

国家精品课程配套立体化教材

生物学 基础实验教程

(第三版)

—— 遗传学实验、生物化学实验、分子生物学实验

滕利荣 孟庆繁 主编

III



科学出版社
www.sciencep.com

国家精品课程配套立体化教材

生物学基础实验教程

(第三版)

(Ⅱ)

——遗传学实验、生物化学实验、分子生物学实验

滕利荣 孟庆繁 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书按遗传学、生物化学、分子生物学等实验内容分为3篇。每篇从基础性实验、综合性实验和设计创新性实验3个层面上设置实验项目。每个实验项目按相关理论知识、目的要求、实验原理、材料与器材、实验步骤、实验结果、注意事项、思考题进行了系统编排。全书共设45个实验。

每个实验相关理论知识内容是将理论课涉及实验的内容独立出来,有助学生加深对实验的理解和掌握。每门实验课程内容后,设有设计创新实验,列出选题范围,使学生根据自己的兴趣爱好自主选题,设计研究方案,进行实验研究。并在本书后附有设计创新实验程序与要求。另外,从实验原料的选用、实验路线设计、检测方法、统计学分析方法等多个方面进行了调整,使实验知识点训练更具有系统性、完整性和实用性。

本教材是高校生命科学实验教学和教学改革急需的教材,也可作为生命科学科技工作者的参考工具书。为生命科学相关专业和非生物学相关专业的师生、科研、企事业单位的人员提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物学基础实验教程. 2, 遗传学实验、生物化学实验、分子生物学实验/滕利荣, 孟庆繁主编. —3版. —北京: 科学出版社, 2008

国家精品课程配套立体化教材

ISBN 978-7-03-022057-8

I. 生… II. ①滕… ②孟… III. 生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 105495 号

责任编辑:单冉东 李晶晶 / 责任校对:朱光光

责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1999年8月第一版 2004年8月第二版

吉林科学技术出版社

2008年6月第三版 开本:787×1092 1/16

2008年6月第一次印刷 印张:15 1/2

印数:1—4 000 字数:350 000

定价:30.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换<明辉>)

第三版前言

生命科学是 21 世纪各国争先发展的学科之一,要实现我国生命科学的跨越式发展,培养具有国际竞争能力的创新型人才是关键。对于生命科学创新型人才的培养,实践教学是最佳切入点,通过实践教学不仅可以向学生传授生命科学知识,使其掌握娴熟的实验技能,培养其综合分析问题和解决问题能力,而且对于培养学生团结合作、严谨求实、勇于创新的科学品质和为人类造福的价值观具有重要作用。为了适应社会发展对人才培养的需要,我们不断深化实验教学体系、内容和方法的系统改革,并加强与之相适应的配套教材建设,使实验教学改革更有利于学生知识、能力和素质的全面协调发展。

本教材自 1999 年第一版、2004 年第二版出版以来,深受读者欢迎,已被多所高校所采用。随着科学技术的快速发展,新知识、新技术和新方法不断诞生。为了保持实验内容的先进性,适应新形势下高素质创新型人才培养的需求,经征求广大读者使用意见,结合生物学实验教学改革的实践,决定对本教材再次修订。第三版修订中仍然秉承“加强基础、拓宽知识、培养能力、激励个性”的人才培养思想,坚持有利于学生自主学习、合作学习和研究性学习的原则,在保持第二版整体实验教学体系基础上,在实验内容上做了部分调整和部分实验内容的修改。

本书是国家精品课程——生物学基础实验的配套立体化教材之一,该系列教材包括:①《生物学基础实验教程(第三版)(I)——植物生物学实验、动物生物学实验、微生物学实验、细胞生物学实验、免疫学实验》;②《生物学基础实验教程(第三版)(II)——遗传学实验、生物化学实验、分子生物学实验》;③《高校教学实验室管理》;④《现代生命科学实践教学改革的研究》;⑤《生物学综合实验网络教程》(光盘);⑥普通高等教育“十一五”国家级规划教材《生命科学仪器使用技术教程》,共同组成生命科学实验教学系统的配套教材。

