

生物学理科基础人才培养基地教材

TEXTBOOK SERIES FOR BIOLOGICAL SCIENCE BASE



EXPERIMENTS IN MODERN GENETICS

现代遗传学实验

■ 朱睦元 王君晖 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

生物学理科基础人才培养基地教材

现代遗传学实验

主 编 朱睦元 王君晖

副主编 韩 凝 边红武 潘建伟

 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代遗传学实验/朱睦元,王君晖主编. —杭州:浙江大学出版社,2009.5

ISBN 978-7-308-06573-3

I. 现… II. ①朱… ②王… III. 遗传学—实验—高等学校—教材 IV. Q3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 018795 号

现代遗传学实验

朱睦元 王君晖 主编

责任编辑 沈国明

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 10.75

字 数 260 千字

版 次 2009 年 5 月第 1 版 2009 年 5 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-06573-3

定 价 18.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88925591

Preface 前言

多年以来,我们遗传学课程组一直想编一本关于遗传学实验的书。在 2008 北京奥运会隆重举办、中国队成绩喜人之际,这本书终于完成了。

我们编写本书的目标有两个:第一,它既可以在本科生实验教学环节中作为教材(要有可操作性),也能够同学们在以后的学习和工作中作为工具书(要有全面性和前沿性)。如果同学们在上完遗传学实验课程后,舍不得把书丢掉,在工作和深造中还能用到它,那么我们的这个目的就达到了。第二,突出模式生物在现代遗传学研究中的应用。模式生物是指在人们在研究生命现象过程中长期、反复作为研究材料的物种,从这些物种研究中得出的许多生命活动规律往往代表了许多物种共同的规律。近年来,许多模式生物的基因组全序列被测定,它们作为生物学实验材料的优越性得到了更充分的体现,使基础生物学研究进入一个全新的功能基因组时代和蛋白质组时代。

围绕这两个目标,本书的内容分成两大部分。第一部分是我们多年来开设的遗传学实验以及近年在教学改革中新增加的实验。在总共 36 个实验中,以果蝇和拟南芥为材料的实验共 16 个,以酵母和大肠杆菌为材料的实验共 8 个,医学和人类遗传学实验共 6 个,其他实验共 6 个。第二部分阐述遗传学研究中的重要工具和研究资源。工具部分重点介绍了 PCR 实验技术、重组克隆技术和染色体步行技术,等等;资源部分重点介绍各个模式生物的 DNA、突变体和生物信息学资源。

我们课程组的前身是原杭州大学生物系的遗传教研室,从 20 世纪七十年代末期就开始设立遗传学实验课程,所编写的遗传学实验讲义几经修订,不仅供本校师生使用,也在许多高校中广为流传。前辈老师们所打下的基础使我们受益匪浅,同时也激励我们要把他们的经验和我们的体会整理出来。在本书编写过程中,我们还特邀了浙江大学生物化学研究所的金勇丰教授编写 RNA 编辑部分,金文涛老师提供了部分实验材料和数据。另外,我们课程组的很多研究生也参加了本书的编工作。杨燕君、鲍烈明、朱宇斌和金炜元等同学参加了遗传学工具部分的一些编写工作;林二培、邓敏娟、陈哲皓、李璇、鲍烈明、谢亚坤和余文静等同学参加了遗传学研究资源部分的一些编写工作。我们向所有为本书编写工作付出辛勤劳动的师生表示衷心的感谢。

