

水产动物

遗传育种学实验指导

• 李雅娟 主编 •

中国农业科学技术出版社

水产动物

遗传育种学实验指导

• 李雅娟 主编 •



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

水产动物遗传育种学实验指导 / 李雅娟主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2012. 7

ISBN 978 - 7 - 5116 - 1011 - 9

I. ①水… II. ①李… III. ①水生动物 - 遗传育种 - 实验 - 教材
IV. ①S917. 4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 164506 号

责任编辑 李 雪 朱 绯

责任校对 贾晓红 范 潇

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106626(编辑室)(010)82109704(发行部)

(010)82109709(读者服务部)

传 真 (010) 82109707

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 10

字 数 260 千字

版 次 2012 年 7 月第 1 版 2012 年 7 月第 1 次印刷

定 价 21.00 元

《水产动物遗传育种学实验指导》

编委会

主 编 李雅娟 （大连海洋大学水产与生命学院）

副主编 （按姓氏首字母顺序排列）

蔡明夷 （集美大学水产学院）

仇雪梅 （大连海洋大学水产与生命学院）

田 焱 （大连海洋大学水产与生命学院）

前 言

水产动物遗传育种学是水产养殖专业重要的专业课之一，实验课是理论联系实际、培养和训练学生掌握科学思维方法、实事求是的科学态度与独立的科研动手能力之重要环节和手段。本实验教材是在总结编者长期的工作经验的基础上，广泛吸取兄弟院校遗传育种学的宝贵经验，并参阅有关文献资料，进一步整理编写而成的。

根据水产动物遗传育种学的教学内容和要求，本教材包括 34 个实验，主要有两部分：第一部分遗传学实验，共 31 个实验，涵盖经典遗传学、细胞遗传学、分子遗传学及数量与群体遗传学等领域；第二部分水产动物育种学实验，共 3 个实验。同时，为了便于实验的准备，另在最后列出 6 个附录，以供参阅使用。水产动物遗传育种学实验目的主要有两方面：一方面验证遗传学的基本规律，帮助理解和记忆遗传学的基本理论；另一方面学习和掌握水产动物遗传育种学研究的基本操作技能，为将来从事水产动物遗传育种研究或继续深造打下良好基础。

本书在编写过程中参阅了国内外部分《遗传学实验》及育种学资料，对于编写助益良多，谨此致谢。本书可供水产养殖、水生生物等专业的本科学生使用，也可供水产动物遗传育种学方面的科研工作者参考使用。

