



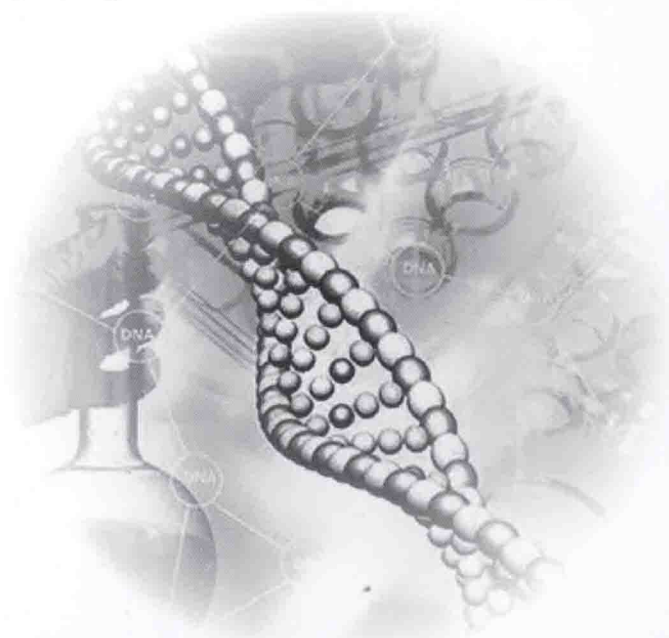
国家精品课配套教材
生命科学核心课程系列教材

遗传学实验

Genetics Experiment

(第二版)

卢龙斗 常重杰 主编



科学出版社

国家精品课配套教材
生命科学核心课程系列教材

遗传学实验

(第二版)

卢龙斗 常重杰 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书的 50 个实验涵盖植物遗传学、动物遗传学、人类遗传学、微生物遗传学和分子遗传学等五个方面。既有较多的传统实验项目,也增加了不少近些年发展起来的新技术和新方法。每个实验编排有实验目的、实验原理、实验材料、实验器具、实验试剂、实验步骤、实验结果、实验作业等部分。从实验项目的设计到每一部分的介绍都重视每个实验的完整性和系统性,重视对学生科学素养的训练和熏陶。同时书中语言简练,通俗易懂,图文并茂,便于学生的预习和教师的备课。

本书适于高等院校生物科学专业及农、林、医药院校等相关专业的本科生、研究生遗传学教学实验使用,不同的专业可以根据教学需要从中选取 13~15 个实验。本书也可作为教师和从事遗传学研究的科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验 / 卢龙斗, 常重杰主编. —2 版. —北京: 科学出版社, 2014.6

国家精品课配套教材 生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-040811-2

I. ①遗… II. ①卢… ②常… III. ①遗传学—实验—教材 IV. ①Q3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 113639 号

责任编辑: 席 慧 刘 丹 / 责任校对: 邹慧卿

责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

铭浩彩色印装有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 9 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2014 年 6 月第 二 版 印张: 15

2014 年 6 月第十次印刷 字数: 393 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《遗传学实验》(第二版)编委会名单

主 编 卢龙斗(河南师范大学)

常重杰(河南师范大学)

副主编 周延清(河南师范大学)

高武军(河南师范大学)

邓传良(河南师范大学)

夏晓华(河南师范大学)

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

杜启艳(河南师范大学)

葛荣朝(河北师范大学)

李书粉(河南师范大学)

李锁平(河南大学)

卢全伟(安阳工学院)

路淑霞(河南师范大学)

南 平(河南师范大学)

庞瑞华(信阳师范学院)

庞振凌(南阳师范学院)

汪琛颖(郑州师范学院)

徐来祥(曲阜师范大学)

薛 香(河南科技学院)

赵晓平(包头师范学院)

第二版前言

《遗传学实验技术》第一版于 2007 年 9 月出版,国内先后有 60 多所院校的 7 届学生使用。根据使用本教材的教师、学生的使用情况和反馈意见,结合本实验室近几年带遗传学实验课教师的经验体会,我们进行了较大范围的修改。修改过程中,我们对复旦大学乔守怡教授、中山大学王金发教授、中国农业大学杨大祥教授、首都师范大学李雅轩教授等编写的几本遗传学实验教材进行了认真的研读,参考了他们书中的不少内容。同时,查阅了大量文献资料,将近些年发展起来的遗传学新技术和新方法也编排到本书中,如染色体原位杂交、遗传标记分析、亲子鉴定、表观遗传等。

