从点样孔将胶修成 14.5 厘米长的条。

2. 准备好与胶大小相当的印迹膜(如硝化纤维膜),并在一侧用铅笔作上记号。

3. 裁 3 张同胶大小一样的 3 号新华滤纸。

4. 在盘内以 1 升 0.25 M HCl 浸泡凝胶 10 分钟并轻轻摇动,这时标记的染料变成黄色。

5. 倾倒去酸,用蒸馏水漂洗凝胶,并使胶浸泡在 0.4 M NaOH 中 25 分钟。

6. 在用酸处理胶的同时,也为印迹作准备。小心地将印迹膜平铺于 0.4 M NaOH 溶液的表面使其湿润均匀后沉入于溶液中。以同样的方式浸泡两张 3 号滤纸。

干印转膜。准备一叠高 4 厘米的吸水纸堆。处理凝胶以后,将其置于倒置的培养皿光面上。用干的 3 号滤纸吸去凝胶表面多余的缓冲液。小心地将印迹膜铺在凝胶上,不使中间形成气泡。同样地铺上两张湿的 3 号滤纸。将吸水纸铺在 3 号滤纸的上部,不使其中留有空隙。取适当重量的薄有机玻璃板压在上面,吸印 4—6 小时或过夜。

流动印迹转膜。在盛有 0.4 M NaOH 的盘上放上玻璃板或塑料板,置两张 3 号滤纸于其上,纸的两端下垂与碱溶液接触。纸充分湿润后用玻璃棒将纸与玻璃板间的气泡赶走。处理后将凝胶置于其上。用宽 3 厘米的封胶膜(parafilm)将凝胶框起来。准备与凝胶一样大小的叠好的吸水纸。用一张干的 3 号滤纸与凝胶表面接触去掉过多的缓冲液。小心地将印迹膜铺于凝胶上,两者间不留任何气泡。同样铺上两张湿的 3 号滤纸。吸水纸堆则置于 3 号滤纸上,使吸水纸刚好不大不小盖在凝胶上。在这种情况下缓冲液只能通过凝胶流动。上面用有机玻璃板压上,印迹过夜。为了顺利印迹应注意更换湿的滤纸。

7. 印迹后在 $2\times$ SSC, 0.1% SDS 中室温下冲洗,接着第二次以 $0.2\times$ SSC, 0.1% SDS 洗。在 3 号滤纸上空气干燥的膜贮于干燥和 4 $^{\circ}$ C 条件下。

缺口翻译制探针

1. 以 60ng 随机的六聚引物结合 25—30ng 模板 DNA,总体积为 15 μ l。

2. 混合物热至 100 $^{\circ}$ C 5 分钟,然后在冰中冷却。

3. 添加 5 μ l 10 $\times$ 标记缓冲液, 6 μ l dATP, dGTP 以及 dTTP(分别为 5mM)溶液, 20 μ l H₂O, 1 μ l (3U)Klenow 酶, 5 μ l (50 μ Ci)[α -³²P]dCTP,混合后室温下保温 2 小时或以上。

4. 用 5 μ l 柱染料缓冲液终止反应。

5. 没参入的 dNTP 可借混合物通过葡聚糖凝胶 G-50 柱排除,含有蓝葡聚糖染料的部分含有标记的 DNA。

6. 混合样本,将 1%或以下的样本置于 Eppendorf 管内和置于闪烁计数器的小瓶内。计数至反应成功。根据已知的³²P 数量 cpm 可将 cpm 转换成 dpm。比活性应在 10⁸ 和 10⁹dpm/ μ g 模板 DNA 之间。

标记的 DNA 立刻使用或贮于 -20 $^{\circ}$ C 下。

Southern 杂交

1. 准备 50ml 杂交缓冲液,如在冰箱内杂交缓冲液的 SDS 结絮,温热之可使其再溶解。
 2. 融溶冰冻的变性鱼精 DNA,加入于缓冲液中使最后浓度为 5mg/50ml(50ml 缓冲液可加 1ml 5mg/ml 贮液)。
 3. 将膜先铺于缓冲液表面,湿后浸没。在 68℃ 下保温 4 小时或更长。
 4. 添加 10^6 dpm 左右标记的 λ DNA 作为探针杂交分子量标记。加热至 100℃ 5—10 分钟以使探针变性。立刻将探针加于杂交盒或贮于冰上令其慢慢再退火。
 5. 将探针加于杂交缓冲液内充分混合。在 68℃ 下过夜。
 6. 准备 1 升洗液($2\times$ SSC, 0.1%SDS)并热至 68℃,漂洗膜后并在 68℃ 下浸泡 20 分钟。
 7. 改换 $1\times$ SSC, 0.1%SDS 洗液,在 68℃ 下第二次漂洗,并在 68℃ 下浸泡 20 分钟。
 8. 改换 $0.5\times$ SSC, 0.1%SDS 洗液漂洗,并在 68℃ 下浸泡 20 分钟。
 9. 杂交膜在 -80℃ 有增强屏的暗盒中过夜或更长的时间作放射自显影。
- 最通常用的探针是由 mRNA 或基因组 DNA 克隆来的序列。

1.3. 细胞器 DNA 分离和 RFLP 分析(依 Palmer, J. D., 1992)

叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 均比核基因组 DNA 小,所以对它们进行研究相对来说比较容易。

所用的溶液:

分离缓冲液: 0.35M 山梨醇, 50mM Tris-HCl, pH8.0, 5mM EDTA, 0.1% BSA(W/V), 0.1% β -巯基乙醇(V/V, 现使现配)。

