

生物科学专业

《生物工程实验指导》

生物科学与技术学院

王华芳 选编

二〇一〇年九月

实验一 烟草叶片愈伤组织诱导和植株再生

选自魏群主编. 生物工程技术实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2002:152-155

[实验目的]

通过诱导烟草叶片愈伤组织和植株再生, 分析生长素和细胞分裂素对烟草叶片离体培养的作用, 了解植物组织在离体培养条件下脱分化和再分化的特点; 验证植物细胞全能性, 探究离体条件下植物细胞形成完整植株的条件。

[实验原理]

根据 Skoog 和 Miller 提出的生长素和细胞分裂素相对浓度调节器官分化的概念, 相对高的生长素浓度有利于细胞增殖和不定根的分化, 而相对高的细胞分裂素浓度有利于不定芽的分化。通过改变激素的种类和浓度, 有效地调节培养组织的器官分化, 已经在许多植物的组织培养中得到证实, 甚至在一些低等植物(如葫芦藓)中也得到了证实。

[仪器、材料和试剂]

(一) 仪器

1. 超净工作台
2. 高压灭菌锅
3. 光照培养箱

(二) 材料

1. 烟草幼苗
2. 萘乙酸(Naphthylacetic acid, NAA)
3. 苄基氨基嘌呤(6-Benzylamino purine, BA)
4. 2, 4—二氯苯氧乙酸(2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D)
5. 硝酸铵(NH₄NO₃)
6. 硝酸钾(KNO₃)
7. 氯化钙(CaCl₂ · 2H₂O)
8. 硫酸镁(MgSO₄ · 7H₂O)
9. 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)
10. 碘化钾(KI)
11. 硼酸(H₃BO₃)
12. 硫酸锰(MnSO₄ · 4H₂O)
13. 硫酸锌(ZnSO₄ · 7H₂O)
14. 钼酸钠(NaMoO₄ · 2H₂O)
15. 氯化钴(CoCl₂ · 6H₂O)
16. 硫酸铜(CuSO₄ · 5H₂O)
17. 硫酸亚铁(FeSO₄ · 7H₂O)
18. 乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA)
19. 甘氨酸(Glycine)
20. 烟酸(Nicotinic acid, Vitamin PP)
21. 盐酸吡哆醇(Pyridoxine—HCl, Vitamin B₆)
22. 盐酸硫胺素(Thiamine—HCl, Vitamin B₁)
23. 肌醇(Inositol)

24. 蔗糖(Sucrose)
25. 琼脂(Agar)
26. 氯化汞(HgCl₂)
27. 次氯酸钠(Sodium hypochlorite)
28. 二乙酸荧光素(Fluoresceindiacetate, FDA)
29. 伊凡蓝(Evan's blue)
30. 醋酸(Acetic acid)
31. 甲醇
32. 磷酸氢氨((NH₄)₂HPO₄)
33. 酒精(95%的医用酒精, 100%的工业酒精)
34. 三角瓶(50mL)
35. 棕色瓶(100mL, 500mL, 1000 mL)
36. 枪形镊子
37. 搪瓷烧杯(500 mL, 1000 mL)
38. 玻璃烧杯(100 mL)
39. 培养皿(Φ=9cm)
40. 解剖刀

(三) 试剂

1. MS 基本培养基贮液:

大量元素 / g · L ⁻¹ (10X)		微量元素 / mg · L ⁻¹ (100X)		铁母液 / g · L ⁻¹ (100X)		有机营养 / mg · (100 mL) ⁻¹ (100X)	
NH ₄ NO ₃	16.5	KI	83	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3.73	肌醇	1 000
KNO ₃	19	H ₃ BO ₄	620	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.78	烟酸	5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.4	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2 230			盐酸吡哆醇	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.7	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860			盐酸硫胺素	1
KH ₂ PO ₄	1.7	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	25			甘氨酸	20
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.5				
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5				

2. 1 mol / L NaOH

3. 1 mol / L HCl

4. 生长调节剂贮液

(1) 10⁻³ mol / L 的萘乙酸溶液:

称取 18.6 mg 的萘乙酸用少量 1 mol / L NaOH 溶解后, 用水稀释并定容至 100mL。

(2) 10⁻³ mol / L 的 6-苄氨基嘌呤溶液:

称取 22.5mg 6-苄氨基嘌呤, 用少量 1 mol / L 的 HCl 溶解后, 用水稀释并定容到 100mL。

5. 70%或 75%的消毒酒精(用 95%的医用酒精配制)

[实验步骤]

1. 培养基的配制

(1) 将各种贮液按比例混合, 配制成 MS 培养基。

(2) 分别加入一定浓度的 NAA 和 BA(在 10⁻⁶-10⁻⁷ mol / L 范围内, 由学生自己设计不同浓度的生长调节剂组合)。

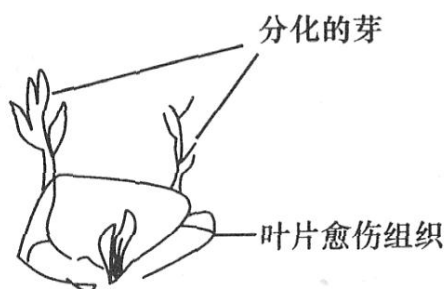
- (3)培养基中加入3%蔗糖,0.7%琼脂。加去离子水到一定体积。
- (4)用1N的NaOH调pH至5.8。
- (5)将培养基煮沸,分装到50mL三角瓶中。每瓶15—20 mL左右。用封口膜或棉塞包扎瓶口。
- (6)将三角瓶放入高压灭菌锅,在120℃、120 000Pa下灭菌15min。待温度降低到105℃以下,打开放气阀排气后,取出三角瓶、平放冷却备用。
- (7)按上述方法高压灭菌去离子水,烧杯,培养皿和相关用具。
2. 外植体的表面消毒与接种培养
- (1)取自烟草完全展开的幼叶,用自来水洗净晾干。
- (2)在超净工作台(操作前开机20min)上将叶片浸于70%酒精的无菌玻璃烧杯中30s,然后移入10%的次氯酸钠溶液中5-10 min(消除外植体表面的微生物)。无菌水至少洗涤3次(消毒液对外植体有很大伤害,必须清洗干净),每次停留3—5 min。
- (3)将灭菌后的叶片置于无菌培养皿内,用解剖刀将无菌叶片切成5mmX 5 mm大小。
- (4)将适宜大小的外植体接种到培养基上,每个三角瓶中接入4—5块叶外植体。
- (5)将三角瓶置于生长箱或培养室内的培养架上。培养条件为:温度25-27℃,光周期为:光照16h和黑暗8 h,光照强度约1 500lx左右。

[实验结果]

观察烟草叶外植体的器官分化,如图实验16—1所示。



照片图



示意图

图实验16—1 烟草叶外植体的器官分化

[实验安排]

整个实验在1 d内完成,学生配制全部试剂和完成全部操作,利用课余时间来培养室观察记录烟草叶片愈伤组织生长、不定芽和不定根分化的情况。

实验二 烟草原生质体分离和体细胞杂交

选自魏群主编.生物工程技术实验指导.北京：高等教育出版社，2002:156-160

[实验目的]

通过烟草叶片和愈伤组织原生质体的分离和融合，学习植物原生质体分离和体细胞杂交的一般方法，认识体细胞杂交打破物种生殖隔离，促进种质交流的特点，建立起细胞工程育种技术体系。

[实验原理]

原生质体是消除细胞壁的细胞部分。利用纤维素酶和果胶酶消化植物细胞壁，能获得大量的原生质体。聚乙二醇(PEG)高钙高 pH 融合诱导方法是体细胞杂交的主要方法之一。PEG 带微弱极性的负电荷，能与水、蛋白质和碳水化合物等具有正电荷基团的分子形成氢键。当 PEG 分子链足够大时，在邻近原生质体表面之间起着分子桥的作用，引起原生质体紧紧粘连成团。 Ca^{2+} 在蛋白质或磷脂负电荷基团和 PEG 之间形成桥梁，加强原生质体之间的粘连作用， 10mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 能完全消除烟草原生质体表面的电荷。在洗涤过程中，直接或间接与质膜结合的 PEG 分子从原生质体表面洗脱，并随着 pH 的降低，导致膜电荷的不平衡和发生重新分布。质膜紧密接触区域的电荷重新分布使一原生质体的某些正电荷基团与另一原生质体的负电荷基团联结，反之亦然，最后导致原生质体发生融合。融合细胞在培养过程中再生细胞壁、分裂生长形成愈伤组织和再生植株，产生体细胞杂种植株。根据双亲遗传物质在体细胞杂种中的遗传，体细胞杂种又分为核对称杂种、核不对称杂种和细胞质杂种。本实验用于诱导核对称杂种。