由于可供参考的资料有限，加之编者水平有限，时间仓促，错误和欠妥之处在所难免，恳请使用本实验指导的同志批评指正，以便补充修改。

编 者
2012 年 5 月

目 录

第一部分 遗传学实验

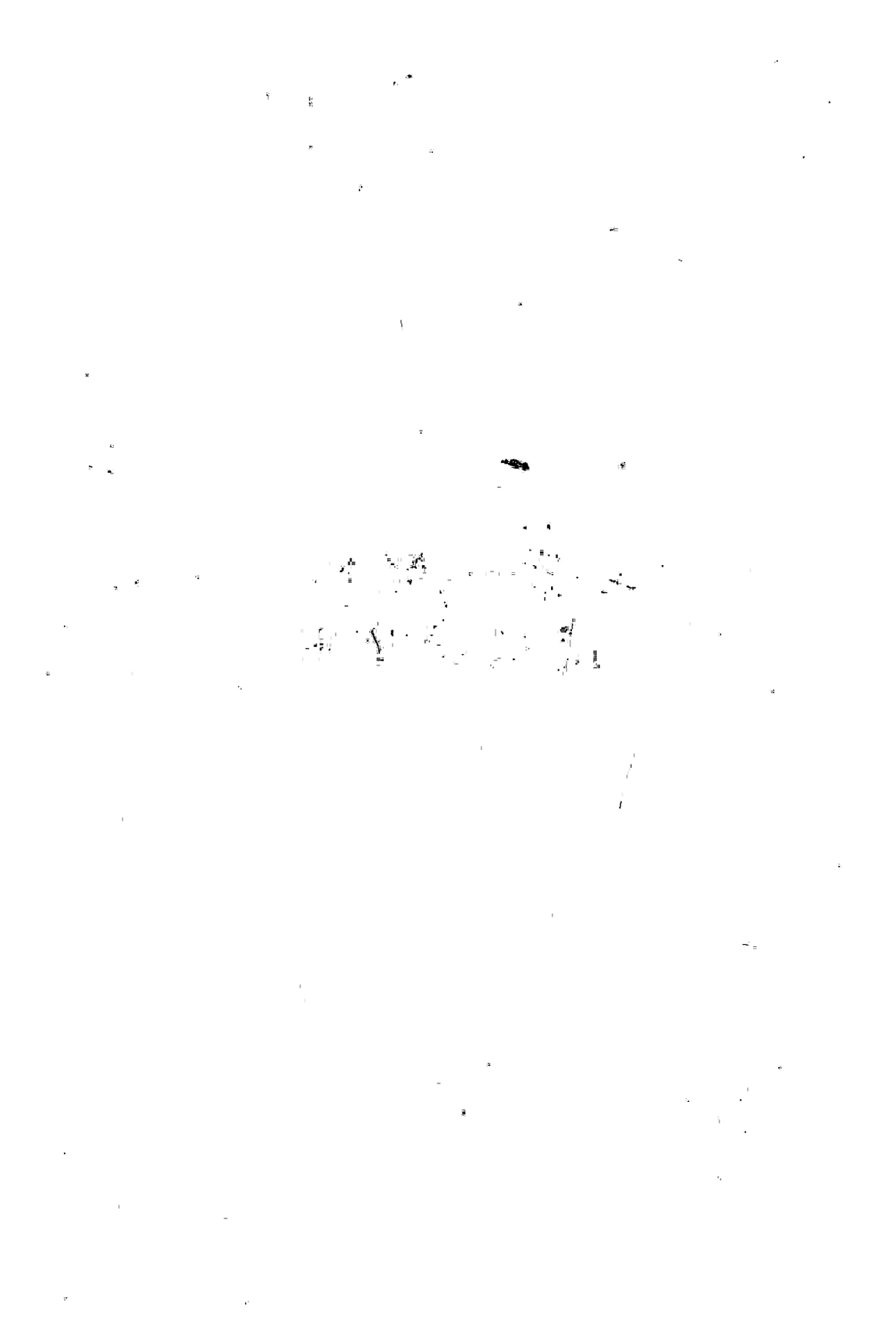
第一章 经典遗传学实验	(3)
实验一 果蝇饲养和遗传性状的观察	(3)
实验二 果蝇唾腺染色体标本的制备和观察	(9)
实验三 果蝇的单因子杂交实验	(12)
实验四 果蝇的两对因子杂交	(15)
实验五 果蝇的三点测交与遗传作图	(18)
实验六 果蝇的伴性遗传分析	(22)
第二章 细胞遗传学实验	(26)
实验七 有丝分裂过程中染色体行为的观察	(26)
实验八 减数分裂过程中染色体行为的观察	(29)
实验九 鱼类鳃细胞染色体标本的快速制备及观察	(35)
实验十 鱼类外周血淋巴细胞短期培养及染色体制备技术	(38)
实验十一 鱼类染色体核型分析	(43)
实验十二 植物多倍体的诱导及鉴定	(47)
实验十三 鱼类间期核和中期染色体核仁组织区的银染和观察	(50)
实验十四 水产动物 CMA ₃ /DA/DAPI 三重荧光染色	(52)
实验十五 水产动物细胞染色体荧光原位杂交技术	(55)
实验十六 染色体显带技术及带型分析	(61)
实验十七 鱼类染色体复制带技术	(64)
实验十八 姐妹染色单体分染技术	(68)
实验十九 诱变物质的微核测试	(71)
第三章 分子遗传学实验	(75)
实验二十 牡蛎肌肉组织总 DNA 的提取 (苯酚—氯仿抽提法)	(75)
实验二十一 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(78)
实验二十二 牙鲆肌肉组织 RNA 的提取 (Trizol 法)	(81)
实验二十三 聚合酶链式反应	(83)