由于我们能力和水平的限制,书中错误一定不少,恳请同行和使用本书的同学们批评指正。同时,欢迎省内外同行采用本书作为遗传学实验教材,我们会竭力提供相关实验材料。

编 者

2009 年 3 月 于浙江大学紫金港校区

Contents 目录

前 言	1
上篇 实验操作部分	
果蝇系列实验	3
实验一 果蝇的饲养、雌雄鉴别和性状观察	4
实验二 果蝇单因子和双因子杂交实验	8
实验三 果蝇的伴性遗传	12
实验四 果蝇的三点测验	14
实验五 果蝇翅形的两对基因互补	17
实验六 果蝇唾腺染色体的制作与观察	19
实验七 果蝇基因组 DNA 的提取和鉴定	22
实验八 果蝇钠离子通道基因 RNA 编辑位点的鉴定	24
拟南芥系列实验	27
实验九 拟南芥的培养及性状观察	28
实验十 拟南芥的杂交实验	32
实验十一 拟南芥的化学诱变及突变体筛选	34
实验十二 拟南芥基因组 DNA 的提取与鉴定	36
实验十三 农杆菌介导的拟南芥转化及转基因植物的鉴定	38
实验十四 用 GUS 基因表达观察启动子功能	41
实验十五 拟南芥 SNP 遗传标记的检测	44
实验十六 拟南芥愈伤组织及悬浮细胞系的建立	47
酵母系列实验	49
实验十七 酵母细胞的培养	51
实验十八 酵母 DNA 的小量制备	54
实验十九 酵母的转化	56
实验二十 利用酵母双杂交分析蛋白质-蛋白质相互作用	58
大肠杆菌系列实验	63
实验二十一 大肠杆菌的培养	64

实验二十二	大肠杆菌质粒 DNA 的制备及酶切鉴定	67
实验二十三	大肠杆菌的转化	70
实验二十四	大肠杆菌的杂交及基因定位	73
医学与人类遗传实验		76
实验二十五	姐妹染色单体交换的观察	76
实验二十六	小鼠骨髓细胞微核观察	78
实验二十七	Y 染色体上 DYZ1 序列的 PCR 反应鉴定人类性别	80
实验二十八	人类细胞巴氏小体的观察	82
实验二十九	人类染色体核型分析	84
实验三十	人群中 PTC 味盲基因频率的分析	87
其他实验		90
实验三十一	粗糙链孢霉的分离和交换	90
实验三十二	洋葱根尖有丝分裂的观察	94
实验三十三	蝗虫精巢减数分裂过程中染色体行为的观察	97
实验三十四	洋葱根尖多倍体的诱发	101
实验三十五	洋葱表皮基因枪法的瞬时转化	103
实验三十六	农杆菌叶盘法转化烟草	106
下篇 工具和资源部分		
工具部分		111
第一节	卡平方(χ^2)测验	111
第二节	遗传系谱分析	114
第三节	PCR 实验技术	116
第四节	重组克隆技术	123
第五节	染色体步行与图位克隆	128
资源部分		134
第一节	果蝇遗传学研究的 DNA、突变体和生物信息学资源	134
第二节	拟南芥遗传学研究的 DNA、突变体和生物信息学资源	136
第三节	酵母遗传学研究的 DNA、突变体和生物信息学资源	138
第四节	大肠杆菌遗传学研究的 DNA、突变体和生物信息学资源	139
第五节	线虫	140
第六节	小鼠	145
第七节	水稻	148
第八节	杨树	151
第九节	其他已经基因组测序的生物	155
附录		159

上篇 实验操作部分

果蝇系列实验

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是一种双翅目昆虫,是遗传学、生理学、进化学等生物学研究中一种重要的模式生物。

果蝇之所以成为生物学研究,特别是遗传学和发育生物学研究的重要材料,是因为它具有以下特点:

- 个体小,在实验室条件下易于培养;
- 生长周期短(约 2 周),繁殖能力强;
- 幼虫唾腺组织中形成巨大的唾腺染色体,染色体上的膨突(puff)暗示着转录和基因活性所在的区域;
- 只有 4 对染色体,其中 3 对常染色体和 1 对性染色体;
- 雄性果蝇不发生减数分裂重组,便于进行遗传学研究;
- 果蝇遗传转化的技术已经十分成熟;
- 基因组测序工作于 2000 年完成。

哈佛大学的伍德文斯(Charles W. Woodworth)是第一个大量培养果蝇的科学家。1910 年开始,遗传学家摩尔根(Thomas Hunt Morgan)以果蝇为材料开展了一系列遗传学研究工作,并和他的同事一起扩展了孟德尔的工作,揭示了 X-连锁的遗传规律。这一工作不仅证明基因位于染色体上,同时促使了染色体遗传图谱的诞生。果蝇染色体的第一张遗传图由斯图尔特(Alfred Sturtevant)完成。因为实验室的开创性成就,摩尔根等人获得了 1933 年诺贝尔生理学或医学奖。

