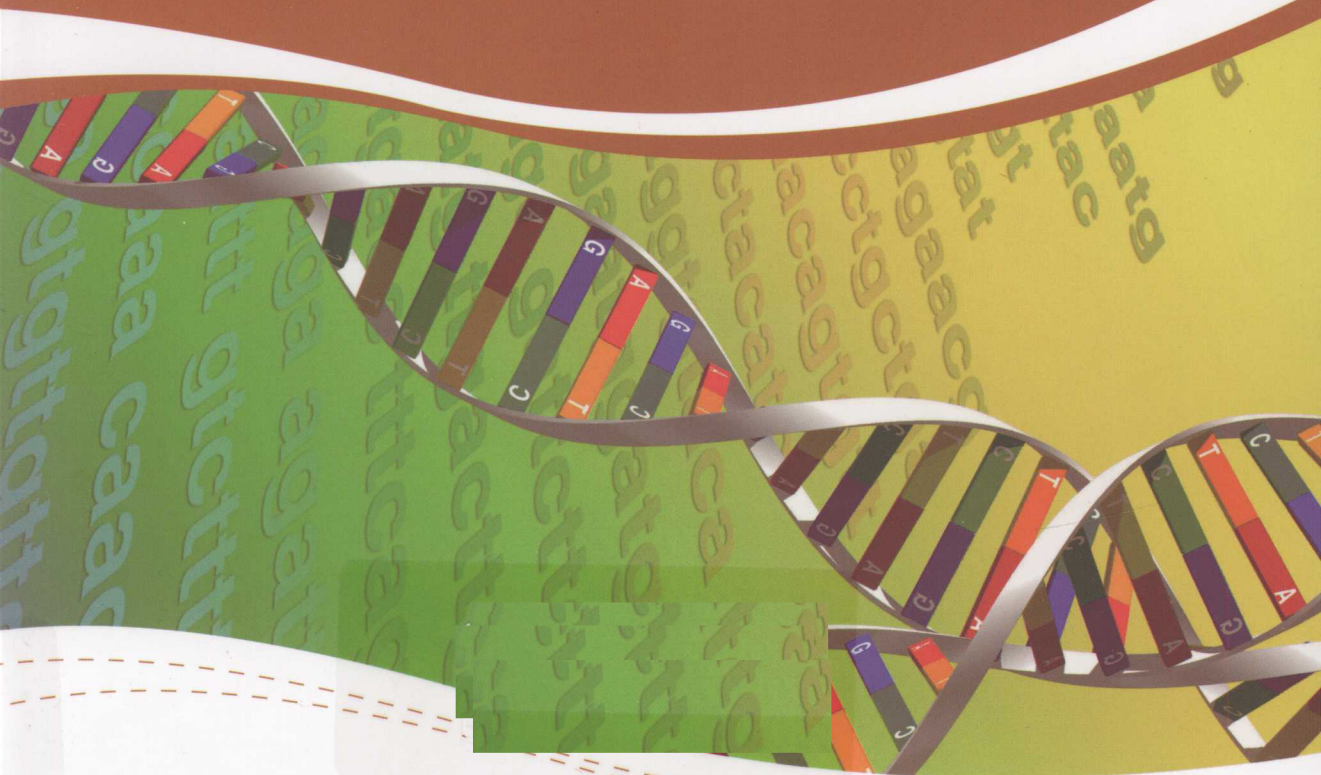


高等农林院校基础生物学系列实验教材

遗传学 实验教程

主编 穆平 乔利仙



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高等农林院校基础生物学系列实验教材

► 高等农林院校基础生物学系列实验教材

遗传学实验教程

Yichuanxue Shiyan Jiaocheng

专业“遗传学”课程的教学实践,编写了这本《遗传学实验教程》。本教材主要有以下特点:

内容按照基础性实验、综合性实验、研究性实验的思路编排。基础性实验即对遗传学基本理论、基本规律的验证实验;

培养学生综合运用遗传学知识解决问题的能力;研究性实验主要是为了

培养学生的进一步学习的能力。

主 编 穆 平 乔利仙
副主编 樊连梅 杨国锋 隋炯明 郭宝太

编 者 (以姓氏笔画为序)

