

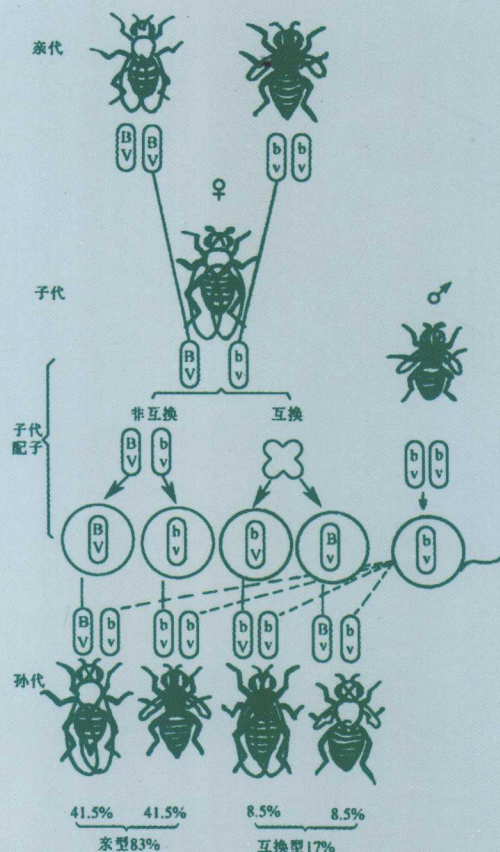


21世纪高等院校示范性实验系列教材

遗传学实验教程

YICHUANXUE SHIYAN JIAOCHENG

主编 许文亮 李学宝



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

遗传学实验教程

主 编 许文亮 李学宝
副主编 余知和 张明菊 张秀英 匡银近
编 委 (按姓氏拼音顺序排列)
黄耿青 匡银近 李 兵
李登弟 李 利 李学宝
李 扬 刘致浩 任 峰
许文亮 余知和 严镇钧
赵福永 赵慧君 张明菊
张秀英 张则婷



华中师范大学出版社
2012年·武汉



北航

C1636392

Q3-33
17

013831202

内 容 提 要

本实验教程根据遗传学的发展历史,以基因为线索,以模式生物为研究材料,选取了反映遗传学个体水平、细胞水平、分子水平等方面特别是分子遗传学方面的具有代表性的 26 个实验,体现了现代遗传学的研究进展,反映了学科发展的趋势。

本书可作为综合性大学以及理工和师范院校生物学专业本科生的遗传学实验教材,也可作为遗传学相关专业研究生的实验指导,还可作为从事遗传学教学和科研工作人员的参考书。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程/许文亮,李学宝 主编. —武汉:华中师范大学出版社,2012. 6

(21 世纪高等院校示范性实验系列教材)

ISBN 978-7-5622-5530-7

I. ①遗… II. ①许…②李… 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(2012)第 108950 号

遗传学实验教程

©许文亮 李学宝 主编

责任编辑:张晶晶

编辑室:第二编辑室

出版发行:华中师范大学出版社有限责任公司

社址:湖北省武汉市珞喻路 152 号

销售电话:027-67863426/67863280

邮购电话:027-67861321

传真:027-67863291

网址:<http://www.ccnpublish.com>

印刷:仙桃市新华印务有限公司

字数:268 千字

开本:889mm×1194mm 1/16

版次:2012 年 8 月第 1 版

印数:1—2 000

责任校对:李 彤

电话:027-67867362

封面设计:罗明波

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

督印:章光琼

印张:9.75

印次:2012 年 8 月第 1 次印刷

定价:19.80 元

欢迎上网查询、购书

敬告读者:欢迎举报盗版,请打举报电话 027-67861321

前言

遗传学不仅是生命科学的带头学科和中心课程之一,还是一门实验的科学,其研究对象包罗万象,有动物、植物、微生物等,目前的分支学科有 20 多门,与细胞生物学、生物化学、生态学、生理学、免疫学、生物技术、分子生物学、发育生物学、人类学、行为学等有着广泛的联系和交叉,而且每天都有新技术和新发现出现。遗传学每一次理论上的重大突破都是以实验进展为基础的,可以毫不夸张地说,离开了实验,遗传学将一事无成。

遗传学是以基因为中心,研究基因的发现、基因的结构、基因的传递、基因的表达、基因的变异等问题的一门学科。可以这样说,遗传学的发展史实际上是一部基因的发展史。在遗传学实验内容的选择及安排上,我们基本按照这一历史发展的过程,依据遗传学个体水平、细胞水平、分子水平的从宏观到微观的发展规律来选择和安排实验内容。

实验生物对遗传学的研究非常重要,应该具有以下一些基本的特点:最好是小型生物、易饲养、生活周期短、繁殖能力强、易发生突变、有较大的后代繁殖群体、基因组小、形态易于区分、有复杂的发育过程可用于遗传学分析等。遗传学研究的主要实验生物有细菌、酵母、果蝇、线虫、小鼠、拟南芥、豌豆、玉米等。在我们的实验内容体系中主要使用的材料有玉米(分离定律——玉米花粉、减数分裂——玉米花序),蚕豆(植物染色体制片、染色体组型分析、微核检测),果蝇(培养、性状分析、唾腺染色体分离与检测),酵母(单杂交、双杂交),拟南芥(核酸提取、RT-PCR、遗传转化及分析),烟草(转基因分析)等。每一种材料的实验都是一个综合大实验,这些材料基本上都是目前在遗传学、细胞生物学、分子生物学、发育生物学等基础研究中广泛使用的,它们在种植和培养上相对容易,对实验条件要求较低,实验结果易于观察,可操作性强。

