

发育生物学实验

An Experimental Guide for Developmental Biology

董巍 张俊争 编著

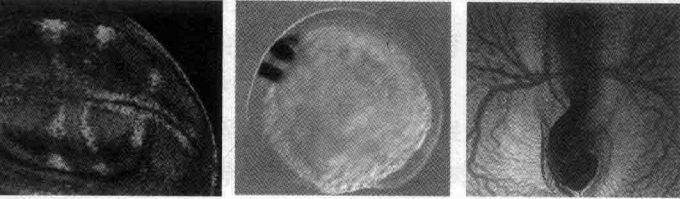


高等教育出版社

发育生物学实验

F A Y U S H E N G W U X U E S H I Y A N

董 巍 张俊争 编著



高等教育出版社·北京

内容提要

本书以发育生物学研究中常用的模式生物为实验材料,根据实验内容的性质分为两个部分:第一部分为模式生物发育阶段的划分与形态发生,以实验胚胎学为基础,重点介绍早期胚胎发育的形态构建、发育阶段的特征,使学生直观和全面地了解多种多样的生物发育现象和过程。第二部分是发育的遗传与分子机制研究。内容选取发育生物学研究中若干经典的实验,涵盖发育生物学研究领域的多个方面,如早期胚胎发育过程中形态发生原对图式形成的作用和机制,发育中细胞分化的调控,以及基因在发育调控中的表达和功能分析等,以加强学生对发育生物学基本概念和研究方法的了解。本书配套数字课程中包括部分发育生物学模式生物实验操作视频。

本书面向高等院校及科研院所的生物类专业及相关学科的高年级本科生和研究生,可作为发育生物学教学的实验指导教材,也可供科研人员、教师参考。

图书在版编目(CIP)数据

发育生物学实验/董巍,张俊争编著. --北京:
高等教育出版社,2014.4
ISBN 978-7-04-034392-2

I. ①发… II. ①董… ②张… III. ①发育生物学-
实验-高等学校-教材 IV. ①Q111-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第059729号

策划编辑 王莉 高新景 责任编辑 高新景 封面设计 张楠 责任印制 田甜

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 三河市吉祥印务有限公司
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 6.75
字数 170千字
插页 4
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2014年4月第1版
印 次 2014年4月第1次印刷
定 价 17.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 34392-00

数字课程（基础版）

发育生物学实验

登录方法：

1. 访问 <http://res.hep.com.cn/34392>
2. 输入数字课程账号（见封底明码）、密码
3. 点击“LOGIN”、“进入 4A”
4. 进入学习中心

账号自登录之日起一年内有效，过期作废。

使用本账号如有任何问题，

请发邮件至：lifescience@pub.hep.cn

登录以获取更多学习资源！

发育生物学实验

董巍 张俊争

[内容介绍](#) | [纸质教材](#) | [版权信息](#) | [联系方式](#)

4A

学习中心

欢迎登录

账号

密码

LOGIN

内容介绍

本数字课程配套《发育生物学实验》教材，其资源包括部分发育生物学实验相关的视频：

- (1) 线虫早期胚胎发育；
- (2) 果蝇幼虫成虫解剖；
- (3) 斑马鱼早期胚胎发育；
- (4) 斑马鱼幼鱼形态；
- (5) 斑马鱼雌、雄成鱼形态；
- (6) 爪蟾人工注射；
- (7) 鸡胚整装片制作；
- (8) 8 天鸡胚观察。

高等教育出版社版权所有 2014

<http://res.hep.com.cn/34392>

请在具有 IE 内核的浏览器下访问该网站。其他浏览器访问，可能造成课程资源无法正常显示。

精彩资源 先睹为快



前 言

多细胞生物的发育是重要的生命现象。伴随遗传学、分子生物学、生物信息学和生物技术的发展，人们对发育现象的研究取得了长足的进步。在传统的胚胎学基础上，近几十年来，发育生物学逐步建立和成熟，已经成为生命科学一个重要的分支学科，发育生物学课程也陆续成为各高校重要的教学内容。为满足教学的需求，应高等教育出版社的邀请，在数年实验教学积累的基础上，我们编写了《发育生物学实验》一书。

发育生物学源自胚胎学，胚胎学研究所侧重的多细胞生物的形态发生与发育阶段的划分是认识发育现象的基础。发育生物学对发育现象的研究深入到遗传与分子机制层面，带来了研究理念和方法的巨大变化。发育生物学的研究对象是多细胞生物从发生、发育到衰老、死亡的全过程，因此这一学科展现出高度的涵盖性、综合性，也不可避免地赋予其内容和方法上日新月异的特点。为了反映这一学科的特点，我们在本书的结构和选材方面做了如下的设计。