王晶珊 乔利仙 孙世孟 李冬梅
杨国锋 郭宝太 盖树鹏 隋炯明
樊连梅 穆 平



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

■ 内容提要

本实验教材根据遗传学理论课程的教学内容,按照基础性实验、综合性实验、研究性试验的顺序,安排了26个实验。其中,涉及经典遗传学方面的实验包括:分离定律、自由组合定律的验证及基因互作观察;植物减数分裂染色体行为观察及制片技术;植物染色体核型分析;果蝇的性别鉴定、性状观察及生活史观察;果蝇唾液腺染色体标本的制备与观察;植物多倍体的诱导及鉴定;植物、动物遗传率的估算;动物遗传相关的估算;作物杂种优势的估算;基因频率估算及群体遗传平衡分析等。涉及细胞、分子方面的实验包括:PCR扩增技术;植物基因组DNA的提取及纯化;动物基因组DNA的提取;细菌转化及转化子的筛选;大肠杆菌质粒DNA的提取及酶切鉴定;微卫星标记(SSR)的多态性分析等。

本书可作为农林院校、师范院校、职业院校生物类及农业类本、专科生遗传学实验教材。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程/穆平,乔利仙主编. —北京:高等教育出版社,2010.9

ISBN 978-7-04-030822-8

I. ①遗… II. ①穆…②乔… III. ①遗传学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第170831号

策划编辑 吴雪梅 李光跃 责任编辑 王超然 封面设计 张志奇
版式设计 余杨 责任印制 韩刚

出版发行 高等教育出版社 购书热线 010-58581118
社址 北京市西城区德外大街4号 咨询电话 400-810-0598
邮政编码 100120 网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经销 蓝色畅想图书发行有限公司 网上订购 <http://www.landaco.com>
印刷 廊坊市文峰档案印务有限公司 <http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开本 787×1092 1/16 版次 2010年9月第1版
印张 6.5 印次 2010年9月第1次印刷
字数 160 000 定价 12.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 30822-00

高等农林院校基础生物学系列 实验教材编委会

主任委员：刘家尧

副主任委员：郭立忠 王 伟 王冬梅

委 员：(以姓氏笔画为序)

王明友 王晶珊 朱 伟

全先庆 刘 新 刘洪庆

主任委员：刘家尧

(以姓氏笔画为序)

王明友 王晶珊 朱 伟

全先庆 刘 新 刘洪庆

▶ 前 言

目 录

为进一步促进遗传学实验教学,我们根据多年来生物类和农业类专业“遗传学”理论课程及实验课程的教学实践,编写了这本《遗传学实验教程》。本教材主要有以下特点:

内容按照基础性实验、综合性实验、研究性实验的思路编排。基础性实验即对遗传学基本理论、基本规律的验证;综合性实验的目的是培养学生综合运用遗传学知识解决问题的能力;研究性实验主要是为了满足学有余力的学生进一步学习的需要。

本实验教材的研究对象除了模式生物如果蝇、玉米以外,还结合农业院校的特点把家畜等作为研究对象。另外,在实验类型方面,除安排一定数量经典遗传学和细胞遗传学实验外,还安排一定数量的分子遗传学实验,以满足不同专业学生的需求。

由于编者的水平有限,本教材可能存在不少错误和疏漏之处,望广大读者批评指正。

编 者

2010年6月

第二部分 综合性实验

实验15 植物有性杂交技术	66
实验17 植物染色体分带技术	68
实验18 作物杂种优势的估算	71
实验19 大肠杆菌的杂交及染色体作图	73
实验20 细菌转化和转化子的筛选	75
实验21 小鼠骨髓细胞和睾丸细胞染色体标本的制备和观察	78
实验22 大肠杆菌质粒 DNA 的提取及酶切鉴定	80

目 录

基础性实验

第一部分 基础性实验

实验 1	分离定律、自由组合定律的验证及基因互作观察	2
实验 2	植物有丝分裂染色体常规制片技术	6
实验 3	植物减数分裂染色体行为观察及制片技术	10
实验 4	植物染色体核型分析	14
实验 5	果蝇的性别鉴定、性状观察及生活史观察	17
实验 6	果蝇唾腺染色体标本的制备与观察	20
实验 7	植物多倍体的诱导及鉴定	23
实验 8	植物基因组 DNA 的提取及纯化	26
实验 9	动物基因组 DNA 的提取	28
实验 10	琼脂糖凝胶电泳	30
实验 11	PCR 扩增技术	32
实验 12	植物遗传率的估算	36
实验 13	动物遗传率的估算	39
实验 14	动物重复率的估算	50
实验 15	动物遗传相关的估算	54