本书修订的实验项目选择设计时,结合“生物学基础实验”国家精品课程建设和生物学自身的特点,按基本技术、宏观(个体)水平、细胞水平和分子水平 4 个层次统筹设计实验项目,避免了内容的重复,节省了学时。本书注重各门实验技术和实验方法的合理综合,注重实验内容与科研、生产和实际应用的密切联系,体现基础与前沿、经典与现代的有机结合,有利于学生自主学习、合作学习和研究性学习。同时,每门实验课后均设有设计创新实验。

第 I 分册按植物生物学实验、动物生物学实验、微生物学实验、细胞生物学实验、免疫学实验等实验内容分为 5 篇;第 II 分册按遗传学、生物化学、分子生物学等实验内容分为 3 篇。每篇从基础性实验、综合性实验和设计创新性实验 3 个层面上设置实验项目。每个实验项目按相关理论知识、目的要求、实验原理、材料与器材、实验步骤、实验结果、注意事项、思考题等进行了系统编排。为了培养学生综合实践能力,加强了实验内容的科学综合;为了保持实验内容的先进性,将科学研究成果中技术先进、方法成熟、适合本科生教学的实验项目引入到实验教材;为了使实验教学内容与理论课内容合理衔接,本教材将理论课程内容涉及的实验内容独立出来,作为每个

实验相关理论知识内容,列在每个实验之前。为了给学生创造个性发展和创新能力培养的空间环境,调动学生设计创新实验的积极性,激发学生设计创新实验热情,每门实验课程内容后面,设计创新实验,列出选题范围,让学生根据自己的兴趣爱好自主选题,设计研究方案,进行实验研究。另外,从实验原料的选用、实验路线设计、检测方法、统计学分析方法等多个方面进行了调整,使实验知识点训练更具有系统性、完整性和实用性。

本书由吉林大学生命科学学院、东北师范大学生命科学学院、吉林大学白求恩医学院、吉林大学畜牧兽医学院、吉林大学珠海分校、长春理工大学生命科学与技术学院和长春工业大学化学与生命科学学院等单位长期从事实验教学工作、潜心钻研实验教学改革、科学研究有所建树的教师集体编写,他们为此书的撰写付出了艰辛劳动。科学出版社单冉东编辑也为系列图书编写和顺利出版提供大力支持,在此一并表示感谢!

在本书编写过程中,错漏在所难免,还望同仁不吝赐教!

编者

2008年3月

第二版前言

《生物学基础实验教程》自 1999 年出版以来,深受广大读者的欢迎,在此期间经过多次印刷,被多所高校作为教材和工具书。读者们在使用本书后,对本书也提出不少的修改意见和建议。这些都使得编者深受鼓舞与鞭策,产生了修订本书的动力。随着生命科学迅速发展,新技术、新方法层出不穷,为了适应实践能力和创新能力人才培养的需要,更好地满足学生自主学习、自主训练,在吉林大学生命科学学院本科实验教学改革实践的基础上,我们对本教程进行了修订。

与第一版相比,实验体系和内容都作了重大调整,将原来的一本教材分为生物学基本技术实验、普通生物学基础实验、现代生物学基础实验三册,将生物学常用的实验技术和实验方法,以及常用相关仪器的操作规程及注意事项单独列为基本技术实验分册,供学生基本技术和仪器设备训练。将植物生物学实验、动物生物学实验、微生物学实验、遗传学实验和细胞生物学实验五门课程的 49 个实验项目列入普通生物学基础实验中,将生物化学实验、免疫学实验和分子生物学实验三门课程的 43 个实验项目列入现代生物学基础实验中。实验项目按基础性实验、综合性实验和设计创新性实验三个层面设置,注重各门实验课程内容之间的衔接,突出综合性、设计创新性实验,特别是将最新的适合实验教学的科研成果引入到实验项目中,使实验内容与科研、工程、社会应用项目密切联系,体现基础与前沿、经典与现代的有机结合。本书强调先进性和实用性,注重对学生综合能力、实践能力和创新能力的培养,使实验内容更符合生命科学优秀人才培养的需要。

