

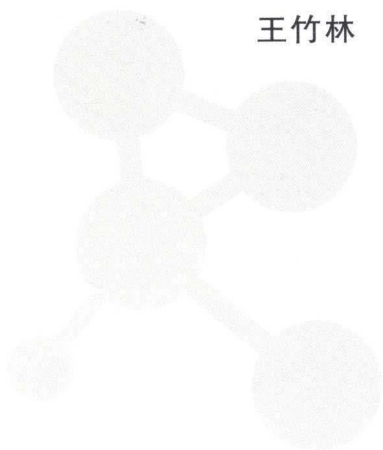


遗传学

实验指导

YICHUANXUE SHIYAN ZHIDAO

王竹林 主编



西北农林科技大学出版社

遗传学

实验指导

《遗传学》(第2版)实验指导

2016.08

高等教育出版社

遗传学实验指导

王竹林 主编

吉林科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验指导/王竹林主编. —杨凌:西北农林科技大学出版社,2011
ISBN 978-7-81092-669-0

I. ①遗… II. ①王… III. ①遗传学—实验—高等学校—教学参考资料
IV. ①Q3—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 168029 号

遗传学实验指导

王竹林 主编

出版发行	西北农林科技大学出版社	
地 址	陕西杨凌杨武路 3 号	邮 编 712100
电 话	总编室:029-87093105	发行部:87093302
电子邮箱	press0809@163.com	
印 刷	陕西龙源印务有限公司	
版 次	2011 年 8 月第 1 版	
印 次	2011 年 8 月第 1 次	
开 本	787 mm×960 mm	1/16
印 张	5.5	
字 数	102 千字	

ISBN 978-7-81092 669 0

定价:10.00 元

本书如有印装质量问题,请与本社联系

前 言

遗传学是生物科学的核心领域,起着联系生物科学各分支学科的枢纽作用。遗传学历经了 100 多年的历史,相比于其他许多学科,仍然属于一门较年轻的学科。但是,自从它诞生,特别是分子遗传学诞生后,遗传学显示出愈来愈强大的活力,越来越重要的作用,新的理论、新的实验技术和方法不断涌现。20 世纪中后期,以遗传学理论为基础,结合微生物学、生物化学等学科的实验技术和方法派生出了许多交叉学科,如分子生物学、蛋白质组学、基因组学、生物克隆、生物芯片等等。进入 21 世纪后,后基因组计划试图解释所有生物 DNA 的序列和生物学功能,遗传学更是向人们展示出了诱人的前景和无穷的魅力。

作为一门学科,遗传学的诞生和发展依赖于两大基石,即理论与实验。相较于其他生物科学,虽然理论占有较大的比重,但实验的作用不可低估,更不可或缺。可以说遗传学的一大特点就是理论与实验并重。随着遗传学的发展而诞生的一些新型研究领域,如基因工程更是以实验为主。因此,在各高校的遗传学教学中,实验教学的比重越来越大,由过去的 20%~30% 上升到 30%~40%,有些学校甚至将遗传学实验作为单独一门课程开设。

由于社会和科学的发展,对学生提出了更全面的综合素质要求,特别是对学生的创新思维和创新能力的要求。综合型实验、设计型实验和探索性实验有利于学生综合运用所学理论知识,更有利于培养和提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力,以及创新意识和创新能力。为适应我国高校的教育理念更新、教学改革,编者编写了这本《遗传学实验指导》,适用于农林院校的农学、园艺、种子工程、植保、生物技术和生物工程等专业。实验项目包含有经典遗传学、细胞遗传学、数量遗传学和分子遗传学等内容;实验生物包括植物、果蝇和微生物等。全教材共编写了 21 个实验,任课教师可根据专业和学时灵活安排。由于编者知识水平的局限,难免出现错误和疏漏,敬请读者批评和指正。