第二部分 综合性实验

实验 16	植物有性杂交技术	66
实验 17	植物染色体分带技术	68
实验 18	作物杂种优势的估算	71
实验 19	大肠杆菌的杂交及染色体作图	73
实验 20	细菌转化和转化子的筛选	75
实验 21	小鼠骨髓细胞和睾丸细胞染色体标本的制备和观察	78
实验 22	大肠杆菌质粒 DNA 的提取及酶切鉴定	80

实验 23 基因频率估算及群体遗传平衡分析 84

第三部分 研究性实验

实验 24 植物基因定位:三点测验 88
 实验 25 果蝇基因定位:三点测验 91
 实验 26 微卫星标记(SSR)的多态性分析 93
 参考文献 96

遗传性原基 实验一 杂

5 果蝇野生型基因及突变型的杂交自由组合定律的验证 1 实验
 8 木薯甘薯嵌合体染色体分离的遗传学分析 2 实验
 10 木薯甘薯及紫薯不同染色体行为观察及分离定律的验证 3 实验
 14 植物染色体核型分析 4 实验
 17 果蝇的性别鉴定,染色体组分析,染色体组分析 5 实验
 20 果蝇染色体组型的制备与观察 6 实验
 23 植物杂种的鉴定 7 实验
 26 植物基因组 DNA 的提取及转化 8 实验
 28 动物基因组 DNA 的提取 9 实验
 30 琼脂糖凝胶电泳 10 实验
 32 PCR 扩增技术 11 实验
 36 植物遗传率的估算 12 实验
 39 动物遗传率的估算 13 实验
 40 动物遗传率的重复估算 14 实验
 44 动物遗传相关性的估算 15 实验

遗传性原基 实验二 杂

66 植物染色体组型分析 16 实验
 68 植物染色体分带技术 17 实验
 71 植物种间杂交的估算 18 实验
 73 大鼠染色体组型的杂交及染色体组型分析 19 实验
 75 细菌转化和转导的筛选 20 实验
 78 小鼠骨髓瘤细胞融合及染色体组型分析 21 实验
 80 大鼠骨髓瘤细胞融合及染色体组型分析 22 实验

的,当显性基因 P_1 存在时,呈现紫色,当隐性基因纯合子 (p_1p_1) 存在时,呈现白色。显性基因 A_1, A_2, A_3, C, R 中缺少任何一个或所有这些色素基因均为白色,但当显色基因纯合子存在时,均表现为无色。

由于控制玉米糊粉层颜色的基因 A_1, A_2, A_3, C, R 间表现为互补作用,只有这5个基因都呈显性状态时,色素才能形成,籽粒表现为有色,籽粒无色,基因型为 $aaCCrr$ 和 $AA_1_2_3RR$ 的籽粒表现为有色, F_2 自交果穗籽粒的性状分离比为:有色(9/16) : 无色(7/16)。

第一部分

基础性实验

1. 互补作用

与玉米糊粉层色素形成有关的基因 A_1, A_2, A_3, C, R 间表现为互补作用,只有这5个基因都呈显性状态时,色素才能形成,籽粒表现为有色,籽粒无色,基因型为 $aaCCrr$ 和 $AA_1_2_3RR$ 的籽粒表现为有色, F_2 自交果穗籽粒的性状分离比为:有色(9/16) : 无色(7/16)。

2. 抑制作用

在糊粉层色素形成过程中,显性基因 I 抑制显性基因 C 的表达,基因型为 $aaCCII$ 的有色籽粒与基因型为 $aaCCrr$ 的无色籽粒杂交, F_2 基因型为 $aaCCRR$, 其自交所得 F_2 果穗籽粒性状分离比为:无色(9/16) : 有色(7/16)。

3. 隐性上位作用

基因型 $aaCCrr$ 的有色籽粒与基因型 $aaCCrr$ 的无色籽粒杂交, F_2 基因型为 $aaCCRR$, 其自交所得 F_2 果穗籽粒性状分离比为:无色(9/16) : 有色(7/16)。