遗传学实验内容,不仅要整合好经典的遗传学实验,还要能够紧靠学科发展前沿。以遗传学为基础的分子遗传学及生物技术正处于日新月异的发展中,正在对医疗、农业和环保行业产生革命性的影响,我们特别遴选了一系列这方面的实验,各个学校可根据自身条件选用。

此外,我们在大部分实验的结尾部分增添了科学史话板块,希望读者能更加详细地了解典型实验的发展历史,了解科学家的成长经历、科研团队的建设和科学家的思维,学习前后几代科学家如何将实验一步步往下深入,一代代科学家如何利用前人的成果、是盲从权威还是敢于挑战,在这个过程中,一代代科学家是如何提出新的科学问题、如何解决科学问题、如何设计实验、如何分析实验数据的……

总之,我们希望通过系统的实验训练,培养学生发现问题、提出问题、分析问题和解决问题的能力,锻炼动手操作能力,训练观察、记录、分析、判断、推理等能力以及科学地解释实验结果、清晰而逻辑严密地将结果表达出来的能力;通过遗传学实验的学习,更深刻系统地理解遗传学基本原理,比较熟练地掌握遗传学的主要研究方法和研究手段,能够使用大量现代仪器设备,跟踪学科前沿,具备独立进行遗传学实验教学和 research 的能力,适应 21 世纪迅速发展的生命科学的需要。

本教材由华中师范大学许文亮、李学宝、任峰、黄耿青、李登弟、张则婷、李扬、刘致浩、李兵,长江大学余知和、赵福永、李利,湖北工程学院匡银近,湖北师范学院严镇钧,黄冈师范学院张明菊,湖北文理学院赵慧君,喀什师范学院张秀英共同编写。

由于编者水平有限,书中缺漏和错误之处在所难免,恳请读者不吝指正。

编者
2012 年 8 月

目 录

实验 1	植物细胞减数分裂的制片与观察	1
实验 2	动物细胞减数分裂的制片与观察	5
实验 3	分离定律的验证	8
实验 4	植物细胞有丝分裂的制片与观察	11
实验 5	动物染色体标本的制片与观察	14
实验 6	核型分析	17
实验 7	蚕豆根尖细胞微核检测技术	19
实验 8	果蝇培养与遗传性状的观察	22
实验 9	果蝇唾腺染色体观察	27
实验 10	脉孢菌的有性杂交	30
实验 11	细菌的三亲本杂交	33
实验 12	拟南芥基因组 DNA 的提取纯化及浓度测定	36
实验 13	拟南芥叶片总 RNA 的提取及浓度测定	39
实验 14	RNA 电泳检测	43
实验 15	RT-PCR 法研究基因的表达	46
实验 16	Northern 杂交研究基因的表达	49
实验 17	转基因烟草	53
实验 18	拟南芥的转化及转基因植株表型分析	61
实验 19	蛋白质亚细胞定位分析	67
实验 20	酵母单杂交技术验证 DNA 与蛋白质的相互作用	70
实验 21	酵母双杂交系统	74
实验 22	蛋白质双向电泳	79
实验 23	植物免疫组织化学技术	82
实验 24	人群中 PTC 味盲基因频率的分析	86
实验 25	植物有性杂交技术	89
实验 26	动物组织石蜡切片技术	94
附录 实验报告		
实验 1	植物细胞减数分裂的制片与观察实验报告	99
实验 2	动物细胞减数分裂的制片与观察实验报告	101
实验 3	分离定律的验证实验报告	103
实验 4	植物细胞有丝分裂的制片与观察实验报告	105
实验 5	动物染色体标本的制片与观察实验报告	107

实验 6	核型分析实验报告	109
实验 7	蚕豆根尖细胞微核检测技术实验报告	111
实验 8	果蝇培养与遗传性状的观察实验报告	113
实验 9	果蝇唾腺染色体观察实验报告	115
实验 10	脉孢菌的有性杂交实验报告	117
实验 11	细菌的三亲本杂交实验报告	119
实验 12	拟南芥基因组 DNA 的提取纯化及浓度测定实验报告	121
实验 13	拟南芥叶片总 RNA 的提取及浓度测定实验报告	123
实验 14	RNA 电泳检测实验报告	125
实验 15	RT-PCR 法研究基因的表达实验报告	127
实验 16	Northern 杂交研究基因的表达实验报告	129
实验 17	转基因烟草实验报告	131
实验 18	拟南芥的转化及转基因植株表型分析实验报告	133
实验 19	蛋白质亚细胞定位分析实验报告	135
实验 20	酵母单杂交技术验证 DNA 与蛋白质的相互作用实验报告	137
实验 21	酵母双杂交系统实验报告	139
实验 22	蛋白质双向电泳实验报告	141
实验 23	植物免疫组织化学技术实验报告	143
实验 24	人群中 PTC 味盲基因频率的分析实验报告	145
实验 25	植物有性杂交技术实验报告	147
实验 26	动物组织石蜡切片技术实验报告	149



