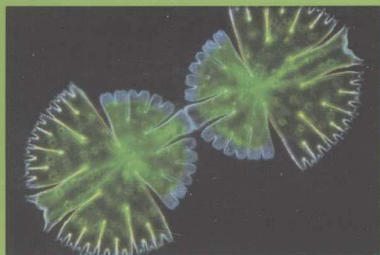


海洋生命科学实验教材

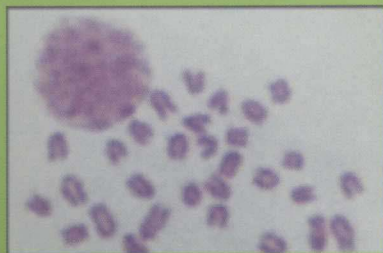


遗传学

实验

YICHUANXUE SHIYAN

汤志宏 编著
黄琳



中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS



9 787102 010000 >

遺傳學

實驗

YICHUANXUE SHIYAN

第 2 版
2013 年 12 月



人民郵電出版社

教材

遗传学实验

汤志宏 黄琳 编著

中国海洋大学出版社

· 青 岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验/汤志宏,黄琳编著. —青岛:中国
海洋大学出版社,2011.9
ISBN 978-7-81125-852-3

I. ①遗… II. ①汤…②黄… 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(2011)第 195952 号

出版发行 中国海洋大学出版社
社 址 青岛市香港东路 23 号 邮政编码 266071
出 版 人 杨立敏
网 址 <http://www.ouc-press.com>
电子信箱 WJG60@126.com
订购电话 0532-82032573(传真)
责任编辑 魏建功 电 话 0532-85902121
印 制 日照报业印刷有限公司
版 次 2011 年 9 月第 1 版
印 次 2011 年 9 月第 1 次印刷
成品尺寸 170 mm×230 mm
印 张 10.75
字 数 193 千字
定 价 20.00 元

前 言

遗传学实验是生命及农、林、医等学科的专业基础课程之一,不同学科对该课程的内容的要求既有广泛的共同点又有明显的特殊性。本教材以各学科普遍适用经典实验为基础,以生命学科内容为主干,以海洋生物为特色而编写。是一部兼具普适性和海洋生物特色的专业基础实验教材,适合于相关学科的本科生实验教学使用,特别适合于海洋生命科学的本科生实验教学需要。

本教材分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分,共 19 个实验,其中与海洋生物相关的实验有 7 个。本教材注重基础,突出特色,图文并茂,深入浅出,将现代实验技术和手段融入本科实验教学,除适合作为相关学科遗传学本科实验教学的教材外,也可以作为本科生毕业论文、SRDP 等项目指导的参考教材。

本书在编写过程中,得到了中国海洋大学生命学院领导的大力支持,得到了生命学院杨官品、隋正红、韩宝琴、汪小龙、孔繁娜等老师的支持与关心;水产学院的郑小东、孔令峰老师提供了部分实验内容;海洋生物专业的硕士研究生张宁同学参与了部分实验内容的改革与文稿校对工作。在此一并表示衷心的感谢!

由于作者经验与水平上的局限性,难免存在不足之处,真诚希望读者给予批评指正。

汤志宏 黄琳
2011 年 7 月

目 次

第一部分 基础性实验

实验一 植物减数分裂过程中染色体行为的观察	(3)
实验二 果蝇的性状观察、生活史、培养及杂交方法	(9)
实验三 果蝇的自由组合实验	(17)
实验四 果蝇的伴性遗传实验	(25)
实验五 果蝇的三点测交实验	(29)
实验六 链孢霉的分离和交换	(37)
实验七 人类 X 染色质小体的检测	(47)

第二部分 综合性实验

实验八 果蝇唾腺染色体制片技术	(53)
实验九 植物多倍体的诱发和鉴定	(57)
实验十 染色体组型分析	(60)
实验十一 人体外周血淋巴细胞的培养和染色体标本的制备	(75)
实验十二 染色体显带技术	(80)
实验十三 皮肤纹理分析	(83)

第三部分 研究性实验

实验十四 应用植物细胞微核监测海水诱变剂的实验	(93)
I. 扁藻细胞微核监测海水诱变剂的实验	(94)
II. 蚕豆细胞微核技术监测淡水诱变剂的实验	(98)