果蝇基因组包含 4 对染色体,其中 3 对常染色体(以 2,3,4 编号)和 1 对性染色体。果蝇的基因组测序工作于 2000 年完成,其序列在果蝇数据库 FlyBase database (<http://flybase.bio.indiana.edu/>)上可搜索到。果蝇基因组大小为 120Mb,包含约 13,767 个蛋白质编码基因,约占基因组的 20%。与人类不同,果蝇的性别由 X 染色体与常染色体组数的比例决定。

果蝇基因一般依据突变导致的表型来命名,例如某一基因缺失导致突变体胚胎不能发育成心脏,科学家则将其命名为铁人(tinman)。约 75%的已知人类疾病基因与果蝇基因有一定的相似性,50%的果蝇蛋白质序列与哺乳动物相关蛋白同源。果蝇已被用于一些人类疾病包括帕金森症、亨廷顿症、小脑共济失调和阿尔茨海默病等神经退化疾病的遗传学研究,同时也可作为衰老和氧化胁迫、免疫、糖尿病、癌症、药物滥用分子机制研究的模式材料。

此外,果蝇是发育遗传学、行为遗传学和神经科学研究的重要模式系统之一。1995 的诺贝尔生理学或医学奖就颁给了 Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard 和 Eric F. Wieschaus 等三位科学家,因为他们在果蝇早期胚胎发育的遗传调控机制研究中的突破性成就。

实验一

果蝇的饲养、雌雄鉴别和性状观察

一、实验目的

1. 了解果蝇的生活史、培养方法及研究概况。
2. 掌握果蝇麻醉的方法。
3. 学习雌雄果蝇的鉴别方法,观察不同品系果蝇的性状,从而为进行果蝇遗传学试验做好准备。

二、实验原理

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是生物学研究中的一种重要的模式生物。约在1909年,摩尔根就开始以果蝇作为材料进行遗传学实验,解决了一系列重大的遗传学问题。

果蝇作为遗传材料具有很多突出的优点:染色体数目少, $2n=8$;具有许多可遗传的突变性状;世代周期短,在 25°C 下约9~10天就完成一个世代;个体小,易于饲养,费用低廉;繁殖能力强,一次杂交可产生大量后代供统计分析。

果蝇为昆虫纲双翅目昆虫,其生活史包括卵—幼虫—蛹—成虫四个阶段,属完全变态的昆虫(图1-1)。果蝇也和大多数动物一样,有最低、最高和最适生长温度, $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 是果蝇的最适生长温度, 30°C 以上则引起不育或出现不正常的形态。

果蝇的食物主要是酵母,凡是能使酵母发酵的基质都能作为培养基,其中最常用、效果最好的是玉米粉培养基。

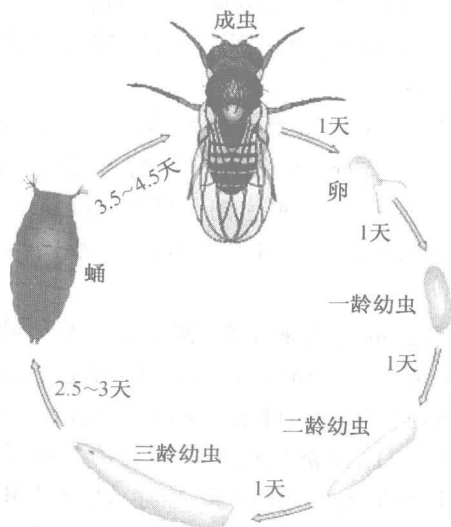


图1-1 果蝇的生活周期

三、实验准备

1. 材料: 5个品系的果蝇。

2. 试剂：乙醚、果蝇培养基。

3. 器具：果蝇培养瓶、玻璃麻醉瓶、毛笔、瓷板、海绵板、显微镜、电炉、恒温培养箱。

四、实验步骤

1. 果蝇生活史观察

卵 成熟的雌蝇交尾后(2~3天)将卵产在培养基的表层。用解剖针的针尖在果蝇培养瓶内沿着培养基表面挑取一点培养基,将其置于载玻片上,然后滴上1滴清水,用解剖针将培养基展开后,放在显微镜低倍镜下进行仔细观察。果蝇的卵为椭圆形,长约0.5 mm,腹面稍扁平,前端伸出的触丝可使卵附着在培养基表层而不陷入深层。