编 者

2011 年 8 月

目 录

实验一	根类细胞有丝分裂制片与观察	1
实验二	减数分裂制片与观察	4
实验三	果蝇唾腺染色体的观察	10
实验四	果蝇性状观察	13
实验五	果蝇一二对因子分析	17
实验六	果蝇伴性遗传的分析	19
实验七	红色面包霉的基因分离和交换	23
实验八	植物多倍体诱导及细胞学鉴定	26
实验九	植物单倍体植株的诱导	28
实验十	作物雄性不育的鉴别	33
实验十一	大肠杆菌非中断杂交实验	36
实验十二	大肠杆菌普遍性转导	41
实验十三	大肠杆菌的转化实验	48
实验十四	荧光原位杂交实验	51
实验十五	植物基因组 DNA 的提取	55
实验十六	DNA 的酶切与连接	57
实验十七	聚合酶链式反应 (PCR)	61
实验十八	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	64
实验十九	植物总 RNA 的提取	67
实验二十	SSR 标记的检测	70
实验二十一	AFLP 标记的检测	74
	主要参考文献	79

实验一 根类细胞有丝分裂制片与观察

一、实验目的

细胞分裂是生物进行生长和繁殖的基础。高等生物的细胞分裂主要是以有丝分裂方式进行的。生物通过有丝分裂,不但增加细胞的数量、体积,维持个体的正常生长发育,而且保证子代和亲代遗传组成上的一致性,因而它对保证物种的稳定性和连续性有很重要的意义。本实验的目的是学习根尖压片的制作方法,观察有丝分裂过程中各个时期染色体的变化规律,以加深对有丝分裂的认识。

二、实验原理

在各种生长旺盛的植物组织包括孢原组织、根尖、茎尖等分生组织、愈伤组织、分化的小孢子以及萌发的花粉管等都进行着细胞有丝分裂。经过适当取材处理,加以固定、离析、染色、压片等步骤,可以迅速地将细胞分散附着于载片与盖片之间。经过药物或冰冻处理,阻止纺锤体形成,使细胞分裂停止在中期,同时还可使染色体缩短,便于观察研究。另外通过酸性水解处理除去细胞间果胶层,并使细胞壁软化,使细胞容易彼此散开,利于压片和染色。

细胞由第一次分裂结束到第二次分裂结束所经历的过程为一个细胞分裂周期,包括分裂间期和分裂期。分裂期又分为以下四个时期。

1. 前期

细胞核内的染色体呈细丝状,在核内互相缠绕成一团。核仁开始消失,核膜也随之破裂。由于间期的复制,此时染色体已由两条染色单体所组成。只在着丝点处连接。

2. 中期

各染色体的着丝点排列在赤道面上,各染色体的两臂伸向赤道面的两边。纺锤体完全形成,其一端与染色体的着丝点相连接,另一端则集中于极端。中期时染色体高度浓缩,具有各物种染色体的典型形态,因此中期是染色体计数的最好时期。

3. 后期

每一染色体的着丝点分裂,两个染色单体彼此分开成为两个子染色体,子染色体在纺锤丝的牵引和着丝点的导向下,分别移向两极。

4. 末期

移向两极的染色体,逐渐松散成染色质,纺锤丝消失,赤道面上出现细胞板,

把一个细胞分隔成两个子细胞。与此同时,核膜重新形成,核仁出现,逐渐进入间期状态。

三、实验材料、仪器与试剂

1. 材料

豌豆(蚕豆、大麦或大蒜)的根尖。

2. 仪器用具

恒温箱、水浴锅、镊子、刀片、瓷盘、纱布、吸水纸、载玻片、盖玻片。

3. 药品试剂

冰醋酸、95%乙醇、改良品红、1 mol/L 盐酸。

配制试剂

(1)卡诺固定液(现用现配):3份95%乙醇+1份冰醋酸。

(2)改良品红

原液 A:称取 3 g 碱性品红溶于 100 mL 70%乙醇中(此液可长期保存)。

原液 B:量取 10 mL 原液 A 加入到 90 mL 的石炭酸(酚)水溶液中,两周内使用。

染色液:取 55 mL 原液 B、6 mL 冰醋酸、6 mL 37%甲醛混合。

取染色液 2~10 mL,加入 90~98 mL 45%醋酸和 1.8 g 山梨醇,放置两周后使用。放置时间越长,染色效果越好。

四、实验方法及步骤

1. 发芽

取豌豆种子放入烧杯中用水浸泡,使之充分吸胀,放入铺有几层湿吸水纸的培养皿中,置于 20℃~25℃ 条件下培养,待根长到 1~2 cm 时(图 1-1),于上午 9~11 时剪下根,立即放入新配制的卡诺固定液中静置固定 24 h。

