

遗传学实验

黎杰强 伍育源 朱碧岩 / 编著

YICHUANXUE
SHIYAN

 湖南科学技术出版社

遗传学实验

黎杰强 伍育源 朱碧岩 / 编著

YICHUANXUE
SHIYAN

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验 / 黎杰强, 伍育源, 朱碧岩编著. — 长沙:
湖南科学技术出版社, 2006.9
ISBN 7-5357-4719-1

I. 遗… II. ①黎…②伍…③朱… III. 遗传学
- 实验 - 高等学校 - 教材 IV. Q3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 113463 号

遗传学实验

编 著: 黎杰强 伍育源 朱碧岩

责任编辑: 刘堤地

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 276 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系: 本社直销科 0731-4375808

印 刷: 长沙东一印务有限公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 东屯渡新桥村

邮 编: 410001

出版日期: 2006 年 9 月第 1 版第 1 次

开 本: 787×1092mm 1/16

印 张: 9

字 数: 157000

书 号: ISBN 7-5357-4719-11Q·75

定 价: 18.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

普通遗传学实验是高等院校配合遗传学理论教学而设置的一门基础性实验课程。通过遗传实验的教学实践,能够使同学们对遗传学的基本理论和概念有更加深刻的认识,激发同学们探索生命遗传规律的浓厚兴趣。更为重要的是,通过实验可以培养和提高同学们观察问题、分析问题和解决问题的能力,锻炼同学们的实际操作能力。

编者根据国家教育部教学大纲和课程设置的要求,在总结多年教学科研成果,广泛汲取兄弟院校遗传学实验教学的宝贵经验,并在参阅有关文献资料的基础上,编写了本书。

本书共分为两部分。第一部分为基础实验,内容包括植物染色体常规压片技术及核型分析、减数分裂染色体制片观察、人类染色体制片分析、姊妹染色体分析、显微摄影技术、果蝇杂交试验、X小体、Y小体检测等,共有18个实验。第二部分为综合实验,共有7个实验。学生完成基础实验后,在老师的指导下,以小组为单位,由学生选题,查阅资料,确定研究方案,独立完成相关实验,写出规范性实验报告。通过专业技术训练,目的是初步培养学生科学研究能力,为开展科学研究和完成毕业论文打下基础。

本书的大部分图片为本实验室人员在遗传学研究和实验教学过程中所拍摄和制作。遗传学实验的教学能得到不断完善与提高,倾注了许多教师和工作人员的汗水和心血。本书由黎杰强、伍育源、朱碧岩合编,黎杰强负责统编。高峰教授、李玲教授对本书提出了很多宝贵的意见,何风华副教授、张德明高级实验师也给予很大的支持帮助,在此我们谨表谢意!

本书可作为师范院校和综合性大学相关专业的实验课教材使用。鉴于知识和能力所限,教材之中缺点与错误难免,恳请各位同仁予以批评指正。

作 者

2006年6月于华南师范大学

目 录

实验须知·····	(1)
-----------	-----

实验报告的书写·····	(2)
--------------	-----

基础实验

实验一 植物染色体常规压片技术及核型分析·····	(7)
实验二 动物精母细胞减数分裂染色体制片与观察 ·····	(16)
实验三 果蝇的饲养管理和性状观察 ·····	(20)
实验四 果蝇唾腺染色体标本的制作和观察 ·····	(26)
实验五 摇蚊多线染色体的制片和观察 ·····	(30)
实验六 果蝇的杂交试验 ·····	(34)
实验七 人类 X 小体、Y 小体检测 ·····	(38)
实验八 粗糙链孢霉的分离和交换 ·····	(41)
实验九 骨髓细胞染色体制片与观察 ·····	(46)
实验十 去壁低渗法制备植物染色体标本 ·····	(50)
实验十一 植物多倍体诱发和鉴定 ·····	(55)
实验十二 辐射对植物的作用——苗期及染色体观察 ·····	(58)
实验十三 显微摄影技术 ·····	(61)
实验十四 高等植物核 DNA 的提取和纯化 ·····	(68)
实验十五 人的外周血培养制备染色体标本 ·····	(71)
实验十六 姊妹染色单体色差方法 ·····	(77)
实验十七 人类染色体分化染色技术 ·····	(82)
实验十八 荧光原位杂交实验 ·····	(88)