幼虫 果蝇的受精卵经过一天的发育即可孵化为幼虫。幼虫在培养基内及瓶壁上都有,培养基内的幼虫一般要小一些。这是因为果蝇的幼虫从一龄幼虫开始经两次蜕皮,形成二龄和三龄幼虫,随着发育而不断长大,三龄幼虫往往爬到瓶壁上来化蛹,其长度可达4~5 mm。幼虫一端稍尖为头部,黑点处为口器。幼虫在培养基内和瓶壁上蠕动爬行。

蛹 幼虫经过4~5天的发育开始化蛹。一般附着在瓶壁上,颜色淡黄。随着发育的继续,蛹的颜色逐渐加深,最后为深褐色。在瓶壁上看到的几乎透明的蛹,是羽化后遗留的蛹的空壳。

成虫 刚羽化出来的果蝇虫体较长,翅膀未完全展开,体表未完全几丁质化,所以呈半透明乳白色。随着发育,身体颜色加深,体表完全几丁质化。羽化出来的果蝇在12 h后开始交配,成体果蝇在25℃条件下的寿命为37天。

2. 果蝇的麻醉

在进行杂交和子代观察、统计时需对果蝇进行麻醉。操作要点:拔去麻醉瓶小口上的橡皮塞,滴入数滴乙醚(注意不能太多,以免乙醚流入瓶内),再塞上橡皮塞。将果蝇培养管在海绵板上敲击几下,拍打管壁,使果蝇集中在底部。然后迅速拔去培养管棉塞,插入麻醉瓶大口,轻轻拍打培养管,使果蝇全倒入麻醉瓶,然后迅速盖上麻醉瓶的盖子。麻醉到一定程度后,将果蝇倒在白瓷板上。当果蝇翅膀上翘45°时,表示已经死亡。

3. 果蝇突变性状的观察(表1-1,1-2)

表1-1 5个品系果蝇的性状

品 系	眼 色	翅 膀	刚 毛	体 色
野生型	红	长翅	直	灰
残 翅	红	残翅	直	灰
小 翅	白	小翅	焦刚毛	灰
黑檀体	红	长翅	直	黑檀体
白 眼	白	长翅	直	灰

表 1-2 果蝇的一些突变性状及其相关基因

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,小眼数少	X
褐色眼	bw	复眼褐色	II
猩红眼	st	复眼猩红色	III
黑檀体	c	身体乌木色	III
黄 体	y	身体浅橙黄色	X
焦 毛	sn ³	刚毛卷曲烧焦状	X
黑 体	b	颜色比黑檀体深	II
匙形翅	nub ²	翅小匙状	II
残 翅	vg	翅退化,不能飞	II
翻 翅	cy	翅向上翻卷,纯合致死	II
小 翅	m	翅膀短小,不超过身体	X

4. 雌雄果蝇的鉴别(表 1-3)