- (3) 可将载玻片在酒精灯火焰上来回 3~4 次稍加热(均匀, 勿使材料沸腾, 可以使材料软化和着色,

并破坏部分细胞质使染色背景清晰),继续染色 5 min~10 min(如用改良苯酚品红染液,可不加热)。

(4)用镊子取出花药残渣并弃去,加清洁盖玻片,在盖玻片上覆一小块吸水纸,用拇指加压(加压时勿使盖玻片与载玻片相对滑动)。

(5)镜检(先低倍再高倍),找出减数分裂各时期的细胞。

减数分裂各时期主要特点简介

1. 间期 I: 玉米的减数分裂中,间期细胞染色质松散,核内染色较为均匀。

2. 减数第一次分裂

2.1 前期 I: 整个前期持续时间长,染色体变化较为复杂,又可分为 5 个时期。

(1)细线期: 染色体呈细丝状,首尾不分地绕成一团。核仁明显。

(2)偶线期: 同源染色体开始配对联会。

(3)粗线期: 染色体逐渐变粗变短。在好的制片中,可以数出染色体的对数。由于每条染色体已经复制为二,而着丝点还未分开,这样的染色体称为二价体。

(4)双线期: 染色体更为粗短。配对的染色体开始互相排斥而分开,此时可以看到染色体的交叉现象。

(5)浓缩期(终变期): 染色体最为粗短,是染色体计数的最好时期。

2.2 中期 I: 核仁、核膜消失,纺锤体形成,染色体排列在细胞的赤道面上。但每对同源染色体的着丝点分处在赤道面的两侧。

2.3 后期 I: 同源染色体彼此分开,移向细胞两极。由于此时着丝点未分开,所以细胞两极的染色体数是性母细胞的一半,但每条染色体中依然含有 2 条单体。

2.4 末期 I: 染色体到达细胞两极后逐渐解旋。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。每个子细胞中含有单倍的染色体(n)。

3. 减数第二次分裂

3.1 前期 II: 前期 II 与有丝分裂的前期一样,每条染色体都具有 2 条单体,不同的是前期 II 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 $2n$ 。

3.2 中期 II: 染色体浓缩变短,着丝粒排列在细胞赤道面上,纺锤体出现,每条染色体的姊妹染色单体呈分离状态,但着丝点仍未分开。

3.3 后期 II: 着丝点完成复制,彼此分开。每一染色体纵裂为二,姊妹染色单体开始移向细胞的两极。

3.4 末期 II: 移向细胞两极的染色体逐渐解旋,核仁、核膜出现。在细胞的赤道面出现细胞板,每个细胞分为 2 个子细胞。

经过这样的减数分裂,1 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。如图 1-1 所示。

6. 注意事项

(1)注意实验材料的选择;