第一，模式生物概念的形成和体系的建立是当代生命科学发展的重要标志，可以说它给当代生命科学研究建立了一个完整的坐标系，深刻地影响到生命科学各个领域的发展。同时，模式生物研究体系的建立也为发育生物学的发展奠定了坚实的基础，它带来的不仅是对发育现象的系统揭示，也创造了不同生物类群间相互比对和借鉴的平台，从而摆脱了胚胎学基本是对不同生物各自描述的局面，实现了普适性的发育生物学理论体系的建立，极大地推动和提高了人们对多细胞生物发育现象的认识。因此，面对数百年来浩如烟海各类多细胞生物（从各种门类的植物到千姿百态的动物）发育现象研究的积累，本书在内容选择上以模式生物为主线，突出了对模式生物发育规律的介绍。

第二，人们对发育现象的认识从观察和研究个体发育的形态发生与阶段划分开始。历经数百年的发展，胚胎学建立的理论框架和许多重要的概念，直到今天对我们探索发育现象仍有着指导意义。胚胎学提出的胚层的概念不仅奠定了发育阶段划分的基础，给出了各种组织器官发生的依托，更开启了人们对各类多细胞生物演化关系的深入思考。当今，随着发育生物学研究的深入，人们惊奇地发现，胚胎学建立的以胚层为基础的多细胞生物发育认知框架不仅没有过时，而从分子和程序水平更显示出了这一理念的天才预见性。基于此，本书的第一部分为发育的形态观察与阶段划分，主要介绍模式生物的研究背景和胚胎发生。以实验胚胎学为基础，着重于早期胚胎发育的形态构建、发育阶段的特征识别等。本书在介绍形态发生观察的同时，增加了动手实验的内容，力图将立体的生物发育时空过程全面地展现给学生。

第三，对发育现象的研究目前已经进入到探索其遗传与分子机制的层面，日益成为当今发育生物学教学的重要内容。本书的第二部分为发育的遗传与分子机制研究。在这部分中，

我们选取了发育生物学研究中的一些经典范例，并在可操作性上加以改进，设计成为综合性的教学实验。我们采取了两段式实验标题的方法，以增强学生对于发育机制和原理的理解，并对发育生物学研究方法获得更全面、更深入、更系统的了解。我们认为只有完成上述两方面的知识和实验技能的学习，才能实现对发育现象的全面把握。

第四，如何将当今高度综合与精细的发育生物学实验付诸于可行的课堂教学之中，包括对不同模式生物的兼顾，对各个发育研究方向的展示，对差异研究策略和方法的介绍，对最新研究进展的追踪等，这些都给编写实验教材带来许多的困难。在编写过程中，我们十分注意对诸多方面的协调。同时，我们也注意到要给教师提供充分的选择和发展空间，实验者可以根据自身的实验条件，选取其中部分实验，以达到学习发育生物学实验的目的。

在此，我们特别感谢北京大学生命科学学院樊启昶教授在本书编著过程中给予的指导和帮助。作为北京大学发育生物学课程的开创者，樊老师毫无保留地把他在多年教学和科研中获得的宝贵经验和心得倾囊相授。在本书的内容选择、章节编排和文字表述，以及每一个实验的科学逻辑性和严谨性等方面，樊老师都严格把关，精益求精。北京大学生命科学学院多位从事发育生物学研究的教授及他们的实验室，也给予了实验教学工作大力支持，他们是朱作言、张博、刘东、刘磊、朱健、郭红卫、董春霞等。同时，在本书的编写过程中，袁园、姚颀、王家亮、刘朋朋、赵峰、李辉辉、吴颖、牟肖肖等多名科研第一线的博士研究生，参与了规范实验操作、翻译英文资料及提供图片素材等大量基础而细致的工作。编者在此一并表示最诚挚的谢意！

本书的编写不仅是应当前教学的需求而作，也是一种尝试，我们对书中援引的各种资料的作者表示衷心的感谢，也热切地希望各位读者和本书的使用者提出批评和建议。

编 者

2013年12月于北京大学

目 录

第一部分 模式生物发育阶段的划分与形态发生

- 实验 1 秀丽隐杆线虫胚胎发育的阶段划分与性别鉴定 2
- 实验 2 黑腹果蝇胚胎不同发育阶段的大体观察与三龄幼虫的成虫盘解剖 7
- 实验 3 斑马鱼早期胚胎发育与主要器官发生的形态观察 11
- 实验 4 爪蟾人工授精与胚胎的早期发育观察 16
- 实验 5 鸡胚的整装片制作与羊膜卵结构的观察 20
- 实验 6 鸡胚肢体发生的实验胚胎学研究 26
- 实验 7 拟南芥生长周期不同阶段的形态结构观察 31

