

发育生物学



实验

验

EXPERIMENTS IN
DEVELOPMENTAL BIOLOGY



主 编 李巧峡

副主编 李建真



甘肃文化出版社

Q111-33
2014/

发育生物学



实

验

EXPERIMENTS IN
DEVELOPMENTAL BIOLOGY



主 编 李巧峡

副主编 李建真



甘肃文化出版社

图书在版编目(CIP)数据

发育生物学实验/李巧峡主编. --兰州:甘肃文化出版社,2013.8

ISBN 978-7-5490-0475-1

I. ①发… II. ①李… III. ①发育生物学—实验—教材 IV. ①Q111-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 214584 号

发育生物学实验

李巧峡 主编

责任编辑: 原彦平 张莎莎

装帧设计: 史春燕

出版: 甘肃文化出版社

地址: 兰州市城关区曹家巷 1 号

邮编: 730030

营销: 甘肃文化出版社发行部(0931)8454870

排版: 甘肃文化出版社排版室

印刷: 兰州万易印务有限责任公司

地址: 兰州市城关区玉垒关 23 号

邮编: 730010

开本: 787 毫米×1092 毫米 1/16

字数: 200 千

印张: 12.5

版次: 2013 年 9 月第 1 版

印次: 2013 年 9 月第 1 次

书号: ISBN 978-7-5490-0475-1

定价: 26.00 元

本书如存在印装质量问题, 请与印厂联系调换

版权所有 违者必究

《发育生物学实验》 编写人员

主 编：李巧峡

副主编：李建真

编著人员：（按姓氏汉语拼音顺序排序）

丁文龙（汕头市上头澄海苏北中学）

李 凯（上海生命科学院神经所）

李建真（西北师范大学）

李巧峡（西北师范大学）

梁桂霞（西北师范大学）

王芳春（西北师范大学）

前 言

发育生物学是在动物胚胎学的基础上发展起来的一门学科，它与形态解剖学、细胞生物学、生物化学、分子生物学和分子遗传学等学科之间具有很强的依存性和相融性，在学生的知识结构体系中占有重要的地位。其实验教学不仅能够加深学生对课堂理论知识的理解和记忆，而且可以培养学生的观察能力、实践动手能力、分析问题与解决问题的能力以及科研创新能力，在发育生物学的整个教学环节中起着举足轻重的作用。

本实验材料是编者在本校以往自编教材的基础上，参考近年来国内外发育生物学的进展重新编写而成。教材第一部分根据进化顺序列写了多个动物(线虫、文昌鱼、斑马鱼、花背蟾蜍、鸡与大白鼠)的发育模式与发育机制，涵盖了部分经典的发育生物学实验，如形态学观察，用活的胚胎来观察发育过程并以切片观察为补充，从而使学生在胚胎早期发育中建立起局部与整体、平面与立体、静止与发展的观念。另外通过显微注射、细胞核移植、免疫组织化学、western-blot、目的基因的PCR扩增、原位杂交等来探讨动物机体及细胞发育的机制。每一个实验均列举了具体的实验方法，实验可操作性强。各个学校可以根据自身的实际情况选择适合自己的动物材料。同时，教材中第二部分介绍了模式植物拟南芥花的发育，通过花的诱导、花器官发生、雌雄配子体的发育、花粉管的萌发、花发育过程中多糖与蛋白质的分布与含量变化、花发育过程中一些激素、蛋白质及核酸的定位与检测以及一些基因的表达等相关技术手段，来探讨植物花发育的机制。拟南芥容易培养，生长周期短，学术界对相关问题的研究也较深入，学生可以通过拟南芥花这一模式材料系统掌握植物发育生物学实验的方法与思路，实验较易开展。

本实验教材编写人员所在的西北师范大学生命科学学院的前辈学者在长期的动物胚胎学和发育生物学的教学、科研工作中积累了丰富的经验，为本教材的编写奠定了理论与实践基础，提供了丰富的实验素材，在此表示衷心



感谢!