(2)注意区分花粉母细胞与花药壁细胞(见表 1-1)。

表 1-1 花粉母细胞与花药壁细胞的比较

	花粉母细胞	花药壁细胞
细胞形态	圆形	方形
细胞大小	较大	较小
染色程度	较浅	较深

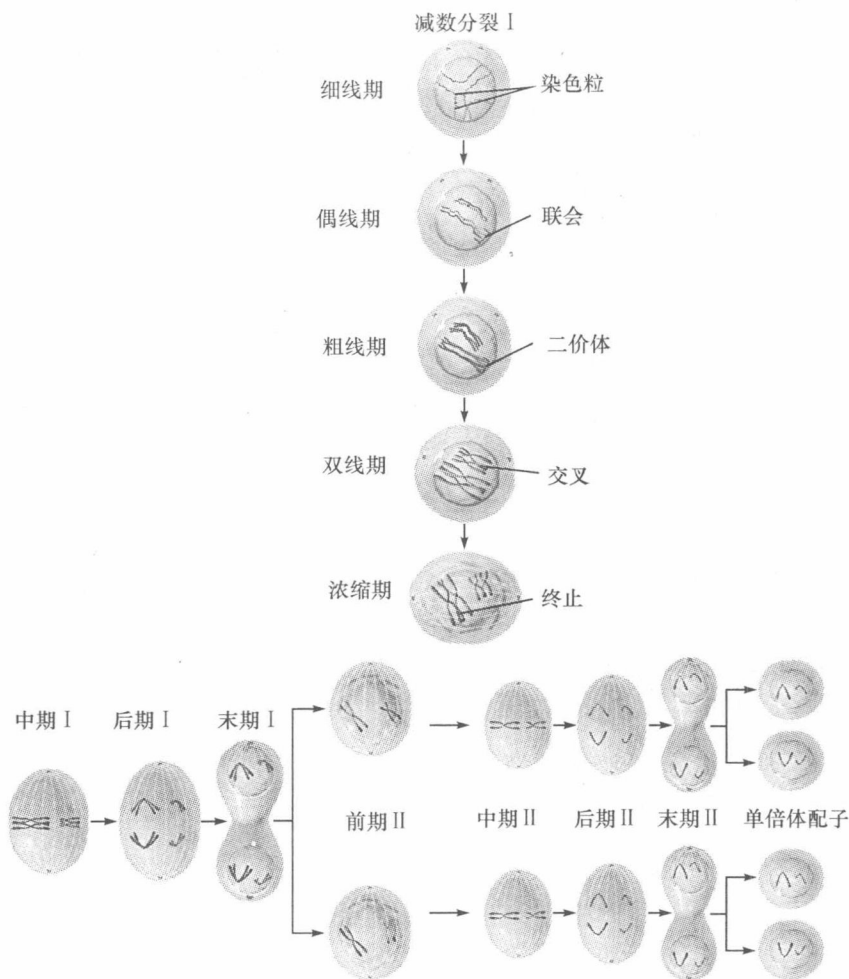


图 1-1 植物减数分裂过程模式图

7. 参考文献

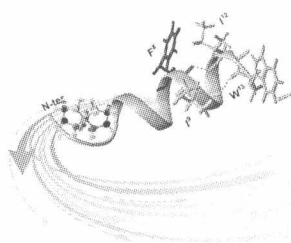
- [1] 杨大祥. 减数分裂的研究历史[J]. 生物学教学, 2007, 32(1): 61-63.
- [2] 张贵友等编著. 普通遗传学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003.
- [3] 刘祖洞, 江绍慧主编. 遗传学实验[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1987.
- [4] 王建波等编. 遗传学实验教程[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- [5] William S Klug, Michael R Cummings, Charlotte A Spencer. Essentials of Genetics[M]. 6th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2008.
- [6] 李雅轩, 赵昕主编. 遗传学综合实验[M]. 北京: 科学出版社, 2006.

8. 科学史话

阐明减数分裂过程实际上是几代科学家辛勤工作的结果。1883年, Caldwell 与 Threlfall 设计并制造了第一台切片机, 这种切片机能够切出足够薄的连续切片供显微观察, 切片机的出现使得在显微镜下观察动植物染色体的效果大为改观。就在同一年, 比利时的细胞学家 Beneden 做了一项重要的观察。他发现马蛔虫(*Ascaris megalocephala*)的受精卵中, 染色体的数目为4, 而卵子与精子中的染色体数则都为2, 这意味着他已经看到了减数分裂的结果, 但很遗憾的是, 他并未对这个结果做更深

入的分析,从而将能做出一项更大发现的机会拱手让给了 Weismann。实际上,Weismann 对生物学的一项更重要的贡献就是预言减数分裂的存在,1887 年,他系统地总结了前人及自己实验室对极体的研究结果。他认为,虽然极体与卵细胞比起来在大小上差别甚大,但实质上它们和卵细胞一样,是卵母细胞分裂的结果。卵母细胞产生极体的意义就在于使卵中的遗传物质减半。因为如果配子细胞中的染色体数与卵母细胞中的染色体数一致,那么,子代细胞中的染色体数将成倍地增长。他将卵母细胞形成卵子的特殊分裂方式称为 reducing division,并推论在精子形成的过程中存在着同样的过程,这就是减数分裂概念的最初来源。

Weismann 的预言无疑是非常正确的,但弄清单数分裂的完整过程却花了研究者们很长的时间。其中一个很大的问题就是如何将减数分裂的各个时期排出个先后顺序来。在减数分裂的研究史上,Sutton 与 Carothers 两个师兄妹留下了浓墨重彩。他们俩都是 McClung 的学生,McClung 是性染色体的发现者。1902 年和 1903 年,Sutton 连续在 Biological Bulletin 上发表了两篇文章。在第一篇文章中,Sutton 描述了笨蝗染色体的形态,在这篇文章的结尾,Sutton 特别提到了在减数分裂时染色体的行为与孟德尔提出的“遗传因子”行为平行,很可能染色体即是孟德尔遗传定律的物质基础。在第二篇文章中,Sutton 进一步详细地阐述了他对染色体与遗传关系的构想。这些构想包括:在减数分裂过程中,不同对的染色体向两极分配是随机的行为,这种随机的行为就构成了孟德尔自由组合定律的基础。更为难能可贵的是,他推论,一个物种性状的数目一定多于染色体数,所以一个染色体上必然有多个基因(这即是后来 Morgan 发现的连锁遗传)。这个构想被 Sutton 的博士生导师 Wilson 命名为 Sutton-Boveri 假设。1916 年,Morgan 的助手 Bridges 用“不分离”确证了 Sutton 的染色体遗传学说。因此可以说,正是通过 Sutton-Boveri 假设,促成了新兴的遗传学与传统的细胞学联姻,使遗传学迅猛发展。



实验2

动物细胞减数分裂的制片与观察

1. 实验目的

- (1)了解动物生殖细胞的形成过程;
- (2)熟悉减数分裂各期特点;
- (3)学习生殖细胞的取材和染色体制片。

2. 实验原理

雄性动物性成熟后,性腺中的原始细胞经过多次有丝分裂产生出许多核大而圆的精原细胞,体积逐渐增大成为初级精母细胞(染色体已经过复制),核中染色体聚集成团,进入减数分裂前的准备时期。1个初级精母细胞($2n$)经过第一次分裂,由于同源染色体的分离,形成2个染色体减半的次级精母细胞(n)。次级精母细胞较初级精母细胞体积小,每个次级精母细胞经过第二次分裂,姊妹染色单体分离,形成2个精细胞(n),所以1个初级精母细胞($2n$)经过减数分裂形成4个精细胞(n),精细胞(n)进一步发育成为精子(n)。雌性动物性成熟后,性腺中也发生类似的过程,所不同的是1个初级卵母细胞($2n$)经过第一次分裂,形成1个染色体减半的次级卵母细胞(n)和1个体积较小的极体(n)。次级卵母细胞(n)和极体(n)经过第二次分裂,形成1个卵细胞(n)和3个极体,3个极体退化。

