

遗传学实验

鄢慧民 袁文静 编著

武汉大学出版社

通性學堂題

編者：張子雲、張建

北京大學出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

遗传学实验/鄢慧民, 袁文静编著
——武汉: 武汉大学出版社, 1994. 11
ISBN 7-307-01161-1

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

武汉大学出版社出版发行

(430072 武昌 珞珈山)

武汉华运印刷厂印刷

1994年11月第1版 1995年8月第2次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 10

字数: 257千字 印数: 1 001—3 000

ISBN 7-307-01161-1/Q·15 定价: 9.80元

内 容 提 要

本书是一本实用性的遗传学实验教材和参考书。全书由两大部分共五十二个实验组成。第一部分（实验一至三十）内容包括减数分裂，孟德尔三大定律，果蝇的有关实验技术，三点试验，染色体畸变，基因突变，细菌接合、转导、转化，各种染色体技术和植物体细胞的基本培养技术。第二部分（实验三十一至五十二）内容包括各类DNA的提取纯化及分析，质粒DNA的酶切与连接，切口平移，Southern印迹技术，电泳技术，层析技术，电镜技术等遗传生化及基因工程基本技术。

本教材可供综合性大学、师范和农林院校本科生的遗传学实验教学使用，也可供生物有关系科研究生、高等和中等学校教师参考使用。

前 言

遗传与变异是生命科学的核心问题。遗传学是生命科学中至关重要的基础学科，它在高等院校与生物有关的各专业的课程设置中具有不可替代的地位，是一门实验性很强的学科。遗传学的每一次重大发展都与研究方法和技术的革新分不开。因此，对于每一个跨入生命科学领域的大学生，掌握了解有关的遗传学实验方法和技术是十分必要的。

在多年的遗传学实验教学中，我们迫切感到需要一本实用性、参考性相结合的遗传学实验教材。在使用了数年的简明自编教材的基础上，参考国外及国内相关实验教材，同时兼顾配合宋运淳和余先觉教授编著的《普通遗传学》内容体系，我们编写了本教材。考虑高等学校本科学生遗传学教学的基础性以及各院校实验教学的客观条件，同时也为了适应我系遗传学专业及生物学试验班学生的教学需要，我们既编入了最基本的验证性实验，也编入了一些遗传学新近发展的技术。每种实验技术在篇幅允许的情况下，尽可能详细地提供基本原理和相关的遗传学背景知识，以求与理论课教学紧密联系。某些实验列出了几种方法和实验材料。这样既可供学生比较参考，也可供不同教学实验室酌情选用。第一部分（实验一至实验三十）主要作为基础实验供各专业遗传学基础课教学使用，由鄢慧民执笔。第二部分（实验三十一至实验五十二）主要供遗传学专业高年级学生的专业实验技术课程及试验班教学选用，由袁文静执笔。

在过去的教学实践和教材的编写过程中，承蒙武汉大学生命科学院及遗传系各级领导、老师、同事和学生的鼓励和支持，宋运淳教授、丁毅副教授、崔建勋老师热情提供参考资料并提出宝

贵建议，宋文贞同志也给予了多方协助，在此一并表示衷心感谢。

在编写过程中，我们虽尽了一定努力，但错误和不当之处在所难免，诚请读者批评指正。

编 者

1994年5月

目 录

实验一	减数分裂.....	(1)
实验二	植物有性杂交技术.....	(8)
实验三	果蝇的形态、生活周期及其饲养	(15)
实验四	单因子实验	(23)
实验五	孟德尔自由组合规律的验证	(27)
实验六	果蝇的伴性遗传	(29)
实验七	果蝇的三点试验	(33)
实验八	粗糙链孢霉顺序四分子分析	(38)
实验九	人类几种常见遗传特性的调查	(47)
实验十	植物多倍体的人工诱导	(54)
实验十一	果蝇 X 染色体隐性致死突变的检出	(58)
实验十二	微核检测技术	(63)
实验十三	大肠杆菌接合及基因定位	(69)
实验十四	大肠杆菌 P1 噬菌体普遍性转导及基因定位 ...	(75)
实验十五	大肠杆菌 λ 噬菌体局限性转导	(81)
实验十六	细菌质粒 DNA 的快速分离提取	(88)
实验十七	大肠杆菌的转化	(95)
实验十八	互补测验	(99)
实验十九	酵母菌原生质体的分离制备和再生.....	(104)
实验二十	酵母菌原生质体转化.....	(108)
实验二十一	果蝇唾腺染色体制片.....	(111)
实验二十二	小鼠细胞染色体制片及观察.....	(116)
实验二十三	人类性染色质的检测.....	(120)
实验二十四	外周血淋巴细胞培养及染色体制片.....	(125)