实验二十四	质粒 DNA 的抽提的原理和方法	(86)
实验二十五	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) 转化实验	(90)
实验二十六	单链构象多态性 (SSCP) 分析	(93)
第四章	数量与群体遗传学实验	(98)
实验二十七	数量性状统计分析	(98)
实验二十八	数量性状遗传力的估计	(101)
实验二十九	数量性状遗传相关的估计	(109)
实验三十	群体遗传平衡分析及等位基因频率、基因型频率的估计	(113)
实验三十一	群体杂种优势的测定	(116)

第二部分 水产动物育种学实验

实验三十二	鱼类多倍体的诱导和观察	(123)
实验三十三	鱼类红细胞 (核) 大小测量	(128)
实验三十四	人工诱导鱼类雌核发育及鉴定方法	(132)
附录 A	可用做遗传学实验材料的水产动物	(137)
附录 B	常用试剂的配制方法	(139)
附录 C	染色体标本制备, 显微镜使用、观察记录	(147)
附录 D	χ^2 检验	(149)

第一部分
遗传学实验



第一章 经典遗传学实验

实验一 果蝇饲养和遗传性状的观察

【实验目的】

1. 了解果蝇生活史中各个不同阶段的形态特点；
2. 掌握雌、雄果蝇主要性状差异和几种常见果蝇突变类型的主要性状特征；
3. 掌握实验果蝇的饲养、管理方法和技术。

【实验原理】

果蝇 (Fruit fly) 是双翅目 (Diptera) 昆虫, 属果蝇属 (*genus Drosophila*), 约有 2 500 个种。通常用作遗传学实验材料的是黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)。果蝇中有许多突变类型, 据不完全统计突变性状有 400 多种, 这些突变型大多属于形态突变, 如白眼、残翅、黄体等, 因此很容易进行观察。由于果蝇具有多线染色体以及生活史不同发育阶段的特征, 染色体数目少等特点使其成为遗传学研究中的模式生物, 同时在遗传学研究中得到广泛而深入的研究。

果蝇作为实验材料有许多优点:

1. 果蝇体型小, 在培养瓶内易于人工饲养。在常温下, 以玉米粉等作饲料就可以生长、繁殖。
2. 生长迅速、繁殖力很强, 在适宜的温度和营养条件下每只受精的雌蝇可产卵 400 枚左右, 每两周就可完成 1 个世代, 因此, 在短时间内就可以获得大量的子代, 便于遗传学分析。
3. 染色体数目少, 只有 4 对。
4. 唾液腺染色体制作容易。横纹清晰, 是细胞学观察的好材料。
5. 突变性状多, 而且多数是形态突变, 便于观察。

雌、雄果蝇在外部形态上存在差别, 可以通过观察果蝇的形态判断其性别, 用于杂交实验。果蝇的饲养和管理需要在一定的条件下完成。

【实验材料】

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 及其几种常见果蝇突变类型 (白眼、黄体、黑檀体、残翅等果蝇)。

纯系果蝇:

野生型 (+ +) 灰身, 红眼, 长翅;

白眼 (X^wX^w , X^wY) 灰身, 白眼, 长翅;
 黑檀体 (ee) 黑檀体, 红眼, 长翅;
 残翅 ($vgvg$) 灰身, 红眼, 残翅。

【实验内容】

1. 果蝇的生活史 (图 1-1)

果蝇的一生经历卵、幼虫、蛹、成虫 4 个阶段。果蝇的生活周期长短与温度关系密切。30℃ 以上的温度能使果蝇不育和死亡, 低温则使它的生活周期延长, 同时生活力也降低, 果蝇培养的最适温度为 20 ~ 25℃。