在《遗传学实验》第二版编写过程中,河南师范大学的常重杰教授和杜启艳教授、河南大学的李锁平教授、曲阜师范大学的徐来祥教授、河北师范大学的葛荣朝教授、包头师范学院的赵晓平教授、南阳师范学院的庞振凌教授、郑州师范学院的汪琛颖教授等对本书内容的取舍、实验的设计、实验步骤的编排等都进行了认真的讨论,做出了整体规划,并进行了统稿工作。实验 1 至实验 11 由高武军副教授编写;实验 12 至实验 24 由邓传良副教授编写;实验 25 至实验 36 由夏晓华副教授编写;其他实验及附录部分由薛香副教授、庞瑞华副教授、路淑霞副教授、南平副教授、李书粉副教授、卢全伟老师等编写。

值此教材修订再版之际,我代表编委会向曾给予本书关心、支持和帮助的老师、学生及同仁们表示真挚的感谢。祝大家身体健康,工作顺利,也祝我们的遗传学实验教学事业取得更大的成功。

尽管我们做了很大的努力,但限于作者的经验和水平,本书还可能会存在一些不足之处,诚挚地欢迎广大师生继续给我们提出宝贵意见,以便于我们进一步修改和完善。意见和建议可以直接发到邮箱:13598644838@163.com。

编 者

2014 年 2 月于河南新乡

第一版前言

遗传学在生命科学领域中占有非常重要的位置,同时,遗传学又是一门发展迅速、实践性强的学科,学生只有通过实验操作和对实验结果的分析才能掌握和理解遗传学的基本理论和基本知识。目前,着重于培养学生分析问题、解决问题的能力,培养和提高学生的科研素质的实验教学改革正在进一步深化,为此,我们结合多年来的实验教学实践和教学改革经验,编写了《遗传学实验技术》一书。书中 43 个实验分为基础性实验、综合性实验和设计创新性实验三个部分,涵盖了细胞遗传、生化遗传、分子遗传和群体遗传等方面的内容。

河南师范大学卢龙斗教授、常重杰教授和周延清教授对该书实验内容的确定、实验的编排以及实验方法步骤设计等做了整体规划,并对全文进行了统稿。实验 1、2、3、4、5、6、7、18、19、24、26、27、28 由河南师范大学高武军、邓传良编写;实验 10、12、13、14、16、17、29、31、34、39 以及附录部分由河南师范大学周延清、路淑霞编写;实验 22、32、33、36、37、38、42 由河南师范大学杜启艳编写;实验 8、9、11、15、30、41 由南阳师范学院庞振凌和河南科技学院薛香编写;实验 20、21、23、25、35、40、43 由信阳师范学院庞瑞华和河南师范大学南平编写。

由于我们的经验和水平有限,书中可能存在这样或那样的问题,真诚地希望使用该实验教材的学生、教师以及同行给予批评指正,以利于再版时修改和补充。

编 者

2007 年 8 月 5 日于新乡

目 录

第二版前言

第一版前言

第一章 植物遗传学实验	1
实验 1 植物有丝分裂中染色体行为观察	2
实验 2 植物减数分裂中染色体行为观察	7
实验 3 去壁低渗法制备植物染色体玻片标本	12
实验 4 植物染色体核型分析	15
实验 5 植物多倍体诱发及微核检测	20
实验 6 植物有性杂交	25
实验 7 小麦数量性状统计和遗传率估算	31
实验 8 农作物杂种优势测定	33
实验 9 玉米籽粒性状分析及基因互作观察	36
实验 10 玉米三点测交和遗传作图	41
第二章 动物遗传学实验	45
实验 11 动物减数分裂中染色体行为观察	46
实验 12 果蝇性别鉴定、常见性状及生活史观察	50
实验 13 果蝇唾液腺染色体玻片标本制备与观察	55
实验 14 摇蚊唾液腺染色体玻片标本制备与观察	59
实验 15 小鼠骨髓细胞染色体玻片标本制备与观察	63
实验 16 银染核仁组织区与近端着丝粒染色体随体联合	66
实验 17 果蝇两对相对性状遗传分析	69
实验 18 果蝇的三点测交和遗传作图	72
实验 19 果蝇的伴性遗传分析	75
实验 20 果蝇数量性状遗传分析	78
第三章 人类遗传学实验	83
实验 21 人外周血淋巴细胞培养和染色体核型分析	84
实验 22 人类染色体分带技术	89
实验 23 姊妹染色单体色差分析	94
实验 24 人体细胞 Barr 小体和 Y 小体观察	97
实验 25 人体常见性状的调查与遗传分析	100
实验 26 人类指纹的遗传分析	104
实验 27 群体遗传平衡分析和基因频率估算 (PTC 尝味)	108
实验 28 人类染色体荧光原位杂交技术 (FISH)	111

