

◎ 21世纪高等院校教材

Y

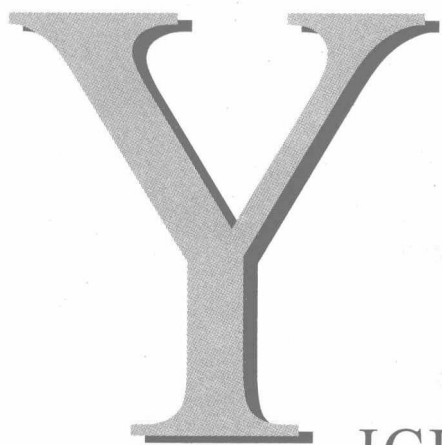
遗传学实验

ICHUANXUE SHIYAN 主编 ◎ 舒海燕 田保明



 郑州大学出版社

◎ 21世纪高等院校教材



遗传学实验

ICHUANXUE
SHIYAN

主编 ● 舒海燕 田保明

 郑州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验/舒海燕,田保明主编. —郑州:
郑州大学出版社,2008.6

ISBN 978 - 7 - 81106 - 856 - 6

I. 遗… II. ①舒…②田… 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 (2008) 第 043131 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人:邓世平

全国新华书店经销

新乡市凤泉印务有限公司印制

开本:787 mm × 1 092 mm

印张:14

字数:340 千字

版次:2008 年 6 月第 1 版

邮政编码:450052

发行部电话:0371 - 66966070

1/16

印次:2008 年 6 月第 1 次印刷

书号:ISBN 978 - 7 - 81106 - 856 - 6 定价:25.00 元

本书如有印装质量问题,由本社负责调换

《遗传学实验》编写人员

主 编 舒海燕 田保明

副主编 曹刚强 凌华 常胜合

编 委 (以姓氏笔画为序)

田保明 李永欣 袁保梅

凌 华 曹刚强 常胜合

舒海燕

内容提要

遗传学是一门注重实践操作的学科。认真对各个实验进行操作领会,对于理解并掌握遗传学基本原理是必需的。《遗传学实验》注重教学实际,参考多部国内外遗传学名著及实验指导,结合多年实验教学经验和教学的需要编写而成。其内容上包括了经典遗传学、细胞遗传学、数量遗传学、分子遗传学、微生物遗传学及医学遗传学系列实验共6章40个实验,每项实验后备有实验报告及思考与练习,且教材最后附有相关培养基及试剂的配制等内容。

本教材内容和结构编排新颖,既注重学生基本技能的训练,更强调对学生的启发性,力图培养其综合实验能力,注重理论与实践相结合,提高学生用所学知识解决实际问题的能力。

本教材可作为综合性大学、师范院校、农林院校、医学院校等生命科学领域本科生遗传学实验教材,也可作为生物科技工作者的参考用书。

前 言

遗传学是生物科学的一门核心学科,其研究内容已经渗透到生物科学的各个领域。同时,遗传学也是一门特别注重实践操作的学科。认真对各个实验进行操作领会,对于理解和掌握遗传学基本原理是必要的。

《遗传学实验》是依据“普通高等教育‘十一五’国家级教材规划”项目和“教育教学改革工程”,遵循“郑州大学最近几年各学科要推出适合学科发展及自身教学实际的实验系列指导教材”的指导思想,本着“遗传学乃一门实验性学科,其每一步发展研究皆以实验为基础”这一学科规律,同时也是迎合作为新建院系的生物工程系自身教学的需要编写而成的。本教材注重教学实际,参考多部国内外遗传学名著及实验指导,结合多年实验教学经验,在内容和结构编排上力求新颖,既注重学生基本技能的训练,也强调对学生的启发性,主要培养学生的综合实验能力。

本教材为方便教学,每一项实验基本上都按实验目的、实验原理、实验材料、实验器具和药品、实验步骤、实验报告及思考与练习等六个部分来编写的,各实验所用培养基、染色液、缓冲液的配制等内容均列在附录内。