1) 玉米 (*Zea mays*) (糯性 × 非糯性) F_2 花粉粒和 F_2 自交果穗的性状

2) 玉米 (*Zea mays*) 有色 × 无色 (籽粒) F_2 自交果穗的性状

3) 玉米 (*Zea mays*) 显性基因互作的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

4) 玉米 (*Zea mays*) 抑制作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

5) 玉米 (*Zea mays*) 隐性上位作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

6) 玉米 (*Zea mays*) 互补作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

7) 玉米 (*Zea mays*) 显性基因互作的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

8) 玉米 (*Zea mays*) 抑制作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

9) 玉米 (*Zea mays*) 隐性上位作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

10) 玉米 (*Zea mays*) 互补作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

四、实验步骤

1. 玉米 (*Zea mays*) 糯性 × 非糯性 F_2 花粉粒和 F_2 自交果穗的性状

2. 玉米 (*Zea mays*) 有色 × 无色 (籽粒) F_2 自交果穗的性状

3. 玉米 (*Zea mays*) 显性基因互作的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

4. 玉米 (*Zea mays*) 抑制作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

5. 玉米 (*Zea mays*) 隐性上位作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

6. 玉米 (*Zea mays*) 互补作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

7. 玉米 (*Zea mays*) 显性基因互作的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

8. 玉米 (*Zea mays*) 抑制作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

9. 玉米 (*Zea mays*) 隐性上位作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

10. 玉米 (*Zea mays*) 互补作用的籽粒颜色性状分离的果穗标本。

实验 I

分离定律、自由组合定律的验证 及基因互作观察

一、实验目的

1. 通过玉米的一对、两对相对性状的遗传杂交实验,分析杂种后代的性状表现,验证分离定律及自由组合定律。
2. 通过玉米籽粒颜色杂交实验,了解基因互作现象。

二、实验原理

根据分离定律,植物细胞发生减数分裂形成配子时,位于同源染色体上的等位基因彼此分离,互不干扰地分配到不同的配子中去,因而配子中只具有成对基因中的一个。将具有一对性状差异的两个纯合亲本杂交,在完全显性的情况下, F_1 表现1种表型,产生2种比例相同的配子,其自交子代和测交子代的表型分离比分别为3:1和1:1。在形成配子时,等位基因随同源染色体的分离而分离,非同源染色体上的基因自由组合。因此,将非同源染色体上的两对基因的纯合亲本进行杂交,在完全显性的情况下, F_1 表现1种表型,产生4种比例相同的配子,其自交子代和测交子代的表型分离比分别为9:3:3:1和1:1:1:1。如果非等位基因间存在相互作用,则 F_2 的分离比就会发生变化,根据互作方式的不同而表现不同的分离比。

玉米籽粒的结构见图1-1。

已知控制玉米籽粒各种性状的基因,具有下列遗传表现:

玉米籽粒的非糯性和糯性由一对基因决定,非糯性的杂合体($Wxwx$)减数分裂产生含有 Wx 和 wx 的花粉粒,具有非糯性基因 Wx 的花粉粒,产生直链淀粉,遇碘液呈蓝黑色;具有糯性基因 wx 的花粉粒,产生支链淀粉,遇碘液呈棕黄色。

胚乳性状有非甜粒和甜粒,非甜粒外形饱满,甜粒外形皱缩。非甜粒对甜粒表现完全显性,相关基因(Su/su)位于第6染色体上。

糊粉层颜色性状有紫色、红色和无色,主要由7对基因(花青素基因: A_1a_1 、 A_2a_2 、 A_3a_3 ;糊粉粒色基因: Cc 、 Rr 、 $Prpr$;色素抑制基因: li)所控制。只有当显性基因 A_1 、 A_2 、 A_3 、 C 、 R 同时存在而抑制基因又呈隐性纯合 ii 时,色素才能形成。而色素形成的类别是由 $Prpr$ 决定



图1-1 玉米籽粒结构图

的,当显性基因 Pr 存在时,呈现紫色,当隐性基因纯合子($prpr$)存在时则表现为红色。当显性基因 A_1 、 A_2 、 A_3 、 C 、 R 中缺少任何一个或所有这些色素基因均为显性,但当显性抑制基因 I 存在时,均表现为无色。

由于控制玉米糯性和糊粉层颜色,以及胚乳性状的基因分别位于非同源染色体上,故这些性状的遗传表现为独立分配和基因互作现象。其中基因互作表现为 3 种作用:

1. 互补作用

与玉米糊粉层色素形成有关的基因 A_1 、 A_2 、 A_3 、 C 、 R 间表现为互补作用,只有这 5 个基因都呈显性状态时,色素才能形成,籽粒表现有色。只要缺少一个显性基因,籽粒即呈现无色。将籽粒无色、基因型为 $AACCrr$ 和 $AAccRR$ 的两亲本杂交,产生 F_1 基因型为 $AACcRr$,籽粒表现有色。 F_1 自交果穗籽粒的性状分离比为:有色($9AAC_R_$):无色($3AAC_rr + 3AAccR_ + 1Aaccrr$) = 9:7。