综合实验

实验十九 同工酶遗传标记分析 ·····	(99)
----------------------	------

实验二十 利用微核技术检测环境污染·····	(105)
实验二十一 动植物染色体核型分析·····	(107)
实验二十二 植物染色体结构与 Giemsa 分带技术 ·····	(108)
实验二十三 利用彗星分析核损伤·····	(116)
实验二十四 果蝇寿命的影响因素探讨·····	(120)
实验二十五 花粉培养诱导单倍体植株·····	(122)
附录 1 实验室常用药剂的配制 ·····	(125)
附录 2 不同的 χ^2 值及自由度时的 P 值表 ·····	(130)
附录 3 花药常用培养基的配方及配制 ·····	(132)
参考文献·····	(134)

实验须知

1. 遵守实验室规则。
2. 实验时不准迟到、早退或无故缺席，有病或有事需向任课教师请假。
3. 带齐实验用品，提前 5 min 进入实验室，进入实验室后应保持安静。
4. 要爱护仪器、设备，使用仪器要小心，严格遵守操作规程，如有损坏应主动向老师报告，按规定处理。
5. 使用贵重仪器设备，一定要在任课教师的指导下操作，使用完毕，要进行登记。
6. 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂及传染性强的物品时，应严格操作，注意自我保护。如发生意外应立即报告任课老师，及时处理。
7. 实验完成后，及时处理实验材料和清洁实验用具（特别注意将显微镜擦拭干净），并将仪器设备、用具等放归原处。
8. 值日生负责清扫室内卫生，检查水电，关好门窗，经任课教师检查后，方可离开实验室。
9. 实验报告应在老师指定的时间内完成。

实验报告的书写

实验报告是对实验观察、比较和结果的真实记载，是科学的记录。实验报告可以根据实验内容的不同而分为文字描述、绘图和列表 3 种形式。

1. 文字描述

文字描述是将观察所得的实验结果客观地加以描述，有时还需要作进一步分析。在此过程中，要求抓住主要问题，描述准确，条理清楚，文字简明。

2. 绘图

生物绘图是形象地描绘生物体的外形与结构的一种重要的科学记录方法。其原则是要求对所描绘的对象做深入细致的观察，从科学的角度充分了解其有关形态结构特征，在此基础上，准确、严谨地绘制。所绘图形要具有真实性，并且简要清晰。

(1) 绘图的主要工具 HB 及 2H (或 3H) 铅笔、橡皮、直尺、绘图纸和削笔刀。

(2) 绘图的基本要求

①准确、典型，符合科学性。画面要如实、准确反映所观察的标本各部分结构的层次、形状、大小、长短和比例等，不可抄袭教材或他人的图。

②应用“点”和“线”的技巧，精细描绘。点组成的画面要整齐、干净、朴素，力求达到准确、美观。

(3) 绘图步骤

①合理布局。图的位置一般偏于纸的左侧，右侧作引线及注字。

②起稿和修正。先用软铅笔 (HB) 将观察标本轮廓主要部分轻轻绘出，然后添加各部分详细结构，再加以修改，最后用尖的硬铅笔 (2H) 以清晰、流畅的笔画绘出全图。

③绘黑点。用不同疏密但大小均匀的黑点表示各部分结构的深浅和明暗。

④引线及注字。绘图纸上所有文字必须用硬铅笔以楷书写出，不可潦草。注字引线应水平伸出，各引线不交叉。图序和图题应写在图的下面。

3. 制图

实验报告中用图形可以表达信息，图形有多种，如曲线图、柱形图、三维

图、扇形图等。图表经常表明两种变量 (x 和 y) 之间的关系, 两个数轴是相互垂直的。横轴为横坐标 (x 轴), 纵轴为纵坐标 (y)。通常, x 轴表示自变量 (如某实验处理), y 轴表示因变量 (如生物效应)。每个数轴都要有说明性的标注及合适的测量单位。每个数轴都要有刻度和参照标记。

4. 制表

表格通常是简洁、准确、有条理地表示数值型数据的合适方式, 它能有效地压缩和展示实验结果, 并有助于详尽地对数据进行比较。表格包括的内容如下:

(1) 标题 必要时写上参考标注和日期。

(2) 行和列的表头 附上合适的测量单位; 将相关数据或特性按类别垂直列出, 用行展示不同的实验处理、生物类型等; 对照值常放在表格的开头, 相互比较的列要靠在一起。

(3) 数据值 引用有意义的有效数据, 根据需要列出统计参数。

(4) 脚注 解释缩写符号、修饰符号及单个细节。

基础实验

实验一

植物染色体常规压片技术及核型分析

一、实验目的

学习和掌握植物材料的常规压片技术；观察有丝分裂过程中染色体的形态特征和动态变化，掌握核型分析的原理和方法。

二、实验原理

生命的一个基本特征是具有自我复制能力。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，经过有丝分裂使细胞不断增殖并经过一系列复杂的分化过程形成新一代个体。有丝分裂是细胞增殖的主要方式，在有丝分裂过程中，细胞核内染色体能准确地复制，并能有规律地均匀分配到两个细胞中，使子细胞的遗传组成与母细胞完全一致。对于多细胞生物体来说，无论是体细胞还是生殖细胞一般都是通过有丝分裂实现细胞增殖的，而生殖细胞在形成配子时才经历了减数分裂的细胞分裂形式。

一般来说，只要是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（根尖和茎尖）、居间分生组织（禾本科植物的幼茎及叶壳）、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。只要我们适时取材，并加以固定、解离、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。这是细胞遗传学中最为基础和常用的方法，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。

1. 核型的概念

核型（karyotype）是指细胞核内染色体群的形态而言，是一个物种的体细胞内染色体数目、形态、着丝点位置、长度、臂比和随体等情况的总和。因此可以用核型代表生物的不同类型和特征。核型研究的新趋势是研究染色体形态、结构和功能的关系。除了观察在有丝分裂中期染色体的数目、形态、各染色体间的差异、着丝点的位置、随体的大小及数目外，还注意到染色体的结构、带型及间期染色质的形态差异等。

2. 核型分析的内容

(1) 染色体数目 通常统计根尖、茎尖等体细胞的染色体数目。

(2) 染色体形态 观察染色体的长度、着丝粒及次缢痕的位置、随体的形态等。

长度测定：染色体通常为棒状，其长度大小可用绝对长度和相对长度来度量。

绝对长度指在显微镜下用测微尺直接测量到的从染色体的一端到另一端的线性长度，通常以微米(μm)表示。染色体的绝对长度常因分裂期的差异、前处理方法的不同而有所变化，因此绝对长度的数据也只有相对意义。

相对长度是每条染色体的绝对长度与正常细胞全部染色体总长度的比值，通常用百分比(%)表示。染色体的长度常常以相对长度表示。

着丝粒的位置：一般来说，每条染色体着丝粒的位置是恒定的。染色体的两臂常在着丝粒处呈不同程度的弯曲。着丝粒位置的测定常用 Evans 提出的方法即以染色体的长臂(P)和短臂(Q)的比值来表示。

3. 核型表示法

核型以 K 表示。

染色体长度可分为长(L)、中(M)和短(S)三类。

若不能明显分为三类，可以按长短顺序依次排列为 A、B、C、D、E…来表示。

着丝点(kinetochores)的位置以 M、m、sm、st、t 表示。

随体(satellite)以 Sat 表示。

异染色质(heterochromatin)以 H 表示。

次缢痕(secondary constriction)以 Sc 表示。

易位(translocation)以 V 表示。

三、实验材料

洋葱(*Allium cepa*)及蚕豆(*Vicia faba*)等。

四、实验用具及药品

1. 用具

显微镜、测微尺、培养皿、恒温水浴锅、温度计、烧杯、量筒、染色缸、剪刀、镊子、刀片、载玻片、盖玻片、酒精灯等。

2. 药品

无水乙醇、70%乙醇、冰醋酸、饱和对二氯苯水溶液、0.1%秋水仙碱、

1 mol/L HCl。

五、实验步骤

1. 材料培养

(1) 洋葱培养 把洋葱置于盛有清水的小烧杯口上,使生根部位与水接触,25℃~28℃条件下培养,根长1~1.5 cm时,于上午8时~9时把根尖约0.5 cm剪下备用。