本教材可作为综合性大学、师范院校、农林院校、医学院校等生命科学领域本科生遗传学实验教材,也可作为生物科技工作者的参考用书。

由于编者水平所限,在取材、实验方法和编排等方面肯定有不少缺点与错误,希望读者批评指正。

在本书编写过程中得到了郑州大学生物工程系各位领导、遗传学教研室各位老师及研究生邓云娟、廉玉利等的大力支持和热心帮助,在此一并表示感谢。郑州大学生物工程系动物学教研室主任路纪琪教授审阅了本书的初稿,并提出了宝贵的修改意见,在此表示衷心感谢。

编者

2008年1月

目 录

第一章 经典遗传学系列实验

实验一	果蝇的性别鉴定、遗传性状及生活史的观察	2
实验二	果蝇一对相对性状的杂交	8
实验三	果蝇两对相对性状的杂交	11
实验四	果蝇的伴性遗传	14

第二章 细胞遗传学系列实验

实验五	植物细胞有丝分裂	20
实验六	植物细胞减数分裂	23
实验七	果蝇唾腺染色体的制片与观察	28
实验八	植物多倍体的诱发与鉴定	34
实验九	小白鼠骨髓细胞染色体制片	37
实验十	植物染色体 Giemsa 分带技术	39
实验十一	植物染色体组型分析	44
实验十二	植物小孢子培养再生植株及其遗传鉴定	48

第三章 数量遗传学系列实验

实验十三	植物数量性状的遗传分析	52
实验十四	农作物杂种优势的测定	55
实验十五	正交试验法在微生物培养条件优化选择中的应用	58

第四章 分子遗传学系列实验

实验十六	植物同工酶分析技术	64
实验十七	植物 DNA 的提取及纯化	67
实验十八	质粒 DNA 的提取及纯化	70

实验十九 植物细胞总 RNA 的分离	73
实验二十 DNA 纯度、浓度及相对分子质量的检测	76
实验二十一 两步法反转录-PCR 扩增技术	78
实验二十二 质粒 DNA 的酶切和基因片段的回收	83
实验二十三 真核生物基因组 DNA 的限制性内切酶反应	88
实验二十四 重组质粒的构建、转化和蓝白筛选	91
实验二十五 植物遗传分析——AFLP 分子标记技术	94
实验二十六 农杆菌侵染转化拟南芥及转化子的筛选	99
实验二十七 动物转基因技术——转基因斑马鱼实验	102
实验二十八 植物转基因技术	106

第五章 微生物遗传学系列实验

实验二十九 粗糙脉孢菌的分离和交换	115
实验三十 大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选	120
实验三十一 大肠杆菌转化实验	125
实验三十二 酿酒酵母营养缺陷型菌株的筛选	129
实验三十三 酿酒酵母杂交实验	134

第六章 医学遗传学系列实验

实验三十四 人类 X 小体、Y 小体检测	139
实验三十五 人类 ABO 血型鉴定与遗传分析	143
实验三十六 人体手部皮纹的遗传分析	146
实验三十七 人类染色体的核型分析	152
实验三十八 人群苯硫脲尝味能力测定与分析	156
实验三十九 人群嗅觉的测量与分析	160
实验四十 人类外周血淋巴细胞的培养及染色体制片	162

附录

附录 1 果蝇实验常用培养基的配制	165
附录 2 生物实验常用培养基的配制	167
附录 3 细菌培养基的配制	171
附录 4 常用植物组织和细胞培养基的配制	174
附录 5 动物组织和细胞培养的常用溶液和培养基的配制	177

附录 6	植物小孢子培养基的配制	179
附录 7	常用染色液的配制	181
附录 8	粗糙脉孢菌培养基的配制	183
附录 9	实验室常用试剂的配制	185
附录 10	常用缓冲液的配制	188
附录 11	部分植物染色体数目及大小	196
附录 12	常用的同工酶检验法	197
附录 13	常用显影液和定影液的配制	201
附录 14	永久玻片标本的制作方法	202
附录 15	人类常见性状的遗传机制	203
附录 16	实验室工作规则	207
参考文献		209