含有单倍体染色体的雌雄配子经过受精作用后,合子中的染色体数目又恢复到二倍体水平,因此它是维持大多数动植物染色体数目世代稳定传递的根本机制。另外,基因的分离、自由组合以及交换都发生在减数分裂时期,而且在减数分裂过程中,染色体将发生一系列形态结构上的变化,是我们研究动物染色体的好材料。合子包含了来自两个亲本的同源染色体,基因的分离、自由组合以及非姊妹染色单体之间的交换,增加了遗传的多样性,是生物体性状变异的重要来源,深入认识减数分裂对学习遗传学规律是非常重要的。

对动物来说,在配种季节里(无发情季节的动物为终年)精母细胞都在不断地分裂增殖形成精子,因此,取出精巢组织,经过低渗液固定等适当处理,制成细胞悬液,再用空气干燥法制片,所得标本常可观察到减数分裂各个时期的细胞。

3. 实验仪器和试剂

(1)仪器:生物显微镜、手术刀、剪刀、镊子、表面皿、烧杯、滴管、尖底离心管、离心机(1 000 r/min)、玻璃棒、水浴锅。

(2)试剂:生理盐水,0.075 mol/L KCl 溶液,Giemsa 染液(或改良苯酚品红染液),Carnoy(卡诺氏)固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)等。

4. 实验材料

性成熟的公鸡。

5. 实验方法与步骤

(1)取睾丸前2 h先给实验动物经腹腔注入适量秋水仙素(约 $2\text{ }\mu\text{g/g}$ 体重),手术法取出性成熟公鸡睾丸,投入2%柠檬酸钠溶液内,洗去血液,移入盛有适量上述溶液的小平皿,剪开被膜,用锐利的小剪刀将睾丸组织尽可能剪成小块,随即用玻璃棒研磨5 min~10 min。

(2)将睾丸组织悬液移入尖底离心管中,200 r/min离心3 min~4 min,使块状组织沉底,用滴管吸取中层的细胞悬液2 mL~4 mL,移入另一离心管中,加入等量0.075 mol/L KCl溶液在37℃恒温水浴锅中低渗20 min~30 min。

(3)取出离心管,沿瓶壁加入1 mL固定液,吹打均匀后1 000 r/min离心6 min,弃上清,得细胞沉淀。

(4)加入新配制的Carnoy固定液5 mL,5 min后,用吸管将细胞团块轻轻打散,固定20 min。

(5)1 000 r/min离心10 min,弃上清。

(6)再加入Carnoy固定液5 mL,5 min后,用吸管将细胞团块轻轻打散,固定20 min。

(7)再次1 000 r/min离心10 min,弃上清。

(8)视细胞的多少加入适量的固定液。

(9)制片:取一张在冰箱(0℃~4℃)中预冷的清洁载玻片,用滴管吸取1~4滴细胞悬液,用嘴吹气使细胞分散,再通过火焰使其干燥。

(10)用6%~8% Giemsa 染液(或改良苯酚品红染液)染色20 min~30 min。用清水冲洗后镜检。

(11)镜检:找出减数分裂各个时期的细胞,如图2-1所示。

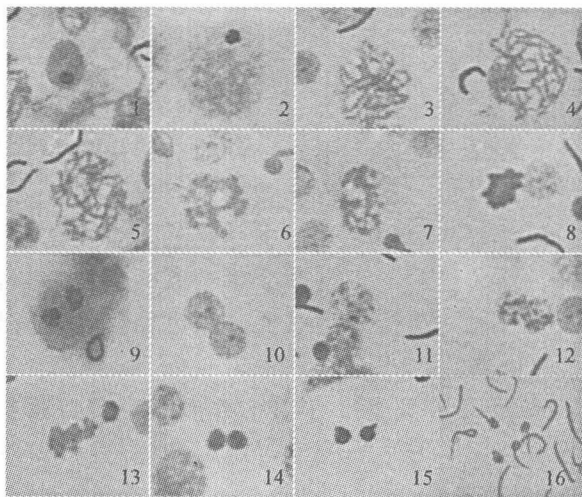


图2-1 公鸡精母细胞减数分裂各期图

1. 间期; 2. 细线期; 3. 偶线期; 4. 粗线期; 5. 双线期; 6. 终变期; 7. 中期 I; 8. 后期 I
9. 末期 I; 10. 前期 II; 11. 中期 II; 12. 后期 II; 13. 末期 II; 14~16. 精细胞变为精子

相关试剂的配制

1. Giemsa 原液

称重1 g Giemsa 染料,溶于66 mL甘油中,在研钵中研细,置56℃恒温水浴锅90 min,冷却后,加入66 mL甲醇混合,过滤,装入棕色瓶中备用。

2. 磷酸盐缓冲液

取2.2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 置于100 mL容器中,加入约30 mL蒸馏水溶解后转移到容量瓶中用蒸馏水定容至100 mL,pH为7.0~7.2,储存备用。

3. Giemsa 工作液

Giemsa 原液:磷酸盐缓冲液:蒸馏水=2:3:5。

4. 改良苯酚品红染液

原液 A: 取 3 g 碱性品红溶于 100 mL 70% 酒精中(可长期保存)。

原液 B: 取原液 A 10 mL 加入 90 mL 5% 苯酚(即石炭酸)水溶液中(2 周内使用)。

原液 C: 取原液 B 55 mL 加入 6 mL 冰醋酸和 6 mL 38% 甲醛溶液(可长期保存)。

改良苯酚品红染液配制时, 取原液 C 10 mL~20 mL, 加入 90 mL~80 mL 45% 醋酸和 1.5 g 山梨醇。放置 2 周后使用, 染色效果显著。