从表 1-1 中可以看出, 25℃ 时, 从卵到成虫约 10d; 在 25℃ 时成虫约活 15d。

表 1-1 果蝇在不同温度下发育所需时间

阶段	10℃	15℃	20℃	25℃
卵→幼虫			8d	5d
幼虫→成虫	57d	18d	6.3d	4.2d

卵: 羽化后的雌蝇一般在 12h 后开始交配, 两天后才能产卵。卵长 0.5mm, 为椭圆形, 腹面稍扁平, 在背面的前端伸出一对触丝, 它能使卵附着在食物 (或瓶壁) 上, 不致深陷到食物中去。

幼虫: 从卵孵化出来后, 经过两次蜕皮, 发育成三龄幼虫, 此时体长可达 4 ~ 5mm。肉眼可见其前端稍尖部分为头部, 上有一黑色斑点即为口器。口器后面有一对透明的唾液腺, 透过体壁可见到一对生殖腺位于躯体后半部上方的两侧, 精巢较大, 外观上是一明显的黑点, 而卵巢则较小, 可以此作为鉴别。幼虫活动力强而贪食, 它们在培养基上爬行时, 留下很多条沟, 沟多而且宽时, 表明幼虫生长良好。

蛹: 幼虫生活 7 ~ 8d 准备化蛹, 化蛹前从培养基中爬出, 附着在瓶壁上, 逐渐形成一梭形的蛹。在蛹前部有两个呼吸孔, 后部有尾芽, 起初蛹壳颜色淡黄而柔软, 以后逐渐硬化, 变为深褐色, 表明即将羽化了。

成虫: 幼虫在蛹壳内完成成虫体型和器官的分化, 最后从蛹壳前端爬出。刚从蛹壳里羽化出来的果蝇虫体比较长, 翅膀尚未展开, 体表尚未完全几丁质化, 故呈半透明的乳白色。透过腹部体壁, 可以看到黑色的消化系统。不久, 变为短粗圆形, 双翅展开。体色加深。如野生型初为浅灰色, 然后呈灰褐色。

2. 果蝇的形态观察

果蝇身体可以分为头部、胸部和腹部 3 部分。

头部: 有 1 对复眼, 3 个单眼和 1 对触角。

胸部: 有 3 对足, 1 对翅和 1 对平衡棒。

腹部: 背面有黑色环纹, 腹面有腹片, 外生殖器在腹部末端, 全身有许多体毛和刚毛。

(1) 雌雄成蝇的鉴别: 为了准确地配制果蝇的杂交组合和果蝇遗传性状分析, 必须首先能够正确辨别果蝇的性别。

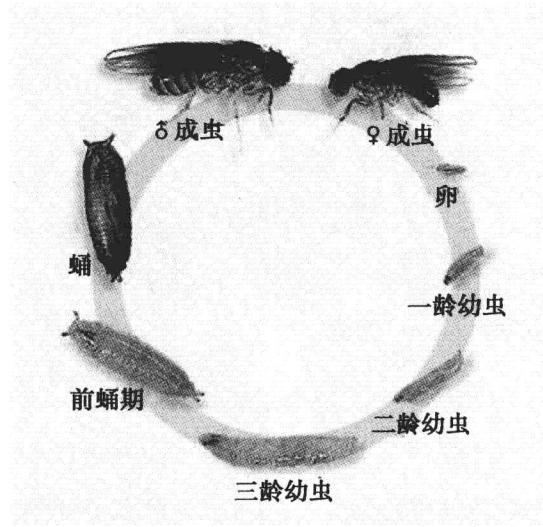


图 1-1 果蝇的生活史示意图

为了便于性状观察和转移果蝇，要对果蝇实施麻醉，麻醉时一定要根据实验目的而确定麻醉的深度。如果只是进行观察，可以将果蝇麻醉至死。死亡时表现为翅膀与身体呈45°角。但如果是麻醉鉴别后再进行转移培养，就应避免麻醉至死。麻醉时，在麻醉瓶的瓶盖内塞入沾有乙醚的棉花，待乙醚气体在瓶内充满后将果蝇培养瓶的瓶口与麻醉瓶口对准，将果蝇转入麻醉瓶内，盖好瓶盖。观察果蝇的表现，若果蝇从瓶壁上纷纷落到瓶底，表示麻醉已生效。转移麻醉后的果蝇时，应用毛笔的笔尖粘取。