2. 抑制作用

在糊粉层色素形成过程中,显性基因 I 对 5 个色素基因表现为抑制作用,将基因型为 $AACCRRii$ 的有色籽粒与基因型为 $AAccRRII$ 的无色籽粒杂交, F_1 基因型为 $AACcRRii$,其自交所得 F_2 果穗籽粒性状分离比为:无色($9C_I_ + 3ccI_ + 1ccii$):有色($3C_ii$) = 13:3。

3. 隐性上位作用

玉米籽粒色素类型由另一对基因 $Prpr$ 决定,显性 Pr 存在时表现紫色,隐性 pr 纯合时表现红色, a 、 c 、 r 基因对 $Prpr$ 基因表现为隐性上位作用。将玉米籽粒糊粉层颜色为紫色的亲本($CCPrPr$)与糊粉层为无色的亲本($ccprpr$)杂交,得到 F_1 基因型为 $CcPrpr$,糊粉层颜色为紫色。 F_1 自交果穗 F_2 籽粒糊粉层颜色分离比为:紫色($9C_Pr_$):红色($3C_prpr$):无色($3ccPr_ + 1ccprpr$) = 9:3:4。

三、实验材料、仪器及试剂

1. 材料

- (1) 玉米(*Zea mays*) (糯性 × 非糯性) F_1 花粉粒和 F_1 自交及测交的果穗。
- (2) 玉米(*Zea mays*) (有色、非甜 × 无色、甜粒) F_1 自交及测交的果穗。
- (3) 具有基因互作的玉米籽粒性状分离的果穗标本。

2. 仪器

显微镜、计算器、镊子、解剖针、载玻片、盖玻片等。

3. 试剂

1% 碘 - 碘化钾溶液的配制:取 2 g 碘化钾溶于 5 mL 蒸馏水中,加入 1 g 金属碘,待其溶解后再加入 295 mL 蒸馏水,保存于棕色瓶中,备用。

四、实验步骤

1. 一对相对性状的遗传分析

(1) 取非糯性与糯性玉米杂交所得 F_1 杂种的花药,放在洁净的载玻片上,加一滴 1% 碘 - 碘化钾染色液染色,用解剖针轻压,将花粉粒挤出,除去杂质后盖上盖玻片,置于

低倍镜下观察,并取3~5个视野(300~500个花粉粒)对蓝黑色花粉粒(非糯性)和棕黄色花粉粒(糯性)分别计数。

(2) 取非甜粒杂合玉米 F_1 自交所得 F_2 果穗3~5个,区别果穗上的不同表型,非甜粒籽粒饱满且光滑,甜粒籽粒呈皱缩状。对非甜粒和甜粒玉米籽粒分别计数。

以上观察统计结果填入下表1-1,并进行 χ^2 检验。

表1-1 一对相对性状的遗传分析统计

表型	F_1 花粉粒		F_2 籽粒	
	糯性	非糯性	甜粒	非甜粒
观察值(O)				
理论值(E)				
偏差[d=(O-E)]				
$d^2 = (O-E)^2$				
$\chi^2 = \sum d^2/E$				
df=N-1				
P值				

2. 两对相对性状的遗传分析

取玉米籽粒有色、非甜与无色、甜粒杂交组合所得 F_1 植株的自交果穗,观察果穗上4种不同的表型,并分别统计有色、非甜,无色、甜粒,有色、甜粒,无色、非甜的玉米籽粒数目。以上观察统计结果填入表1-2,并进行 χ^2 检验。

表1-2 两对相对性状的遗传分析统计

表型	F_2 籽粒性状			
	有色、非甜	无色、甜粒	有色、甜粒	无色、非甜
观察值(O)				
理论值(E)				
偏差[d=(O-E)]				
$d^2 = (O-E)^2$				
$\chi^2 = \sum d^2/E$				
df=N-1				
P值				

3. 基因互作的遗传分析

(1) 互补作用:观察($AACCr r \times AAccRR$) F_1 自交果穗籽粒颜色分离比例,按有色、无色分类计数。

(2) 抑制作用:观察($AACc\ddot{u} \times AAccII$) F_1 自交果穗籽粒颜色分离比例,按有色、无色分类计数。

(3) 隐性上位作用:观察($CCPrPr \times ccprpr$) F_1 自交果穗籽粒颜色分离比例,按紫色、红色、无色分类计数。

以上观察统计结果填入表 1-3, 并进行 χ^2 检验。

表 1-3 基因互作的遗传分析统计

表型	互补作用		抑制作用		隐性上位		
	有色	无色	有色	无色	紫色	红色	无色
观察值(O)							
理论值(E)							
偏差[d=(O-E)]							
$d^2=(O-E)^2$							
$\chi^2=\sum d^2/E$							
df=N-1							
P 值							