第一章

经典遗传学系列实验

经典遗传学部分主要是以模式生物果蝇为研究对象,验证基因的分离、连锁、互换等遗传学定律。遗传学研究通常采用黑腹果蝇。早在 1909 年,摩尔根(Thomas H Morgan)就开始用果蝇做遗传学实验;也因此解决了一系列重大的遗传学问题。果蝇作为遗传学研究材料具有很多突出的优点:染色体数目少($2n = 8$),基因组小;具有多达 400 种以上的可遗传的突变性状;世代周期短,在 25 ℃ 下 9 ~ 10 天就能完成一个世代;个体小,易于室内饲养,培养费用低廉;繁殖能力强,生长迅速,可以在短期内产生较大的子代群体供观察、统计及遗传分析。

本章实验设计包括果蝇的一对及两对相对性状的杂交、果蝇伴性遗传等实验,充分验证了经典遗传学的三大基本规律,从而可加深学生对遗传学的基本原理的理解。

实验一 果蝇的性别鉴定、遗传性状及生活史的观察

一、实验目的

1. 掌握鉴别雌雄果蝇的方法,观察黑腹果蝇及几种常见突变体的表型特征。
2. 熟悉果蝇的实验室饲养管理方法以及实验过程中果蝇的处理技术。
3. 了解果蝇生活史中各个阶段的形态特征。

二、实验原理

果蝇是遗传学实验中最常用的动物。属于昆虫纲(Insecta)、双翅目(Diptera)、果蝇科(Drosophilidae)、果蝇属(*Drosophila*)。果蝇的分布是全球性的,全世界已记载的种类有3 000多种,我国已发现800余种。遗传学研究通常用黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)。其黑色的消化道,可以在幼体腹部一侧见到,故称为黑腹果蝇。此外,这种果蝇是分布地域最广泛,最常见的种类,而且是最早、最普遍用于遗传学研究的种类,又称为普通果蝇。

果蝇作为遗传学研究的材料具有很多突出的优点:染色体数目少($2n=8$),基因组小;具有多达400种以上的可遗传的突变性状;世代周期短,在25℃下9~10天就能完成一个世代;个体小,易于室内饲养,培养费用低廉;繁殖能力强,生长迅速,可以在短期内产生较大的子代群体供观察、统计及遗传分析。对果蝇的遗传学研究广泛而深入,在基因分离、连锁、交换以及染色体变异等方面十分突出,为遗传学的发展做出了巨大的贡献。正因为如此,果蝇至今仍是遗传学、细胞生物学、发育生物学、分子生物学等研究中常用的模式材料。

三、实验材料

果蝇野生型及部分突变型:黑腹红眼野生品系、残翅突变品系、白眼突变品系、黑体大果蝇突变品系。

四、实验器具和药品

1. 器具 培养箱、培养瓶、注射器、显微镜、体视解剖镜、放大镜、麻醉瓶、常用解剖器具。

2. 药品 玉米粉、琼脂、酵母粉、白糖、丙酸、乙醚。

五、实验步骤

(一) 果蝇生活史观察

果蝇是完全变态昆虫,其完整的生活周期可分为4个明显的时期,即卵、幼虫、蛹和成虫(图1-1)。果蝇全部生活史所需的时间,常因饲养温度和营养条件的差异而有所不同。当营养条件适宜时,在20℃下饲养,卵到幼虫期平均约为8天,蛹到成虫期约为6天;若在25℃,卵到幼虫期平均约5天,蛹到成虫期仅需4天。因此当营养条件适合而在25℃下饲养时,只需10天即可完成一代生活史。普通果蝇生活的最适温度为20~25℃,当温度低至10℃时,生活周期将延长至57天以上,而且生活力明显降低;如果高于30℃时则将引起不育和死亡。