实验十五 海洋鱼类有丝分裂染色体制片技术	(101)
实验十六 绿潮浒苔遗传多态性及亲缘关系的 AFLP 分析	(105)
I. 藻类基因组的提取与检测	(107)
II. DNA 酶切及接头的连接	(113)
III. 聚合酶链式反应(PCR)	(117)
IV. 聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物的分离与检测	(121)
实验十七 用 RAPD 技术对四种海产贝类基因组 DNA 多态性的分析	(127)
实验十八 应用微卫星标记进行牡蛎家系的亲子鉴定	(132)
实验十九 荧光原位杂交实验	(140)
附录一 显微互动系统的使用方法	(145)
附录二 玻璃器皿的清洗	(151)
附录三 培养基配制方法	(152)
附录四 染液的配制	(154)
附录五 实验室常用试剂的配制	(156)
主要参考文献	(161)



第一部分 基础性实验

实验一 植物减数分裂过程中染色体行为的观察

【实验目的】

1. 学习并掌握植物减数分裂染色体标本的制片方法和技术。
2. 了解高等植物小孢子母细胞的减数分裂过程及染色体的动态变化,加深对减数分裂过程的认知。

【实验原理】

减数分裂(meiosis)是生物在配子形成过程中的一种特殊的细胞分裂方式。在此过程中,先由有性组织(花药或胚珠)中的某些细胞分化成为二倍体($2n$)的性母细胞(小孢子母细胞或大孢子母细胞),这些细胞进行连续两次细胞分裂(减数分裂 I 和减数分裂 II),而染色体仅复制一次,结果 1 个二倍体的性母细胞形成 4 个染色体数目减半的单倍体子细胞,即每个子细胞中染色体数为 n 。因此,将这种细胞分裂方式称为减数分裂。减数分裂的另一个特点是前期特别长,而且变化复杂,人为分为五个亚期:细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期。

减数分裂在遗传学上具有重要的意义:性母细胞($2n$)减数分裂后形成染色体数目减半的配子(n),再经受精作用,雌、雄配子融合为合子,染色体数目恢复为 $2n$ 。这样,在物种延续的过程中确保了染色体数目的恒定,从而使物种在遗传上具有相对的稳定性。另外,在减数分裂过程中,发生了同源染色体的配对、交换、分离和非同源染色体的自由组合,这些都为遗传学上的分离、自由组合和连锁互换规律提供了细胞学基础,并导致了各种遗传重组的发生,为生物进化提供了物质基础。

在适当的时期采集玉米植株的雄穗,经固定、染色、压片等操作程序后,就可以在显微镜下观察到细胞减数分裂过程中染色体的动态变化。

【实验材料】

玉米(*Zea mays*), $2n=20$; 水稻(*Oryza sativa*), $2n=24$; 蚕豆(*Vicia faba*), $2n=12$ 。

任选上述一种作物的花药。本实验以玉米为例。

【实验器具和试剂】

1. 器具:体视显微镜、显微镜、解剖针、镊子、刀片、载玻片、盖玻片、吸水纸、培养皿等。
2. 试剂:卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)、醋酸洋红或改良苯酚品红。

【实验方法与步骤】

(一)取材

选取刚开始孕穗的玉米植株(即雄穗尖端露出前的7~10天,此时植株一般有12~14片展开的叶片),以上午7~8时取材为好,此时减数分裂较盛。以手指挤摸穗尖的外部,觉得松软时,表明雄花序即将抽出,此时用刀片纵向划开茎叶,取下颜色发白的幼穗分枝若干条(如已变绿或黄则表明时期已过,不可使用)。

(二)固定与保存

将玉米雄穗固定于新配制的卡诺氏固定液中,固定液的体积为材料的17倍。固定时间一般在上午7~9时为宜,此时分裂相较多。固定12~24小时,用95%的乙醇洗脱醋酸,再依次换入90%,80%,70%乙醇溶液冲洗,直到闻不到醋酸味为止,最后置于70%乙醇溶液中存放于4℃冰箱中保存待用(可存两年)。

(三)染色与制片

1. 根据玉米雄穗上的分裂时期进行制片。材料的选取:在每一个花序中,以中部偏上区域为比较成熟的部分,以此往尖端或基部,小穗逐渐幼嫩。通常在一个花序上从幼嫩的部位向较为成熟的区域同时取材混合制片,这样可以在一个片子中看到小孢子形成过程的各个时期。玉米小穗是成对存在的,无柄小穗的发育时期比邻近的有柄小穗的发育时期要早,每小穗中有两朵小花,各有花药3个,第一朵小花比第二朵小花幼嫩,第一朵小花的分裂时期依各小穗着生部位不同有一定的顺序性,而同一朵小花的三个花药几乎处于同一发育时期。据此可以进行适当选材(三个同学可取不同部位的小花,剥取花药后,互换一枚花药,这样每位同学的玻片上就分别有三个不同时期的分裂相)。