第二部分 发育的遗传与分子机制研究

- 实验 8 发育轴向图式信息的建立
——形态发生原视黄酸 (RA) 对斑马鱼后脑发育的调节 36
附: 斑马鱼胚胎整体原位杂交 (WISH) 实验 42
- 实验 9 发育中细胞分化的诱导机制
——鸡胚中 FGF-8 对肢芽形成的诱导作用 46
- 实验 10 发育中细胞分化的远程调控
——甲状腺激素对蝌蚪变态发育的调控 51
- 实验 11 发育程序的级联调控
——RAS 信号通路与线虫产卵器的发育 56
附: 线虫 RNA 干扰 (RNAi) 实验 61
- 实验 12 发育信号在细胞中的转导
——Hh 信号通路参与果蝇翅的图式形成 63
- 实验 13 发育调控基因的组合利用
——拟南芥不同花器官决定的 ABC 模型 68
- 实验 14 环境因子对发育程序的干扰
——化学致畸物质对斑马鱼发育的影响 73
- 实验 15 发育的重编程现象
——水螅切割后体轴的再现 78
- 实验 16 结构与功能的再建
——斑马鱼侧线毛细胞的损伤及修复 84

附录 发育生物学研究中常用的模式生物

- I 线虫的培养和实验操作 89
- II 果蝇的饲养和实验操作 90
- III 斑马鱼的繁养和实验操作 92
- IV 鸡胚的实验室培养和孵化 93
- V 水螅的饲养 95



第一部分

模式生物发育阶段的划分与形态发生

实验 1 秀丽隐杆线虫胚胎发育的阶段划分与性别鉴定

【实验目的】

观察不同发育时期的线虫,识别雌雄同体线虫和雄性线虫,掌握简单的线虫实验操作。

【背景知识】

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)属于线虫动物门,线虫纲,小杆线虫目,广杆线虫属,简称秀丽线虫,是一种常见的小型土壤线虫。秀丽线虫个体微小,成体长 1~1.5 mm,体宽约 70 μm ,在野生环境中主要以土壤中的细菌为食物。

秀丽线虫属于假体腔动物,身体形态为不分节的圆柱体状,在头尾两端收窄为锥形。其基本解剖学结构十分简单,包括构成外层体表的胶原蛋白角质层(collagenous cuticle)及皮下组织,控制运动的神经元和肌肉,由口、咽、肠、排泄孔组成的消化系统,以及性腺和产卵器或交配器。秀丽线虫包括雄性(male)和雌雄同体(hermaphrodite)两种不同性别的个体。雄性个体的生殖器官包括一个单叶性腺(single-lobed gonad)、输精管,及特化为交配用的尾部;雌雄同体的线虫有两个卵巢、输卵管、受精囊及单一子宫。雌雄同体的线虫体可同体产生卵和精子,卵在通过受精囊时与精子结合而进行自体受精,以此种自交繁殖方式产生的后代中,雄虫的比例非常低,仅有大约 0.2%。同时线虫还存在另一种生殖方式,即雄虫与雌雄同体间的交配,在此情况下雌雄同体会优先选择雄性的精子,并且产生的后代中雌雄同体与雄性个体的比例是 1:1。

秀丽线虫生活周期很短,在实验室恒温培养、食物充足的理想条件下,其平均寿命为 2~3 周,而从受精卵发育至成熟个体仅需约 3 天。秀丽线虫的卵外被一层坚硬的几丁质外壳,在母体中受精并开始卵裂,经约 2.5 h 发育至原肠胚时期(约包含 30 个细胞)从母体产出,在体外继续发育。秀丽线虫的胚胎在体外经过约 9 h 的发育,孵化成为幼虫,再经过一龄(L1)、二龄(L2)、三龄(L3)、四龄(L4)4 个幼虫期和青春期约 50 h 发育成熟,到达成虫期(图 1-1)。伴随着发育的进行与个体的生长,每个幼虫期完成一次蜕皮。线虫发育过程中特有的一个现象是,当食物匮乏或外界环境恶劣时,一龄幼虫可以进入一种特殊的发育状态,形成耐受型幼虫(dauer)。耐受型幼虫对外界压力具有很强的抵抗性,可耐受逆境达 4 个月之久,当外界环境好转时,可以重新进入正常发育程序直至形成健康的成虫。

线虫早期胚胎发育

自 1965 年英国科学家 Sydney Brenner 将秀丽线虫引入动物发育研究领域以来,它已经成为经典的模式生物之一。目前研究中广泛使用的 N2 Bristol 品系是从英国城市 Bristol 附近的蘑菇堆肥中分离得到的,并于 1965 年被定名为 N2。秀丽线虫作为模式生物具有许多独特的优越性,如通体透明、体细胞数目恒定、特定细胞位置固定等,这使得它成为研究个体发生的良好材料。利用这些优越条件,英国科学家 John Sulston 通过活体观察线虫的胚胎发育和细胞迁移途径的方法,于 1983 年完成了线虫从受精卵到成体的细胞谱系,这是发育生物学史上具有里程碑