本书由李巧峡统筹组织和审定,由编写成员通力合作而成。本书编写过程中得到西北师范大学教学研究项目基金资助,谨致谢忱。

由于编者水平有限和编写时间紧迫,疏漏及不妥之处在所难免,恳请各位读者给予批评指正。

编者

2013年3月

目 录

第一篇 动物发育实验

第一章 动物生殖细胞的发生过程与受精过程 / 3

实验一 生殖细胞的发生过程及成熟精子的形态观察 / 3

实验二 动物受精过程的细胞学观察 / 9

第二章 线虫的发育实验 / 16

实验三 秀丽隐杆线虫的胚胎后发育 / 16

实验四 秀丽隐杆线虫显微注射技术 / 19

第三章 文昌鱼的发育实验 / 23

实验五 文昌鱼的胚胎发育 / 23

第四章 硬骨鱼的发育实验 / 26

实验六 斑马鱼的饲养 / 26

实验七 斑马鱼的繁殖 / 30

实验八 斑马鱼的胚胎发育 / 33

实验九 斑马鱼总 RNA 的提取及 cDNA 的制备 / 41

实验十 斑马鱼目的基因的 PCR 扩增 / 45

实验十一 斑马鱼 RNA 整体原位杂交 / 51

实验十二 斑马鱼胚胎组织切片的制备 / 55

实验十三 斑马鱼软骨及骨双染色 / 57

实验十四 斑马鱼胚胎显微注射 / 60

实验十五 斑马鱼卵母细胞发育观察 / 62

实验十六 斑马鱼卵母细胞的体外成熟观察 / 65

实验十七 斑马鱼视网膜的形态发生过程 / 68

实验十八 利用免疫组织化学定位斑马鱼视觉系统内、中高分子量神经丝蛋白 / 73

实验十九 利用 Western blot 技术分析斑马鱼视神经再生过程中 RT97 识别的神经丝蛋白在视觉系统内的表达 / 80

第五章 两栖类的发育实验 / 88

实验二十 花背蟾蜍的人工催产及人工受精 / 88

实验二十一 花背蟾蜍人工孤雌生殖 / 91

实验二十二 花背蟾蜍早期发育 (一) / 93

实验二十三 花背蟾蜍早期发育 (二) / 97

实验二十四 花背蟾蜍细胞核移植技术演示 / 100

第六章 鸟类的发育实验 / 103

实验二十五 鸡胚的孵化及活体观察 / 103

实验二十六 鸡胚的永久性整体装片与观察 / 106

第七章 哺乳类的发育实验 / 110

实验二十七 小白鼠受精卵及早期胚胎发育的观察 / 110

实验二十八 大鼠海马神经元分离培养 / 113

实验二十九 蛋白 b-catenin 对大鼠神经元发育影响 / 116

第二篇 植物发育实验

第八章 植物花发育的生理学实验 / 121

实验三十 光周期与赤霉素对拟南芥的开花诱导 / 121

第九章 植物花发育的组织学实验 / 123

实验三十一 拟南芥花器官的发生 / 123

实验三十二 拟南芥花发育过程中多糖与蛋白质在花芽中的分布 / 129

实验三十三 拟南芥雌雄配子体的发育 / 132

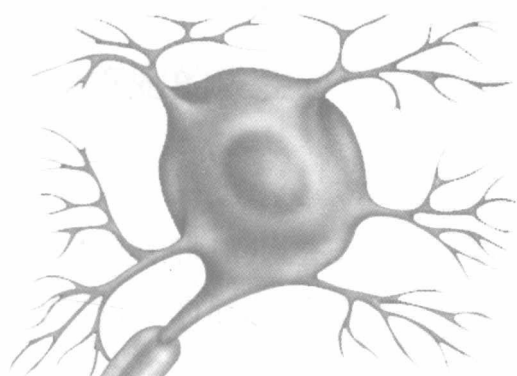
实验三十四 拟南芥花粉管的萌发 / 135

第十章 植物花发育过程中激素、蛋白质及核酸的定位与检测 / 138

- 实验三十五 利用 LC-ESI-MS 方法测定拟南芥花发育过程中赤霉素的含量 / 138
- 实验三十六 拟南芥花发育过程中激素的免疫组化研究 / 142
- 实验三十七 利用 western-blot 技术分析拟南芥花发育中蛋白的表达 / 147
- 实验三十八 半定量 RT-PCR 技术分析拟南芥花发育中基因的表达 / 151
- 实验三十九 实时荧光定量 PCR 技术分析拟南芥花发育中基因的表达 / 158
- 实验四十 RNA 原位杂交技术分析拟南芥花发育中基因的表达与定位 / 161