我们在编写第二版时仍然秉承第一版写作的指导思想——力求内容全面新颖,语言深入浅出、通俗易懂,能反映生命科学各领域涉及的主要实验技术和实验方法,但限于编者的知识水平和写作能力,错误和纰漏之处在所难免,恳请读者批评指正。

编者

2004 年 7 月

第一版前言

随着科学技术的不断发展和知识经济的不断深入,国家和社会对高素质生命科学人才的要求日益广泛,而生命科学人才的基本素质之一,是对生物学基础实验全面、正确的理解与掌握。因此,人们对于一本广泛涉及生物学基础实验内容的教科书的要求也愈来愈迫切,激励我们编写这样一本综合的生物学基础实验教程。

生物学基础实验是一门内容广泛、技术操作性强,全面体现生物学基本方法、基本手段的实验教学。它是植物生物学、动物生物学、细胞生物学、生物化学、分子生物学等学科的基础训练。

高等教育的发展正由过细的专业划分走向综合化,这就要求在实验内容上,以不断改革的教学思想为指导,设置既有基础实验技术,又有学科发展前沿、知识结构合理的实验内容。学习生命科学的学生,要对生命科学各个专业的的基本方法、基本技术和基本操作,有一个系统的学习与掌握,并从中培养学生的实验动手能力、综合分析能力、创新能力和科学思维,达到全面提高学生素质的目的。我们按照教育部对大学生物学基础实验的要求,根据《世界贷款高等教育发展项目实验教学建设方案》提供的生物学基础教学实验项目,在确定实验内容方面做了大量的筛选工作,着重将生物实验中最基本、最常用的内容详尽地介绍给大家,并尽可能地介绍一些近年发展起来的新方法、新技术,以及我们在实验教学和科学研究中的经验总结。本实验教程涉及生物学的类群、个体、细胞和分子等诸多层次的实验教学内容。本书可供综合性大学生命科学学院、师范院校生物系和相关院校农、林、医、药等专业开设“生物学基础实验”课程的教材使用,也可供从事生物科学、医学、生物制药等专业的研究人员参考。

本书的编写由主编和副主编进行集体策划、构思,经编委多次讨论,根据各自专长分工编写,再互审互改,最后由主编统稿修改。可以说,每个篇章的内容都包含了各位编者在教学、科研中的经验和心血,因此本教材是集体智慧的结晶。

由于编者水平有限,在编写过程中疏忽与错漏在所难免,恳请读者批评指正,我们将不胜感激。

编者

1999年6月10日

目 录

第三版前言
第二版前言
第一版前言

第一篇 遗传学实验

实验一 植物细胞有丝分裂的制片与观察	3
实验二 减数分裂的制片与观察	6
一 玉米减数分裂的制片与观察	6
二 蝗虫减数分裂的制片与观察	8
实验三 植物多倍体诱发	11
实验四 染色体畸变的制片与观察	13
一 染色体结构变异的制片与观察	13
二 染色体数目变异的制片与观察	14
实验五 链孢霉有性杂交的四分子分析	16
实验六 植物组织培养	19
实验七 植物染色体组型分析	22
实验八 小麦有性杂交技术	25
实验九 数量性状的遗传分析——遗传率的估算	28
实验十 群体等位基因频率估算及遗传平衡分析	31
实验十一 植物基因组 DNA 的提取、鉴定与转化	33
一 植物基因组 DNA 的提取方法	33
二 植物基因组 DNA 的质量鉴定和浓度估测	35
三 感受态细胞的制备及目的 DNA 的转化	35
实验十二 果蝇的饲养及性状、性别的观察	38
实验十三 果蝇的杂交实验	41
一 果蝇的单因子遗传	41
二 果蝇的双因子遗传	43
三 果蝇的伴性遗传	45
四 基因的连锁与交换	48
五 果蝇的三点实验和基因定位	50
实验十四 果蝇唾腺染色体制片与观察	53
实验十五 蟾蜍骨髓染色体制备与观察	55
实验十六 小白鼠染色体技术	57

一	骨髓染色体制备与观察	57
二	活体姊妹染色单体色差方法	58
三	染色体 C-带显带方法	60
实验十七	人的染色体技术	62
一	外周淋巴细胞培养及染色体制片	62
二	染色体 G-带显带方法	64
三	姊妹染色单体互换的制片与观察	65
实验十八	设计创新实验	67