[仪器、材料和试剂]

(一)仪器

1. 超净工作台
2. 高压灭菌锅
3. 光照培养箱
4. 低速离心机
5. 倒置光学显微镜

(二)材料

1. 烟草试管苗叶片和愈伤组织
2. 萘乙酸(Naphthylacetic acid, NAA)
3. 苄基氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, BA)
4. 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D)
5. 硝酸铵(NH_4NO_3)
6. 硝酸钾(KNO_3)
7. 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
8. 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
9. 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)
10. 碘化钾(KI)
11. 硼酸(H_3BO_3)
12. 硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
13. 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

14. 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
15. 氯化钴, ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
16. 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
17. 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
18. 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)
19. 甘氨酸(Glycine)
20. 烟酸(Nicotinic acid, Vitamin PP)
21. 盐酸吡哆醇(Pyridoxine $\cdot$ HCl, Vitamin B₆)
22. 盐酸硫胺素(Thiamine—HCl, Vitamin B₁)
23. 肌醇(Inositol)
24. 蔗糖(Sucrose)
25. 琼脂(Agar)
26. 氯化汞(HgCl_2)
27. 次氯酸钠(Sodiumhypochlorite)
28. 二乙酸荧光素(Fluoresceindiacetate, FDA)
29. 伊凡蓝(Evan's blue)
30. 醋酸(HAc)
31. 甲醇
32. 磷酸氢氨($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
33. 酒精(95%的卫生酒精, 100%的工业酒精)
34. 三角瓶(50mL)
35. 枪形镊子
36. 血细胞计数板
37. 葡萄糖
38. 氢氧化钠(NaOH)
39. 盐酸(HCl)
40. 纤维素酶 OnozukaR—10(CellulaseOnozukaR—10)
41. 离析酶 R—10(Macerozyme R—10)
42. 二甲基亚砷(DMSO)
43. 甘露醇
44. 氯化钠(NaCl)
45. 氯化钾(KCl)
46. 细菌过滤器(0.45 μm 的硝酸纤维素膜)
47. 培养皿(直径 4.5 cm)
48. 解剖刀
49. 尼龙网筛或不锈钢网筛(300 目)

(三)试剂

1. D2 原生质体培养基

(1)大量元素(mg / L)

NH_4NO_3 270

KNO_3 1480

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 900

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 900

KH_2PO_4 170

(2)碳素营养

葡萄糖 0.4mol / L

蔗糖 0.05 mol / L

(3)生长调节剂

NAA 0.5—1.0 mg / L

BA 0.05—0.1 mg / L

(4)D2 原生质体培养基的其他成分同 MS 基本培养基(见附录)

2. MS 分化培养基

MS 基本培养基+0.2mg / LBA+0.01 mg / LNAA+3%蔗糖+0.6%琼脂

3. 原生质体分离的酶液组成

(1)CPW 培养基(mg / L), pH 5.4

KH₂PO₄ 27.2

KN0₃ 101

CaCl₂·2H₂O 1480

MgSO₄·7H₂O 246

K₁ 0.16

CuSO₄·5H₂O 0.025

(2)2%纤维素酶 OnozukaR—10, 0.5%离析酶 R—10

(3)0.4mol / L 甘露醇

4. PEG 融合液

(1)20%PEG600, 0.06mol / LCaCl₂, 0.3 mol / L 甘露醇

(2)1 mol / L 甘氨酸—NaOH, pH 10.0

(3)二甲基亚砜(DMSO)

(4)使用前将(1), (2)和(3)溶液按 8: 1: 1 比例混合

5. Ws 稀释液(pH 5.6)

125 mmol / LCaCl₂, 155 mmol / LNaCl, 5 mmol / LKCl, 5 mmol / L 葡萄糖

[实验步骤]