(2) 蚕豆培养 把干燥的蚕豆种子置水中浸泡12 h,种子吸水膨胀后转到铺有几层吸水纸的培养皿或瓷盘中,上盖双层湿纱布并加少许水,25℃~28℃条件下培养,待根长1~1.5 cm时,于上午9时~10时或下午3时~6时剪下根尖备用。

2. 预处理

在正常情况下固定的材料中,由于细胞分裂中期持续的时间很短,一般只有10~30 min,中期分裂象较少,而且即便是处在分裂中期的细胞,由于染色体紧密排列在赤道面上,因此在制片过程中很难将染色体分散开来,这样也就不能准确地进行染色体的计数和形态观察。为了克服这一困难,一般采用化学或物理的方法对材料进行预处理。经过预处理可以阻碍细胞分裂中纺锤体的形成,但并不影响分裂前期细胞的正常分裂,因此使细胞分裂停止于中期。这样便可以获得较多的中期分裂象,同时预处理可改变细胞质的黏度,使染色体缩短,易于分散。

(1) 预处理常用药物

①秋水仙碱(colchicine):分子式为 $C_{22}H_{25}NO_6$,商品秋水仙碱为淡黄色粉末。熔点为155℃。易溶于冷水、乙醇、氯仿和甲醛,但在热水中溶解度较低,不易溶于苯和乙醚。一般认为秋水仙碱对纺锤丝有麻痹和毒害作用,也有人认为秋水仙碱通过抑制ATP的机制从而破坏纺锤丝的形成及活动。秋水仙碱水溶液的作用效果与其浓度成正比,浓度越高,作用效果越强。通常用0.05%~0.2%的秋水仙碱溶液处理2~4 h。

秋水仙碱毒性极强,可以导致眼睛暂时失明和使中枢神经系统麻痹而导致呼吸困难。在使用过程中要特别注意自身安全。

②饱和对二氯苯(*p*-Dichlorobenzene):分子式为 $C_6H_4Cl_2$,无色结晶,具有特殊的臭味,常温下可升华。易溶于乙醇、乙醚、苯等有机溶剂,难溶于水,易燃而且有毒。由于对二氯苯难溶于水,所以一般用它的饱和水溶液,它的作用效果与秋水仙碱相似,但价格却低得多,便于广泛使用。室温下处理3~5 h,此法特别适于染色体小而多的植物。

③8-羟基喹啉 (8-Hydroxyquinolin): 分子式为 C_9H_7NO , 为白色结晶或粉末, 溶于乙醇而难溶于水。8-羟基喹啉的作用机制, 一般认为它首先引起细胞质黏度的改变, 结果导致纺锤体的活动受阻。所用浓度范围为 $0.002 \sim 0.004 \text{ mol/L}$, 特别适合用于具有较大染色体的植物。用它处理的优点是, 染色体的缢痕区比较清晰。

④ α -溴萘 (α -bromonaphthalene): 分子式为 $C_{10}H_7Br$, 是一种无色或淡黄色的液体。易溶于乙醇和苯, 微溶于水。在使用时, 可以将 1 滴 α -溴萘加入到 100 mL 蒸馏水中配成饱和水溶液使用。但注意随配随用, 新配制的药液效果较好。 α -溴萘特别适合于禾本科和水生植物的预处理, 如将小麦的非离体根浸入到 α -溴萘的饱和水溶液中培养 12 h, 可以得到大量的分裂中期的染色体。

(2) 药物预处理方法

①离体处理: 将植物的根或茎等组织从植株上切下来, 然后直接放到预处理液中进行处理。

②非离体处理: 将植物的种子萌发后, 把带根的种子一起放到预处理液中进行处理。

(3) 低温预处理方法

低温处理可以引起染色体的缩短并可获得较多的中期分裂象, 而且此法无须使用任何药物, 安全性高。但不同的植物所需的预处理温度是有差异的, 如小麦的预处理温度为 $1^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$, 水稻和玉米则需 $6^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$, 剪下的根尖置于盛有蒸馏水的烧杯内, 放入冰箱中低温预处理 $20 \sim 40 \text{ h}$ 。