附 录 常用试剂配制

- 附录 1 缓冲液的配制 / 170
- 附录 2 常用固定液的配制 / 178
- 附录 3 常用生理盐水的配制 / 184
- 附录 4 常用粘片剂的配制 / 185
- 附录 5 常用染料的配制 / 186
- 附录 6 常用显色液的配制 / 189
- 附录 7 常用封片剂的配制 / 190



动物发育实验

第一章 动物生殖细胞的发生过程与受精过程

实验一 生殖细胞的发生过程及 成熟精子的形态观察

【实验目的】

- 1.掌握精巢与卵巢的切片制作过程。
- 2.通过切片及活体观察，理解精子和卵子的发生过程，加深对成熟精子形态的认识。

【实验原理】

卵子发生是在卵巢内进行的，以哺乳动物为例：在性成熟以前，卵巢内有相当数量的卵原细胞，经增殖分裂后数量更多。随着动物性成熟的过程，卵原细胞开始进入生长期即初级卵母细胞。最初，卵母细胞较大，周围为一层扁平的滤泡细胞包围，称为初级滤泡；随着滤泡细胞层数的增多，称为生长滤泡；随着滤泡细胞之间的小腔逐渐汇成一个大腔（滤泡腔），与此同时，初级卵母细胞日趋成熟，积累了各种营养物质，并渐向滤泡腔（充满蛋白质、激素、cAMP 和及其他分子的混合物）突出，形成卵丘，此即称为次级滤泡或成熟滤泡。然后初级卵母细胞在激素或神经的诱导下从卵巢中排除，并在体腔中完成第一次减数分裂，成为次级卵母细胞。遗留的滤泡细胞发育为黄体（后由卵泡迅速转变成的富有血管的腺体样结构），如卵子不能受精，黄体仅维持二周即萎缩，被结缔组织结疤所代替，形成白体。若卵子受精成功并开始妊娠，黄体继续增长，至妊娠 2~3 月后慢慢萎缩。

精子形成于精巢，哺乳动物成熟的精子储存于附睾中，取其活体状态下附睾内精液，借助显微镜，即可观察到活体的精子形态。精巢是一结构复杂的器官，在脊椎动物主要由曲细精管和小的导管所构成，曲细精管是由各个时期的生殖细胞和支持细胞所组成。在高等动物雄性动物性成熟时，由精原



细胞产生精子，但精巢内的精原细胞并不是在同一时间突然发育成精子，而是每隔一段时间有周期地有一部分精原细胞发育成为成熟的精子。因此，在同一时间内，在曲细精管的不同部位，即由基膜向管腔排列依次为不同发育时期的精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和分化中的精子。