第二篇 生物化学实验

实验一	啤酒酵母蔗糖酶的提取、分离纯化、性质鉴定及反应动力学	71
一	啤酒酵母蔗糖酶的提取及分离纯化	71
二	考马斯亮蓝法测定蛋白浓度	75
三	紫外分光光度法测定蛋白浓度	77
四	蔗糖酶活力的测定	79
五	蔗糖酶纯度和相对分子质量的测定——SDS-PAGE 电泳法	81
六	用正交试验设计法测定几种因素对蔗糖酶活性的影响	87
七	蔗糖酶米氏常数 K_m 最大反应速率 V_{max} 值的测定和抑制剂常数 K_i	91
实验二	亲和层析法纯化胰蛋白酶	98
实验三	酶谱分析技术分析纤维素酶	102
实验四	大豆蛋白的提取与含量测定	107
一	大豆蛋白的提取	107
二	微量凯氏定氮法测定蛋白质含量	109
三	蛋白质含量的测定——Folin-酚法	113
四	双缩脲法测蛋白含量	114
五	大豆蛋白的氨基酸分析	115
实验五	N 末端氨基酸分析——DNS-Cl 法测定蛋白质及肽的 N 末端氨基酸	117
实验六	细胞色素 c 的制备及测定	122
实验七	核酸的提取及核苷酸的分离	127
一	动物组织核酸的提取及含量测定	127
二	植物组织核酸的提取及含量测定	130
三	酵母 RNA 的提取及含量测定	133
四	离子交换柱层析分离核苷酸	134
实验八	维生素 B ₂ 和维生素 C 的含量测定	138
一	维生素 B ₂ 含量测定	138
二	维生素 C 的含量测定	139
实验九	L-谷氨酸的酶促脱羧作用(测压法测定 L-谷氨酸)	142
实验十	三羧酸循环中间产物对酵母耗氧率的影响	146

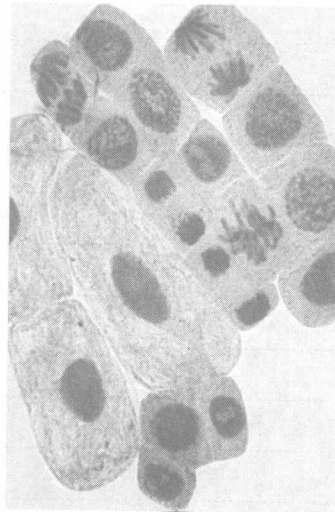
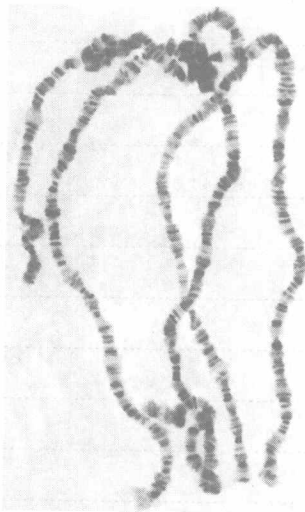
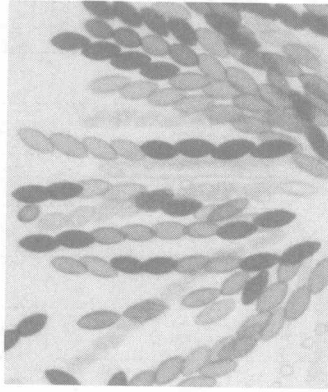
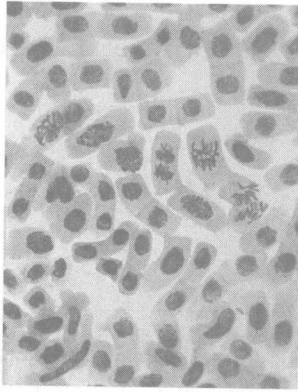
实验十一 脂肪、糖及氨基酸反应的定性实验	148
一 脂肪酸的 β -氧化	149
二 脂肪转化为糖的定性实验	150
三 肌糖原的酵解作用	151
四 氨基移换反应的定性实验	153
实验十二 设计创新实验	156