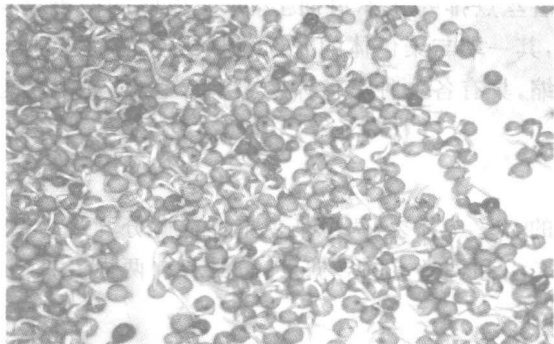


图 1-1 豌豆根尖

2. 保存

经 95% 乙醇、80% 乙醇过渡, 然后放在 70% 的酒精中保存于冰箱内备用。

3. 解离

将根尖移入 1 mol/L 盐酸中, 60°C 下离析 5~8 min。

4. 染色与压片

将解离好的根尖用清水冲洗几次, 洗去盐酸。将根尖放在干净的载玻片中间, 切下 2~3 mm 的根尖分生组织, 用吸水纸吸去水分, 滴一滴改良品红染液, 用镊子将根尖充分夹碎, 染色 10~15 min。取一干净盖玻片, 使其一边与染液接触, 用解剖针或镊子顶住盖玻片, 缓慢抽出解剖针或镊子, 使盖玻片缓缓盖下, 使染液从一边流到另一边布满整个盖玻片, 尽可能地不产生气泡。用带橡皮头的铅笔或镊子敲盖玻片, 尽可能地使植物组织均匀散开。盖玻片上覆吸水纸, 左手中指和食指压住盖玻片两边, 勿使盖玻片移动, 右手拇指垂直用力下压, 中心和四周均要压到, 将多余染液压出, 细胞分散开, 盖玻片紧贴在载玻片上。

5. 观察

在显微镜下检查上述制片, 先用低倍镜找到分裂相后转高倍镜, 可清楚观察到有丝分裂各时期的图像(图 1-2)。

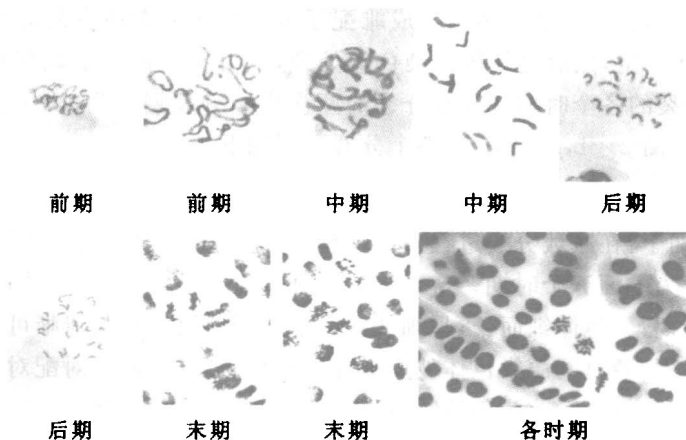


图 1-2 有丝分裂各时期的图像

五、作业及思考题

1. 绘出观察到的有丝分裂各时期的图像。
2. 在上述实验过程中, 固定、解离的作用是什么?
3. 在实验过程中主要应该注意哪些问题?