将麻醉后的同一批次的果蝇放在解剖镜下仔细观察，鉴别雌雄的差异（图 1-2，图 1-3）。

可以着重从以下几方面（表 1-2）观察雌、雄果蝇的主要差异。

表 1-2 雌、雄果蝇主要差异比较

雌果蝇	雄果蝇
体形较大	体形较小
腹部椭圆形，末端稍尖	腹部末端钝圆
腹部背面有明显的 5 条黑色条纹	腹部背面有 3 条黑色花纹，前两条细，后 1 条宽且延续至腹面
腹部腹面有明显的 6 个腹片	4 四个腹片
无性梳	第一对跗节基部的一节有性梳
外生殖器外观比较简单	外生殖器外观较复杂，刚羽化的幼蝇用低倍镜可明显观察到生殖弧、肛口板及阴茎

在雌雄差异中，以性梳的差异最为准确。如刚羽化出的果蝇，身体都较长，颜色很浅。但是，用性梳的有无就可以很快将雌雄分开，在熟练操作几次后，就可以不必借助解剖镜也能很快区分雌雄。在观察性梳时可以用解剖镜观察，也可以用低倍的显微镜观察。

(2) 突变型的观察（图 1-4，图 1-5）：将果蝇麻醉后，在解剖镜下仔细辨认各种

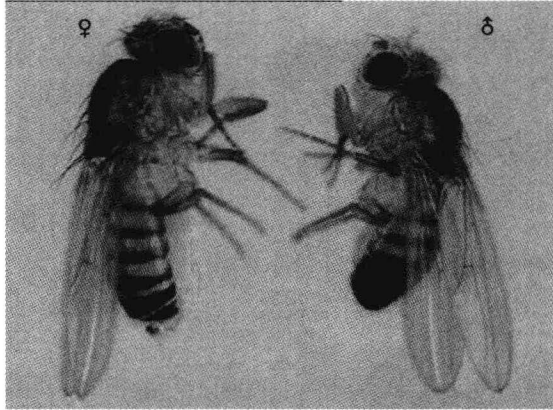


图 1-2 野生雌雄果蝇的外部形态特征

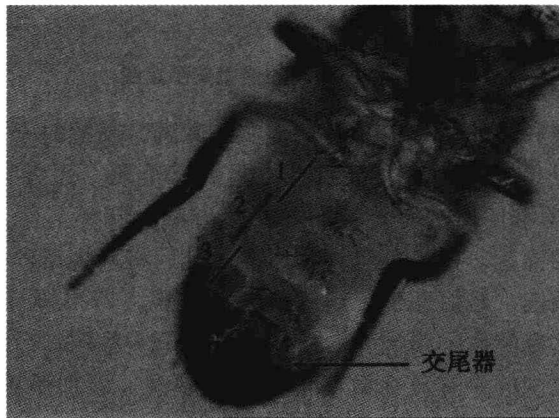


图 1-3 果蝇的腹部交尾器和体节 (4 个腹片)

突变类型。与野生型果蝇作对照，观察突变型果蝇的性状表现，如残翅、黑身、黄身、白眼等。经过一段时间的练习，可以直接区别各种不同性状。

果蝇中的一些突变性状和控制该性状的基因见表 1-3。

表 1-3 果蝇的一些突变性状及控制该性状的基因

突变型	基因符号	表现特征	基因所在染色体
白眼	w	复眼白色	X
棒眼	B	复眼条形	
	bw	小眼数少	X
褐色眼	st	复眼褐色	II
猩红眼	c	复眼猩红色	III
黑檀体	y	身体乌木色	IV
黄体	sn	身体浅橙黄色	X
焦毛		刚毛卷曲烧曲焦状	X

(续表)