2. 染色与制片:取少量雄穗分枝用蒸馏水冲洗数遍后置于培养皿内,加少许蒸馏水,以防干燥。摘取一朵小花,置于载玻片上,用解剖针剥开内外颖片,可以看到三枚棒状的雄蕊。除去内外颖片,只保留雄蕊的花药部分,滴加少量

的改良苯酚品红或醋酸洋红,以刀片或解剖针切断花药,再用解剖针尖轻压花药壁或用小镊子轻轻挤压,挤出花粉母细胞并尽量挤彻底(此时,花药壁变为透明状)。将成堆的花粉母细胞微微捣开,均匀地涂布在载玻片上,除去囊壁残渣后盖上盖玻片,使染液刚好布满载玻片与盖玻片之间成一薄层(染液不可过多,否则花粉母细胞会溢出盖玻片边缘),用吸水纸将盖玻片周围的染液擦拭干净,置于显微镜下进行观察。

如果用醋酸洋红染色而染色效果不甚理想时,可以将载玻片置于酒精灯火焰上微烤(但不要烤干)以加强染色效果。若细胞质染色过深,可在盖玻片的一边滴加 45% 的醋酸,在另一边用吸水纸吸引,让醋酸从盖玻片下通过,能减轻细胞质的着色程度。

(四) 镜检

先用低倍镜观察。寻找分裂相时,从盖玻片的一边开始寻找,找到一个好的分裂相时再转用高倍镜观察。在显微镜下查找花粉母细胞、二分体、四分体、花粉粒及各个时期的细胞。注意区分花药壁细胞(2n)与花粉母细胞(2n)(如图 1-1):花药壁细胞较小,近似方形,排列整齐;花粉母细胞大而圆,壁薄。花药颜色变绿变黄时,其中的细胞均为花粉粒(3n)。只有颜色发白而小的花药中才有处于减数分裂的细胞。

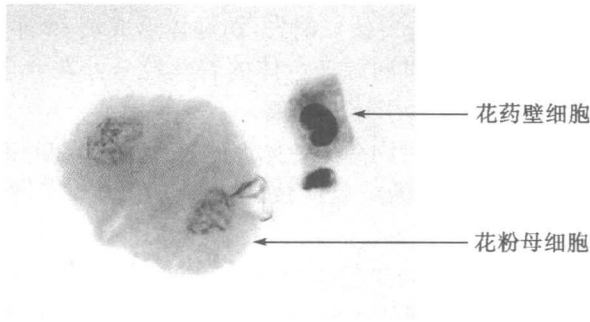


图 1-1 玉米花粉母细胞与花药壁细胞

为观察减数分裂过程,现把减数分裂各时期最主要的特点介绍如下:

1. 间期 I (interphase I): 玉米的减数分裂过程中,间期细胞染色质松散,核内染色较为均匀。

2. 减数分裂 I:

(1) 前期 I (prophase I): 前期持续时间长,染色体变化较为复杂,它可分为五个亚期:

细线期(leptotene stage):每条染色体含有两条染色单体,染色体细长,在显微镜下呈细丝状,染色体在核内一侧首尾不分地缠绕在一起。可见核膜和明显的核仁。

偶线期(zygotene stage):染色体稍粗些,同源染色体配对联会,形成二价体,每个二价体有两个着丝点,这是减数分裂特有的现象。染色体比细线期略分散。

粗线期(pachytene stage):染色体逐渐变粗变短。联会过程完成,同源染色体间的互换发生在这一时期,但因同源染色体联会在一起,所以看不到交叉现象,由于每条染色体已经复制为二,而着丝点还未分开,这样的染色体称二价体。每个二价体含有四条染色单体,但仅有两个着丝粒。

双线期(diplotene):染色体更为缩短。同源染色体分开,由于同源染色体分开,可清楚的看到交叉现象,同时,由于交叉现象的存在,抑制了同源染色体的完全分离,交叉部位可能已发生互换而实现了染色体的重组。在良好的制片中,可以数出染色体的对数。

终变期(diakinesis):染色体进一步变短变粗,交叉点向染色体两极移动——端化现象。呈X、V、O、 ∞ 等形状,此时期可清楚地数出染色体的数目,是染色体计数的最好时期。这时核内有多少个二价体,说明有多少对染色体。终变期末核膜消失,核仁也消失。