第三篇 分子生物学实验

实验一 腺嘌呤脱氨酶基因工程菌的构建、蛋白的表达、纯化及鉴定	159
一 目的基因的获得	161
二 目的基因的亚克隆	162
三 重组质粒的构建	166
四 重组质粒的转化、筛选和鉴定	170
五 蛋白的表达、纯化及鉴定	173
实验二 头发中抽提 DNA 并用 PCR-RFLP 法鉴定 CYP2C9 基因型	177
实验三 植物基因组 DNA、总 RNA 的提取及相对分子质量测定	181
一 植物基因组 DNA 的提取	181
二 植物总 RNA 的提取	182
实验四 蛋白质印迹分析 (Western blot analysis)	185
实验五 DNA 探针的制备和标记	188
实验六 Southern 印迹法	191
实验七 RNA 的 Northern 杂交	196
实验八 真核生物 cDNA 文库的构建和分析	199
实验九 电穿孔法转染哺乳动物细胞	204
实验十 转基因动物	206
实验十一 RNA 甲醛变性电泳	211
实验十二 RT-PCR 扩增目的基因	213
实验十三 聚合酶链式反应—单链构象多态性检测 (PCR-SSCP)	216
实验十四 $P_L P_R$ 启动子表达载体表达目的基因	219
实验十五 设计创新实验	222
主要参考文献	223
附录	225
附录 1 遗传学实验常用试剂、培养基的配制	225
附录 2 设计创新实验程序与要求	226

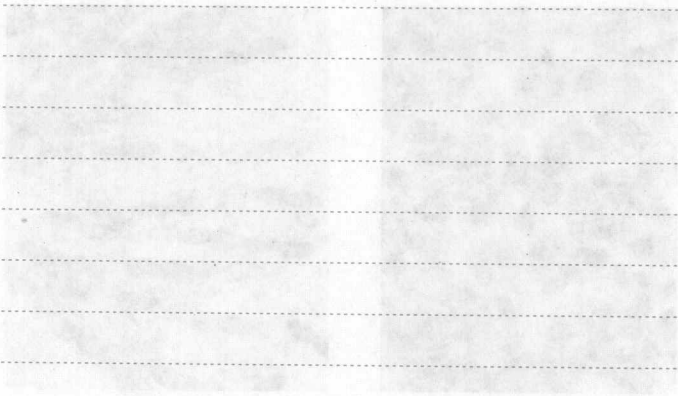
高中生物实验

第一篇 遗传学实验



实验备忘录

姓名：_____ 学号：_____



实验一 植物细胞有丝分裂的制片与观察

相关理论知识

有丝分裂是植物体细胞进行的一种主要分裂方式。植物有机体不断生长是靠有丝分裂完成的。能进行有丝分裂的细胞称为分生细胞,由分生细胞构成的组织叫分生组织。分生组织一般位于植物的根尖、茎尖、节间等部位。所以植物有丝分裂主要在根尖、节间、茎的生长点、芽及其他分生组织里进行。有丝分裂过程是由染色质变为染色体连续的动态过程,前期、中期、后期、末期是描述这个过程的概述。

目的要求

- (1) 学习和掌握植物细胞有丝分裂的制片技术。
- (2) 观察植物细胞有丝分裂过程中染色体的形态特征及染色体的动态变化行为。

实验原理

在有丝分裂过程中,细胞核内的遗传物质能准确地进行复制,然后能有规律地、均匀地分配到两个子细胞中去。植物有丝分裂主要在根尖、节间、茎的生长点、芽及其他分生组织里进行。将生长旺盛的植物分生组织经取材、固定、解离、染色、压片,可以观察到细胞有丝分裂的全过程。若进行染色体形态和数目的观察,需要进行前处理,即取材之后要用物理的或化学的方法,阻止细胞分裂过程中纺锤体的形成,使细胞分裂停止在中期。这时的染色体不排到赤道板上,而是分散在整个细胞核中,便于对染色体的形态、数目进行观察。