突变型	基因符号	表现特征	基因所在染色体
黑体	b	颜色比黑檀体深	II
匙形翅	nub2 vg	翅小匙状	II
残翅	Cy	翅退化, 不能飞	II
翻翅	m	翅向上翻卷, 纯合致死	II
短翅		翅膀短小, 不超过身体	X

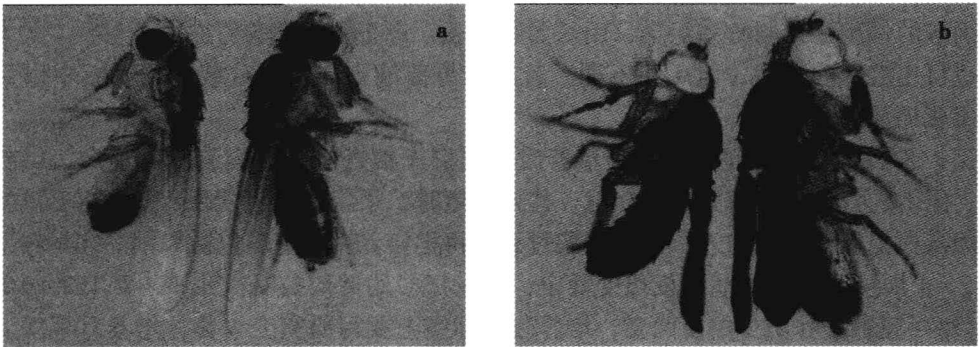


图 1-4 野生果蝇及眼色突变体的外部形态图
a: 红眼果蝇 b: 眼色突变体的白眼果蝇

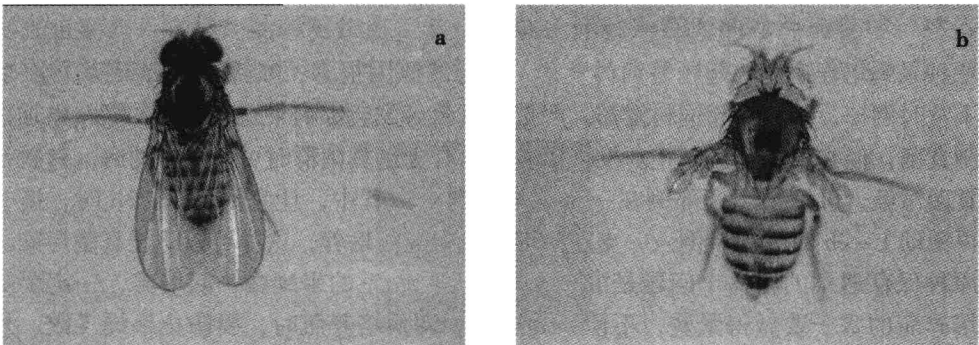


图 1-5 果蝇翅形的外部形态图
a: 正常果蝇翅形 b: 翅形突变体的残翅果蝇

3. 果蝇的饲养、管理

(1) 培养瓶的处理: 培养果蝇用的培养瓶可用牛奶瓶或大、中型指管, 用海绵或纱布包的棉花球作瓶塞。实验室中保存原种以及杂交实验以中指管为宜。培养瓶用前要消毒, 而后再装饲料 (每瓶 2cm 厚即可), 待饲料冷却后, 用酒精棉花擦瓶的内壁, 然后插入消毒过的吸水纸, 作幼虫化蛹时的干燥场所。

(2) 果蝇饲料的配制: 果蝇是以酵母菌作为主要食料的, 因此, 实验室内凡能发酵的基质, 都可用作果蝇饲料。常用的饲料有玉米饲料、米粉饲料、香蕉饲料等。

附：果蝇玉米培养基的配置（1 000ml 用量）

玉米面	红糖	琼脂	干酵母	正丙酸
85g	65g	8.5g	7g	5ml

①取应加水量的二分之一，加入琼脂，煮沸，使充分溶解，加糖，煮沸溶解。

②取另一半水混和玉米粉，加热，调成糊状。

③将上述两者混和，煮沸。以上操作都要搅拌，以免沉积物烧焦。

④待稍冷后加入酵母粉及丙酸，充分调匀，分装。按附表用量配制，可得饲料 200ml 左右。

丙酸的作用是抑制霉菌污染，用量参照附表，每 200ml 饲料约加 1ml 左右。如无酵母粉，也可用酵母液代替，但用法不同。若用酵母菌液则在饲料分装到培养瓶中以后再加入，每瓶加数滴。