表 1-3 雌雄果蝇的特征比较

性 别	体 型	腹部末端	背部条纹	性 梳
♀	大	无色、端尖	7 条(肉眼可看见 5 条)	无
♂	小	黑色、钝圆	5 条(肉眼可看见 3 条)	有

注：性梳为雄果蝇前肢第 5 节附节上 10 根像梳子的棕毛(图 1-2)。

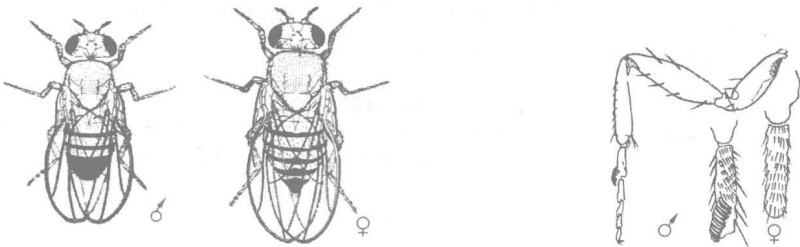


图 1-2 雌雄果蝇及雄果蝇的性梳

5. 果蝇培养用玉米粉培养基的配制

- (1) 将 80 ml 水、2 g 琼脂和 13 g 蔗糖放在大烧杯中煮沸。
- (2) 将 80 ml 水、17 g 玉米粉和 1.4 g 酵母粉,装在小烧杯中调匀。
- (3) 待大烧杯中琼脂融化后,将小烧杯中调匀的混合液倒入,烧开。
- (4) 大烧杯中加入 1 ml 丙酸。
- (5) 每一试管分装 1.5~2 cm 高度(5~10 ml)的培养基,注意请勿将培养基碰到管壁。

五、实验记录与思考

1. 记录培养管中果蝇的性状及雌雄个体的数目。

管 号	眼 色	翅 型	体 色	刚 毛	雌雄个数

2. 除果蝇外,请再列举几种遗传学研究中常用的动物、植物和微生物,并写出它们的拉丁文学名。

实验二

果蝇单因子和双因子杂交实验

一、实验目的

1. 掌握果蝇杂交的实验方法。
2. 通过实验验证分离规律和自由组合规律。
3. 学习运用生物统计的方法对实验数据进行处理分析。

二、实验原理

1. 单因子试验

一对基因在杂合状态中保持相对独立性,而在形成配子时,又按原样分离到不同的配子中去。理论上配子分离比是 1:1,子二代基因型分离比是 1:2:1。若显性完全,子二代表型分离比为 3:1。

单因子试验选用野生型长翅(++)与突变体残翅(vgvg)的果蝇为亲本,研究一对相对性状的遗传规律。野生型果蝇(++)的双翅是长翅,翅长过尾部。残翅果蝇(vg vg)的双翅几乎没有,只有少量残痕,无飞翔能力。vg 的基因座位是第二染色体 67.0,长翅对残翅显性完全。

正交: P: 长翅(♀) × 残翅(♂)
(++) (vg vg)

↓
F₁: 长翅
(+ vg)

↓ ⊗
F₂: 长翅 残翅
(++ +vg) (vg vg)
1 : 2 : 1

反交: 残翅(♀) × 长翅(♂)
(vg vg) (++)

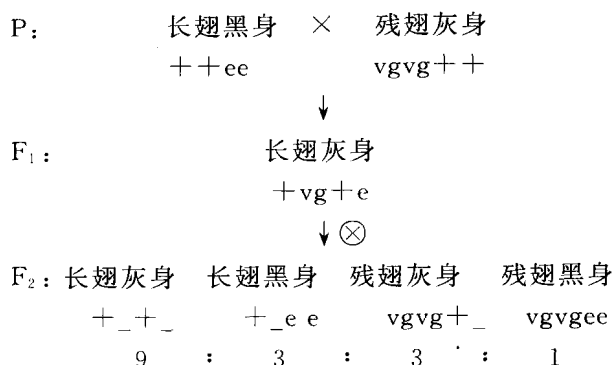
↓
长翅
(+vg)

↓ ⊗
长翅 残翅
(++ +vg) (vg vg)
1 : 2 : 1

2. 双因子试验

位于非同源染色体上的两对基因,它们所决定的两对性状在杂种第二代是自由组合的。根据孟德尔第二定律,一对基因的分离与另一对基因的分离是独立的,所以一对基因所决定的性状在杂种第二代是 3:1 之比,而两对不相互连锁的基因所决定的性状,在杂种第二代就呈 9:3:3:1 之比。

双因子试验采用的材料是长翅黑檀体果蝇和残翅灰身果蝇。野生型果蝇体色为灰色,黑檀体果蝇(ee)体色为乌黑。ebony(e)位于第三条染色体上,而 vg 位于第二条染色体上。通过对杂交后代翅形和体色这两对性状的观察,经数据处理,验证杂种第二代的分离比是否符合 9:3:3:1 的比例。