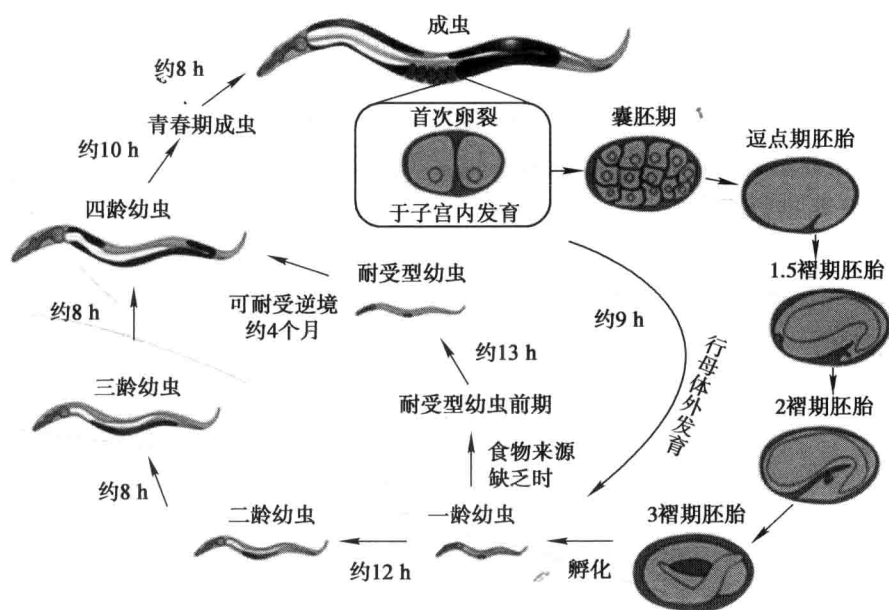


图 1-1 22 °C 秀丽线虫的生活史 (引自 www.wormatlas.org)

性的发现,极大促进了秀丽线虫在胚胎发育、性别决定、细胞凋亡、行为与神经生物学等方面研究中的广泛应用。

【实验准备】

1. 生物材料

N2 Bristol 品系线虫。

2. 实验仪器

20 °C 培养箱,双目解剖镜,微量移液器,无菌培养皿,灭菌吸头,酒精灯,挑虫器。

3. 实验试剂

NGM 培养基(300 ml): NaCl 0.90 g,胰蛋白胨 0.75 g,琼脂 5.1 g, CaCl_2 (1 mol/L) 0.3 ml, MgSO_4 (1 mol/L) 0.3 ml,磷酸钾缓冲液(1 mol/L, pH 6.0) 7.5 ml,溶解于蒸馏水中至终体积为 300 ml,120 °C 高压灭菌 20 min。静置待培养基的温度降至 60 ~ 70 °C 后,加入胆固醇(5 g/L,溶于乙醇中) 0.3 ml(见附录 I)。

B broth 液体培养基(100 ml): NaCl 0.5 g,胰蛋白胨 1.0 g,溶解于蒸馏水中至终体积为 100 ml。120 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 保存。

M9 线虫生理溶液(500 ml): KH_2PO_4 1.5 g, Na_2HPO_4 3 g, NaCl 2.5 g,溶解于蒸馏水中至终体积为 500 ml。120 °C 高压灭菌 20 min 之后加入 MgSO_4 (1 mol/L) 0.5 ml。

去污染剂(50 ml): NaOH (10 mol/L) 7.5 ml, NaClO (100%) 5 ml,加入蒸馏水中至终体积为 50 ml。

【实验内容】

1. 预备实验

(1) 实验前 2~3 天,取繁养线虫的 NGM 培养基及 B broth 液体培养基,将需要观察的线虫品系从保种的培养基中传代到新的培养基中。培养基制备和线虫传代的具体实验操作详见附录 I “线虫的培养和实验操作”。