实验 29 人类亲子关系鉴定	117
实验 30 人类 <i>p15</i> 基因甲基化状态检测	120
第四章 微生物遗传学实验	123
实验 31 粗糙链孢霉的四分子遗传分析	124
实验 32 大肠杆菌杂交分析	127
实验 33 啤酒酵母杂交分析	131
实验 34 啤酒酵母营养缺陷型菌株筛选	134
实验 35 大肠杆菌 P_1 噬菌体普遍性转导及基因定位	138
实验 36 大肠杆菌 λ 噬菌体局限性转导分析	143
实验 37 大肠杆菌紫外诱变及营养缺陷型菌株筛选	147
实验 38 大肠杆菌质粒 DNA 的转化	151
实验 39 大肠杆菌基因的功能等位性测验——互补测验	155
实验 40 化学诱变剂的 Ames 检测	159
第五章 分子遗传学实验	165
实验 41 DNA 的提取及纯化	166
实验 42 PCR 扩增技术及扩增产物的检测——琼脂糖凝胶电泳	171
实验 43 质粒的双酶切和目的基因片段回收	176
实验 44 重组质粒构建、转化和筛选	180
实验 45 外源基因在大肠杆菌中的表达与检测	185
实验 46 总 RNA 提取及反转录扩增 cDNA (RT-PCR)	189
实验 47 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析	193
实验 48 Southern 印迹	196
实验 49 Western 印迹	200
实验 50 Northern 印迹	203
附录	207
附录 A 常用染色液的配制	207
附录 B 遗传学实验室常用试剂配制	208
附录 C 几种常用培养基配制	210
附录 D 果蝇实验常用培养基配制	213
附录 E 微生物实验常用培养基及试剂配制	214
附录 F 常用缓冲液的配制	215
附录 G 常用显影液和定影液的配制	223
附录 H 分子遗传学实验常用试剂配制	223
附录 I 核酸电泳相关试剂及缓冲液	226
附录 J 实验室常用技术参数资料	227

实验 1



植物有丝分裂中染色体行为观察

【实验目的】

1. 观察植物细胞有丝分裂过程中染色体的形态特征和动态变化。
2. 学习和掌握植物根尖细胞压片技术。

【实验原理】

细胞分裂是生物个体生长和生命延续的基本特征。在高等植物中，有两种主要的细胞分裂方式，即有丝分裂和减数分裂。有丝分裂是植物个体生长和分化的基础，染色体是遗传物质的载体，在有丝分裂过程中，细胞核内的染色体能准确地复制，并能有规律地均匀分配到两个子细胞中去，使子细胞遗传组成与母细胞完全一样，从而可推断生物性状的遗传与染色体的准确复制和均等分配有关。

高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎生长点及幼叶等部位的分生组织，其中根尖取材容易，操作和鉴定方便。通过对根尖的固定、染色和压片，可在显微镜下观察到大量处于有丝分裂各个时期的细胞和染色体，看到染色体的变化特点和染色体的形态特征，进行染色体计数。为了获得更多的中期染色体图像，可以采用药物处理或冷冻处理的方法，阻止纺锤体的形成，使细胞分裂停止在中期，同时还可以使染色体缩短，易于分散，便于观察研究。另外，通过对细胞组织进行酸性水解或酸处理除去细胞壁，并使细胞软化，便于细胞彼此分开，有利于压片和染色。

秋水仙素 (colchicine) 是一种生物碱。因最初从百合科植物秋水仙 (*Colchicum autumnale*) 中提取出来而得名。分子式 $C_{22}H_{25}O_6N$ 。纯秋水仙素呈黄色针状结晶，熔点 157°C 。易溶于水、乙醇和氯仿。味苦，有毒。在正常有丝分裂过程中形成纺锤丝，细胞两极的纺锤丝附着在染色体的着丝粒处，牵拉染色体向两极移动，从而使细胞分裂，染色体也均匀分配到两个子细胞中。而秋水仙素能破坏有丝分裂过程中纺锤丝的形成，使染色体失去向细胞两极移动的能力，导致细胞停滞在分裂中期，这种由秋水仙素引起的不正常分裂，称为秋水仙素有丝分裂 (C-mitosis)。

【实验材料】

洋葱 (*Allium cepa*)、大蒜 (*Allium sativum*)、蚕豆 (*Vicia faba*)、小麦 (*Triticum spp.*)、

玉米 (*Zea mays*) 等。

【实验器具】

冰箱、恒温箱、显微镜、水浴锅、电子天平、电炉、温度计、剪刀、镊子、刀片、量筒、量杯、三角瓶、烧杯、漏斗、培养皿、酒精灯、滴瓶、载玻片、盖玻片、滤纸、标签等。

【实验试剂】

无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、45%乙醇、0.075mol/L 氯化钾、0.5%醋酸洋红、0.5%苏木精液、4%铁明矾液、秋水仙素、对二氯苯、8-羟基喹啉、放线菌酮、1mol/L 盐酸、乙酸钠、45%乙酸、2.5%纤维素酶、2.5%果胶酶、加拿大树胶等。