实验二 减数分裂制片与观察

一、实验目的

在生物的生活周期中,减数分裂是配子形成过程中的必要阶段,减数分裂的结果得到只有半数染色体的雌性细胞和雄性细胞(n),雌雄性细胞受精结合为合子,又恢复为全数的染色体($2n$),从而保证了亲代与子代间染色体数目的恒定性,也保证了物种相对的稳定性。由于各个子细胞之间在染色体组成上可能有多种多样的组合,以及同源染色体非姊妹染色单体之间的片段可能发生交换,因而为生物的变异提供了重要的物质基础,为人工选择提供了丰富的材料。通过实验,观察减数分裂过程中细胞变化的特点及染色体的变化规律,学习减数分裂的制片方法,以加深对减数分裂过程的认识和理解。

二、实验原理

4
高等生物雌雄性细胞的形成都是先由有性组织(如花药和胚珠、精巢和卵巢)中某些细胞分化为孢母细胞,即卵母细胞与精母细胞($2n$),经过减数分裂,产生4个子细胞(n)并进一步发育成雌配子或雄配子。在适宜的时期采集植物花蕾,经杀死固定,然后进行压片染色等处理,就可在显微镜下观察到小孢子母细胞减数分裂的各个时期。减数分裂的两次连续分裂划分为前、中、后、末四个连续的时期(图2-1,图2-2),整个分裂过程如下。

1. 减数第一次分裂

(1)前期I:在减数分裂过程中时间较长,其间染色体发生一系列的复杂变化。它又分为下面五个时期。

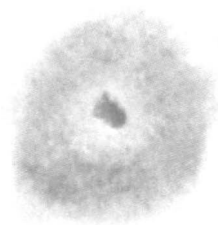
①细线期:染色体细而长,呈细线状盘绕成团,核仁、核膜清晰可见。

②偶线期:各对同源染色体彼此靠拢进行配对,这样的一对配对的同源染色体称为二价体。核仁、核膜仍清晰可见。

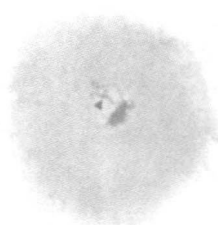
③粗线期:配对的染色体对开始缩短变粗。由于染色体在间期已经复制,所以这时每个染色体已含有两个染色单体,二价体已含有四条染色单体,其中的非姊妹染色单体之间可发生“交换”,但其交换行为不能在显微镜下观察到。核仁、核膜仍可观察到。

④双线期:二价体继续缩短变粗,同源染色体相互排斥,并开始彼此分开,但仍被几个交叉联结在一起,核仁、核膜仍可见到。

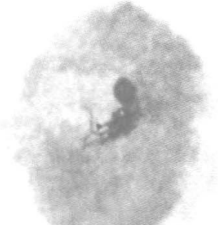
⑤终变期:染色体变得更加粗短,交叉端化、松解,核仁、核膜尚存模糊的痕迹。这时可以清楚地数出全部二价体数。终变期是鉴定染色体数目的最好时期之一。