洗液: 0.35M 山梨醇, 50mM Tris-HCl, pH8.0, 25mM EDTA。

裂解液: 5% 肌氨酸钠(W/V), 50mM Tris-HCl pH8.0, 25mM EDTA。

TE: 10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA。

利用蔗糖和 CsCl-溴化乙锭梯度分离叶绿体 DNA(cpDNA)

1. 取未展开的幼叶,用自来水洗过。
2. 切成 2—10 厘米² 的小块。
3. 取 10—100 克置于 50—400ml 冰冷过的分离缓冲液内。
4. 高速匀浆器中打磨 3—5 次,每次 5 秒钟。
5. 四层纱布过滤。
6. 滤液在 4℃ 和 1000g 条件下离心 15 分钟。
7. 沉淀重悬于 5—8ml 冰冷的洗涤缓冲液内。
8. 蔗糖梯度离心,两层蔗糖液分别为 17ml(52%)和 8ml(30%浓度),两者皆以 50mM Tris-HCl, pH8.0, 25mM EDTA 溶解。
9. 在 4℃, 25 000 rpm(转/分)条件下离心 30—60 分钟。
10. 利用大口吸管从 30—52%界面取出叶绿体带,用 3—10 体积洗液稀释并在 4℃, 1 500g 下离心 15 分钟。
11. 叶绿体沉降物重悬于 1—2ml 洗液中。
12. 添加 1/20 体积的 20mg/ml 自降解(37℃, 2 小时)的蛋白酶溶液,室温下保温 2—10 分钟。

13. 加 1/5 体积裂解缓冲液,混匀后室温下置 15—30 分钟。
14. 使蔗糖梯度沉降物重悬于 1.5ml 洗涤缓冲液中,裂解(重复 12,13 步骤),和清洗(在 1000g 下离心 10 分钟)以及 CsCl 带化处理(见后),能制备富 cpDNA 的总 DNA。
15. 取 3ml 左右的叶绿体 DNA 样本加 3.35g CsCl,研磨混合,再加溴化乙锭至最后浓度为 200 μ g/ml,加蒸馏水使最后体积为 4.45ml,最后密度为 1.55g/ml。
16. 在 20 $^{\circ}$ C, 50 000—58 000 rpm 下离心 4—16 小时。
17. 排除梯度上层的浮渣,取可见的 DNA 带(大约为 0.5—1.0ml)。
18. 如果在第一次梯度后 DNA 部分脏污明显的,可第二次带化处理。可取 4.45ml 体积的 DNA/CsCl 溶液(密度 1.55mg/ml,=每 ml 加 750mgCsCl 粉末),加溴化乙锭(100 μ g/ml)和 TE,并重复 16 和 17 步骤。
19. 用 NaCl(底层)和水(中层)饱和的异丙醇(上层)萃取三次,去掉溴化乙锭。每次加 1—2ml 异丙醇,轻轻摇晃,静止后分层。在 200—500g 下离心可保证有好的相分离。
20. 有两种方法去掉 CsCl。用 2 升 TE 透析 1—2 天,至少换三次,或用乙醇沉淀 DNA。
21. 从第三次异丙醇提取物中去掉水层并加 2 体积 H₂O 以稀释 CsCl。混合后加 6 体积冰冷过的乙醇沉淀 DNA, -20 $^{\circ}$ C 下过夜。
22. 在 2 000g 下离心 10 分钟收集 DNA 沉淀。
23. 用 76%乙醇洗沉淀物,在 2 000g 下离心 2 分钟收集 DNA。
24. 重悬于 0.1—0.5ml TE 中。
25. 贮 DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 下,短期使用可贮于 4 $^{\circ}$ C 下。

利用 DNA 酶 I 分离 cpDNA

1. 剪下的 0.1—1.0 kg 绿叶置于 3—10 倍过量的(W/V)冰冷的分离缓冲液中。
2. 高速匀浆器中打磨 3—5 次,每次 5 秒钟,四层纱布过滤,然后在 4 $^{\circ}$ C 和 1 000 g 下离心 15 分钟。
3. 沉淀物重悬于 20—200ml DNA 酶 I 缓冲液中。
4. 添加 1.5—15 μ g DNA 酶 I 至悬浮后的叶绿体制剂中,轻摇后在冰上放置 1 小时并不时摇动。
5. 添加 3 倍洗涤缓冲液并在 4 $^{\circ}$ C 和 1 500g 下离心 15 分钟。
6. 沉淀物重悬于洗涤缓冲液中并重复离心洗 2 次以上。
7. 重悬沉淀物,溶解叶绿体,并借前面刚提过的 11—25 步骤 CsCl 离心法纯化 cpDNA。

利用 DNA 酶 I 分离 mtDNA

1. 剪下绿叶或黄化苗 0.1—1.0 kg 置于 3—10 倍过量(W/V)的冰冷过的分离缓冲液中。
2. 匀浆化,过滤(参考 cpDNA 分离)并在 4 $^{\circ}$ C 和 1 000g 下离心 15 分钟。
3. 留上清液,废弃沉淀物,并重复离心 1 次,以除去残留的叶绿体和核等。
4. 在 4 $^{\circ}$ C 和 12 000g 下离心 20 分钟得线粒体沉淀物。
5. 沉淀物重悬于 10—100ml DNA 酶 I 缓冲液中,混匀。
6. 添加 3—30 μ g DNA 酶 I,摇混,置于冰上 1 小时并不时摇动。
7. 添加 3 倍体积的洗涤缓冲液并在 4 $^{\circ}$ C 和 12 000g 下离心 20 分钟。
8. 在洗涤缓冲液中使沉淀物重悬并重复离心洗两次以上。
9. 重悬沉淀物,溶解线粒体,并按 cpDNA 分离程序 11—25 步骤纯化 mtDNA。

细胞器 DNA 的 RFLP 分析