五、结果及思考题

1. 通过 χ^2 检验验证各组材料是否符合遗传学规律, 如不符合, 请说明原因。
2. 分析玉米籽粒性状的遗传基础并解释各性状的遗传表现。

4. 解离

将根尖用蒸馏水冲洗后, 放入已在 60℃ 恒温水浴箱中预热的 1 mol/L 盐酸中解离 5~10 min, 取出后用蒸馏水冲洗备用。

5. 染色与压片

取根尖放入盛有 1 滴醋酸洋红染色液, 染色 2~3 min。然后盖上盖玻片, 在酒精灯火焰上方加热, 以感觉微烫即可 (注意不要烫伤)。加热可软化细胞, 利于压片, 还可以使细胞质颜色变浅, 使染色体颜色与细胞质颜色反差更大, 便于观察。染色液滴在盖玻片上, 用食指固定住盖玻片的两边对角线, 防止盖玻片移动, 右手拿棉签垂直敲击盖玻片几下, 以使材料分散, 然后用左手大拇指用力下压盖玻片, 尽量将材料压成薄薄一层, 制成较好的染色体制片。

6. 镜检

将制片放在载物台上, 先用低倍镜 (10×) 观察, 找到中期染色体, 再换高倍镜 (40×) 观察。观察时, 先用低倍镜找到中期染色体, 再换高倍镜 (40×) 观察。观察时, 先用低倍镜找到中期染色体, 再换高倍镜 (40×) 观察。

实验 2

植物有丝分裂染色体常规制片技术

一、实验目的

1. 掌握有丝分裂染色体常规制片技术。
2. 观察有丝分裂过程中染色体的形态特征及动态变化。
3. 掌握永久制片的制备方法。

二、实验原理

植物根尖分生组织的细胞有丝分裂比较旺盛,每天都有分裂高峰时期。如把分裂时期的根尖用固定液固定,再经过染色和压片,然后放在显微镜下进行观察,就可以看到处于有丝分裂各个时期的细胞和染色体。如要进行染色体计数,则需进行预处理,以降低细胞质的黏度,使染色体缩短变粗,易于计数,同时抑制细胞分裂过程中纺锤丝的形成,使更多的细胞处于分裂中期。这时,染色体不排列在赤道板上,而是分散在整个细胞质中。这十分便于对染色体的形态、数目进行观察。

三、实验材料、仪器及试剂

1. 材料

大蒜(*Allium sativum*, $2n = 16$)、洋葱(*Allium cepa*, $2n = 16$)的鳞茎或者玉米(*Zea mays*, $2n = 20$)、蚕豆(*Vicia faba*, $2n = 12$)的种子。

2. 仪器

恒温培养箱、恒温水浴箱、显微镜、解剖针、镊子、载玻片、盖玻片、吸水纸、培养皿、刀片、棉签等。

3. 试剂

95%乙醇、冰醋酸、盐酸、醋酸洋红染色液、秋水仙素、二甲苯、中性塑胶等。

四、实验步骤

1. 材料培养

大蒜、洋葱置于盛有湿沙的托盘中(亦可采用水培法), $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养,待根长至 $1 \sim 2\text{ cm}$ 时取材。玉米和蚕豆的种子可先用温水浸泡,待种子充分吸涨后,再转入铺有多层吸水纸或纱布的培养皿中,置于 $24 \sim 26^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,待根长至 $1 \sim 2\text{ cm}$ 时取材。取

材时使用解剖针及镊子。

2. 预处理

如果只是观察有丝分裂各个时期的染色体动态变化而不进行染色体计数,则不必进行预处理。预处理的主要目的是为了获得更多的有丝分裂中期的分裂相,同时使染色体缩短变粗,易于计数。预处理的方法有化学药物处理和冷冻处理两种。

(1) 化学药物处理:常用的试剂有 0.05% ~ 0.2% 秋水仙素水溶液、饱和对二氯苯溶液及 0.002 ~ 0.004 mol/L 8-羟基喹啉等。秋水仙素水溶液对纺锤体的抑制效果最好,一般在室温条件下处理 2 ~ 4 h 可达到实验要求。如果处理时间过长,染色体会变得过短,不利于对染色体结构进行研究。对二氯苯和 8-羟基喹啉对不同植物细胞的处理效果也不相同。染色体数目多、个体小的植物细胞适合使用对二氯苯进行处理;而中等染色体长度的植物细胞适合使用 8-羟基喹啉进行处理,这样同时可使缢痕区更为清晰。这些化学药物都能使染色体缩短,对染色体具有破坏作用,故应控制处理的时间。不同材料需要的处理时间不同,同一材料在不同温度条件下的处理效果亦不相同,应根据实际情况具体操作。大蒜、洋葱在室温条件下的处理时间以 2 ~ 4 h 为宜。