6. 注意事项

(1) 研磨公鸡睪丸组织时速度和用力要均匀适度, 速度太快或用力过大则细胞碎裂; 反之, 用力不足或速度太慢则不能将细胞从曲细精管中压出, 都将影响标本的质量。

(2) 制片吹气时向同一个方向吹气。

(3) 染色后用清水缓慢冲洗, 以防水流过大使细胞脱落。

7. 参考文献

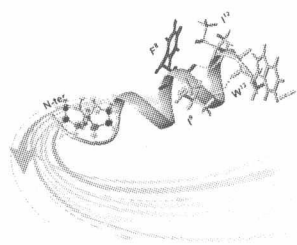
[1] 杨大祥. 减数分裂的研究历史[J]. 生物学教学, 2007, 32(1): 61-63.

[2] 蔡有余, 吴旻. 哺乳类动物减数分裂标本的简易制作方法[J]. 科学通报, 1979(6): 282-284.

[3] 卢龙斗等编著. 遗传学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[4] 张根发主编. 遗传学实验[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2010.

[5] 李雅轩, 赵昕主编. 遗传学综合实验[M]. 北京: 科学出版社, 2006.



实验 3

分离定律的验证

1. 实验目的

- (1)通过果蝇一对相对性状的杂交实验,分析杂种后代的性状表现,验证分离定律;
- (2)掌握基本的遗传结果记录及统计分析(适合度检验)方法。

2. 实验原理

孟德尔分离定律:杂合体中决定某一性状的成对遗传因子,在减数分裂过程中,彼此分离,互不干扰,使得配子中只具有成对遗传因子中的一个,从而产生数目相等的、两种类型的配子,且独立地遗传给后代。

按照孟德尔定律,一对相对性状的双亲杂交产生 F_1 代,表现显性性状,自交 F_2 代出现显性与隐性之比为 $3:1$;测交后代显性与隐性之比为 $1:1$ 。根据 F_2 代和测交后代的表型数计算出卡方值,查概率表,得出结论。

分离定律的实质是成对的基因(等位基因)在配子形成过程中彼此分离,互不干扰,因而配子中只具有成对基因的一个。

分离定律可用测交法进行验证。测交法即把被测验的个体与隐性纯合的亲本杂交。根据测交子代 F_t 表现型的种类和比例,确定被测个体的基因型。因为隐性纯合体只能产生一种含隐性基因的配子,它和某一种配子结合,其子代将只能表现出它所结合的那一种配子所含基因的表现型。所以测交子代表现型的种类和比例正好反映了被测个体所产生的配子的种类和比例。

3. 实验仪器和试剂

(1)仪器:显微镜、双筒解剖镜或放大镜、恒温培养箱、高压灭菌锅、培养瓶、麻醉瓶、白瓷板、毛笔、石棉网、棉签、吸水纸、牛皮纸、小镊子等。

(2)试剂:乙醚、玉米粉、白糖、酵母粉、琼脂、丙酸。

4. 实验材料

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, $2n=8$)的两个品系:野生型的常(长)翅果蝇($+/+$)和突变型的残翅果蝇(vg/vg)。如图 3-1 所示。

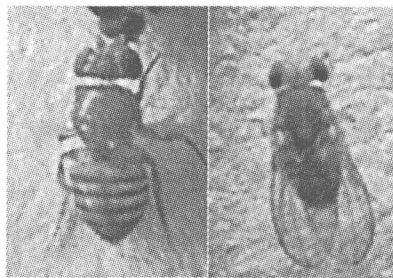


图 3-1 果蝇的残翅(左)和常翅(右)

5. 实验方法与步骤

(1)制备饲养果蝇的培养基

① 培养瓶、棉塞灭菌:培养果蝇用的容器可以采用较粗的试管或广口瓶,这些容器均需在实验前进行高温灭菌才能使用。

② 培养基配制:果蝇是以酵母菌作为主要食料的,因此实验室内凡能发酵的基质,都可用作果

蝇饲料。常用的饲料有玉米饲料、米粉饲料、香蕉饲料等。

果蝇玉米饲料配方如下：

水 100 mL，琼脂 1.0 g，白糖 6.5 g，玉米粉 8.5 g，丙酸 0.5 mL，酵母粉少许。

具体操作是：取应加水量的一半，加入琼脂，煮沸，使充分溶解，加糖，煮沸溶解；取另一半水混和玉米粉，加热，调成糊状。将上述两者混和，煮沸。以上操作过程中都要搅拌，以免沉积物烧焦。稍冷后加入丙酸，充分调匀后分装到灭过菌的试管中，每管撒酵母粉少许。

注意在分装时不要把培养基倒在瓶壁上，否则要用棉签将瓶壁擦干净。

(2) 亲本种蝇的准备

在两种种蝇中进行处女蝇的收集：分别释放两种种蝇的成蝇，让蛹羽化为成虫，一般雌蝇羽化后6 h~8 h不交配。在此之前挑选出的雌蝇即为处女蝇(亲本必须是处女蝇)。雌雄个体分开饲养。