3. 果蝇杂交实验的基本步骤

(1) 挑选处女蝇

将雌雄果蝇放在一起培养,雌蝇的生殖器中有贮精囊,可保留交配所得的大量精子,雌蝇一次交配所得的精子,足够它多次排出的卵受精,因此在做杂交试验时,雌蝇必须选用处女蝇(没有交配过的雌蝇)。雌蝇羽化后 12 h 内不会交配,这个时段内收集的雌蝇是处女蝇。

(2) 配制杂交组合

杂交时把所需品系的雄蝇直接放到处女蝇培养瓶中,贴好标签,注明两亲本的基因型及交配日期,进行培养。7~8 天后倒掉亲本(一定要倒干净,以免亲代和子代混淆),待 F_1 成蝇羽化后开始计算,观察性状。可靠的计数及观察是培养开始的 20 天以内(再晚 F_2 也可能有了)。若需继续实验观察 F_2 ,可在 F_1 内挑出雌雄数对另外培养。因为这次是用 F_1 作亲本,进行个体间互交,所以这时不是处女蝇也可以。但如要把 F_1 雌蝇与另一品系雄蝇杂交时,还是要严格地选取处女蝇。

(3) 杂交后代的性状观察及实验数据的统计分析。

三、实验准备

1. 材料:野生型果蝇、残翅果蝇、黑檀体果蝇。
2. 试剂:果蝇培养用玉米粉培养基、乙醚。
3. 器具:双筒解剖镜、麻醉瓶、果蝇培养瓶、毛笔、白瓷板、恒温培养箱。

四、实验步骤

1. 选取杂交试验的亲本,进行杂交。在杂交管上贴上标签,标注亲本、交配日期与实验者姓名。

单因子试验:以残翅果蝇($vgvg$)和野生型果蝇($++$)为亲本,进行杂交,分正交和反交两种组合,作为母本者必须为处女蝇。

正交: $++(\text{♀}) \times vgvg(\text{♂})$

反交: $vgvg(\text{♀}) \times ++(\text{♂})$

双因子试验:选择残翅灰身和长翅黑檀体果蝇作亲本,正交和反交各做一组,作母本者必须是处女蝇。

正交:残翅灰身 $vgvg++(\text{♀}) \times$ 长翅黑檀体 $++ee(\text{♂})$;

反交:长翅黑檀体 $++ee(\text{♀}) \times$ 残翅灰身 $vgvg++(\text{♂})$ 。

- 7~8 天后,移走亲本果蝇。
- 待 F_1 成虫出来后,观察子一代(F_1)翅膀形状和体色等性状。
- 在一个新鲜培养瓶内,放 5~6 对 F_1 果蝇,这里果蝇不必是处女蝇(请思考为什么?),正交和反交各一瓶贴上标签。
- 7~8 天后移去 F_1 。
- F_2 代统计性状,连续统计 7~8 天,被统计过的果蝇立即放入死蝇盛器中。填表,并进行 χ^2 测验。

五、实验记录与思考

1. 单因子试验

F ₂ 表型的统计				
统计日期 \ 实验结果	正 交		反 交	
	长翅	残翅	长翅	残翅
合 计				

χ^2 测验			
	长 翅	残 翅	合 计
实际观察数(O)			
理论数(3 : 1)(E)			
偏差(O—E)			
(O—E) ² /E			
自由度 = n - 1 =		$\chi^2 =$	

2. 双因子试验

F ₁ 表型的统计				
统计日期 \ 观察结果	_____ (♀) × _____ (♂)			
	灰身残翅	灰身长翅	黑檀体残翅	黑檀体长翅

F₂ 表型的统计

统计日期 \ 观察结果	_____ (♀) × _____ (♂)			
	灰身残翅	灰身长翅	黑檀体残翅	黑檀体长翅
合 计				

F₂ 统计结果的 χ^2 测验

	灰身残翅	灰身长翅	黑檀体残翅	黑檀体长翅
实际观察数(O)				
理论数(E)				
偏差(O-E)				
$(O-E)^2/E$				

自由度 = $n - 1 =$

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E =$$

3. 根据实验结果,请说明实际结果与理论结果是否吻合。若不吻合,请给出可能的解释。