1. 原生质体分离

(1)用 0.45um 孔径硝酸纤维素膜的细菌过滤器过滤酶液和液体 D2 原生质体培养基。

(2)分别取试管苗幼叶和 2—3 周龄的愈伤组织, 用解剖刀切成小块, 按材料: 酶液二 1: 10 加入无菌酶液, 在 25℃ 黑暗条件下消化细胞壁 4—6 h, 间歇轻轻摇动(植物原生质体非常容易破碎, 各种操作必需小心)。

2. 原生质体的纯化

(在超净工作台上用 300 目孔径的尼龙网筛过滤原生质体到 10 mL 有盖离心管内(过滤液中含原生质体和细胞碎片)。

(2)806—1 000r / min 离心 3—5 min, 用无菌吸管吸弃酶液。沿离心管管壁缓缓加入无酶类的原生质体分离液, 轻轻吸打原生质体沉淀, 重新悬浮原生质体, 800—1 000 r / min 离心 3-5 min(离心速度大或时间长, 均使原生质体沉淀紧密, 重新悬浮吸打时容易导致原生质体破裂)。重复 2 次。

(3)原生质体重新悬浮在少量的 CPW 培养基(含 0.4mol / L 甘露醇)中。用血球计数板在显微镜下计数和统计原生质体密度, 用同样的 CPW 培养基调整原生质体密度到 1X10⁶ / mL。

3. 原生质体融合

(1)将叶肉原生质体和愈伤组织原生质体等体积混合, 取 0.2mL 原生质体混合悬浮液

到另一支无菌离心管中。

(2)将(1), (2)和(3)溶液按 8: 1: 1 比例混合后, 沿离心管管壁缓慢加入 0. 2mL 新混合的 PEG 融合液, 静置 10min(原生质体紧密地粘连在一起)。

(3)在 5 rain 内慢慢地加入 5 mLW5 稀释液: 静置 1 h(原生质体在稀释液的处理下, 逐渐发生融合, 此时切忌振动)。

(4)800—1 000r / min 离心 3—5 min, 原生质体重新悬浮在稀释液中, 静置 30min。

(5)用原生质体培养液离心纯化 2 次, 最后调整原生质体密度到 10^5 / mL。

4. 融合细胞的观测

取一滴融合处理后的原生质体悬浮液于载玻片上或培养皿中, 在倒置显微镜下观察。叶肉原生质体密布叶绿体, 愈伤组织原生质体的细胞质透明, 融合的原生质体中存在部分叶绿体(图实验 17—1)。

5. 原生质体培养

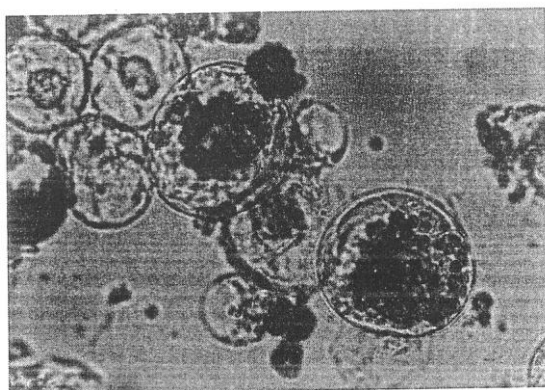
(1)1 mL 原生质体悬浮液植板于直径为 4. 5cm 的培养皿中, 用 parafilm 封口(新培养: 的原生质体呈圆形), 置于 25 ℃、3000x 条件下培养(光照强, 抑制原生质体生长)。

(2)培养 2d 后, 原生质体为椭圆形, 表明细胞壁再生。培养 3—5d 后, 再生细胞发生: 第十次分裂。培养条件将光照提高到 1.5×10^4 lx。

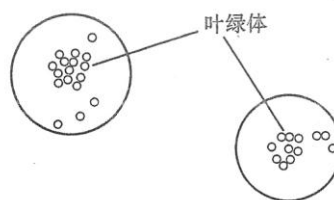
(3)培养 2 周后, 加入 0. 5mL 糖浓度减半的原生质体培养基(培养基中渗透剂浓度高时, 抑制再生细胞的分裂和生长)。

(4)培养 4 周后, 将愈伤组织转移到 MS 再生培养基上, 诱导植株再生。进一步对再生植株进行遗传分析, 鉴定体细胞杂种植株。

[实验结果]



照片图



示意图

观察原生质体融合产物(图实验 17—1)

[实验安排]