具体做法是：首先将一种种蝇的成蝇麻醉(麻醉方法：取一麻醉瓶，瓶口与培养瓶大小相仿。取一棉花塞，在塞入瓶口的一面滴加3滴乙醚。将果蝇转入麻醉瓶内，翻转麻醉瓶使瓶口朝上，迅速将滴有适量乙醚的棉塞盖住麻醉瓶瓶口。约1 min后观察果蝇的表现，若果蝇从瓶壁上纷纷落到瓶底，表示麻醉已生效)。转移麻醉后的果蝇时，应用毛笔的笔尖蘸取。

再麻醉：观察或计数过程中，果蝇可能苏醒，可准备一玻璃培养皿，内以胶带贴一小块棉球，上面滴加适量乙醚，培养皿皿口朝下置于一旁备用，如见果蝇翻身爬动可将培养皿皿口朝下盖于果蝇上方，待其麻醉后再移开。果蝇死亡时表现为翅膀与身体呈45°角(如图3-2所示)。但如果是麻醉鉴别后再进行转移培养，就应避免麻醉至死。转移果蝇至新培养瓶或麻醉瓶的方法：取一新培养瓶，略为松动棉塞，放置于右手侧，取欲转移果蝇培养瓶于左手侧，以左手握住瓶颈，两指轻扣棉塞顶部，以右手轻拍瓶底使果蝇掉落于培养基表面，左手拔起棉塞以两指夹住，右手两指夹住新培养瓶棉塞，并将新培养瓶倒扣于旧培养瓶上，再以左手握住两瓶口相接处，翻转使新培养瓶位于下方，然后以右手掌心轻拍旧培养瓶瓶底，使果蝇掉落于新培养瓶内(如图3-3所示)，迅速盖上各瓶棉塞。转移果蝇时，为避免麻醉的果蝇直接掉落于培养基表面而粘着于培养基表面致死，可将培养瓶横放，将麻醉的果蝇倒于瓶壁，待其苏醒后再将培养瓶正立。

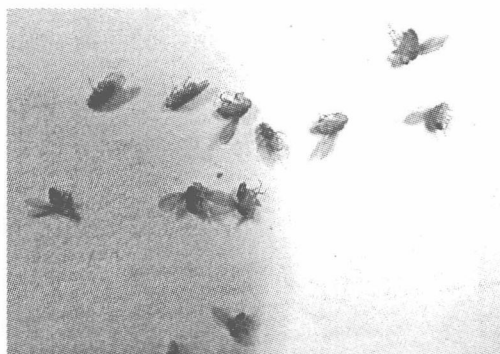


图 3-2 死亡果蝇的识别

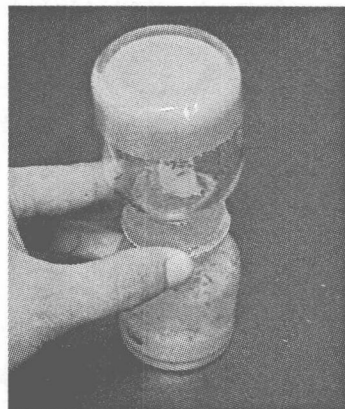


图 3-3 果蝇的麻醉或转移

将麻醉的果蝇倒在白瓷板上，仔细辨认雌雄，分别放在不同试管中饲养。另一种蝇用同样的方法处理。

为准确地配置果蝇的杂交组合，分析果蝇遗传性状，首先要能够准确辨别果蝇的性别。果蝇的雌雄鉴别方法是將麻醉后的果蝇放在解剖镜下仔细观察，区别雌雄果蝇的差异(见表3-1)。在雌雄差异中，以性梳的差异作为鉴别特征最准确。在观察性梳时可以用解剖镜观察，也可以用低倍的显微镜观察。

表 3-1 雌、雄果蝇的主要差异

雌蝇	雄蝇
体型较大	体型较小
腹部椭圆形，末端稍尖	腹部末端钝圆
腹部背面 5 条黑纹	腹部背面 3 条黑纹，最后一条延伸至腹面成一黑斑
无性梳	第一对足第一跗节有性梳

(3) 杂交

正交： $vg/vg(\text{♀}) \times +/+(\text{♂})$

反交： $+/(+)(\text{♀}) \times vg/vg(\text{♂})$

正交操作方法：先将残翅处女蝇倒出麻醉，挑选 5 只放进水平放置的杂交瓶中，再把常翅处女蝇倒出麻醉，挑选 5 只雄蝇，放入上述杂交瓶中。等果蝇都苏醒后再将杂交瓶直立，并贴上标签(注明组合名称、杂交日期、小组编号，也可直接用记号笔写明)。移入 25℃ 培养箱中培养。

按照同样方法做好反交。

(4) 6 d~7 d 后，待幼虫出现，释放杂交亲本(记日期)。成蝇要放飞干净。

(5) 4 d~5 d 后，连续观察记录 F_1 代性状，并统计数量(麻醉后倒在白瓷板上进行统计)。

(6) 选出正、反交各 5 对~6 对 F_1 代雌、雄蝇，分别移入新试管，在 25℃ 培养箱中培养。同时选出 5 只雌蝇与 5 只残翅雄蝇进行测交。

(7) 6 d~7 d 后释放 F_1 代和测交亲本(记录日期)。

(8) 4 d~5 d 后， F_2 代和 F_t 代成蝇出现，连续观察统计各种性状。

验证分离定律的另一可选方案

基因的分离也可以通过 F_1 花粉粒某些性状的分离而观察到。如水稻、玉米、高粱、谷子等作物的花粉粒中的淀粉，有糯质和非糯质之分。糯质含支链淀粉多，遇碘呈棕色；非糯质含较多的直链淀粉，遇碘呈蓝色。这是一对等位基因的差别，非糯(Wx)对糯(wx)是显性。形成配子时，两种淀粉的花粉粒理论上数量相等。