【实验用品】

1.材料

小鼠或家兔的精巢、附睾及家兔卵巢

2.器材：解剖器具，载片，盖玻片，吸水纸，酒精灯，染缸，包埋纸盒，手摇切片机，组织包埋机，普通光学显微镜。

3.试剂：酒精，二甲苯，石蜡。

卡诺氏固定液：95% 酒精:冰醋酸=3:1。

1mol/L 盐酸溶液：取 82.5 mL 密度 1.19 g/mL 的浓盐酸加蒸馏水至 1000 mL。

希夫试剂 (Schiff 试剂)：称取 1 g 碱性品红置于 200 ml 煮沸的重蒸馏水中，5 分钟后使其冷却至 55~50℃，过滤到一个棕色的试剂瓶中，加入 1mol/L HCl 20 ml，继续冷却至 25℃，加入 1 g 偏亚硫酸氢钠，摇动瓶子使其溶解。密闭瓶口，置黑暗低温处或冰箱内（4℃左右），18~24 小时后检查，试剂如透明无色或呈浅黄色时即可使用，这就是 Schiff 试剂溶液。如有不同程度红色未褪现象，可加入 1 g 活性炭，强烈震荡一分钟，仍在低温下静置过夜，然后用滤纸过滤后使用。密封瓶口，包以黑纸，在 5℃以下冰箱内可以保存半年。如有白色沉淀，就不能再使用，如颜色变红，可加入少许偏重亚硫酸钠，使之再转为无色，仍可继续使用。

亚硫酸水溶液：取 200 mL 蒸馏水，加入 10 mL 10%偏重亚硫酸钠水溶液和 10 mL 1mol/L HCL，三者使用前混匀。

0.5%固绿酒精染液：称取 0.5 g 固绿溶于 100 ml 95%乙醇中。

0.9%生理盐水。

Bouin 氏固定液：饱和苦味酸 50 mL，40% 甲醛 250 mL，冰醋酸 50 mL。饱和苦味酸过滤，甲醛和冰醋酸最好在临用前加入。

1%氨水酒精溶液：99 ml 70%酒精中加 1 ml 氨水。

1%盐酸酒精溶液：99 ml 70%酒精中加 1 ml 盐酸。

1%伊红水溶液：1 g 伊红溶于 95%乙醇 100 ml，充分搅拌完全溶解，用前加两滴冰醋酸。

埃里希氏苏木精：苏木精：0.2 g；无水乙醇：3.3 mL；硫酸铝钾：5 g；蒸馏水：66.7 mL；碘酸钠：0.04 g；冰醋酸：4 mL；甘油：30 mL。

配制方法：将苏木精溶于无水乙醇，再将硫酸铝钾溶于蒸馏水，溶解后将甘油倾入一起混合，最后加入冰醋酸和碘酸钠。

【实验程序】

1.精子的发生过程

(1) 精巢制片——Feulgen 染色法

①取材：处死小鼠，取其精巢，用解剖针在精巢上刺几个小孔。

②固定：卡诺氏固定液固定 0.5~2 h。

③脱水：85%，95%，100%酒精各 1 h。

④透明：先在 100%酒精与二甲苯混合液中 0.5 h，然后在二甲苯中 0.5 h，中间换一次二甲苯。

⑤浸蜡：二甲苯与石蜡等量混合液 0.5 h，纯石蜡中换两次，每次 0.5 h。

⑥包埋：将精巢包埋于石蜡中。第 5、6 部在组织包埋机中进行，包埋机温度为 56℃。

⑦切片：切片厚度为 7μm。

⑧Feulgen 染色：石蜡切片溶蜡：溶蜡二甲苯 I (3~5 min)，溶蜡二甲苯 II (3~5 min)，1/2 纯酒精+1/2 二甲苯 (3~5 min)；复水：纯酒精 I (2~3 min)，纯酒精 II (2~3 min)，95% 酒精 (2~3 min)，85% 酒精 (2~3 min)，70% 酒精 (2~3 min)，蒸馏水；水解：室温 1mol/L HCl，过一下，1 mol/L HCl，60℃，8~10 min (水浴或温箱中)；染色：Schiff 试剂染色 (60 min)；漂白：亚硫酸水 I (2 min)，亚硫酸水 II (2 min)，亚硫酸水 III (2 min)，自来水清洗 (5~10 min)，蒸馏水，过一下；对染：0.5%固绿酒精溶液 (15 s)；脱水：95%乙醇 (2 min)，纯酒精 I (2 min)，纯酒精 II (2 min)；透明：透明二甲苯 I (2 min)，透明二甲苯 II (2 min)；封片：中性树胶封片。

(2) 小鼠精巢切片观察 (附图 1-4)