实验二十五	植物有丝分裂染色体制片技术·····	(130)
实验二十六	染色体显带技术·····	(136)
实验二十七	姊妹染色单体区分染色法·····	(142)
实验二十八	染色体组型分析·····	(148)
实验二十九	植物组织的脱分化培养·····	(155)
实验三十	植物原生质体的分离和培养·····	(162)
实验三十一	质粒 DNA 的大量抽提与纯化 ·····	(167)
实验三十二	快速氯化铯密度梯度离心法提取分离大质粒 DNA (大于 15kb) ·····	(171)
实验三十三	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度、 浓度及分子量·····	(175)
实验三十四	DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 ·····	(180)
实验三十五	质粒 DNA 的酶切降解与连接 ·····	(185)
实验三十六	重组质粒 DNA 的快速制备与酶切分析 ·····	(191)
实验三十七	从低熔点琼脂糖凝胶电泳凝胶中回收 DNA 片段 ·····	(195)
实验三十八	切口平移标记 DNA 探针的制备 ·····	(199)
实验三十九	Southern 印迹杂交法 ·····	(204)
实验四十	兔肝 mRNA 的提取分离 ·····	(212)
实验四十一	用无细胞体系测定兔肝 mRNA 的 翻译活性·····	(217)
实验四十二	植物细胞核高分子量 DNA 的快速提取 ·····	(221)
实验四十三	植物线粒体 DNA (mtDNA) 的抽提 ·····	(224)
实验四十四	植物 mtDNA 电子显微镜观察·····	(229)
实验四十五	叶绿体 DNA 的分离纯化 ·····	(237)
实验四十六	DNA 中 GC 克分子百分率 $[(G+C)\%]$ 的测定·····	(242)
实验四十七	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 蛋白质的分子量·····	(247)

实验四十八	种子胚蛋白质双向电泳分析.....	(252)
实验四十九	植物酯酶同工酶电泳分析.....	(257)
实验五十	凝胶等电聚焦电泳分离蛋白质.....	(262)
实验五十一	大鼠肝脏组蛋白的分级分离.....	(264)
实验五十二	植物器官的扫描电镜观察.....	(269)
附录一	器具和溶液的灭菌方法.....	(273)
附录二	常用缓冲液的配制方法.....	(277)
附录三	制备染色体常用溶液及染液.....	(285)
附录四	微生物实验常用器材及培养基.....	(288)
附录五	动物组织和细胞培养的常用溶液和培养基.....	(293)
附录六	植物组织和细胞培养常用培养基.....	(297)
附录七	特殊试剂的配制.....	(301)
附录八	几种特殊的处理方法.....	(304)
参考文献		(307)

实验一 减数分裂

一、目的

1. 了解动、植物生殖细胞的形成过程。
2. 从遗传学角度，熟悉减数分裂各期的特点，加深对减数分裂的认识。
3. 学习生殖细胞的取材和染色体制片。

二、原理

减数分裂是形成生殖细胞的一种特殊方式的细胞分裂。它是遗传学中一个特别重要的事件，是维持大多数动物植物品种染色体数目世代稳定传递的根本机制。同时，基因的分离、自由组合以及交换无不是通过减数分裂发生的。可以说减数分裂是经典遗传学的根本。深入了解认识减数分裂对学习遗传学基本规律是极为重要的。动植物都是通过减数分裂形成配子，所以减数分裂通常以植物的花粉母细胞或动物的精巢卵巢作材料进行观察。减数分裂的特点是：连续进行两次核分裂，而染色体仅复制一次，从而形成四个只含单倍数染色体的产物——生殖细胞（或配子）。

三、实验材料

1. 玉米雄花序。
2. 小鼠精巢。

四、器具和试剂

镊子、解剖刀、解剖针、载玻片、盖玻片、直尺、大培养皿、

酒精灯、吸水纸、吸管、注射器、离心管、离心机、显微镜。

2%柠檬酸钠溶液；含 0.05%秋水仙素的 2%柠檬酸钠溶液；70%和 80%酒精；甲醇，冰醋酸；醋酸洋红。

五、实验说明

植物在花粉形成过程中，花药内的一些细胞分化成小孢子母细胞，即花粉母细胞 ($2n$)，每个花粉母细胞进行连续的两次细胞分裂，产生四个子细胞，即具单倍体染色体数 (n) 的小孢子或花粉 (图 1-1)。