(2)中期 I (metaphase I):核仁消失,纺锤体形成,一个个二价体(同源染色体)排列在赤道面上,但每对同源染色体的着丝粒分处在赤道面的两侧。同源染色体的着丝粒受纺锤丝牵引逐渐远离。

(3)后期 I (anaphase I):同源染色体彼此分开,移向细胞两极。由于此时着丝粒未分开,所以细胞两极的染色体数是性母细胞的一半,但每条染色体依然含有两条单体。

(4)末期 I (telophase I):染色体到达细胞两极后逐渐解旋,又呈细丝状,核仁、核膜重新出现,在赤道面处形成新的细胞板,1个性母细胞分裂为2个子细胞。每个子细胞只接受了每一对同源染色体中的一条染色体,即染色体数减半。

间期 II:即二分孢子时期。在此时期不发生DNA合成和染色体复制。也有的植物和大多数动物不经过末期和间期 II,直接进入第二次减数分裂的晚前期。

3. 减数分裂 II:植物减数分离产生的子细胞均包被于共同的胼胝体壁中,子细胞基本上同步分裂,这个特点比较容易区分植物减数分裂 I 和减数分裂 II,此外,减数分裂 I 的细胞近似球形,减数分裂 II 的细胞近似半球形。

(1)前期Ⅱ(prophase Ⅱ):染色体变粗变短。每个染色体含有一个着丝粒和纵向排列的两条染色单体。此时的细胞仅有半数的染色体(n),而有丝分裂的前期,染色体数为 $2n$ 。

(2)中期Ⅱ(metaphase Ⅱ):纺锤体形成,染色体排列在赤道板上。每条染色体的姐妹染色体呈分离状态,但着丝粒仍未分开。

(3)后期Ⅱ(anaphase Ⅱ):着丝粒完成复制,彼此分开。每一染色体纵裂为二,姐妹染色单体开始移向细胞的两极。

(4)末期Ⅱ(telophase Ⅱ):移向细胞两极的染色体逐渐解旋,变为细丝状。在细胞的赤道面出现细胞板。核膜重建,核仁重新形成,每个细胞分为两个子细胞。

经过这样的减数分裂,一个性母细胞分裂形成4个子细胞,即四分孢子,四分孢子在花粉囊中进一步发育成为花粉粒(彩页图1)。

【注意事项】

1. 取材时间的早晚是实验成功与否的关键之一,必须适时取材。除玉米外,常用来进行减数分裂过程观察的植物有蚕豆、小麦、棉花等,其取材时间如下:

蚕豆:从现蕾开始,取材最好在上午10:00~11:00。可以选取2~3 mm大小的花蕾或一段小花序进行固定。蚕豆的开花次序是由上而下,由外而内。

小麦:从开始挑旗,到旗叶与下一片的叶耳间距为1~2 cm时进行固定较为适宜。一般花药长2 mm左右,表现黄绿色时,为减数分裂观察的最适时期。如花药为绿色时,则取材时间过早;花药为黄色,则取材的时间已过。上午7:00~8:00为取材最佳时间。

大葱:在北方地里越冬的大葱,第二年春季3~4月长出花序,待花序长出,颜色呈绿色,花蕾长度为3~4 mm。花药长度为1~1.1 mm时取材。上午9:00~10:00为取材最佳时间。

棉花:棉花现蕾不久就开始进行减数分裂,由于花序分节着生,连续生长,所以常常按照花蕾的长度进行取材。例如:陆地棉,一般当三角苞长到1 cm左右,花萼与花瓣等长,整个花蕾长3~5 mm时取样较好。

2. 注意区分性母细胞及小孢子形成过程中各时期细胞的特点,并与花药壁细胞进行区分。

【思考及作业】

1. 本实验所用固定液配方是什么?各成分所起的作用是什么?

