

高等学校试用教材

# 遗传学实验

刘祖洞 江绍慧 编

高等教育出版社

普通高等教育出版社

# 遗传学实验

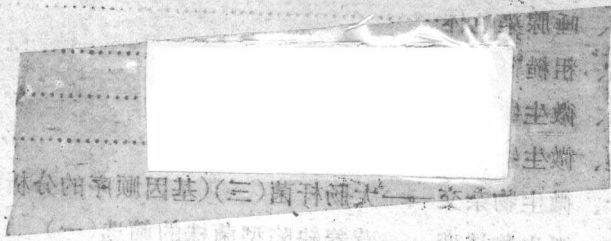
第二版 王德信 主编

科学出版社

高等学校试用教材

# 遗传学实验

刘祖洞 江绍繁 编



高等教育出版社

高等学校试用教材  
**遗传学实验**  
刘祖洞 江绍慧 编

·  
高等教育出版社出版  
新华书店北京发行所发行  
北京顺义小店印刷厂印装

·  
开本 850×11681/32 印张 36/16 字数 80,000  
1979年6月第1版 1985年4月第7次印刷

印数 781,651—791,150

书号 14010·034 定价 0.63 元

## 前 言

根据 1977 年 10 月成都综合性大学生物学教材会议的决议我们在编写“遗传学”教材的同时，又编写了这本“遗传学实验”目的是为了使学生更好地掌握遗传学基本理论和有关的研究技术，因而在内容上尽可能配合遗传学的教学。

实验内容包括两个方面：一是验证遗传学的基本规律，例如果蝇的单因子遗传和伴性遗传，链孢霉的分离和交换，细菌的转导，细菌和酵母菌的营养缺陷型(生化突变)的筛选等。二是与遗传学有关的实验技术，这又可分两类：一类是沿用已久，但目前仍有广泛用处的，如石蜡切片法，压片法，植物的杂交，植物多倍体的诱发等；另一类内容较新，是近一、二十年内发展起来的，但在研究工作上很有用处，如外周血的培养，二倍体细胞培养，植物单倍体培养，鼠伤寒菌微粒体系统的诱变检测法，姊妹染色单体的色差方法等。希望学生们做了这些实验后，既能巩固所学的遗传学知识，又能掌握遗传学研究中的一些实验技术。

本实验指导包括各类实验 21 个，数目较多，而实验时间有限，不可能都做，所以可以根据具体情况，酌情选择。此外还有附录三个，供教师准备实验时参考。至于一些分子水平上的实验技术，限于时间而未收集，有待以后补充。

在编写过程中，承王文华、顾惠娟、吕群、邱信芳、陈佩芬、赵寿元、乔守怡、金建中同志们的大力支持，提供实验方法，编写部分实验，除在有关实验后注明外，在此谨表谢意。

刘祖洞 江绍慧

1979.3



# 目 录

林德用对外学高

## 前言

一、切片制作法(石蜡切片法).....	1
二、有丝分裂(Feulgen 染色法).....	6
三、减数分裂.....	10
四、果蝇单因子试验.....	13
五、果蝇的伴性遗传.....	16
六、唾腺染色体.....	18
七、粗糙链孢霉的分离和交换.....	20
八、微生物杂交——酵母菌(一).....	25
九、微生物杂交——大肠杆菌(二).....	28
十、微生物杂交——大肠杆菌(三)(基因顺序的分析).....	31
十一、微生物诱变——营养缺陷型菌株的筛选(一) (物理因素诱变).....	35
十二、微生物诱变——营养缺陷型菌株的筛选(二) (化学因素诱变).....	40
十三、细菌转导.....	45
十四、鼠伤寒沙门氏菌/微粒系统检测化学诱变剂的方法.....	49
十五、人的外周血淋巴细胞培养.....	56
十六、两倍体细胞株培养.....	60
十七、姊妹染色单体色差方法.....	65
十八、植物多倍体的诱发.....	68
十九、植物杂交.....	69
二十、植物单倍体——水稻花药培养.....	72



# 一、切片制作法(石蜡切片法)

## 一、实验目的:

通过对材料的固定、脱水透明、浸蜡、包埋、切片等实验操作,了解石蜡切片的基本过程,掌握石蜡切片的制作方法。

## 二、实验准备:

1. 用具 小标本瓶, 指管, 眼科镊子, 蜡杯, 载玻片, 毛笔, 蜡铲, 刀片, 量筒(10 毫升), 漏斗, 滴管, 酒精灯, 小木块, 切片木框, 切片盒, 吸水纸, 标签纸, 切片机, 切片刀, 熔蜡箱, 展片台, 真空泵, 解剖针。