先用低倍镜观察曲精小管不同切面的全貌，然后转换高倍镜，找一个较清楚的曲精小管切面，从管壁到管腔依次认出：

精原细胞：靠基膜的一层或两层细胞，细胞核大而圆，染色深。

初级精母细胞：比精原细胞大得多，往往在分裂期间，染色质正在形成染色体。

次级精母细胞：比初级精母细胞小，胞核圆，染色淡，接近管腔。

精子细胞：体积小，最近管腔。染色最深，多呈梭形和细杆状。

精子：成簇聚集于管腔或支持细胞上。

支持细胞：夹杂分布于生殖细胞间，锥形或不规则形，细胞核靠近基部。形状不定，染色淡，细胞轮廓不易认出。

2. 成熟精子的形态观察（活体）

剪开刚处死的家兔附睾的一端，轻微将其断面在清洁过的载玻片上涂一下，然后加 0.9% 生理盐水一滴于涂片上，盖上盖玻片在高倍镜下观察。可看见家兔高级分化型的，有头尾结构的精子作活泼的运动。

再加上一滴苏木精染液于盖玻片一侧，用吸水纸在盖片的另一侧吸水，将染液引至材料上，约 1 分钟后，即可在显微镜下观察，则头尾较为明显（似人类精子）。

3. 卵子的发生过程

（1）卵巢的切片制作——H E 染色法

①取材：处死家兔，取其卵巢。

②固定：卵巢于生理盐水中清洗后，用 Bouin 氏固定液固定 24 h。

③脱水：取出卵巢，用刀片分割成 5~8 mm 小块，用 70% 酒精清洗 3 次后于 70% 酒精中保存（过夜）。取出组织进行逐级脱水，80% 酒精（2~3 h）—90% 酒精（2~3 h）—95% 酒精 I（2 h）—95% 酒精 II（2 h）—无水乙醇 I（2 h）—无水乙醇 II（2 h）。

④透明：1/2 二甲苯 + 1/2 酒精（过夜），然后在二甲苯中 0.5~1 h，中间换一次二甲苯。

⑤浸蜡：二甲苯与石蜡等量混合液 0.5 h，纯石蜡中换两次，每次 0.5 h。

⑥包埋：将卵巢在包埋台上进行石蜡包埋。

⑦切片:切片厚度为 $7\sim 8\mu\text{m}$ 。

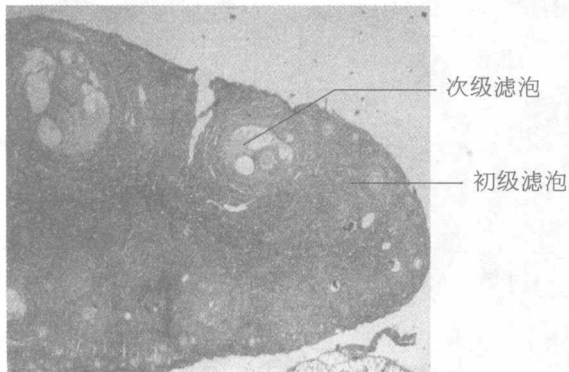
⑧H E染色:脱蜡:二甲苯 I (15 min),二甲苯 II (15 min),1/2酒精+1/2二甲苯(5 min);复水:无水乙醇 I (5 min),无水乙醇 II (5 min),95%酒精(5 min),90%酒精(5 min),80%酒精(5 min),70%酒精(5 min),蒸馏水 I (5 min),蒸馏水 II (5 min);染色:埃里希氏苏木精(15~30 min),自来水冲洗(5 min);分化:1%盐酸酒精(20 s),自来水冲洗(稍洗),1%氨水酒精(4 s),蒸馏水 I (3 min),蒸馏水 II (3 min);复染:1%伊红(3 min);脱水:70%酒精(30 s),80%酒精(30 s),90%酒精(5 min),95%酒精(5 min),无水酒精 I (5 min),无水酒精 II (5 min);透明:1/2二甲苯+1/2酒精(5 min),二甲苯 I (10 min),二甲苯 II (10 min);封片:将染色完成的切片取出,确保二甲苯未干燥,迅速用玻璃棒蘸取树胶滴在组织上,盖上盖玻片,待凝固后观察结果。