第一天: 配制全部试剂。

第二天: 原生质体分离, 纯化, 融合和培养。显微观察原生质体融合产物。准备烟草试管苗和愈伤组织。

第三天: 配制 MS 分化培养基。将愈伤组织转移到 MS 再生培养基上, 诱导植株再生。

学生利用课余时间观察原生质体再生细胞分裂和生长, 更换新鲜、低渗透剂浓度的培养基。

实验三 烟草叶盘法转基因

一.实验目的:

学习并了解叶盘法转基因烟草的技术流程。

二. 实验原理:

土壤中的农杆菌是一种革兰氏阴性菌，能够感染植物的受伤部位。农杆菌中有一种环形的 Ti 质粒，Ti 质粒最重要的两个区域为 T-DNA 区和毒性区，T-DNA 是 Ti 质粒上唯一能够整合到植物染色体上的序列，而毒性区上一系列则帮助 T-DNA 区整合到植物的染色体上。

土壤农杆菌转化植物的常用方法是叶盘法。这种转基因方法十分简单，一般是将植物的叶片切成小圆片，用农杆菌感染后共培养 2-4 天，而后转移到加有选择压的分化培养基上分化出芽，在 MS 培养基上生根后，再生出完整的植株。

三. 试剂及设备

1.试剂及用品:

MS 培养基：配方见“植物的组织培养技术”实验指导

Kan: 卡那霉素

Cef: 头孢噻肟钠

NAA: 萘乙酸

6-BA: 细胞分裂素

Rif: 利福平

Beef extract（牛肉浸膏）

Yeast extract（酵母膏）

Peptone（蛋白胨）

Sucrose（蔗糖）

MgSO₄·7H₂O（硫酸镁）

Hyg: 潮霉素

保鲜膜

滤纸

培养皿

封口膜

T1 培养基: MS 培养基

T2 培养基: MS 培养基+6-BA1.0mg/L+NAA0.1 mg/L+Hyg20 mg/L+Cb500 mg/L

T3 培养基: MS 培养基+ Hyg15 mg/L+Cb500 mg/L

(T2: 生长培养基; T3: 生根培养基)

2.仪器:

光照培养箱, 恒温摇床, 超净工作台, 接种器械等

四.实验步骤:

1 农杆菌培养

1) 从平板上挑取含有目的基因的单菌落, 接种到 3 ml YEB 液体培养基中 (Str 25 $\mu\text{g/ml}$ 、Rif 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Kan 80 $\mu\text{g/ml}$) 于恒温摇床上 27 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 摇培过夜至 OD 600 为 0.6-0.8。

2) 摇培过夜的菌液按 1%-2%的比例, 转入新配置的无抗生素的 YEB 培养基中, 在与上述相同的条件下培养 6 h 左右, OD600 为 0.2-0.5 时即可用于转化。

或: 将按上述方法培养的 OD 600 为 0.6-0.8 的菌液, 转入无菌离心管中, 于室温条件下, 5000 rpm 离心 10 min, 去掉上清液, 菌体用 1/2 MS 液体 (pH 5.4-5.8) 培养基重悬, 稀释至 OD600 为 0.2 左右, 用于转化。

2 侵染

于超净工作台上, 将菌液倒入无菌的小培养皿中。取不具 Kan 抗性的烟草无菌苗的幼嫩、健壮叶片, 去主脉, 将叶片剪成 0.5 cm^2 的小块, 放入菌液中, 浸泡适当时间 (一般 5-10 min)。取出叶片置于无菌滤纸上吸去附着的菌液。

<注>: 同时设未经农杆菌侵染的叶盘作为阴性对照, 以下步骤同。

3 共培养

将侵染后的烟草叶片接种在不含任何激素和抗生素的 MS 基本培养基 (T1) 上, 用封口膜封好培养皿, 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗中培养 2-4 天。

4 选择培养

将黑暗中共培养 2-4 天的烟草叶片转移到筛选培养基(T2)中, 用封口膜封好培养皿, 在光照为 2,000-10,000 lux、25-28 $^{\circ}\text{C}$ 、16/8 hd^{-1} 光暗条件下选择培养。

<注>: 叶盘边缘轻压入培养基中, 以增加选择压力。

5 生根培养

约 2-3 周后，待不定芽长到 1 cm 左右时，切下不定芽并转移到生根培养基(T3)上进行生根培养，5-10 天后长出不定根。