### 2. 玻璃器皿的清洗

指管的清洗: 用毛刷沾肥皂粉表里擦洗, 用水冲净, 晾干或烘干即可。

载玻片的清洗: 切片所用的载玻片必须洗得很干净, 否则切片容易脱落。新的载玻片用洗液浸泡半天取出, 用自来水冲洗后, 用纱布擦干净, 放入盒内备用。擦拭时应捏住玻片两端的边缘操作, 手指勿与玻片的表面接触, 以免手指上的脂肪沾污玻片。

盖玻片的擦洗: 新的盖片可放入 95% 酒精内浸泡数十分钟, 或用洗液浸泡。注意盖片要一片片投入, 使盖片的二面都接触到液体, 浸泡后, 水冲洗干净后再放入 95% 酒精中浸泡, 然后用干净白布擦拭。擦拭时应注意, 手指不能接触玻面, 应以左手拇指和食指夹持盖片, 右手持布趁酒精未干时, 一一擦拭之。

### 3. 实验需用药品及其配制

70%、85%、95%、100% 的酒精,

二甲苯, 甘油蛋白,



固定液，

石蜡。

### ① 各种浓度酒精配制

实验室常以 95% 酒精来配制各种低浓度的酒精，因 100% 纯酒精系由 95% 酒精再蒸馏而成，价格昂贵，一般不用于稀释。

配制方法：

配 70% 酒精时，可取 95% 酒精 70 毫升再加入蒸馏水 25 毫升即得。一般遵照以下原则：无论用任何浓度的酒精稀释时，即稀释多大浓度就取多少毫升的酒精，然后用蒸馏水加至该酒精原有浓度即可。

### ② 固定液的配制

采用卡诺氏醋酸酒精固定液，醋酸用冰醋酸，酒精用纯酒精，体积比为醋酸：酒精 = 1:3。注意须现配现用。

### ③ 甘油蛋白的配制

取鸡蛋的蛋白加入等量的甘油搅拌混合，至均匀为止。加入约为 1% 量的麝香酚小块，借以防止微生物的侵入和腐败。放入冰箱备用。

三、实验材料：蚕豆根尖或洋葱根尖等。

### 四、实验步骤：

1. 取材固定 发芽的蚕豆，当其根尖长到一粒米大小时，用刀片切下来，立即投入盛有固定液的标本瓶中，贴上标签，注明固定日期、固定液名称。固定 4—12 小时。固定剂的用量一般为材料的 10—15 倍或稍多，同一标本管中的材料不宜太多，因组织在固定过程中，水分或其他溶解物渗出后会影响到固定剂的浓度。卡诺固定液渗透力及凝固作用很强，是一种比较激烈的固定液适宜固定 DNA 和 RNA。脂肪及类脂体被溶解，收缩较少，对材料无硬化作用，对染色无不良影响。

2. 洗涤 倒出固定液，加入 70% 酒精，隔数小时后再换一次

至二次，如不及时使用，可放入冰箱保存。如间隔时间较长，可在酒精中加入适量甘油，再放入冰箱中保存。

3. 脱水与透明 将材料从70%酒精中取出，顺序放入85%乙醇  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  95%乙醇  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  100%乙醇  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  100%乙醇  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  二甲苯1:乙醇4(纯)  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  二甲苯2:乙醇1  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  二甲苯4:乙醇1  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  二甲苯  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  二甲苯  $\xrightarrow{\text{抽气3-5分钟}}$  二甲苯  $\xrightarrow{\text{抽气3-5分钟}}$  然后透蜡。脱水和透明时的注意点：

① 在85%酒精内组织可保留较久，如果当天来不及做完，可暂时保存一晚，第二日再做。

② 每更换一次酒精要用吸水纸把根尖吸干，免得把低浓度酒精和水分带到高浓度酒精中去，这样脱水可干净。

③ 组织放入二甲苯后，待组织块透明后，即可透蜡。真空抽气是为了加速组织透明，在真空情况下，二甲苯容易透入组织。如不抽气，组织在二甲苯中停留时间须在半小时以上。

4. 透蜡

① 在透蜡以前，先做好准备工作，选取适当熔点的石蜡，熔化，分装在(1)号、(2)号、(3)号三个蜡杯内，置入熔蜡箱(55—60°C)。另外再准备一杯石蜡，供包埋用，也置于熔蜡箱内，一定要控制好熔蜡箱的温度，保持恒定。