(3) 原种培养：在作新的留种培养时，应事先检查一下果蝇有没有混杂，以防原种丢失。亲本的数目一般每瓶 5~10 对，移入新瓶时，须将培养瓶横卧，然后用毛笔将麻醉的果蝇从白瓷板上轻轻扫入，待果蝇醒过来后再把培养瓶竖起，以防果蝇黏在饲料上。原种每 2~4 周换一次培养基（依温度而定，10~15℃ 约 4 周换一次，20~25℃ 约两周换一次）。每一原种培养至少保留两套，培养瓶的标签上要写明突变名称，培养日期等。作原种培养温度可控制在 10~15℃，培养时避免日光直射。

果蝇在适宜条件下产生子代，在肉眼能看到幼虫时就可把亲本倒掉，几天以后，新的成蝇便产生。待成蝇有了足够保种的数量后，要调换培养瓶，作为下一代的亲本，继续培养。

原种果蝇培养遇到的问题是饲料发霉。发霉的原因很多，如用具没有灭菌，空气污染，亲本不及时倒掉，都会引起饲料发霉。严重的真菌污染会影响果蝇的生长。饲料中加丙酸可以抑制真菌，但并不能完全制止。发现培养瓶中有少量真菌群时可用烧过的解剖针挑出。若大量真菌污染，可把果蝇全部倒在一个消毒过的空试管中，让它活动 2~3h 时，换一支试管，再活动 1~2h 时，而后倒入一支新的培养瓶中继续培养，这样可以防止真菌污染。

原种保存遇到的另一个问题是混杂，几个不同品系的果蝇在一起培养，一定要防止混杂。培养瓶的塞子要做得紧些，不使果蝇逃出。调换培养瓶时，要防止果蝇飞散。外逃的果蝇要打死。发现了混杂的原种，要根据原种果蝇的全部特征，挑出数对雌雄蝇饲养，进行筛选直到完全没有分离为止。这样做，费时费力，只是在不得已时才采用。一般混杂时，只要方便，可以重新引种，将混杂种弃去。

【实验作业】

绘制雌、雄果蝇成体形态图，并注明差异点。

【思考题】

1. 果蝇突变体在遗传发育研究中的作用是什么？如何获得突变体？
2. 用果蝇作为研究遗传学的实验材料的优点有哪些？

3. 果蝇的生活史分几个阶段，你所观察到的不同类型的果蝇在整个生活史阶段有什么差异？

4. 配制果蝇培养基时应注意什么问题？

【参考文献】

[1] <http://flybase.bio.indiana.edu>

[2] 张文霞，戴灼华．遗传学实验指导 [M]．北京：高等教育出版社，2006．

(仇雪梅)

实验二 果蝇唾腺染色体标本的制备和观察

【实验目的】

1. 掌握分离果蝇三龄幼虫唾腺的技术；
2. 学习唾腺染色体的制片方法；
3. 观察了解果蝇唾腺染色体特征。

【实验原理】

本世纪初，D. Kostoff 用压片法首先在 *D. melanogaster* 果蝇幼虫的唾腺细胞核中发现了特别巨大的染色体——唾腺染色体（图 1-6）。事实上，双翅目昆虫（如摇蚊、果蝇等）的幼虫期都具有很大的唾腺细胞，其中的染色体就是巨大的唾腺染色体。这些巨大的唾腺染色体具有许多重要特征，为遗传学研究的许多方面，如染色体结构、化学组成、基因差异表达等提供了独特的研究材料。