用放大镜从培养瓶外观察果蝇生活史中的4个时期,然后取出,在显微镜或体视解剖镜下对其生活史的各个时期分别进行观察。

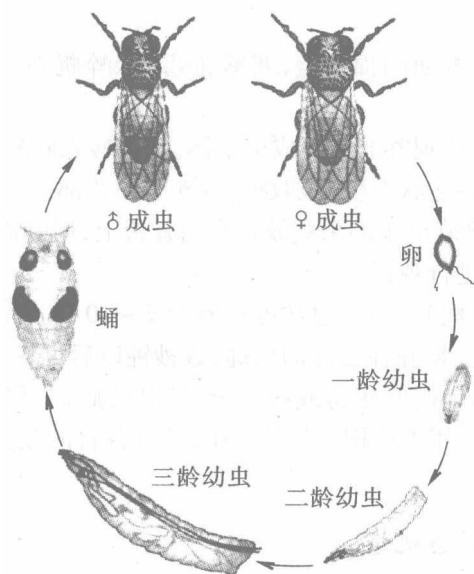


图1-1 果蝇生活史模式图

1. 卵 羽化后的雌蝇一般在12 h左右开始交配。交配后2天开始产卵。受精卵呈白色,长约0.5 mm,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。

可取附有卵的培养基少量涂于载玻片上,滴加一滴生理盐水进行稀释,盖上盖玻片,置显微镜的低倍镜下进行观察。也可取一只成熟的雌果蝇放于载玻片上,用解剖针轻轻

向后挤压果蝇腹部中部,可见从尾部挤出一些白色颗粒,即卵粒。去掉雌果蝇,在卵粒上滴加一滴生理盐水,放于显微镜的低倍镜下观察。

2. 幼虫 受精卵经 24 h 可孵化成幼虫,然后需经过 2 次蜕皮才能从一龄幼虫发育成为三龄幼虫。三龄幼虫体长可达 4~5 mm;肉眼可见幼虫一端稍尖为头部,上有一黑点即口器;稍后有一对半透明的唾腺,每条唾腺前有一个唾腺管向前延伸,然后汇合成一条导管通向消化道。神经节位于消化道前端的上方。通过体壁,可看到一对生殖腺位于身体后半部的上方两侧,精巢较大,外观为一个明显的黑色斑点,而卵巢则较小。

3. 蛹 幼虫生活 7~8 天后即化蛹,化蛹前从培养基上爬到瓶壁上,逐渐形成一个梭形的蛹,在蛹前部有 2 个呼吸孔,后部有尾芽,起初蛹壳颜色淡黄、柔软,经 3~4 天后硬化为深褐色,显示要羽化了。

4. 成虫 幼虫在蛹壳内完成成虫体型和器官的分化,最后从蛹壳前部爬出。刚从蛹壳里羽化出来的果蝇,虫体较长,翅还没有展开,体表也未完全几丁质化,所以呈半透明的乳白色,透过腹部体壁可以看到消化道和性腺。1 h 后蝇体变为粗短椭圆形,双翅伸展、体色加深,如野生型果蝇起初为浅灰色,而后成为灰褐色。

雌性成虫果蝇自羽化后约 12 h 即可交配。交配后 2 天雌蝇开始产卵。

(二) 果蝇的麻醉

1. 将数滴乙醚滴在麻醉瓶的棉塞上,塞紧瓶塞(麻醉瓶必须干燥而洁净),等待 1~2 min。

2. 用吸虫管吸取部分待观察的果蝇成虫个体,轻轻转入麻醉瓶中,果蝇开始变得不活动,由瓶壁跌落在瓶底呈昏迷状态(附肢收缩,双翅紧贴背部)。

3. 约 2 min 后,将完全麻醉了的果蝇放置在白瓷板上,用毛刷将其集中排列在白瓷板中央成一行,在放大镜下进行观察。

4. 若在观察过程中果蝇苏醒了(通常可被麻醉 5~10 min)需要再麻醉时,可滴几滴乙醚于滤纸(或棉球)上,立即扣住复苏的果蝇,数秒钟以后可继续观察。

5. 用解剖针轻轻拨动果蝇的翅膀或腹部,翻转其背腹面,仔细检查其性别和表型特征。将观察过的果蝇成虫,用毛刷刷入尸体瓶中,清理各自的吸虫管,麻醉瓶等用具,以防混杂。