(2) 配制 M9 线虫生理溶液和去污染剂各 50 ml 备用。

(3) 制作挑虫器。线虫实验操作的工具称为挑虫器 (pick, 图 1-2)。挑虫器的制作和使用详见附录 I。



图 1-2 挑虫器示意

预备实验工作可由教师或实验员完成,也可指导学生自己动手。

2. 观察不同发育时期和不同性别的线虫

要求:观察并分辨不同发育时期的线虫;辨识四龄幼虫时期的雌雄同体线虫;辨识雌雄同体和雄性成虫。

由于线虫成虫体长约为 1 mm,幼虫更小,并且全身透明,因此无法直接用肉眼观察。需使用中倍解剖镜,观察并区分不同发育时期和不同性别的线虫。

(1) 将线虫培养皿正面朝上放在双目解剖镜下,用透射光源观察。

(2) 在低倍镜下观察线虫的形态与运动,比较不同发育时期线虫形态上的差别(图 1-3)。

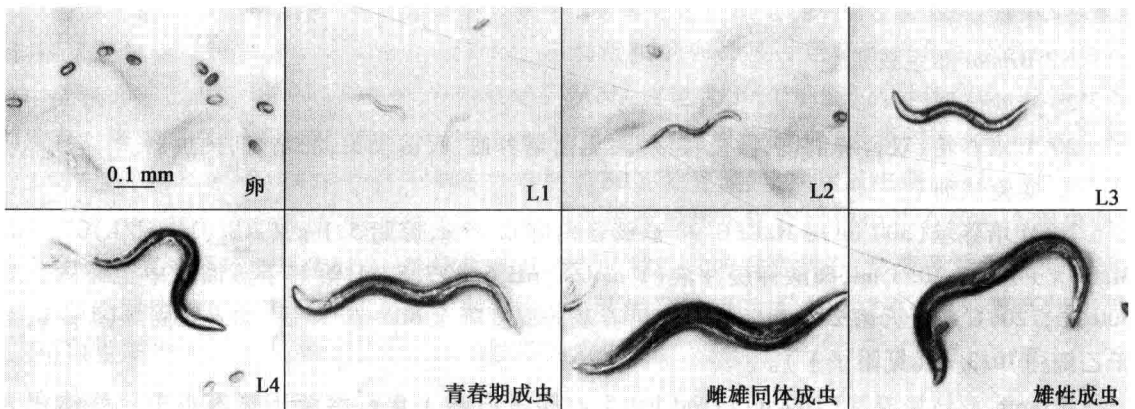


图 1-3 不同发育时期的秀丽线虫虫体示例

(3) 挑选线虫密度较低视野区域,调整放大倍数和焦距,仔细观察线虫的形态及身体器官构造,辨别雄虫(图 1-4)和雌雄同体虫(图 1-5)尾部的差异。

3. 线虫的传代培养

要求:从线虫培养皿中挑取 10 条雌雄同体线虫到新培养基中。

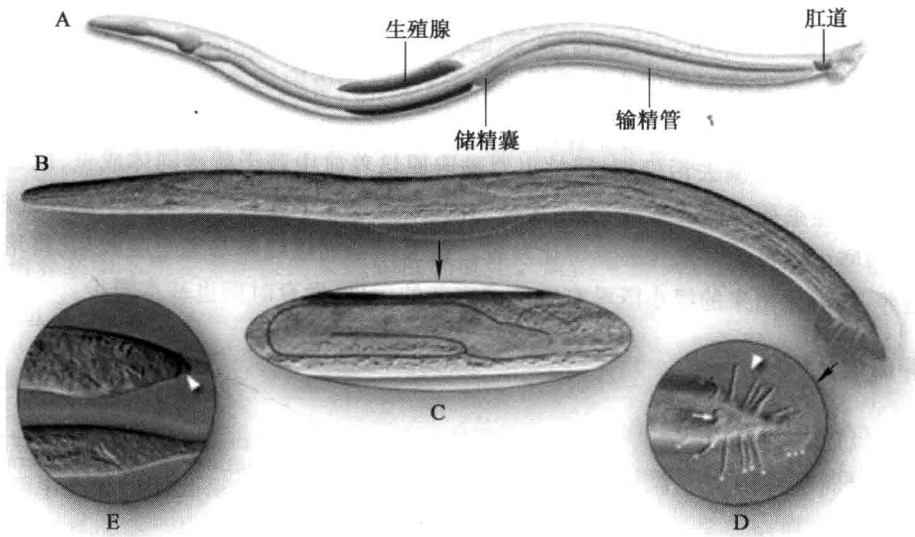


图 1-4 成年雄性线虫 (引自 WormAtlas)