【实验步骤】

1. 根尖培养

1) 洋葱和大蒜

对前一年收获的洋葱,可以首先将其鳞茎外部几层干枯的表皮除去,剪掉干枯的老根,充分洗净后置于盛清水的小烧杯口上,使根部与水接触。然后转移到 25~28℃ 条件下培养,每天换一次水,以防污染、烂根。一般 3~4d 即可获得实验所需材料。待根尖长到 1~1.5cm 时,在 9:00~10:00 剪取根尖约 1cm 备用。

如果使用当年刚采收的新洋葱鳞茎培养生根,则应设法打破它的休眠。常用的方法是用低浓度的赤霉素溶液浸泡洋葱鳞茎底盘,这样可以促使其生根。或把新鲜洋葱鳞茎在太阳下暴晒 20~30d,然后再用来培养生根,也能获得很好的效果。

大蒜根尖的培养方法基本上与洋葱相同。对于新收获的大蒜,也需要在太阳底下暴晒 20~30d。

2) 玉米、小麦和蚕豆

用温水将蚕豆种子浸种 2d,玉米及小麦种子浸种 1d,待吸水膨胀后转移到铺有几层吸水纸的培养皿或搪瓷盘中。上面盖双层湿纱布并加入少许水,放在 25~28℃ 条件下培养。待根尖长到 2cm 左右时,在 9:00~10:00 或 15:00~17:00 取下根尖备用。

2. 预处理

为了有利于对有丝分裂中染色体的观察和计数,在固定之前应对剪下的根尖进行预处理,这样可以改变细胞质的黏度,抑制和破坏纺锤丝的形成,促使染色体缩短和分散。预处理的方法有低温预处理和药物预处理。

1) 低温预处理

将剪取的根尖浸入盛有蒸馏水的烧杯内,置于 1~4℃ 的冰箱中进行低温处理 24h。此法效果很好,对染色体无破坏作用,染色体缩短均匀,简便易行,各种植物都适用。

2) 药物预处理

(1) 秋水仙素处理:用 0.05% 或 0.1% 秋水仙素溶液于室温、暗环境下处理根尖 2~4h,对抑制纺锤体活动效果明显,易获得较多的中期分裂相,且染色体收缩适中,有利于染色体结构的研究。秋水仙素属于剧毒药品,使用时戴口罩和眼镜,防止溶液溅入口中或眼内,如果发生此情况,应马上用自来水反复冲洗。

(2) 对二氯苯处理: 用饱和对二氯苯溶液于室温下处理根尖 3~5h, 对阻止纺锤体活动和缩短染色体效果也较好, 对染色体小而多的植物, 计数染色体制片效果更好。

(3) 8-羟基喹啉处理: 用 0.002~0.004mol/L 8-羟基喹啉溶液 18℃条件下处理根尖 5~6h, 引起细胞黏滞度的改变, 导致纺锤体活动受阻, 使中期染色体在赤道面上保持相应的排列位置。缢痕区也较为清晰。此种处理方法对中等或长染色体的植物较合适。

(4) 放线菌酮、8-羟基喹啉混合处理: 0.007%放线菌酮和 0.025% 8-羟基喹啉的混合液于 25℃条件下, 根尖不离体处理 5h 左右, 可获得大量的分裂相, 是最值得首选的预处理方法之一。

3. 固定

固定的目的是借助于物理方法或化学药剂的作用, 迅速渗入组织和细胞将其杀死, 防止细胞死亡后的变化, 防止自溶、腐败, 尽量保持生长状态结构; 使细胞中的蛋白质、脂肪、糖、酶等成分转变为不溶性物质, 以保持生前的形态; 使组织内各种物质成分产生不同的折光率, 便于观察和鉴定; 使不同组织成分对染料有不同的亲和力, 便于染色; 防止细胞过度收缩或膨胀, 失去原有的形态结构。

将预处理过的根尖用蒸馏水冲洗两次 (约 5min), 然后移入卡诺氏固定液中, 在 4~15℃条件下固定 20~24h 后, 用 70%乙醇冲洗 2 次, 转入 70%乙醇中, 在 4℃冰箱内保存, 保存时间最好不超过两个月。经过较长时间保存的材料, 进行观察前可以换用固定液再处理一次, 效果较好。或者将预处理过的根尖放入 0.075mol/L KCl 溶液中低渗 20min, 然后在蒸馏水中冲洗 2 或 3 次 (约 10min) 待用。