材料与器材

1. 材料

蒜(*Allium sativum* $2n=16$)、玉米(*Zea mays* $2n=20$)、洋葱(*Allium cepa* $2n=16$)、小麦(*Triticum aestivum* $2n=42$)、大麦(*Hordeum vulgare* $2n=14$)和蚕豆(*Vicia faba* $2n=12$)等。

2. 试剂

95%乙醇、乙酸、石炭酸品红、1 mol/L HCl。

3. 器材

恒温培养箱、显微镜、水浴锅、载玻片、盖玻片、单面刀片、镊子、培养皿、量筒、吸水纸。

实验步骤

1. 生根

根尖分生组织明显,取材容易,操作方便,因此是首选部位。大蒜、洋葱可以水培、沙培、土培。采用水培时要放在暗处培养,使根系生长旺盛。玉米、大麦、小麦和蚕豆种子先用温水浸泡一天之后,转入铺有多层吸水纸或纱布的培养皿中,上面覆盖双层湿纱布,置于24~26℃恒温培养箱中培养,每天换水2次。

2. 取材

待根长至1.5~2 cm时将根剪下。如果只需观察有丝分裂各期特征,根尖直接放入固定液中固定。如果要观察染色体形态和数目,根尖必须进行前处理后才能固定,取材必须要在细胞分

裂高峰期进行,即分裂细胞占细胞总数最大值时进行,这样分裂细胞比例大,便于选择和观察。

不同的植物,不同的环境条件,细胞分裂高峰的时间是不同的。常用的大蒜、洋葱一般是在上午9~11点,下午3~5点是分裂高峰期。如果是一份陌生的实验材料,最好的取材办法是每隔2~3h取材一次,以便找到细胞分裂高峰时间。

3. 前处理

前处理的方法一般采用低温处理和化学药剂处理。

(1) 低温处理:将取下的根尖放入盛有蒸馏水的烧杯或其他容器内,放在1~4℃的冰箱或其他低温条件下处理24h。不同的植物对低温的敏感程度不同,效果也不同,对低温较为敏感的植物是小麦,染色体无破坏作用,缩短均匀,简便易行。

(2) 化学药剂处理:常用的药剂有0.05%~0.1%的秋水仙素水溶液,饱和对二氯苯溶液,0.002~0.004 mol/L 8-羟基喹啉等。

秋水仙素溶液对纺锤体的抑制效果最好,一般在室温条件下处理2~4h可达到理想的效果。如果处理时间过长,染色体会变得更短,不利于对染色体结构进行研究。

对二氯苯和8-羟基喹啉对不同的植物效果也不相同。植物染色体数目多,个体小的适合于用对二氯苯;而染色体中等长度的更适合于用8-羟基喹啉,同时能使缢痕区更为清晰。

4. 固定

固定是指用化学药剂将细胞迅速杀死的过程。固定的目的是为了把细胞真实的生活状态保存下来,避免细胞在实验操作中生活状态发生改变。植物常用的固定剂是Carnoy固定剂。Carnoy固定剂是用3份95%的乙醇和1份乙酸配制成的。这两种药品都具有迅速穿透细胞致细胞死亡的功效,但是乙醇是脱水剂,可使细胞脱水变形;乙酸又是一种膨胀剂,可使细胞膨胀改变生活状态。把这两种药品按照3:1配制使用,既能迅速杀死细胞又可保持细胞真实生活状态。

固定的时间可根据被固定材料的大小而定,根尖固定2~4h可达到固定效果。固定时间过长,能去掉细胞中的一些脂肪油滴等,但是材料将变脆变硬,会给实验操作带来一些困难。

5. 解离

解离的目的是将分生组织细胞之间的果胶质和纤维素等物质破坏掉,在制片过程中使细胞容易散开。常用的解离方法有两种:

(1) 酸解:将1 mol/L HCl放在60℃恒温水浴锅中预热,当HCl温度达到60℃时,将根尖放入HCl溶液中。解离的时间要根据材料来确定。大蒜、洋葱是百合科植物,纤维素和果胶质的含量相对较低,解离4~5 min就可以了。禾本科植物根尖的解离时间要相对加长。解离时要注意观察,如果时间过长,分生区被解离过软,给实验操作增加困难,而且染色效果不好。