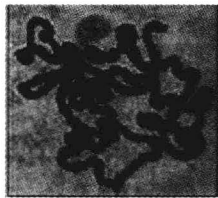


图 1-6 果蝇三龄幼虫的唾液腺染色体

双翅目昆虫的整个消化道细胞发育到一定阶段之后就不再进行有丝分裂，而停止在分裂间期。但随着幼虫整体器官以及这些细胞本身体积的增大，细胞核中的染色体，尤其是唾液腺染色体仍不断地进行自我复制而不分开，经过许多次的复制形成约 1 000 ~ 4 000 拷贝的染色体丝，合起来达 $5\mu\text{m}$ 宽， $400\mu\text{m}$ 长，比普通中期相染色体大得多（约 100 ~ 150 倍），所以又称为多线染色体和巨大染色体。

唾液腺染色体形成初期，其同源染色体即处于紧密配对状态，这种状态称为“体细胞联会”。在以后不断的复制中仍不分开，由此成千上万条核蛋白纤维丝合在一起，紧密盘绕。所以配对的染色体只呈现单倍数。黑腹果蝇的染色体数为 $2n = 2 \times 4$ ，其中第 II、

第Ⅲ染色体为中部着丝粒染色体，第Ⅳ和第Ⅰ（X染色体）染色体为端着丝粒染色体。而唾液腺染色体形成时，染色体着丝粒和近着丝粒的异染色质区聚于一起形成一个染色中心，所以在光学显微镜下可见从染色体中心处伸出6条配对的染色体臂，其5条为长臂，1条为紧靠染色中心的很短的臂。

由于唾腺细胞在果蝇幼虫时期一直处于细胞分裂的间期状态，所以每条核蛋白纤维丝都处于伸展状态，因而不同于一般有丝分裂中期高度螺旋化的染色体。唾腺染色体经染色后，呈现深浅不同，疏密各异的横纹（band）。这些横纹的数目、位置、宽窄及排列顺序都具有种的特异性。研究认为这些横纹与染色体的基因是有一定关系，而一旦染色体上发生了缺失、重复、倒位、易位等，也可较容易地在唾腺染色体上观察识别出来。可见唾腺染色体技术是遗传学研究中一项基本的技术。

【实验材料】

黑腹果蝇三龄幼虫。

【实验器材】

双筒解剖镜、显微镜、镊子、小烧杯、解剖针、载玻片、盖玻片、滤纸、生理盐水、醋酸洋红染液。

【实验步骤】

1. 三龄幼虫的饲养

黑腹果蝇容易饲养，也易获唾腺，为获得理想的染色体制片标本，需要采用生长良好、形体肥大的三龄幼虫（图1-7），以保证唾腺发育良好。所以饲养条件稍别于一般杂交饲养。

（1）饲料要求松软，含水量较高，营养丰富，发酵良好。可采用下列配方：

玉米粉100g、红糖130g、琼脂10g、酵母粉20g、苯甲酸0.75g、丙酸3ml、加蒸馏水1200ml。

（2）在接种出现一龄幼虫后，将成虫移去，在饲料表面滴加低浓度的酵母液（2%~4.5%的水溶液），每天滴加1~2滴。2~3龄幼虫期适当增加酵母液浓度（10%左右）。滴加量以覆盖饲料表面一薄层为宜。

（3）饲料营养对幼虫的发育固然重要，但幼虫密度过大亦会影响幼虫发育。故还需控制幼虫密度。这可通过控制成虫排卵时间来达到。一般情况下，牛奶瓶10对成虫交配后12h左右将成虫转移。

（4）稍低的温度有利于幼虫的充分生长发育，因而可采用15~18℃培养。

2. 唾腺染色体制片

（1）检查幼虫培养瓶，取一只适龄幼虫，置于载玻片上，并加上一滴生理盐水（如幼虫带有饲料可先用生理盐水洗净），置双筒解剖镜下检查。首先熟悉幼虫结构，幼虫具一钝尾和带黑色口器的尖头端。

（2）在解剖镜下用两支解剖针，一针压住头部，压点尽可能靠头部口器处。因为幼虫会蠕动，这一步需先练习几遍。