② 将已透明的蚕豆根尖从二甲苯中取出，放入蜡杯(1)  $\xrightarrow{\text{半小时}}$  蜡杯(2)  $\xrightarrow{\text{半小时}}$  蜡杯(3)半小时候，即可包埋。

5. 折纸盒 按组织之大小折成纸盒，盒上注明材料名称，切片方向等。

6. 包埋 准备好包埋用的吸管，小镊子，放入熔蜡箱内，使之温热。

① 准备好包埋用的吸管，小镊子，放入熔蜡箱内，使之温热。

② 用温热吸管吸热石蜡注入纸盒内，用温镊子夹取组织块放入盒的中央位置。

③ 将纸盒一半浸入冷水中，待表面石蜡凝成一层膜后，将纸盒迅速全部浸入冷水中，待石蜡全部凝结变硬即可取出。

7. 修切蜡块 把包埋好的蜡块用刀片修切成正方形或长方形，注意勿太靠近组织，让组织四周留有少许石蜡。蜡块两边必须切成平行的直线，以免切下的蜡条弯曲。

8. 固定蜡块 取小木块，用蜡铲加上热石蜡，再熔化蜡块底面，粘于小木块上，冷却后装在切片机上。

9. 切片 在开始切片前，先熟悉切片机的构造和用法，装上切片刀，注意刀的倾角不宜过大，亦不宜过小，大致上以 20—30 度为宜。如倾角过大，则切片上卷，过小，则切片皱起。

切片时应做到下列各点：

① 调整刻度指针到要求的厚度，一般要求 5—8 $\mu$ 。切片刀要拭净。

② 用右手摇切片机转轮，左手持毛笔托住蜡带。转动切片机时不可太快，用力宜均匀，不可时快时慢。防止机器震动太厉害，以致切片厚薄不均匀。

③ 用毛笔托住蜡带，放在切片盒内。

切片时如出现各种问题，应找出原因加以解决，一般有以下几种原因：

① 切片不能形成蜡带：是室温过低或石蜡过硬，蜡边过小或不平所致，这时应提高室温，或在切片机旁点燃酒精灯。

② 蜡带弯曲：蜡块上下不平行，刀钝，蜡块不与刀刃平行，均可产生此现象。

③ 蜡片卷起：刀口太钝或不清洁，刀的角度过大或石蜡过硬，蜡片均会卷起。

④ 蜡片易粘在切片刀上或蜡片皱缩：室温过高或石蜡太软所致，用冷水或冰块冰一下即可。刀的角度过小，也能使切片皱缩。

⑤ 蜡片厚薄不一：刀或蜡块没有固定牢，切片机磨损或发生故障。

⑥ 蜡片出现裂隙或碎裂：组织浸蜡不足，或浸蜡温度过高，或在透明剂中时间过久，组织已发脆。

⑦ 蜡片出现纵裂口：刀有缺口或石蜡内有硬物质如钙盐物质，或刀口不洁。

⑧ 蜡块底面成白色：由于刀口的角度过小，被刀碰撞的结果。

## 10. 展片、贴片

① 准备好展片台，使温度保持在比包埋石蜡的熔点低 $5-6^{\circ}\text{C}$ ，如包埋石蜡的熔点为 $53^{\circ}\text{C}$ ，则水温宜在 $48^{\circ}\text{C}$ 左右。如果温度过低，则展片费时过长；反之温度过高，石蜡会熔化。

② 取洁净的载玻片涂以甘油蛋白：以玻棒尖端稍稍蘸取甘油蛋白一滴，轻轻滴于载玻片中央，然后以洗净的手指加以涂布，涂布的面不宜太广，而以恰恰能够贴附蜡片为度。甘油蛋白不能涂布过多，否则，会形成白膜，妨碍观察。