4. 解离

使分生组织细胞间的果胶质分解, 细胞壁软化或部分分解, 使细胞和染色体容易分散压平。解离有酸解和酶解两种方法。

1) 酸解

将根尖从固定液中取出, 用蒸馏水漂洗, 然后放入已经在 60℃水浴锅中预热的 1mol/L HCl 中, 在 60℃的恒温条件下解离 10~15min, 当根尖透明呈米黄色时取出, 用蒸馏水冲洗 2 或 3 次。

酸解的优点是制片清洁, 染色体清晰, 组织软化好, 易于压片, 还可以对染色体 DNA 的含量进行测定。其缺点是, 染色体较软, 容易缠绕, 不易分散。在加强预处理使染色体缩短的情况下, 可获得较好的效果。另外, 对小型染色体的材料效果较差。这一方法在切片、涂片上研究核及染色体时能减少细胞质着色对观察的影响。因此在细胞学研究中受到了普遍的重视。

酸解温度应保持在 $(60 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 如果温度过低或时间过短, 酸解不够, 醛基暴露不充分, 染色会过浅; 若温度过高或时间过长, 会造成酸解过度, 使 DNA 完全解聚, 糖与醛基之间的键被破坏, 游离的核酸分子会扩散到细胞质中, 从而造成染色浅或不均匀一的现象。

2) 酶解

将根尖从固定液中取出, 放在 0.1mol/L 乙酸钠中漂洗, 用刀片切除根冠及延长区 (根尖较粗的蚕豆, 可以把分生组织切成 2 或 3 片), 把根尖分生组织放到乙酸钠配制的 2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶的等量混合液中, 在 25~28℃条件下处理 4~5h, 此时组织已被酶液浸透而呈淡褐色, 质地柔软而仍可用镊子夹起, 用滴管将酶液吸掉, 再滴上 0.1mol/L 乙酸钠, 使

组织中的酶液渐渐渗出,再放入 45%乙酸。

5. 后低渗

将解离后的根尖放在蒸馏水中冲洗 2 或 3 次(约 10min)。酶解后的根尖放入蒸馏水中浸泡 10~15min,然后再冲洗 2 或 3 次。一定要冲洗干净,否则影响染色。低渗后的根尖放入 70%乙醇后备用。

6. 染色与压片

1) 醋酸洋红染色制片

取一处理好的根尖置于载玻片中间,用吸水纸吸去多余的保存液,用刀片将根尖分生组织切下,将其切成薄片,加一小滴醋酸洋红染色液,约 5min 后加盖玻片,用吸水纸放在盖玻片上面,左手按住载玻片,用右手拇指在吸水纸上对准根尖部位施加压力,或用铅笔的橡皮头轻敲盖玻片即可,使材料均匀分散,细胞分离压平。压力要适当,注意不要移动盖玻片。为增强染色效果,可将载玻片在酒精灯上稍加热,但不使其沸腾,以免染料沉淀。加热不仅可以使材料软化和易于着色,而且可以破坏部分细胞质,使核和染色体有一个比较清晰的背景。如果整个细胞染色较浅,可沿盖玻片一侧,滴加少许染色液,使其慢慢渗入,放置片刻再进行加热,如此反复进行染色。

醋酸洋红常用于染色体的临时制片,其着色不强,分色效果也不甚佳,故不宜制作永久制片。

2) 醋酸地衣红染色制片

由于地衣红很容易溶于乙醇,材料从保存液中取出后,应当充分洗净后浸入 45%乙酸中再进行染色。染色时,将材料置一小试管中,加入含盐酸的 2%地衣红使材料浸没,在酒精灯上加热 3~5s,静置约 0.5h 或更长时间,取出材料置载玻片上,加一滴不含盐酸的 1%醋酸地衣红染色液,如醋酸洋红法操作进行压片。地衣红染色液染色,着色力比洋红强,染色较深,尤其对根尖等体细胞染色体的染色比洋红更显优越。

3) 铁明矾-苏木精染色制片

这是用在根尖细胞有丝分裂染色体计数中效果最好的一种方法,对各种植物的染色体均可染上较深的颜色,分色清晰,照相效果较好,利于标本长期保存。

将解离冲洗后的材料置于 4%的铁明矾水溶液中染色 2~4h,如加温(30~40℃)媒染,则可缩短至 0.5~1h。换水洗涤 4 或 5 次,每次约 5min,务必将残留的铁明矾充分洗净。再置于 0.5%苏木精水溶液中染色 2~4h。如在染色时发现染色液混浊,则表示铁明矾未洗净,需重新放入水中洗涤后再行苏木精染色。染色后的材料用水冲洗 5~10min,移入 45%的乙酸内进行分色和软化 10~20min,方可压片。压片时,用镊子取根尖置于载玻片上,切下根尖分生组织,将其切成薄片,滴一小滴 45%的乙酸,迅速捣碎根尖,加盖玻片压片,具体方法同醋酸洋红法。