(三) 果蝇的外部形态观察

果蝇成虫分为头、胸、腹三部分。头部的前端钝而平突,有一对大的复眼、3 个单眼和一对触角,触角芒呈羽毛状。胸部有三对附肢,一对翅,在翅与第三对附肢之间有一对平衡棒。腹部背面有黑色环纹,腹面有腹片,外生殖器在腹部腹面的末端。全身有许多体毛和刚毛(图 1-2)。

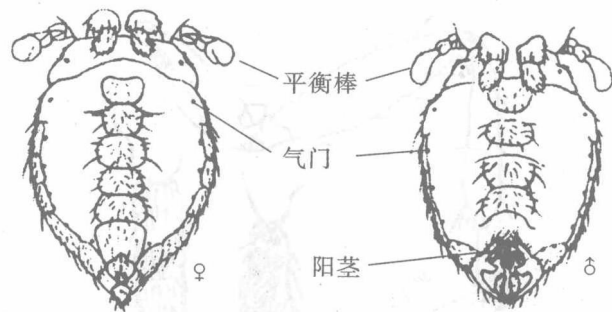


图 1-2 雌雄果蝇胸腹部结构

雄蝇外生殖器的构造比雌蝇复杂,颜色很深,雌蝇则很浅,这是区分雌雄依据之一。在果蝇的翅与第三对附肢之间有一对平衡棒(halter),这是双翅目昆虫调整姿势、保持平衡的器官

(四)果蝇成虫雌雄鉴别

参照图 1-3 及表 1-1,在体视解剖镜下对果蝇的成虫进行雌雄鉴别。

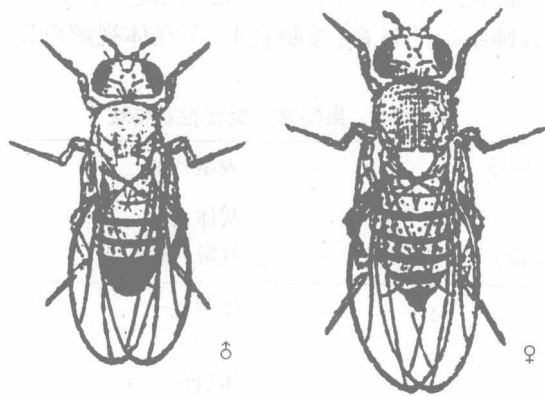


图 1-3 果蝇雌雄成虫

表 1-1 黑腹果蝇成虫的性别差异

项目	性别	
	雌性	雄性
体型	体大	体小
腹部末端	未见明显黑色,尖形	可见明显黑色,圆形
背部条纹	可见 5 条窄的黑色条纹	可见 3 条黑色条纹
外生殖器(腹面)	阴道板,卵道,肛门板	生殖弧,肛上板,阳茎等
性梳	无	在第一对足的跗节基部有性梳(一束黑色硬刚毛)(见图 1-4)