A. 模式图; B. 实物图; C. 放大显示雄虫成体特有的生殖腺;
D. 成年雄虫尾部, 从腹部观察; E. L3 及 L4 雄虫的尾部

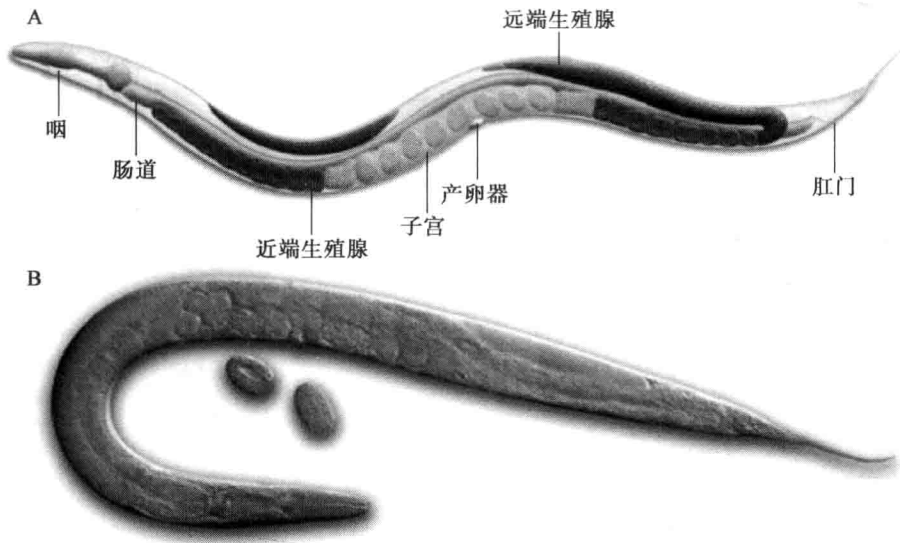


图 1-5 成年雌雄同体线虫 (引自 WormAtlas)

A. 模式图; B. 实物图

(1) 点燃酒精灯, 灼烧挑虫器。

(2) 冷却后, 用挑虫器黏取四龄期雌雄同体幼虫线虫转到新培养基中, 注意不要混入其他线虫。

注意: 由于线虫非常小, 注意动作一定要轻, 以免损伤虫体和培养基。并且注意在挑虫之前

和将线虫放入新培养基后,均要用酒精灯对铂金丝过火灭菌,防止污染和品系混淆。

4. 线虫发育同步化操作

当需要大量同一发育时期的虫体进行实验时,可用去污染剂杀死大量成虫,待其体内卵孵化以获得发育同步化的线虫。

在新培养皿中滴1滴去污染剂,用挑虫器黏取原培养皿中若干雌雄同体成虫,放置在去污染剂中。去污染剂在杀死可能的细菌、霉菌污染的同时,也杀死了线虫。因为几丁质外壳的保护,线虫体内的受精卵可以存活下来并继续孵化发育。待去污染剂被培养基完全吸收后,将培养皿倒置放20℃培养,新孵化出来的线虫既没有细菌或霉菌的污染,发育时期也基本同步。

【推荐阅读】

1. <http://www.wormbook.org>
2. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota

实验 2 黑腹果蝇胚胎不同发育阶段的大体观察与 三龄幼虫的成虫盘解剖

【实验目的】

观察培养基中不同发育阶段的果蝇幼虫和成体。解剖并辨认果蝇三龄幼虫主要的 5 对成虫盘：眼成虫盘、触角成虫盘、翅成虫盘、腿成虫盘、平衡棒成虫盘。

【背景知识】

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)原产于热带或亚热带,属于昆虫纲双翅目果蝇科。我们在日常生活中经常能看到果蝇,雌蝇在腐烂的水果或其他发酵的有机物上产卵,其幼虫以水果腐烂的酵母和细菌,以及水果的糖分等为食。果蝇成体体长约 2.5 mm,雌性果蝇一生可产下约 400 个 0.5 mm 大小的卵,它们由绒毛膜和一层卵黄膜包被,以保护其在体外进行发育。

自 1910 年遗传学先驱 Thomas Hunt Morgan 发现第一个突变体白眼果蝇以来,生物学家使用果蝇作为遗传学研究的模式动物已经近百年。伴随着果蝇遗传学的发展,在果蝇领域累积了大量的突变体及转基因品系等资源,并且开发和创造了丰富的遗传学工具,因此以果蝇为模式动物研究发育生物学具有得天独厚的优越条件。