铁明矾-苏木精染色时,媒染要充分,媒染后水洗要彻底,在此基础上,苏木精染色也要充分,乙酸分色软化要适宜,使染色体呈深蓝色,而细胞质褪淡。

7. 镜检

压好的片子先在低倍镜下观察,可观察到有丝分裂过程中不同分裂时期的染色体(图 1-1)。选取不同分裂时期的典型细胞,换高倍镜观察,注意细胞核及染色体、纺锤体等的变化动态。

8. 制作永久片

详细操作见实验 2。

【实验结果】

洋葱根尖有丝分裂的典型时期见图 1-1。

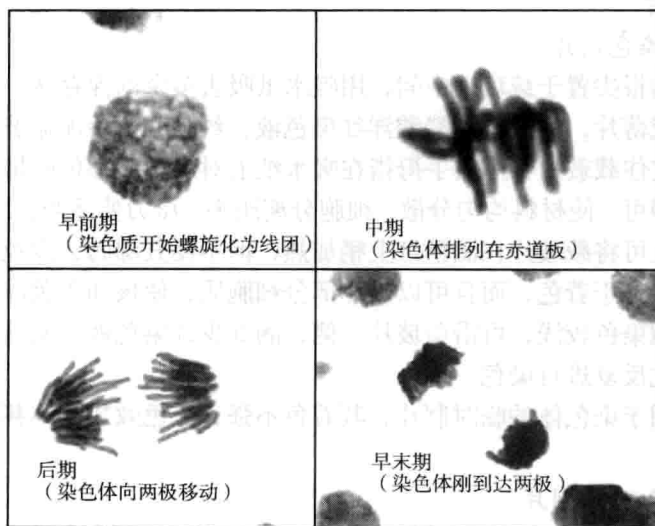


图 1-1 洋葱根尖有丝分裂的典型时期

【实验作业】

1. 制作 1 或 2 张合格的有丝分裂玻片标本, 交 1 或 2 张注明分裂时期及染色方法的永久制片。
2. 绘制 2~4 张有丝分裂时期的简图。

实验 2

植物减数分裂中染色体行为观察

【实验目的】

1. 了解高等植物细胞减数分裂过程，观察染色体的动态变化。
2. 掌握制备植物细胞减数分裂玻片标本的技术和方法。

【实验原理】

减数分裂是生物在形成性细胞过程中的一种特殊的细胞分裂方式，在此过程中先由有性组织（花药或胚珠）中的某些细胞分化为二倍性的小孢子母细胞或大孢子母细胞，这些细胞连续进行两次细胞分裂，即减数第一次分裂和减数第二次分裂。结果一个小孢子母细胞形成4个小孢子，一个大孢子母细胞形成一个大孢子，它们都只具有单倍的染色体。

减数分裂在遗传上具有重要意义。性母细胞（ $2n$ ）经过减数分裂形成染色体数目减半的配子（ n ）。经过受精作用，雌雄配子融合为合子，染色体数目恢复 $2n$ 。这样在物种延续的过程中确保了染色体数目的恒定，从而使物种在遗传上具有相对的稳定性。另外，在减数分裂过程中包含有同源染色体的配对、交换、分离和非同源染色体间的自由组合，这些都是遗传学分离、自由组合和连锁互换定律的细胞学基础。在这些基本规律的作用之下，各种遗传重组发生，而遗传重组又是生物变异的重要源泉。

【实验材料】

蚕豆（ $2n=12$ ）花药、玉米（ $2n=20$ ）花药、小麦（ $2n=42$ ）花药、大葱（ $2n=16$ ）花药、洋葱（ $2n=16$ ）花药、番茄（ $2n=24$ ）花药等。