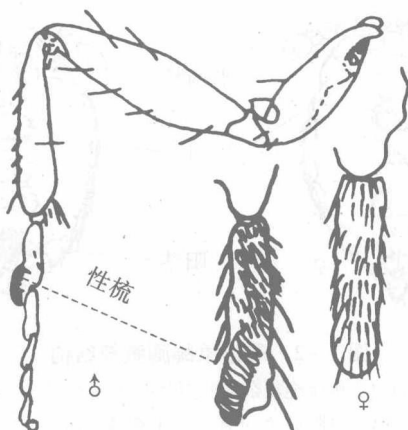


图 1-4 果蝇性梳

(五) 果蝇几种突变类型的观察

观察并比较黑腹果蝇野生型与其突变体在体色、眼色、眼型、翅型、翅脉及刚毛形状等诸方面的表型差异,按教师给定的材料,参照表 1-2 在体视解剖镜下逐一进行观察。

表 1-2 果蝇常见突变性状特征

性状分类	名称及代号	表型特征	基因所在染色体
	野生型 (wild type)	灰体,长翅 红眼,直刚毛	
体色	黄体 y (yellow)	体黄色	X
	黑体 b (black)	体黑色	II
	黑檀体 e (ebony)	体乌木色	III
眼色(形)	白眼 w (white)	复眼白色	X
	棒眼 B (Bar)	复眼棒状(红色)	X
	穆勒 5 u5 (Muller-5)	复眼棒状(杏黄色)	X

续表 1-2

性状分类	名称及代号	表型特征	基因所在染色体
	野生型 (wild type)	灰体,长翅 红眼,直刚毛	
翅形	短翅 m (miniature)	双翅短小(与尾端等长)	X
	匙状翅 nub ² (nub/in ²)	双翅小匙状(凹面向上)	II
	残翅 vg (vestigial)	只有翅的痕迹	II
	卷翅 Cy (Curly)	双翅向上卷曲	II
其他类型	焦毛 sn ³ (singd)	刚毛末端卷曲	X
	横脉缺失 cv (cross veinless)	翅的后横脉缺失	X
	黄体棒眼 yB yellow, Bar	黄体,棒眼(红色)	X

注:白眼,焦毛,短翅(w,sn³,m)为3个伴X隐性基因连锁

六、实验报告及思考与练习

1. 绘一幅果蝇生活史图。
2. 描述所观察到的果蝇雌雄个体的形态特征。
3. 你所用的突变体名称是什么,各有何特点(填入表 1-3)?

表 1-3 果蝇突变体名称与特点

突变体	特点

- #### 4. 为什么把果蝇作为遗传学研究的模式材料?

实验二 果蝇一对相对性状的杂交

一、实验目的

1. 学习遗传学实验结果记录及统计处理方法。
2. 验证并深刻理解孟德尔分离定律。

二、实验原理

根据孟德尔的遗传学理论,基因是一个独立的结构与功能单位,在杂合状态时不发生混淆,完整地在一代传递到下一代,由该基因的显隐性决定其在下一代的性状表现。单因子杂交是指一对等位基因间的杂交。孟德尔第一定律指出,一对杂合态的等位基因保持相对的独立性,其自交后代中表型分离比为 3:1。本实验将观察果蝇单因子杂交后代的表型及其分离情况。

果蝇的长翅和残翅是一对相对性状,它们分别受第二对染色体上显性基因 Vg 和隐性基因 vg 控制,残翅果蝇的双翅几乎没有,只有翅的痕迹,无飞翔能力。长翅对残翅为完全显性,让长翅果蝇($VgVg$)与残翅果蝇($vgvg$)杂交, F_1 代都是杂合体长翅($Vgvg$), F_1 代形成配子时,由于等位基因的分离,雌雄果蝇都形成了 1:1 的 Vg 和 vg 配子类型, F_2 代有 3 种基因型: $VgVg: Vgvg: vgvg = 1: 2: 1$,表现型比例为:长翅:残翅 = 3:1。

通过对 F_2 代中理论值与实际观察值的对比、统计学分析以及卡方检验,即可了解长翅和残翅的遗传是否符合分离定律。

三、实验材料

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 2 个品系:野生型长翅果蝇和突变型残翅果蝇。

四、实验器具和药品

1. 器具 体视解剖镜、恒温培养箱、培养瓶、麻醉瓶、毛笔、白纸片、记录本。
2. 药品 乙醚、玉米粉、琼脂、白糖、酵母粉、丙酸。