果蝇的发育速度很快,其生活周期见图 2-1。果蝇胚胎发育速度受环境温度影响,25 ℃ 为

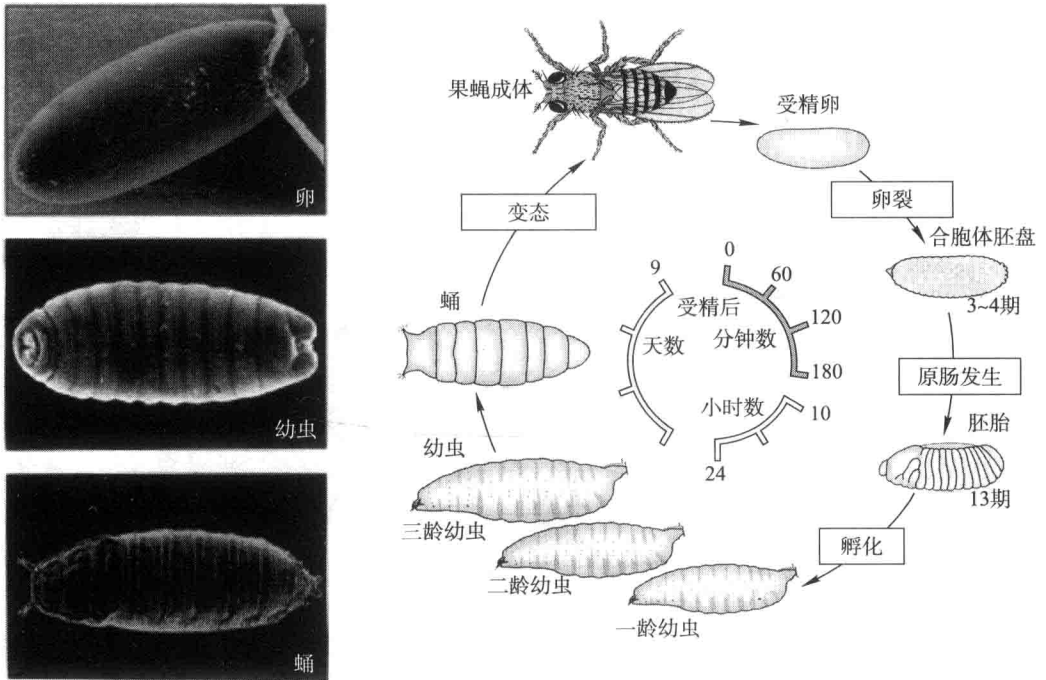


图 2-1 果蝇发育周期

最适宜的生长环境,温度太高或太低都会影响发育的速度。果蝇的受精卵产出后,胚胎发育大约需要 22 h。在胚胎发育早期(2.5 h 以前),精、卵的细胞核在融合后迅速连续进行同步的有丝分裂,复制产生很多个细胞核,但细胞不分裂,使细胞处于“合胞体”状态,这一阶段的胚胎也称为“合胞体胚盘”。在合胞体中,当细胞核数目达到 256 个时,细胞核开始移动到细胞膜附近。当发育至 6 000 个细胞核左右时(约 2.5 h),合胞体胚盘的细胞膜开始向内折叠包绕各个细胞核,形成“细胞胚盘”。至此,果蝇胚胎的第一层单层表皮形成,细胞开始非对称分化,其分化命运由细胞在胚胎中所处的位置决定。

在合胞体期结束后,随之开始胚胎的原肠化(gastrulation)过程,在原肠胚中细胞会分化形成内胚层、中胚层、外胚层三个胚层。再经过一系列的形态发生过程,在受精后 22 h 左右,当身体的分节和器官形成确立以后,受精卵结束胚胎期的发育,孵化形成果蝇的一龄幼虫(first instar larva)。果蝇幼虫开始自主觅食,并且不断生长发育,在 24 h 后出现第一次蜕皮,以后再蜕皮两次,据此可将果蝇幼虫发育分成三个阶段(larval stage 1~3)。这是果蝇生长最快的阶段,在短短的三天时间里,果蝇幼虫的身体增大了 200 倍以上。在结束三个幼虫发育期后,果蝇进入约为四天的蛹期(pupae stage),在此过程中完成变态发育(metamorphosis),最后破蛹羽化(eclosion)而出,成为成虫(adult)。

果蝇成体的组织器官基本上都是由幼虫期的成虫盘(imaginal disc)细胞发育而来,例如果蝇的腿、翅、眼分别由腿成虫盘、翅成虫盘及眼成虫盘分化形成。这些成虫盘细胞的命运在胚胎发育早期就被确定下来,构成特异的细胞团,并在幼虫期分裂增殖形成成虫盘组织(图 2-2A)。成虫盘都是由单层上皮细胞构成的片状或囊状组织,并通过一个细茎与幼虫的上皮连接。成虫盘在一、二、三龄幼虫期都有不同程度的细胞增殖,在晚期三龄幼虫后,即变态发育开始之前,每