【实验器具】

显微镜、镊子、解剖针、载玻片、盖玻片、大培养皿、酒精灯、吸水纸等。

【实验试剂】

无水乙醇、乙酸、醋酸洋红染液、石蜡、二甲苯、固定液（甲醇：冰醋酸=3：1）、加拿大树胶、正丁醇或叔丁醇等。

【实验步骤】

1. 取材

想得到好的、分裂相比较多的材料,取材时间的掌握和植株一些外部形态指标的观察非常重要。不同的植物取材时间和外部形态指标不一样,需要认真把握。

1) 玉米

北方的玉米在5月取材,时间以8:30为好;夏玉米一般在7月取材,以7:00~8:00为好。在玉米雌穗抽出前的7~10d,手摸植株上部(喇叭口下部)有松软感觉,表明雄花序即将抽出。用刀在顶叶近喇叭口处纵向划一刀,切口长10~15cm,剥出雄花序,顶端花药长3~5mm,花药尚未变黄时取材。

2) 蚕豆

从现蕾开始,10:00~11:00可选取2~3mm大小的花蕾或一小段花序。蚕豆开花的次序是由下而上,由外而内。

3) 小麦

在植株开始挑旗,旗叶与下一叶片的叶耳间距为3~4cm,花药长度为1.5~2.0mm,呈黄绿色时取材最好。如花药为绿色时取材则为时过早,花药为黄色,则已过时。7:00~8:00为最佳取材时间。

4) 大葱

在北方地里越冬的大葱,第二年春季3~4月长出花序,待花序长出,颜色呈绿色,花蕾长度为3~4mm,花药长度为1~1.1mm时取材。9:00~10:00为最佳取材时机。

5) 洋葱

4~5月长出花序,同上。

6) 番茄

5~9月均可取材,时间以8:30~9:30为好,花蕾以3~4mm为宜(番茄花期持续时间长,可随时取材)。

2. 固定

通常制作幼小花药压片时,可不经固定,直接放在醋酸洋红染液中,同时进行固定和染色,但是先经固定的材料容易着色、分色且便于保存。固定时将采集的材料置于固定液12~24h,若不及时制片,可将固定后的材料用70%的乙醇冲洗直至闻不到乙酸味为止,后放入70%乙醇中存于4℃冰箱内,可随时取用。

3. 染色制片

用蒸馏水将从固定液或从70%乙醇保存液中取出的花蕾冲洗数遍,然后剥开花蕾,放在载玻片上,用解剖针及刀片把花药横切成3或4段(或纵切),加一滴醋酸洋红染液于材料上,用解剖针轻压花药,使花粉母细胞从切口被挤出来,静置染色5~10min,除去花药壁。加上盖玻片,使染液刚好布满载玻片与盖玻片之间,成一薄层(不可过多,过多花粉母细胞会溢出盖玻片边缘),加上盖玻片后,在酒精灯上轻微加热,以利于进一步着色和染色体的分散。在盖玻片上覆以吸水纸用拇指适当加压。把周围的染液吸干(勿使盖玻片移动),若细胞质染色过深,可在盖玻片的一边滴加45%的乙酸,在另一边用吸水纸吸,让乙酸从盖玻片下流过,减轻细胞质的着色程度。

4. 镜检

在显微镜下查找花粉母细胞、二分体、四分体、花粉粒及减数分裂各个时期的细胞。

5. 制作永久片

较好的临时压片，可制成永久玻片标本或半永久玻片标本。

1) 永久玻片标本

将已制好的玻片浸入盛有 95%乙醇和乙酸各半的培养皿中，有盖玻片的一面朝下，载玻片的一端架在玻璃棒上使其倾斜，盖玻片自动脱落后立即把盖玻片和载玻片转入盛有 95%乙醇的培养皿中 3~5min，再转入盛有 95%乙醇和叔丁醇各半的培养皿中 3~5min，最后在叔丁醇中 3~5min 进行脱水、透明，脱水后用溶于叔丁醇的加拿大树胶封片。

由于正丁醇价格较便宜，因此也可用正丁醇代替叔丁醇。操作过程是将制好的临时玻片以同样的方法浸入盛有 95%乙醇和 45%乙酸各半的培养皿中 5~6min，并滴加几滴正丁醇，依次再移入 95%乙醇中 1~2min；95%乙醇和正丁醇各半的培养皿中 2~5min；正丁醇中 1~2min，最后吸去多余的正丁醇，用溶于正丁醇的加拿大树胶封片。

2) 半永久玻片标本

永久玻片标本制作过程较繁琐，容易导致细胞分裂图像的损坏，因此，在得到较好的玻片标本时也可以先制成半永久玻片标本。左手拇指和食指平捏握载玻片，右手拿解剖刀在酒精灯上稍微加热，加热的解剖刀在固体石蜡上轻轻划一下，然后将熔化在刀锋上的石蜡划在盖玻片的四周。