(2) 冷冻处理:将根尖置于盛有冰水混合物的烧杯或其他容器中,保存于 1 ~ 4 °C 冰箱 20 ~ 24 h。此方法的优点是操作简单易行且无污染,对染色体无破坏作用。用该方法处理禾本科植物材料效果良好。

3. 固定

将经过预处理和未经预处理的材料用蒸馏水冲洗两次,然后转入卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸 = 3:1)中固定 24 h。取材和固定必须在细胞有丝分裂高峰期进行。不同植物在不同的环境条件下,其细胞有丝分裂高峰期的时间是不同的。大蒜和洋葱细胞的有丝分裂高峰期通常是在上午 9 时至 11 时。

4. 解离

将根尖用蒸馏水冲洗后,放入已在 60 °C 恒温水浴箱中预热的 1 mol/L 盐酸中,60 °C 水浴约 10 min,当根尖的伸长区变透明而分生区呈米黄色或乳白色时即可取出,用蒸馏水冲洗后备用。

5. 染色与压片

取根尖放在洁净的载玻片上,用刀片切去伸长区,留下 1 ~ 2 mm 的分生组织区,滴一滴醋酸洋红染色液,染色 2 ~ 3 min。然后盖上盖玻片,在酒精灯火焰上方加热,以手背试之感觉微烫即可(注意不要烫伤)。加热可软化细胞,利于压片,还可以使细胞质颜色变浅,使染色体颜色与细胞质颜色反差加大,利于观察。在盖玻片上盖上吸水纸,用左手拇指和食指固定住盖玻片的两边对角线,防止盖玻片移动,右手拿棉签垂直敲击盖玻片几下,以使材料分散,然后用右手大拇指用力下压盖玻片,尽量将材料压成薄薄一层,从而得到分散性较好的染色体制片。

6. 镜检

压好的片子先在低倍镜下观察,找到处于分裂时期的细胞后,再转换到高倍镜下观察染色体的形态特征,观察不同分裂时期的细胞即可了解染色体在整个细胞分裂时期的动态变化特点。注意比较经过预处理与未经预处理的材料的不同。如果染色体分散良好,图像

清晰,即可进行数目统计,并可制成永久制片。

7. 永久玻片制备

将载玻片和盖玻片用干冰处理或者放入超低温冰箱中放置几分钟,或者普通冰箱冷冻几小时,取出后用薄刀片掀开,将附着有材料的载玻片或者盖玻片置于 37℃ 恒温培养箱中烘干,然后在二甲苯中透明 15 min 左右,中性塑胶封片,自然干燥后即可长期保存。

8. 有丝分裂染色体形态观察(图 2-1)