2. 观察减数分裂不同时期的典型细胞。
3. 观察并绘制减数分裂细线期、偶线期、粗线期、双线期、终变期、中期 I、后期 I、中期 II、后期 II 的细胞,简要描述各分裂时期的染色体行为和特征。
4. 分析自己制片操作过程中出现的问题及可能原因。
5. 对观察到的典型分裂时期的细胞进行图像采集。

实验二 果蝇的性状观察、生活史、培养及杂交方法

【实验目的】

1. 了解果蝇生活史及各个阶段的形态特征,观察果蝇几种常见突变型的特征。
2. 掌握雌、雄果蝇的鉴别方法。
3. 掌握实验果蝇的饲养方法以及实验的处理方法和技术,为果蝇的杂交实验做准备。

【实验原理】

果蝇广泛地存在于全球温带及热带气候区,而且由于其主食为水果上的酵母菌,因此在人类的栖息地内,如果园、菜市场等场所,皆可见其踪迹。除了南北极外,目前已有 3 000 个以上的果蝇物种被发现。遗传学实验中常用的普通果蝇叫黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*),属节肢动物门昆虫纲双翅目果蝇科果蝇属。具有完全变态发育。

实验室最常用的黑腹果蝇最早起源于东南亚,在 1871 年前后,附着在一串香蕉上来到了美国。昆虫学家伍德沃斯(C. Woodworth)首先在实验室饲养了果蝇,卡斯尔(Castle)教授认识到这种果蝇的种种优点之后,便把它介绍给了摩尔根(T. Morgan)。摩尔根非常高效地研究了这种生物,创立了遗传学的第三定律——连锁交换定律。为现代遗传学奠定基础,并于 1933 年获得了诺贝尔生理或医学奖。同时使果蝇成为广为人知的遗传学试验材料和生物学研究的模式生物。

摩尔根等的成功,很大程度上得益于他的选材,果蝇作为实验材料具有如下优点:

1. 饲养容易,在常温下,以玉米粉等做饲料就可以生长、繁殖,所以费用低廉。
2. 个体小,世代周期短。25℃时 10 天左右就能完成一个世代。
3. 生长迅速,繁殖量大,每个受精的雌蝇可产卵 400~500 个,因此在短时间内就可获得大量的子代,便于统计分析。

4. 染色体数目少, $2n=8$ 。
 5. 唾腺染色体制作容易。横纹清晰, 是细胞学观察的好材料。
 6. 突变性状多, 而且多数是形态突变, 便于观察。
- 因此果蝇至今仍是遗传学、细胞学、发育生物学等研究中最好的模式生物。

【实验材料】

饲养的野生型果蝇和表现为突变型的: 残翅、三隐性(白眼、小翅、焦刚毛)、白眼、黑檀体果蝇原种。

【实验器具和试剂】

1. 器具: 体视显微镜、显微镜(观察性梳用)、白瓷板、毛笔、麻醉瓶、培养瓶、培养皿、干棉球(滴加乙醚用于果蝇再麻醉)、死蝇盛留器(取一容器, 内装 70% 的酒精)。

2. 试剂: 乙醚(装在滴瓶中)、玉米粉、红糖、酵母、琼脂粉、丙酸、棉塞。

【实验方法步骤】

在检查果蝇性状和选择亲蝇进行杂交时, 需要用乙醚对果蝇进行麻醉, 使之处于不活动状态。果蝇的麻醉程度分两种: 深度麻醉, 翅膀外展成 45 度角, 果蝇被麻醉致死; 杂交时需进行轻度麻醉, 轻度麻醉的果蝇被麻醉后, 过一段时间后可以复苏。

(一) 麻醉方法

对果蝇进行性状观察或杂交时, 用乙醚麻醉。取一麻醉瓶, 瓶口应与培养瓶大小相仿, 取一棉花塞, 在塞入瓶口的一面滴加 3 滴乙醚(注意不要让乙醚流进瓶内, 麻醉瓶要保持干燥, 否则会粘住果蝇翅膀, 影响观察)。麻醉果蝇时: ①先轻拍有果蝇的培养瓶的瓶壁, 使果蝇全部震落在培养瓶底部; ②然后迅速打开培养瓶的棉塞, 扣上麻醉瓶; ③将两瓶倒过来, 培养瓶在上, 把果蝇倒入去盖的麻醉瓶中; ④拿掉培养瓶, 并立即用滴好乙醚的棉塞盖好麻醉瓶, 待果蝇全部昏迷后, 倒在白瓷板上进行观察。

注意: 过度麻醉将导致果蝇死亡, 所以杂交用的雌雄亲蝇一定要轻度麻醉。

(二) 观察果蝇的生活史

果蝇属完全变态发育昆虫, 一个完整生活周期分为卵、幼虫、蛹和成虫四个明显的时期。25℃时, 从卵到成虫约 10 天, 各个发育时期长短随温度的高低而不同。20℃~25℃是果蝇生活的适宜温度, 温度过高(>30℃)会引起不孕或死