(2) 家兔卵巢切片观察

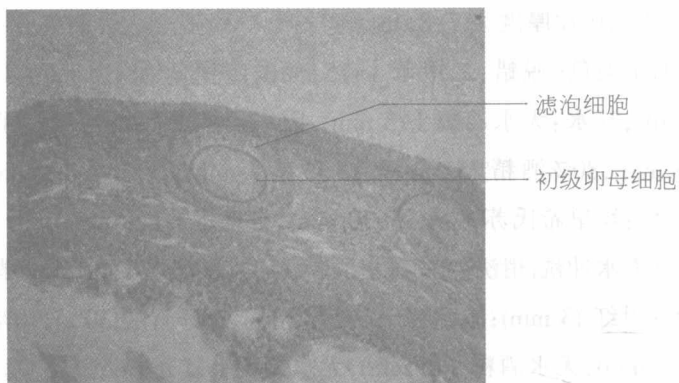
取切片置低倍镜下,观察滤泡在卵巢中分布情况(附图 1-1)。依次高倍镜观察初级滤泡的生长过程和次级滤泡的形态(附图 1-2 和附图 1-3)。

【实验注意事项】

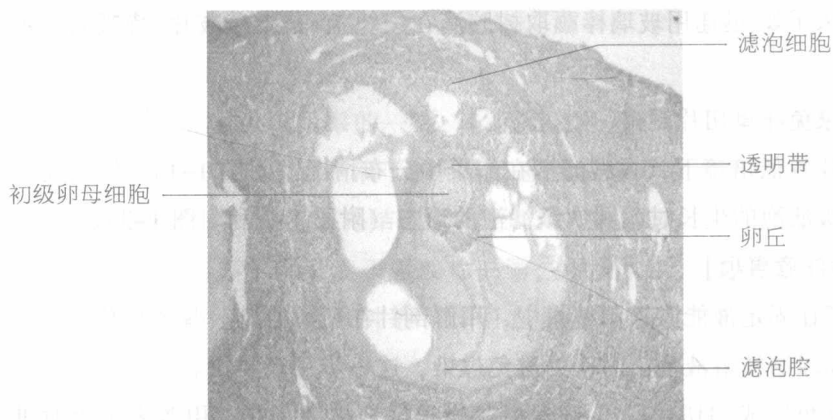
- 1.为了让固定液能渗入到精巢中,用解剖针在精巢上刺一些个小孔。
- 2.用固绿酒精溶液复染时,为避免过染,这一步一定要快。
- 3.将染色完成的切片取出,确保树胶能很好地扩散,在二甲苯未干燥时迅速在组织上滴加树胶。



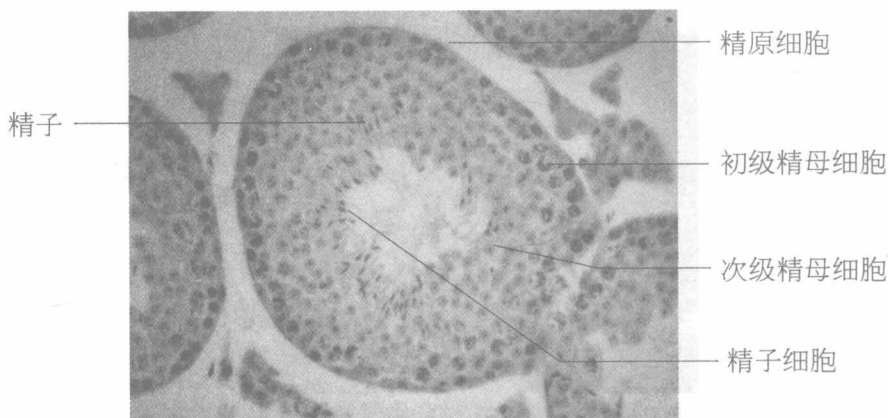
附图 1-1 家兔卵巢切面附图



附图 1-2 初级滤泡



附图 1-3 次级滤泡



附图 1-4 曲精小管中精子的发生过程