③ 在涂有甘油蛋白的载玻片上滴二滴蒸馏水，用刀片将蜡带切成适当长度的片段，以小镊子夹取蜡带，使浮在玻片的水上，摆正位置（一般稍偏于玻片的一端，留下地位可以粘贴标签）。然后把玻片放在展片台上，蜡带受热即自动展开，也可用解剖针轻轻拉开。待蜡片完全展平后，用吸水纸吸去多余水分。注意切片和载玻片之间不能有气泡，否则在展片时气泡会扩大，影响以后镜检。

④ 蜡片在载玻片上展开后，即取下放在切片木框上，让其自然干燥，或置入 $37^{\circ}\text{C}$ 温箱内干燥。

⑤ 干燥的片子留待下次实验用。

## 二、有丝分裂(Feulgen 染色法)

一、实验原理: 细胞中的 DNA 受  $1\text{N}\text{HCl}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  水解作用以后, 核酸中的嘌呤碱很快完全被除掉, 使脱氧核糖中潜在的醛基获得自由状态。水解后, 组织要经水洗再移至希夫(Schiff)试剂中, 希夫试剂即同露出来的醛基发生反应, 呈现紫红色。这个反应是 Feulgen 在 1924 年提出来的, 是 DNA 的一个特异性检查法。

水解的时间很重要, 因为核酸的水解有两个过程, 第一, 嘌呤碱很快被除掉, 脱氧核糖中潜在的醛基显露出来, 第二, 组蛋白和核酸愈来愈多地被除掉。在短时间的的水解作用以后, 第一个过程占优势, 这时候用希夫试剂染色, 染色体的染色作用最强。随着水解作用的继续进行, 第二个过程逐渐变成优势, 因此水解液中的希夫反应增强, 而染色体中的希夫反应减弱。最后, 第二个过程超过第一过程时, 染色体也随之停止反应。

希夫试剂是碱性品红——亚硫酸溶液, 呈无色。与 DNA 醛基反应后, 使碱性品红恢复原来的红色。

二、实验目的: 观察蚕豆根尖细胞或其它根尖细胞内染色体中的 DNA, 以及染色体在有丝分裂中的行为, 掌握 Feulgen 染色方法。

三、实验材料: 上次实验制成的石蜡切片。

四、实验准备:

1. 用具: 立式染色缸一套, 镊子, 盖玻片, 小漏斗, 铁架, 毛边纸, 玻璃棒, 显微镜, 恒温水浴锅, 温度计, 烧杯, 棕色瓶, 黑纸。

2. 玻璃器皿的清洗 主要是染色缸的清洗, 一般用肥皂粉洗, 用水冲净即可。如不能洗净时, 要用洗液浸泡后, 再冲洗, 自来



水洗后,再用少量蒸馏水过洗一次。盛放 100% 酒精、二甲苯的染色缸必须干燥,缸盖内缘必须涂以凡士林,以防止蒸发和吸收水分,影响浓度。染色缸上要贴上标签。

### 3. 实验所需药品及配制

浓盐酸(36—38%),碱性品红,偏重亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ );亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ),固绿(fast green),加拿大中性树脂乙醇(30—100%),二甲苯。

#### 药品配制:

- ① 各种浓度的乙醇配制: 见实验(一)。
- ② 1N HCl 配制: 取浓 HCl 82.5 毫升加蒸馏水至 1000 毫升,摇匀。

#### ③ Schiff 试剂的配制

0.5 克碱性品红,加到已经煮沸的 100 毫升蒸馏水中,再煮沸 3—4 分钟,待溶液冷却到  $50^\circ\text{C}$  时过滤,再等溶液冷到  $25^\circ\text{C}$  以下时,加入 10 毫升的 1 N HCl 和 1.5 克偏重亚硫酸钠,装在棕色瓶中,塞紧瓶子,用黑纸包好,放在暗处,第二天观察,溶液呈无色或淡黄色即可。若有少许红色可用活性炭过滤,经过滤的溶液还是淡红色就不能用,只得重配。

偏重亚硫酸钠与 1 N HCl 反应,放出  $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  与碱性品红反应,生成碱性品红-亚硫酸溶液,呈无色。

#### ④ 漂染液的配制

先配 10% 的亚硫酸钠溶液。

把 10% 亚硫酸钠溶液 10 毫升加 200 毫升蒸馏水,再加 10 毫升 1 N HCl,即成漂染液。

#### ⑤ 固绿染色液

0.5 克固绿溶于 100 毫升 95% 乙醇溶液。

### 五、实验步骤:

1. 脱蜡 将实验(一)制成的片子按下列步骤进行脱蜡。纯二甲苯(1)  $\xrightarrow{10\text{分钟}}$  纯二甲苯(2)  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  100%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  95%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  85%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  70%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  50%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  30%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  蒸馏水(1)  $\xrightarrow{1\text{分钟}}$  蒸馏水(2), 一分钟后, 进行水解。