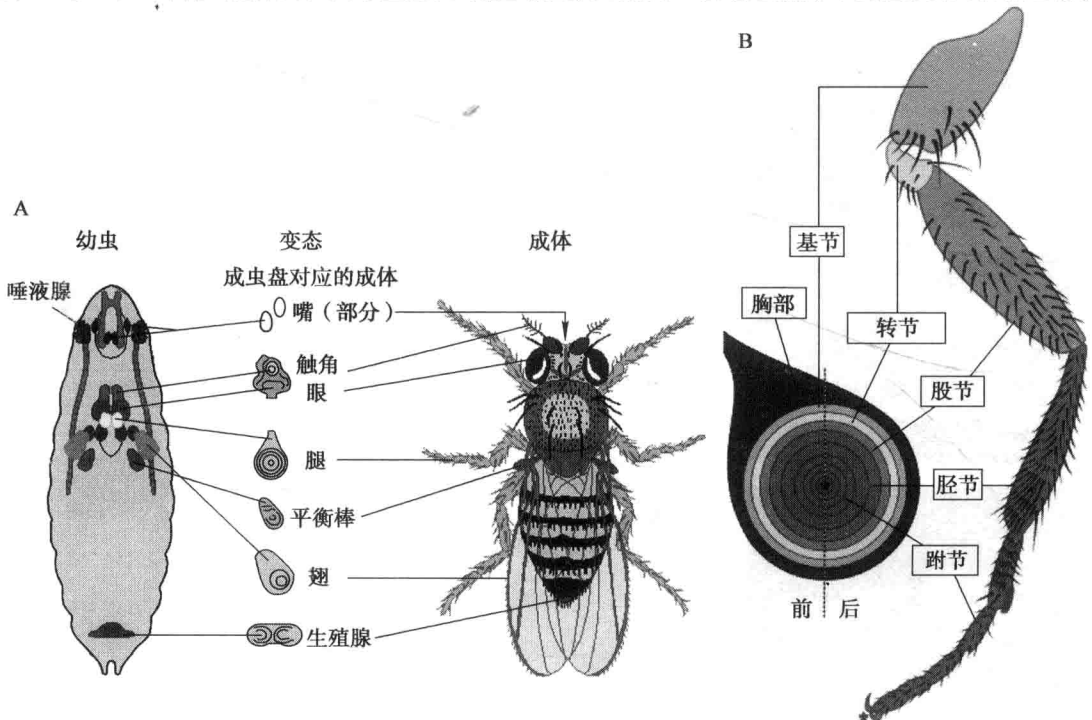


图 2-2 果蝇三龄幼虫期成虫盘的相对位置(A)和腿成虫盘(B)发育对应的结构示意图(彩图见插图)

个成虫盘都包含了数万个细胞。成虫盘的细胞在幼虫期都处于未分化状态,但实验证明这些细胞的命运的特化过程已经完成。以腿成虫盘为例,将三龄幼虫期的腿成虫盘解剖出来异位移植到另一条幼虫体内后,经过蛹期仍然会发育成为成体的腿而不是其他器官。这说明在成虫盘中,特定的发育程序已经被设定,走向既定的分化命运。果蝇附肢的成虫盘(如腿、翅、平衡棒等)在蛹期要经历翻转、延伸等一系列的形态上的变化才能最终发育形成相应的成体结构,例如:腿成虫盘由折叠而展开,并延伸形成一管状(图2-2B);翅成虫盘伸长并展平形成片状的翅。因为成虫盘在早期幼虫中很小,较难辨认,而在蛹和成虫阶段,果蝇体表被几丁质外壳包裹,这给发育研究和观察带来一定困难,因此在发育生物学研究中普遍使用三龄幼虫期的成虫盘作为实验材料及观察对象。在进入蛹期之前,三龄幼虫会蠕动——“爬”出培养基,生活在培养瓶的瓶壁上,使得收集三龄幼虫变得非常便利。

【实验准备】

1. 生物材料

黑腹果蝇三龄幼虫。

2. 实验仪器

解剖镜,眼科尖头镊子2把(可在细砂纸上适当打磨。非常细的镊子也不宜使用,容易弯曲和断裂),有盖塑料培养皿,解剖针1支,吸管若干,凹槽载玻片。

3. 实验试剂

果蝇生理盐水(Ephrussi and Beadle saline):7.5 g/L NaCl,0.35 g/L KCl,0.21 g/L CaCl₂。

PBS(磷酸盐缓冲液):8.0 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,1.15 g/L Na₂ HPO₄,0.2 g/L KH₂PO₄。

【实验内容】

1. 预备实验

为在实验中获得大量的果蝇三龄幼虫,需要在实验前4~5天,从实验用果蝇品系中取雌、雄成体各15只,放入新的培养瓶中,使其交配产卵。果蝇培养基的制备和保种传代的具体操作,详见附录II“果蝇的饲养和实验操作”。

预备实验工作可由教师或实验员完成,也可指导学生自己动手。

2. 观察果蝇发育不同阶段的幼虫

要求:辨识雌、雄果蝇成体;观察并分辨不同发育时期的果蝇幼虫;辨识三龄幼虫。

(1) 用CO₂麻醉并去除培养瓶中的果蝇成虫,辨别雌、雄。

(2) 观察培养基中果蝇幼虫生长情况。

(3) 用镊子挑取少量培养基中的幼虫,放置在一个新的培养皿上,滴加少量果蝇生理盐水适当冲洗后,在解剖镜下观察果蝇发育不同阶段幼虫的形态。

3. 解剖三龄幼虫的成虫盘

要求:辨识和剥离果蝇三龄幼虫主要的5对成虫盘。



果蝇幼虫成虫盘解剖

(1) 在培养皿中央滴加1~2滴果蝇生理盐水。从培养瓶中用解剖针轻轻挑出一条三龄幼