注意：玉米花粉母细胞大而圆，壁薄。花药颜色变黄，则其中均为花粉粒。在小而绿的花药中才有处于减数分裂的细胞。

【实验结果】

细胞的减数分裂包括减数第一次分裂（减数分裂Ⅰ）和减数第二次分裂（减数分裂Ⅱ）。

1. 减数分裂Ⅰ

1) 前期Ⅰ

细线期：染色体很细很长，呈细线状在核内交织成网。每条染色体含两个染色单体，但显微镜下看不到双线结构，染色体呈丝状结构。

偶线期：染色体的形态与细线期差别不大，同源染色体配对，形成二价体，每个二价体有两个着丝粒，染色丝比细线期稍粗。

粗线期：染色体螺旋化，进一步缩短变粗，显微镜下可明显看到每条染色体的两个姊妹染色单体。二价体由 4 个姊妹染色单体和两个着丝粒组成，这时非姊妹染色单体间可能有交换发生。

双线期：染色体进一步螺旋化，变得更为粗短，更为清晰可见，二价体中的两条同源染色体相互分开出现交叉现象，呈“X”、“V”、“∞”、“O”等形状。

终变期：染色体高度浓缩，染色体均匀分散在核膜附近。此时是检查染色体数目的最好时期，核内有多少个二价体，说明有多少对同源染色体。核仁和核膜在前期Ⅰ始终存在，在终变期时核仁、核膜开始消失。

2) 中期Ⅰ

核仁、核膜消失，二价体均匀排列在赤道面上，纺锤体形成。从纺锤体的侧面看，一个

个二价体就像一列横队排列在细胞中，从纺锤体的极面看，一个个二价体分散在细胞质中。这时也是染色体计数的好时期。

3) 后期 I

二价体的两个同源染色体分开，由纺锤丝拉向两极。染色体又变成了染色丝状。

4) 末期 I

同源染色体分别到达细胞两极，染色体变成了染色质状，核膜、核仁重新出现，形成两个子核，每个子核染色体数目减半为 n 。同时细胞质分开形成两个子细胞，即二分体，见图 2-1。

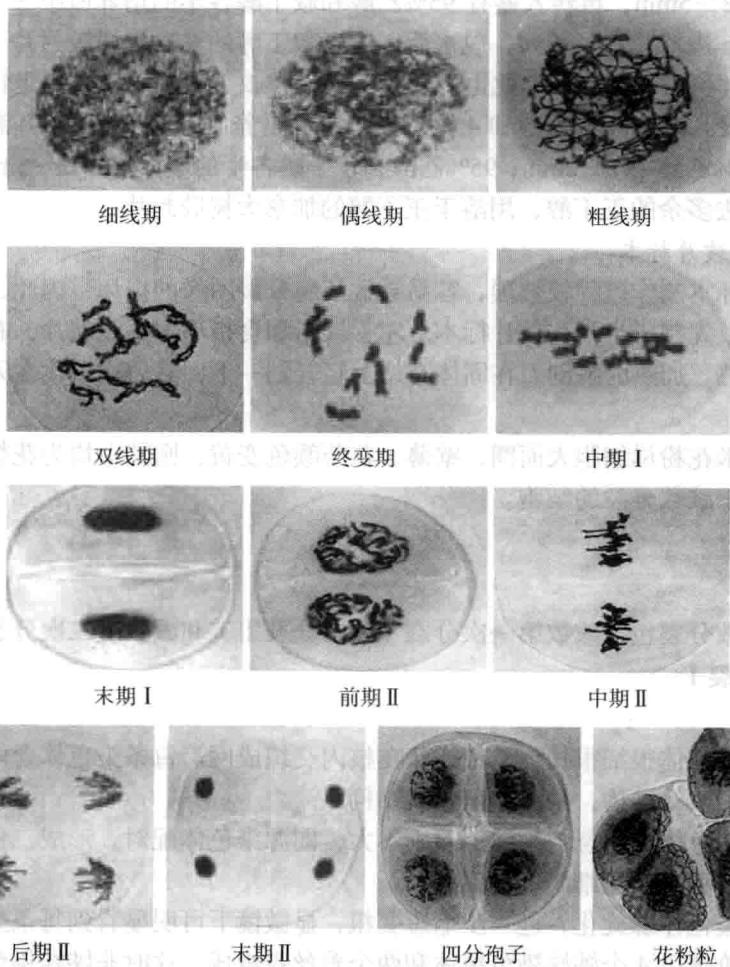


图 2-1 百合花粉母细胞减数分裂过程

2. 减数分裂 II

1) 前期 II

染色体呈染色丝状，每条染色体具两个姊妹染色单体，共用一个着丝粒，二者间有明显互斥作用（分开趋势）。前期 II 快结束时核膜消失。

2) 中期 II

染色体排列在赤道面上，每条染色体有两条染色单体和一个着丝粒。