2. 水解 先在恒温水浴箱中准备好恒温 60°C 的 1 NHCl。注意一定要控制好温度, 不能过高, 高了醛基要破坏, 低了水解不充分, 醛基不能释放出来。水解的时间长短要根据材料, 以及固定液的种类而定。根据试验结果, 取一个适当的时间。

1 NHCl  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  60°C 1 NHCl  $\xrightarrow{8-10\text{分钟}}$  染色

3. 染色 取出片子, 放入含有 Schiff 试剂的染色缸中, 用黑纸包好, 染色 3 小时以上。

4. 镜检 取出片子, 放入漂染液(1)  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  漂染液(2)  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  蒸馏水(1)  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  蒸馏水(2)  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  显微镜下检查, 看有无分裂像, 有的话可进行下列步骤。

5. 封片 片子经下列步骤后, 用加拿大中性树胶进行封固。

50%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  70%乙醇  $\xrightarrow{2\text{分钟}}$  85%乙醇  $\xrightarrow{3\text{分钟}}$  固绿染色液  $\xrightarrow{5-10\text{分钟}}$  95%乙醇  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  100%乙醇(1)  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  100%乙醇(2)  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  二甲苯(1)  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  二甲苯(2)  $\xrightarrow{5\text{分钟}}$  封片。

因加拿大树胶溶于二甲苯, 所以片子一定要经二甲苯透明后才进行封片, 操作方法如下:

- ① 用镊子从二甲苯中取出载玻片, 以毛边纸吸干余液。
- ② 左手开启树胶瓶, 右手用瓶中玻璃棒蘸取树胶滴于载玻片上, 并随即盖好瓶盖。树胶的用量视盖玻片大小而定。要使树胶在盖玻片下满布, 不发生过多或不足。

③ 镊取洁净盖玻片，以一边落于载玻片上，然后徐徐放下，使树胶布满盖玻片与载玻片之间。产生气泡的原因是覆盖太快树胶用量不足，或树胶过稠。气泡侵入后，妨碍镜检，且使标本褪色。如有气泡产生，则可以在靠近气泡的一边再滴树胶一滴，然后轻压盖玻片，使气泡逸出。

片子封片后，放在切片木框上，让其自然干燥，即可保存。

## 六、作业：

1. 绘制你所看到的图像，并说明是有丝分裂的哪一期。

2. 总结这两次实验(一、二)成败原因。

### 三、减数分裂

一、实验原理：植物花粉形成过程中，花药内的某些细胞分化成小孢子母细胞( $2n$ )。每个小孢子母细胞进行二次连续的细胞分裂，第一次减数分裂和第二次减数分裂（每次分裂都分为几个时期，用前期 I，中期 I，后期 I，末期 I，前期 II，中期 II，后期 II，末期 II 表示）。每一小孢子母细胞经减数分裂后，产生四个细胞，每个细胞就是一个单核花粉（即小孢子）。这时，小孢子内细胞核的染色体数目已减一半，成为单倍体( $n$ )。在适当的时机采集植物的花蕾，经固定液固定后进行压片，染色，就可以在显微镜下观察到小孢子母细胞形成花粉粒时的减数分裂过程。

在动物的有性生殖过程中，也有一个由双倍体到单倍体的减数分裂过程；动物的精巢分化出精母细胞，精母细胞减数分裂，形成单倍染色体的精子。

对小孢子母细胞及精母细胞分裂过程的观察，可用来了解动物和植物的生殖细胞的形成过程，进行染色体组型分析，以及分析各种不育的染色体原因等。

二、实验目的：了解植物花粉，动物精子形成中的减数分裂过程，并掌握压片、染色、封片技术。

三、实验材料：蚕豆花蕾、短角斑腿蝗精巢(*Catantops brachycerus*)或其它合适材料。

四、实验准备：

1. 用具 五寸钟表镊子，眼科镊子，解剖针，盖玻片，大培养皿，小培养皿，立式染缸，染色板，酒精灯，量筒 100 毫升、10 毫升，显微镜，毛边纸。