(2) 酶解:酶解时根尖的伸长区要去掉,只留下分生区。酶的浓度以果胶酶和纤维素酶等量混合为2%~3%为宜。酶解时温度条件非常重要,温度与解离时间成反比,温度高,解离时间就短,但是温度不得超过45℃,否则酶会失去作用。

6. 水洗与低渗

解离后的材料要用清水或蒸馏水洗3~5次。酶解的材料洗后还要在水中浸泡10~15 min。水洗的另一个作用是后低渗,压片时有利于染色体分散。水洗时一定要洗净,否则会影响染色效果。

7. 染色与压片

取分生组织的1/3左右于载玻片上,先用镊子或解剖针将分生组织碾碎尽量铺开,然后滴上染液。石炭酸品红染色5 min就可以了,乙酸洋红要染15~30 min,为了增强染色效果,可在酒精灯上加热几秒钟后继续染一段时间。压片时先盖上盖玻片,在没有用力压之前,先用手固定住

盖玻片,用镊子尖或解剖针在材料部位轻敲几下之后再用力压实。

8. 镜检

压好的载玻片要先放在低倍镜下观察,寻找不同分裂时期的典型细胞,转换成高倍镜观察。选择优秀的分裂细胞绘图。

9. 永久装片的制作

将制作好的载玻片放在冻片机上或液氮容器中将载玻片冻透,取出之后用双面刀片迅速揭开盖玻片。空气干燥后,用二甲苯透明,再用中性树胶或加拿大树胶封片。冻载玻片的时间切不可过长,否则细胞会冻裂。封片时要注意胶量不宜过多,树胶既能达到盖玻片的边缘又没有多余是最适量的。

实验结果

有丝分裂是染色体动态变化过程,为了描述这一过程,把它分成了前、中、后、末4个期。

前期(prophase):染色体呈细线状,不断地进行螺旋化,逐渐变得又短又粗。

中期(metaphase):染色体开始向赤道板移动,直至染色体的着丝点整齐地排列到赤道板上。

后期(anaphase):染色体的着丝点处一分为二,姊妹染色单体在纺锤丝的牵引下开始向两极移动,到达两极为止。

末期(telophase):染色体开始解螺旋,一直到两个新的子细胞壁形成。

思考题

1. 做有丝分裂实验时为什么有时取材的细胞分裂相多,有时少?
2. 观察动植物染色体数目时为什么要进行前处理?

实验二 减数分裂的制片与观察

一 玉米减数分裂的制片与观察

相关理论知识

减数分裂(meiosis)是有性生殖的生物在形成配子时的一种特殊的分裂方式。减数分裂的结果使二倍染色体数减为单倍染色体数,当两性配子结合时,受精卵里的遗传物质保持了原有的数量恢复成二倍体,保证了染色体数目的稳定性和遗传的稳定性。

目的要求

- (1) 学习和掌握植物细胞减数分裂的制片方法。
- (2) 了解植物细胞减数分裂过程各期的细胞学特征。

实验原理

减数分裂是在性母细胞中进行的。减数分裂的特点是细胞连续进行两次分裂,即减数第一次分裂和减数第二次分裂,而染色体只复制一次。结果一个小孢子母细胞分裂成4个子细胞,每个细胞染色体数目减少一半,所以叫减数分裂。减数分裂的另一个特点是前期特别长,变化复杂,包括同源染色体配对、交换与基因重组等。

材料与器材

1. 材料

玉米(*Zea mays* $2n=20$)。

2. 试剂

95%乙醇、乙酸、45%乙酸、4%硫酸铁铵(铁矾)、0.5%苏木精。

3. 器材

酒精灯、镊子、解剖针、50 mL 烧杯、10 mL 烧杯、载玻片、盖玻片、吸水纸、量筒、显微镜。

实验步骤

1. 取材

采集正处于减数分裂时期的玉米雄花。此时的雄花尚未抽出,包在旗叶内约10 cm长。用手摸植株的上部(喇叭口下部),有松软弹性感觉,便可将旗叶一起抽出,扒开旗叶分离出雄花序。取材的时间一般应在上午8:30~10:30,下午2:00~4:00为宜。取材时透过颖片可看到花药,如发现花药是黄颜色的,说明减数分裂已经结束,取材已晚。