3. 固定

固定的目的是迅速将组织和细胞杀死, 并使细胞结构尽可能保持生活时的状态。将预处理后的材料水洗 2~3 次, 移入卡诺氏固定液 (乙醇 3 份, 冰醋酸 1 份) 中, $4^\circ\text{C} \sim 15^\circ\text{C}$ 条件下固定 $20 \sim 24 \text{ h}$, 用 70% 乙醇冲洗 2 次后转入 70% 乙醇中置 4°C 冰箱中保存待用。

4. 解离

可除去细胞间的果胶质, 使细胞壁软化或部分分解, 从而使细胞和染色体易于分散。

(1) 酸解 将从固定液或 70% 乙醇中取出的根尖用蒸馏水漂洗后置入 60°C 恒温水浴锅中预热的 1 mol/L HCl 中, 解离 $8 \sim 10 \text{ min}$ 然后用蒸馏水冲洗 2~3 次。在酸解过程中一定要掌握好温度和时间, 若解离不够, 则压片不易分散。若解离时间过长, 在下一步处理时由于材料过软而易将根尖丢失。

(2) 酶解 将从固定液中或 70% 乙醇中取出的根尖置于 0.1 mol/L 醋酸

钠配制的 2.5% 的纤维素酶和果胶酶等量混合液中, 25℃~28℃ 条件下处理 4~5 h, 然后吸掉酶液, 加入 0.1 mol/L 醋酸钠, 使酶液逐渐渗出, 再转入 45% 醋酸中。

5. 染色

(1) 常用染色剂 醋酸洋红、改良品红、结晶紫、Schiff 试剂、铁矾-苏木精。

(2) 染色操作

①醋酸洋红和改良品红的染色: 两种染色的方法基本相同, 固定后的材料经解离后用蒸馏水洗过后, 将材料置于载玻片上, 去除根冠和伸长区仅留分生区部分。加 1 滴染液, 染色约 10 min。注意用醋酸洋红染色时, 在酒精灯上稍加热(勿煮沸)可使材料更易软化和着色, 并破坏部分细胞质使染色背景清晰。

②Schiff 试剂染色 (Feulgen Reaction): 固定的材料用蒸馏水洗 2~3 遍, 然后将材料放入已预热至 60℃ 的 1 mol/L HCl 中保温 10 min 左右, 用蒸馏水洗几遍, 把材料转入 Schiff 试剂中, 在黑暗条件下染色 0.5~1 h, 染色结束后将材料转到漂洗液中。

③铁矾-苏木精染色: 适用于大多数植物材料, 可使染色体染上很深的颜色, 分色清晰。将固定好的材料用蒸馏水洗净, 转入到 40.0 g/L 的铁矾水溶液在 30℃ 下保温 2 h, 然后换蒸馏水洗 4~5 次, 每次 5 min, 将铁矾充分洗净。最后用 5.0 g/L 的苏木精水溶液染色 2~4 h 或更长时间。如果在染色时发现染色浑浊, 则说明铁矾没有洗净, 需重新换水洗涤后再进行染色。染色结束后, 用水将材料洗 5~10 min, 再用体积分数 45% 的醋酸分色并软化至合适, 然后进行压片。

(3) 操作要点 媒染一定要充分, 最好使用新配制的媒染溶液。媒染后的水洗要充分, 洗不足时影响染色效果, 并会在组织内外产生大量沉淀, 制成的片子污浊。分色和软化是此法的关键步骤, 因为用此法染色不仅染色体被染成深黑色, 细胞质和细胞壁也有不同程度的着色, 这需要在体积分数 45% 的醋酸中进行分色和软化, 使得染色体呈现黑色而其他部位的颜色大都褪掉, 这一分色时间的长短在不同材料中是有差异的, 从几分钟到几小时, 在实验中要不断镜检来作出判断。

6. 压片

取一染色的根尖置于载玻片中央, 用吸水纸吸去多余的溶液, 加 1 滴新鲜的染料, 盖上盖玻片, 并在盖玻片上盖上一些吸水纸, 左手固定载玻片, 右手拇指在吸水纸上对根尖施压, 或用铅笔的橡皮头轻敲盖玻片, 使材料尽量