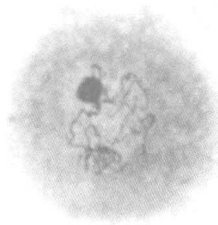
细线期



粗线期



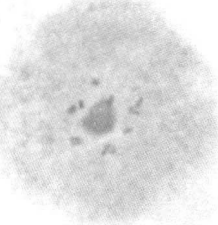
偶线期



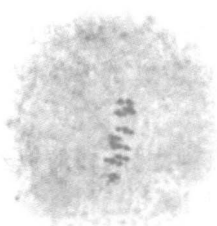
双前期



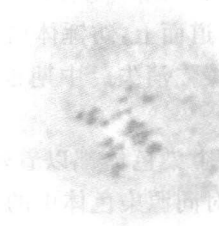
双前期



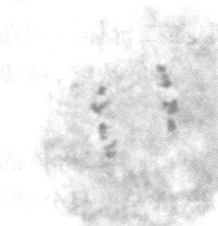
终变期



中期 I



后期 I



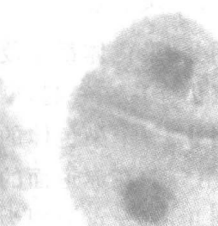
后期 I



末期 I



末期 I



二分体

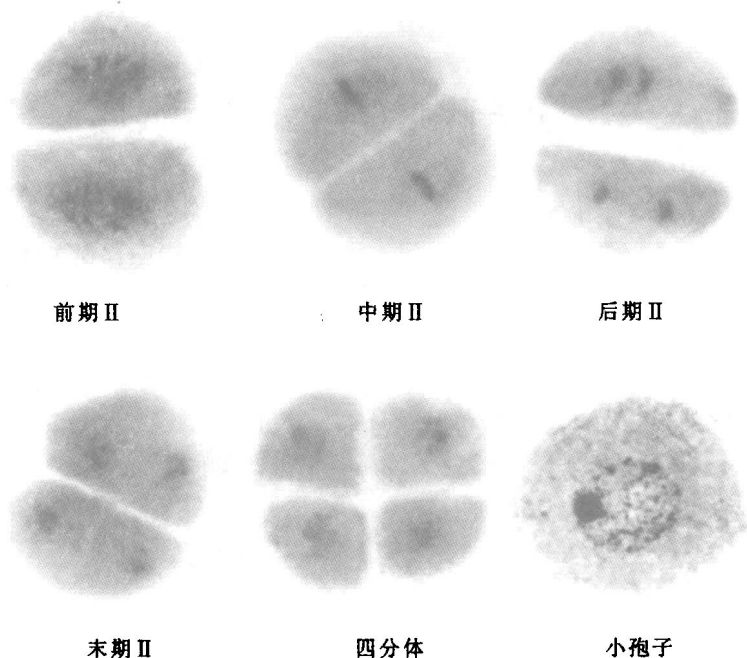


图 2-1 玉米减数分裂过程

(2)中期 I:二价体排列在赤道面上,纺锤体出现,纺锤丝与各染色体的着丝点连接,染色体高度浓缩,核膜、核仁消失。中期也是鉴定染色体数目的最好时期之一。

(3)后期 I:每个二价体的两个染色体都以着丝点为先导,在纺锤丝的牵引下向两极拉开,每一极只分到每对同源染色体中的一个。

(4)末期 I:染色体到达两极,松开变细,形成两个子核,进而进行胞质分裂成为两个子细胞。核膜、核仁重现。

2. 减数第二次分裂

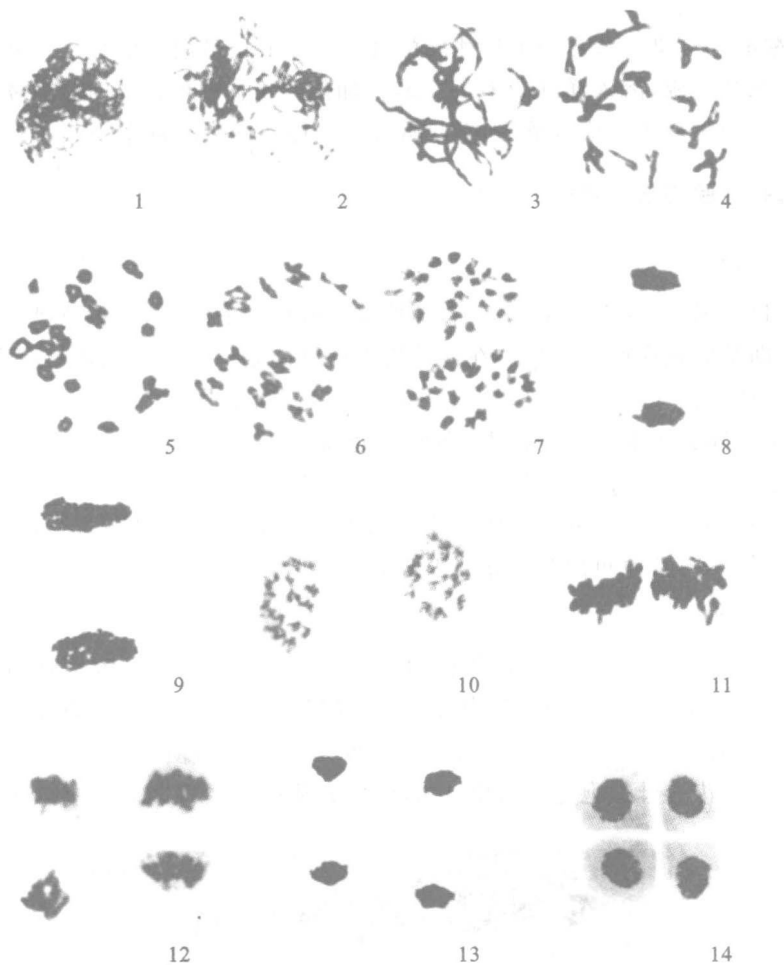
(1)前期 II:染色体都恢复了紧缩状态,但较为松散,每个染色体有两条染色单体,着丝点仍连接在一起,染色单体彼此散得很开。