2. 固定

将采集来的玉米雄花放入新配制的 Carnoy 固定液中(95%乙醇:乙酸=3:1)固定一周(中间更换2次固定液)。

3. 保存

采集玉米雄花是有季节性和时间性的,因此每次要多采集一些,保存起来备用。固定好的材料先用95%乙醇洗1~2次,然后转入70%乙醇中长期保存。为了避免乙醇挥发,保存用的容器封口要严密,为了保存材料的质量,乙醇每年要更换1~2次。

4. 剥离花药

玉米减数分裂是同步分裂,每朵小花中的花药几乎都处于同一分裂时期。因而剥离的量要充足,以便在实验中能进行选择。剥离花药时要注意将颖片剥离干净,使用的镊子和解剖针不可伤害花药,否则花粉母细胞会从伤口处外流,影响实验效果。

5. 媒染

剥离出来的花药放进4%硫酸铁铵(铁矾)溶液中进行媒染,媒染的时间需4~24 h。媒染的目的是让铁离子浸入花粉母细胞中,这些铁离子可以和染色液发生反应,增强染色效果。

6. 水洗

媒染后的花药要彻底洗净表面的铁离子,防止花药表面的铁离子与染色液反应,影响染色效果。为了水洗彻底,可将花药装入尼龙网小袋里流水冲洗5~10 min。

7. 染色

将洗净的花药放入0.5%的苏木精染色液中染4~24 h。为了增强染色效果,可以在25~30℃的温箱里进行染色。若染色时间不足,染色液很难通过花药壁细胞进入到花粉母细胞中去,影响观察效果。

8. 水洗

染色后的花药清水冲洗3~5次,主要是洗净花药表面的染料。

9. 压片

取一枚花药于载玻片上,滴上一滴45%乙酸,在酒精灯上加热3~5 s,盖上盖玻片,用吸水纸折叠2层覆在盖玻片之上,然后在材料部位用力压实。45%乙酸的作用是软化花药壁细胞,使花药壁破裂。另一个作用是去掉花药表面多余的颜色,起到分色的作用。如果加热时间过长,会把染上的颜色全部褪掉。45%的乙酸也是一种褪色剂。

10. 镜检

显微镜下的细胞群中既有花粉母细胞,也有花药壁细胞。而且花药壁细胞中的绒毡层细胞也在进行有丝分裂。因此在观察时要区分花粉母细胞和花药壁细胞。花粉母细胞呈圆形,个体较大;花药壁细胞是长方形,个体较小。如果做体积比较,一个花粉母细胞的体积相当于4~5个花药壁细胞,绒毡层细胞是多核细胞。

实验结果

由于减数分裂具有同步分裂的特点,所以在每枚花药中一般只能看到减数分裂中的一个期。减数第一次分裂复杂,前期中就有5个期:

(1) 细线期(leptotene):染色体呈非常细长的线状,交织成网,每个细胞核中的染色体都团在一起类似一个核仁。这些染色体虽然都含有2条染色单体,但是看不到这种结构。

(2) 偶线期(zygotene):各染色体从其他许多染色体中选择其同源染色体,准确地识别染色体的各位点,这一过程称为同源染色体的联会或配对。这时在显微镜下看到个别染色体的某一点或端部具有双重结构或染色体配对的双股结构。

(3) 粗线期(pachytene):染色体由于螺旋变短变粗,同源染色体联会已经完成,染色体数目由原来的20条染色体变成10个二价体。由于同源染色体的联会,使同源染色体之间产生交换,通过这些交换而发生遗传物质的相互转移和基因重组。另外,我们还能看到染色体上一些深染的颗粒结构,这些颗粒叫染色体结,是玉米粗线期的特有特征。

(4) 双线期(diplotene):进入双线期以后,配对的同源染色体开始分离,由于配对的二价体在长轴上有一点或几点结合着,而使二价体没有完全分离。这些结合的部位称为交叉,它代表着同源染色体间已完成交换的位点,是染色体发生交换的细胞形态学表现。