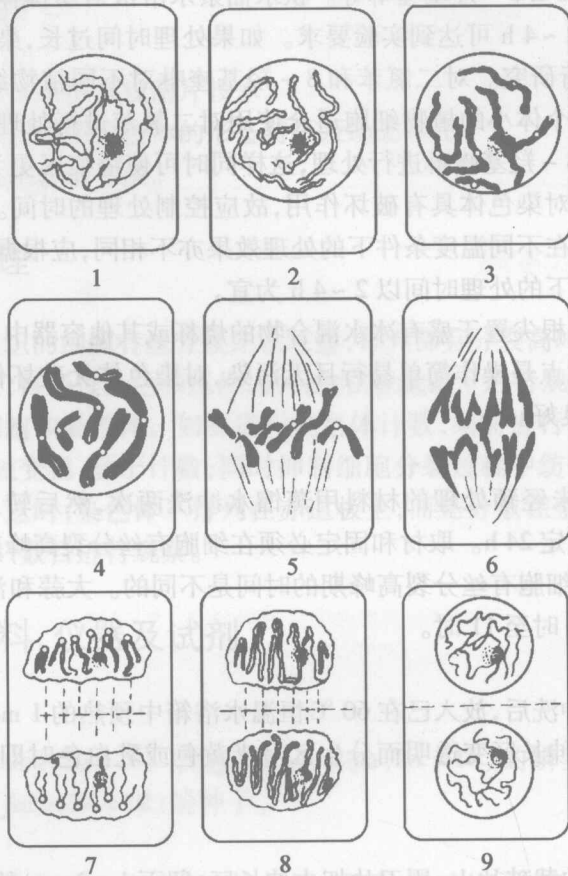


图 2-1 植物细胞有丝分裂模式图

1. 极早前期 2. 早前期 3. 中前期 4. 晚前期 5. 中期 6. 后期 7. 早末期 8. 中末期 9. 晚末期

(1) 间期:染色质伸长呈细丝状;核膜、核仁清晰可见。

(2) 前期:染色质细丝缩短变粗,每条染色体含有两条染色单体;核膜、核仁逐渐消失。

(3) 中期:染色体向赤道面移动,着丝点排在赤道板上;核膜、核仁完全消失。

(4) 后期:着丝点分裂,染色单体分开并分别向两极移动。

(5) 末期:染色体移向两极,每一极含有一组染色体,在赤道面上形成细胞板;核膜、核仁重新出现。

3. 试剂

五、结果及思考题

1. 制备一张染色体分散性好,能进行染色体计数的染色体制片。
2. 经过预处理和未经预处理的根尖制片有何不同?在什么情况下需要进行预处理?
3. 预处理、固定、解离、染色、烤片及压片的作用分别是什么?
4. 理想的有丝分裂染色体制片应该符合哪些要求?

利用玉米花粉母细胞的减数分裂永久制片,参考减数分裂各期的照片,在显微镜下进行系统观察,掌握各期的特点。现将减数分裂各期的主要特点简述如下 (乔利仙)

第一次分裂:

前期 I 分为 5 个时期:

(1) 细线期 (leptotene stage): 核内出现细长如线的染色体,每条染色体都是由两条染色单体所组成。

(2) 偶线期 (zygotene stage): 各同源染色体分别配对 (pairing), 各对同源染色体的对应部位相互紧密并列, 纵向联会在一起。

2. 中期 I

核仁核膜消失, 细胞质内出现纺锤体, 纺锤丝与着丝粒相连。每个二价体中两个着丝粒分别位于赤道面的两侧, 也就是说面向相反的方向。

3. 后期 I

由于纺锤丝的牵引, 每个二价体的两个同源染色体分离, 分别被拉向细胞两极。

终变期和中期 I 是观察染色体最佳时期。

3. 后期 I

由于纺锤丝的牵引, 每个二价体的两个同源染色体分离, 分别被拉向细胞两极。

每个染色体还是由两条染色单体组成。

实验 3

植物减数分裂染色体行为

观察及制片技术

一、实验目的

1. 观察并熟悉减数分裂的细胞学特征,重点了解染色体在这一过程中所发生的变化,为研究遗传学基本规律奠定细胞学基础。
2. 掌握减数分裂制片技术。

二、实验原理

减数分裂是性母细胞在形成性细胞时进行的一种特殊的细胞分裂方式。在此过程中,染色体只复制一次,细胞连续分裂两次,分别称为减数分裂 I 和减数分裂 II。每个阶段根据细胞和染色体的变化特点分为前期、中期、后期和末期 4 个时期。由于减数分裂 I 的前期时间较长而且染色体变化复杂,所以前期 I 又分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期。在减数分裂 I 和减数分裂 II 这两次分裂之间一般有一很短的间期,不进行 DNA 合成,从而也不发生染色体复制。由于细胞核分裂两次,而染色体只复制一次,所以经过减数分裂产生的 4 个子细胞内染色体数目比母细胞减半。对于染色体各时期的变化特点,可以通过对供试材料进行一定的制片处理,在光学显微镜下观察。

高等植物在形成雄配子的过程中,花药内的小孢子母细胞($2n$),经过减数分裂最终产生 4 个小孢子。每个小孢子内的染色体数目已减半为 n 。以后每个小孢子进一步发育为花粉粒。在适宜的时期采集植物的花蕾,经固定液固定,使细胞保持活体时形态。然后进行压片、染色等处理,制成减数分裂玻片标本,在光学显微镜下可以观察到小孢子母细胞的减数分裂过程,重点观察染色体在形态、数量上的变化特点。

三、实验材料、仪器及试剂

1. 材料

- (1) 玉米花粉母细胞的减数分裂永久制片和照片。
- (2) 处于减数分裂期的玉米雄穗。

2. 仪器

显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、解剖针、刀片、标签纸、铅笔、吸水纸、酒精灯等。