(2)中期 II:每个染色体的着丝点整齐排列在各分裂细胞的赤道面上,染色体的两臂自由分散在赤道面的两侧。

(3)后期 II:着丝点分裂为二,每一染色体的两个染色单体这时已成为两个染色体,各个染色体由纺锤丝分别拉向两极。

(4)末期 II:染色体到达两极,逐渐聚集,进而进行胞质分裂。核仁、核膜重新出现。

这样经过两次分裂形成了四个子细胞,核内的染色体数为最初细胞染色体数目的一半。



1. 细线期 2. 偶线期 3. 粗线期 4. 双前期 5. 终变期 6. 中期Ⅰ 7. 后期Ⅰ
8. 末期Ⅰ 9. 分裂间期 10. 前期Ⅱ 11. 中期Ⅱ 12. 后期Ⅱ 13. 末期Ⅱ 14. 四分体

图 2-2 小麦减数分裂

三、实验材料、仪器与试剂

1. 材料

玉米、小麦或大葱等的花药。

2. 仪器用具

显微镜、解剖针、镊子、载片、盖片、酒精灯、吸水纸、纱布。

3. 药品试剂

卡诺固定液、无水乙醇。

配制试剂

醋酸洋红染色液：90 mL 冰醋酸加入 110 mL 蒸馏水配成 200 mL 45% 的醋酸，加热至沸，溶入洋红粉末 1.5 g，再加热 5 min 即可。这时悬一铁钉于染液中，过半分钟取出。染液静置 12 h 后过滤于棕色瓶内贮存备用。

四、实验方法及步骤

1. 取材

(1) 玉米：植株在大喇叭口期，即抽雄前两周左右，这时手握喇叭口下方有松软感，即是雄花序所在部位。在该处用刀片纵向划一切口取出数条花序分枝，如先端小穗颖长 3~4 mm，花药长 2 mm 左右，即可取样。于上午 7~9 时取出合适雄穗立即放入卡诺固定液中，在低温处固定 2~24 h，经 90% 乙醇、80% 乙醇各半小时，最后移入 70% 乙醇中放于冰箱内保存备用。

(2) 小麦：旗叶与下一片叶的叶耳相距 1~2 cm 时，为减数分裂期，此时取材较好。但不同品种间稍有差异。固定同上。

2. 染色

选取适当大小的小花（花药长约 2 mm 左右），用镊子和解剖针剥出 3 个花药（图 2-3），置于干净载玻片中央，吸去酒精，加一滴醋酸洋红染液（注意：染液不能滴的太多，以一滴为宜）。用解剖针或刀片将花药横向切断，用镊子反复挤压花药，使花粉母细胞完全溢出。去净残渣，眼睛可见之物均要去除干净。

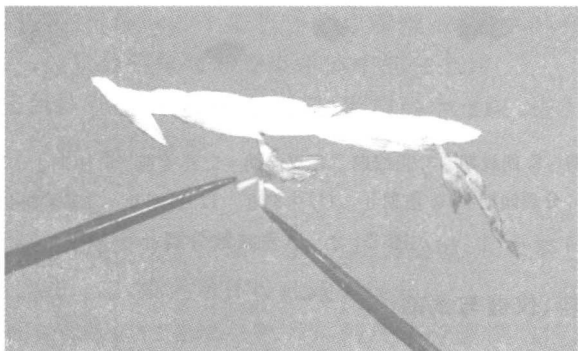


图 2-3 剥花药示意图

3. 压片

经过充分染色之后加盖玻片。在盖玻片上覆以吸水纸，用左手拇指和食指压其边缘，以右手拇指尽力垂直压片（注意：勿使盖玻片移动）。

4. 烤片

压片之后，在酒精灯上适当地微火烤片，可加深染色和透明作用。如果压片

后发现染色较浅,亦可在盖玻片的一边加些染液,静置染色,重复上述操作过程。如此反复进行,可达到理想的染色效果。

5. 观察

在显微镜下观察花粉母细胞减数分裂各时期的图像。

五、作业及思考题

1. 绘出所观察到的减数分裂各期图像。
2. 在形成生殖细胞的过程中,染色体数目是怎样减数的?
3. 减数分裂与有丝分裂的主要区别是什么?