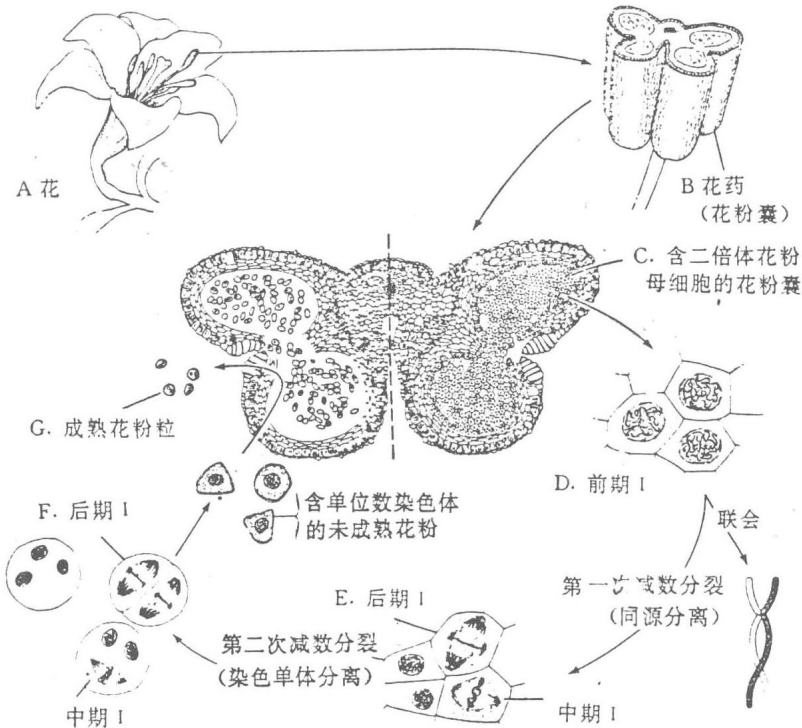


图 1-1 植物花粉母细胞的减数分裂

动物的精细胞则是在精巢由精母细胞经减数分裂形成。卵细

胞在卵巢由卵母细胞经减数分裂形成（图 1—2）。

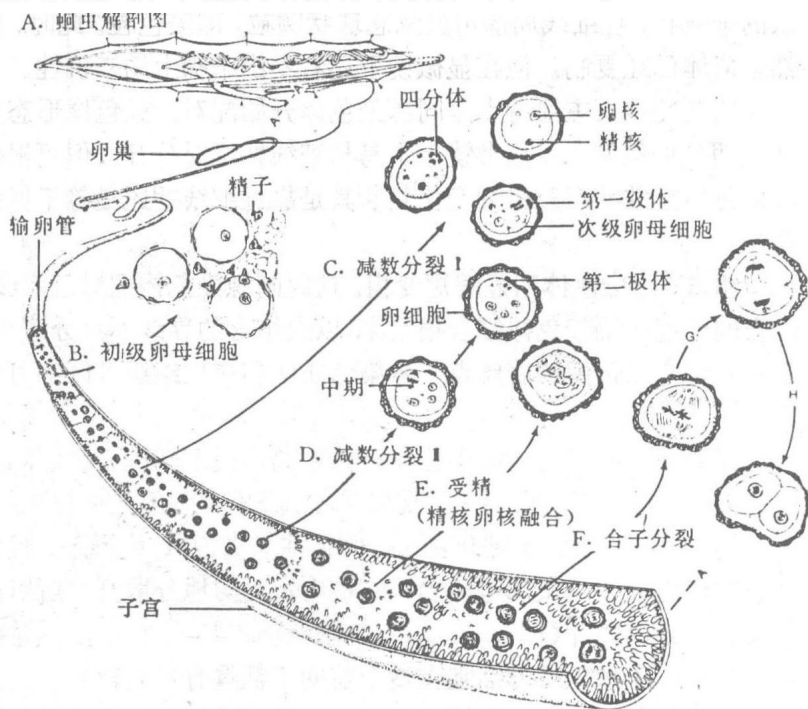


图 1—2 动物的减数分裂

在适当时期采集植物花蕾或雄花序、动物精巢或卵巢，经固定，染色制片后，即可在显微镜下观察到减数分裂不同时期的染色体变化图象。这里以玉米花粉母细胞减数分裂为例，对各期特征作一简要说明，在观察时，请注意实际图象同一般减数分裂模式图的差别。减数分裂分为下列各期。