种植非糯质($WxWx$)和糯质($wxwx$)两种基因型的玉米植株，待雄蕊抽出、即将开花前套袋，于上午露水干时(9:00 左右)，轻拍纸袋，收集花粉，另将上述两种基因型的玉米植株雌蕊套袋杂交(正交或反交)得 F_1 种子，将 F_1 种下，按上述方法收集花粉，干燥保存。

用牙签(或大头针)蘸取少量杂种一代(F_1)花粉于干燥清洁的载玻片上，加 1 滴 $KI-I_2$ 液，混匀，加盖玻片，在低倍镜(4×或 10×)下区别糯质和非糯质花粉粒色泽，按五点取样法统计 F_1 花粉粒中糯质和非糯质花粉粒的数目，总数不得少于 200 粒。进行卡方测验。

6. 注意事项

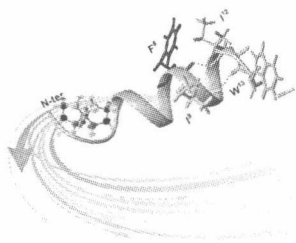
(1) 麻醉剂的使用：乙醚有毒且挥发性强，使用时要注意随时盖好瓶盖，防止乙醚挥发。

(2) 麻醉深度：麻醉果蝇时要防止麻醉过度，影响继代培养。

(3) 要准确识别雌雄果蝇。

7. 参考文献

- [1] 张文霞，戴灼华主编. 遗传学实验指导[M]. 北京：高等教育出版社，2007.
- [2] 王建波等编. 遗传学实验教程[M]. 武汉：武汉大学出版社，2004.
- [3] 刘祖洞，江绍慧主编. 遗传学[M]. 北京：高等教育出版社，1987.
- [4] 徐晋麟，赵春耕主编. 基础遗传学[M]. 北京：高等教育出版社，2009.
- [5] 王亚馥，戴灼华主编. 遗传学[M]. 北京：高等教育出版社，2008.



实验4

植物细胞有丝分裂的制片与观察

1. 实验目的

- (1)掌握染色体制片方法;
- (2)观察染色体动态变化。

2. 实验原理

具有自我复制能力是生命的一个基本特征。单细胞生物可以通过细胞分裂直接复制自身,而多细胞生物从受精卵开始,通过有丝分裂使细胞不断增殖,再经过一系列复杂的分化过程形成新一代个体。一般来说,只要能够进行细胞分裂的植物组织或是单个细胞都可以作为观察染色体的材料。如植物的顶端分生组织(根尖或茎尖)、居间分生组织(禾本科植物的幼茎及叶鞘)、愈伤组织和胚乳、萌发的花粉管等,在这些组织内不断进行着细胞分裂。只要适时取材,并加以固定、离析、染色等处理后制成染色体玻片标本,即可利用显微镜对有丝分裂和染色体进行观察。这也是细胞遗传学最基本和常用的方法,在物种亲缘关系鉴定、染色体变异、杂种分析等工作中有着广泛的用途。

根尖是指从根的顶端到着生根毛部分的这一段。根尖可以分为四个部分:根冠、分生区、伸长区和根毛区。根冠是由薄壁细胞组成的帽状结构,位于根尖的顶端,包围着根尖的分生区。分生区位于根冠内侧,全长1 mm~2 mm,是分裂产生新细胞的主要地方,又称生长点。分生区是典型的顶端分生组织,因此细胞具有顶端分生组织的特点。伸长区位于分生区稍后部分,此区细胞分裂活动越来越弱,并逐渐停止,而细胞体积却不断扩大,并沿着根的纵轴方向伸长。伸长区的长度为2 mm~5 mm,外观较为透明洁白,可与生长点相区别。此区细胞除显著伸长外,在后端的部分细胞已加速了分化,开始出现了早期的各种组织,并不断地向根毛区过渡。

3. 实验仪器和试剂

- (1)仪器:显微镜、解剖针、镊子、刀片、载玻片、盖玻片、吸水纸、小广口瓶、酒精灯。
- (2)试剂:醋酸洋红、改良苯酚品红等。

4. 实验材料

蚕豆根尖。

5. 实验方法与步骤

(1)材料培养:蚕豆种子充分浸种,发芽后埋在干净的湿沙中培养,或者直接种入地里,待根长到1 cm~1.5 cm长时,进行前处理。

(2)前处理:剪下根,在14:30~17:30时间段用0.05%秋水仙素浸泡,过夜。前处理的目的是降低细胞质的黏度,使染色体缩短分散,防止纺锤体形成,让更多的细胞处于分裂中期。

(3)固定:乙醇—冰醋酸(3:1)固定液固定4 h~24 h以后,转入70%乙醇中,4℃冰箱保存。固定的目的是采用渗透力强的固定液将植物的组织、细胞迅速杀死,使蛋白质沉淀,并尽量使其保持