实验三 果蝇唾腺染色体的观察

一、实验目的

学习果蝇幼虫唾腺的解剖方法和唾腺染色体的制片技术,加深对唾腺染色体形态、结构和功能的认识。

二、实验原理

果蝇唾腺染色体又叫巨大染色体,比其他体细胞染色体大 200 多倍。它的巨大性是由于染色体中的染色线连续复制,但细胞核本身不分裂而形成多线染色体的结果。果蝇幼虫唾腺细胞内,4 对染色体是分别同源联会着的,即“体细胞染色体联会”。第 I、II、III 对染色体都以中部着丝粒区聚集,各自的两条臂自然弯曲分散,而第 4 对染色体很小,呈颗粒状,它们都以着丝粒为联结点,构成染色中心。由于每条染色体的染色线在不同的区段螺旋化程度不一,因而出现一系列宽窄不同、染色深浅不一或明暗相间的横纹(图 3-1)。不同染色体的横纹数量、形状和排列顺序是恒定的。利用这些特征不仅可以鉴定不同的染色体,还可以结合遗传实验结果进行基因定位。此外,由于其体细胞同源染色体的配对,故易于进行染色体的缺失、重复、倒位和易位的细胞学观察和研究。



图 3-1 果蝇唾腺染色体图

三、实验材料、仪器与试剂

1. 材料

果蝇的三龄幼虫。

2. 仪器用具

灭菌锅、微波炉、显微镜、解剖针、镊子、盖玻片、载玻片、铅笔、吸水纸、纱布、药棉。

3. 药品试剂

改良品红、生理盐水(0.7%)。

四、实验方法及步骤

1. 拉出唾腺

在一载玻片上滴半滴生理盐水,用解剖针挑取三龄幼虫于生理盐水中,一手持镊子,一手持解剖针,用镊子夹住虫体中部稍后处,不使其移动,用解剖针按在头部黑点稍后处,轻缓地拉开头部,唾腺随之拉出(图3-2)。这时可看到一对透明而微白的长形小囊即唾腺(图3-3),常在一侧附一条白色脂肪。如未拉出,可用解剖针轻压虫体中上部,将唾腺压出。

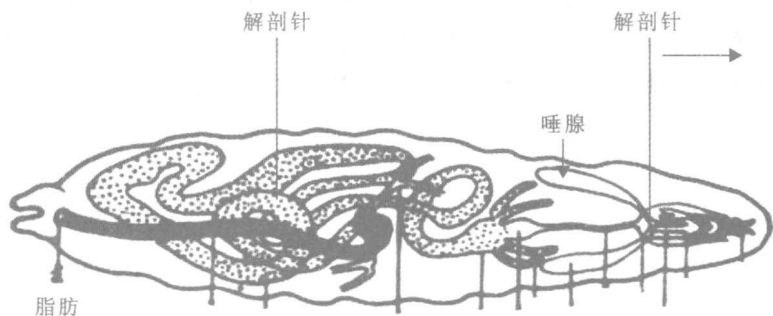


图3-2 剖取果蝇幼虫唾腺的方法

2. 显微镜检查(低倍)

除去杂物,置于低倍显微镜下检查,唾腺为一对透明的长形囊状物,中间有一细丝相连,腺体由两层细胞构成,在显微镜下清晰可见为数不多的较大的腺体细胞。可用解剖针在显微镜下小心去除脂肪。

3. 染色压片

用吸水纸吸去生理盐水(勿使唾腺黏附到吸水纸上),加一滴改良品红染液染色20~25 min,再置于低倍镜下检查,可见腺体细胞核中清晰的染色体,即可