减数分裂 I：

前期 I 减数分裂的特点之一就是前期 I 特别长，而且变化复杂。通常根据细胞核内结构变化特征又将这一期分成几个分期，即细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期。

细线期：这是减数分裂的开始时期，染色质开始浓缩为细而长的细线状，且细线局部可见到念珠状颗粒，即染色粒。此时，虽然染色体已经复制，但在显微镜下还看不出结构上的二价性。

偶线期：其主要特点是同源染色体开始配对。染色体形态与细线期差别不大。在显微镜下不易与细线期绝对分开，但可根据其染色体分散状态及粗细变化判断其是靠近细线期还是趋于偶线期。

粗线期：染色体明显缩短变粗。这时同源染色体配对已完成，联会的两条同源染色体结合很紧密，以致结合的界线不易分清，在玉米，每个二价体的着丝点、异染色质区和核仁组织者区都可看清。

双线期：配对的同源染色体开始分离。由于同源染色体间发生过交换，此时可观察到交叉现象。此期染色体图象呈现扭花状。

终变期：由于交叉端化，二价体往往呈X、O、V形态，且显著收缩变粗，并向核周边移动，在核内较均匀地分散开。所以此期有利于染色体计数。

此外，玉米花粉母细胞在整个前期Ⅰ都具有较大较明显的核仁，这是前期的一个显著标志，进入中期核膜核仁才开始消失。

中期Ⅰ 各个二价体排列在赤道面上，纺锤体形成。双价体开始分离。

后期Ⅰ 同源染色体分开，移向两极，每一极得到 n 条染色体，每一染色体具两个单体。此时，染色体数减半。

末期Ⅰ 染色体解旋，核膜重新形成，胞质分裂，成为二分体花粉。此期较短，再经短暂的间期即进入减数分裂Ⅱ。

减数分裂Ⅱ：

这一次分裂基本与普通有丝分裂相同，前期Ⅱ较短。中期Ⅱ染色体排列于赤道面，两条染色单体分开，着丝粒分裂，移向两极，末期Ⅱ两极各有 n 条染色体，染色体解旋，形成核膜，出现核仁，胞质分裂，形成花粉四分体，进一步发育为成熟花粉粒

(图1-3)。

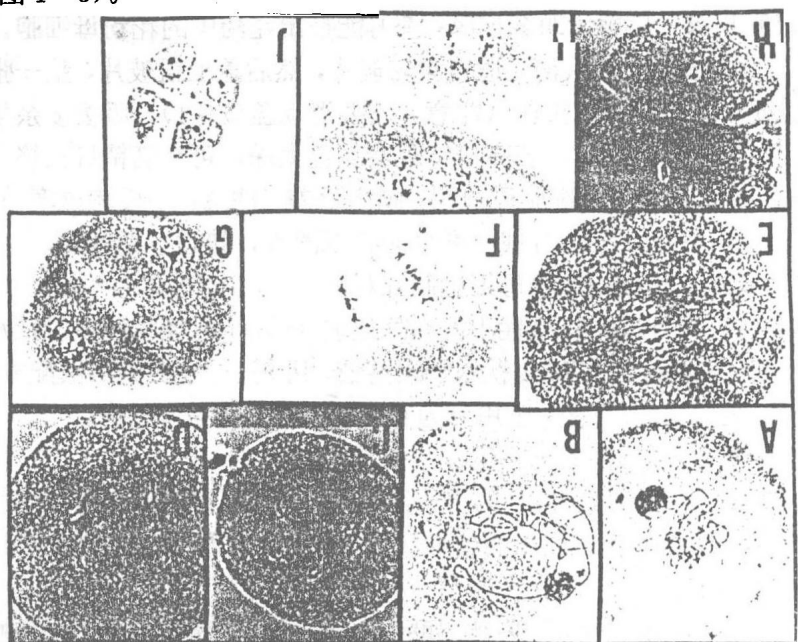


图1-3 玉米减数分裂各期

A. 细线期 B. 粗线期 C. 双线期 D. 终变期 E. 中期Ⅰ
F. 后期Ⅰ G. 间期 H. 中期Ⅱ I. 后期Ⅱ J. 小孢子

六、实验步骤

(一) 玉米花粉母细胞涂片观察

1. 采集玉米不同花期的雄花序用新配制的甲醇-冰醋酸(3:1)固定液固定18~24小时,经80%和70%酒精各泡半小时,然后保存于70%酒精中备用。这样处理的材料可保存使用2~3年。

2. 取经固定处理好的雄花序,根据经验,选取约0.5cm长的小花,用解剖针或镊子挑出花药(每一朵小花中有3个花药),选约0.2cm长的花药,置于载玻片上。

3. 在花药上滴一滴醋酸洋红染液，然后用解剖针把每个花药截成几段，用镊子撕裂片段，尽可能挤出花药中的花粉母细胞。

4. 去除花药残渣，适当涂匀玻片，然后盖上盖玻片，垫一张滤纸，以拇指均匀按压（注意：不要滑动盖玻片！），吸去多余染液，即可镜检观察。若高倍镜观察颜色太深，可在酒精灯火焰上过几遍，微烫，使细胞质透明，增大反差（注意：不要烤过度！）。

5. 仔细观察，寻找减数分裂各期图象，熟悉各期特点。

（二）小鼠精巢精母细胞制片观察

1. 预处理：将雄性小鼠在处死前 3~4 小时经腹腔注射秋水仙素（注射液为 0.05% 秋水仙素溶液，用 2% 柠檬酸钠溶液配成，预热至 37℃，每克体重用量为 0.02ml）。此步亦可省略。

2. 断颈椎法处死小鼠。

3. 剖开小鼠腹腔，取出小鼠精巢，用 2% 柠檬酸钠溶液洗去血污，剔除外膜，取出曲精细管置于 1% 柠檬酸钠溶液中静置 10~15 分钟。

4. 用新配制的甲醇-冰醋酸（3:1）固定液固定 10~20 分钟。

5. 将精细管转入装有 2ml 50% 醋酸的离心管。振荡或以吸管反复吹吸以分散细胞。

6. 吸出一滴溶液于干净载玻片上。用酒精灯微热，自然干燥。

7. 醋酸洋红染色 15~20 分钟。

8. 45% 醋酸溶液稍洗几秒钟，即可观察。也可以经 70%~100% 酒精脱水再封片制成永久制片。

七、实验结果

制片完成后，仔细观察，根据减数分裂各期特点，在制片中找出处于各期的花粉母细胞或精母细胞，并绘图。

八、思考题

1. 结合观察减数分裂过程中染色体形态结构的变化，简述减

数分裂过程中有哪些重要的遗传学事件发生？

2. 比较动、植物减数分裂的差异。

实验二 植物有性杂交技术

一、目的

1. 了解玉米或水稻等作物的花器构造、开花习性、授粉、受精等有性杂交基础知识。

2. 初步掌握一些作物的杂交方法，了解杂交后代的一般遗传现象和规律。

二、原理

具有不同基因型的两个品种或类型，通过雌雄细胞的结合，产生新类型，称为杂交。植物有性杂交是人工创造植物新的变异类型最常用的有效方法，也是传统遗传育种的重要方法之一。通过有性杂交方式，在子代可以重新组合基因，借以产生亲本各种性状的新组合，从中选择出最需要的基因型，进而创造出对人类有利的新种。在理论上，可分性状的遗传方式，决定于某一性状的基因的性质和数量等。根据进行杂交亲本间亲缘关系的远近，有性杂交又区分为近缘杂交和远缘杂交两大类，前者是指同一植物种内的不同品种之间杂交，后者指在不同植物种属或科间进行的杂交，也包括栽培种与野生种之间的杂交。如籼稻与粳稻属不同亚种，籼、粳稻杂交，即属远缘杂交。品种间杂交为近缘杂交，由于品种间亲缘关系较近，具有基本相同的遗传物质基础，因此品种间杂交易获成功。通过正确选择亲本，能在较短期间选育出具有双亲优良性状的新品种。但品种间杂交，有利经济性状的遗传潜力具有一定限度，往往存在有品种之间在某些性状上不能互相弥补的缺点。而采用远缘杂交的方式，可以扩大栽培植物的种质