

生物实验室系列

现代发育生物学 实验指南

吴秀山 主编



Chemical Industry Press



化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物实验室系列

现代发育生物学实验指南

吴秀山 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

现代发育生物学实验指南/吴秀山主编. —北京: 化学工业出版社, 2006. 12

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-5025-9842-6

I. 现… II. 吴… III. 发育生物学-实验-指南
IV. Q111-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 161345 号

责任编辑: 郎红旗 傅四周
责任校对: 李 林

文字编辑: 张春娥 焦欣渝
装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社
(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京市振南印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 33½ 字数 827 千字 2007 年 6 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 79.00 元

版权所有 违者必究

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处

理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

现代发育生物学的研究是一门相当独特的探究体系,在因果关系的切入点上,结果往往是第一位的,从结果中挑选我们有兴趣的研究对象进而运用种种方法追溯成因。在这些方法中,现代发育生物学吸纳了包括分子生物学、遗传学、生物化学、物理学、计算机学、医学等领域的研究手段,极大地丰富了研究方法,并成为了一门综合度越来越高的边缘科学,一方面可以极大地促进本学科的发展,而另一方面因为跨领域知识的增多也从事实上阻碍了一部分研究者的步伐。因此,全面介绍发育生物学实验知识、实验手段、实验安全的书籍是必不可少的。在我国,由于现代发育生物学起步较晚,间接导致了本领域理论与实验性书籍的缺乏。笔者集 20 余年在欧美和国内的发育生物学研究经验,将近年来该领域的研究成果分门别类,已经出版下列专著:《心脏发育研究》、《心脏发育概论》、《信号调控与心脏发育》、《现代发育生物学实验指南》等。该系列专著的每一册都编写成一个独立的系统,但又不脱离整套系列专著总的框架。该系列专著只是为了有一个抛砖引玉的效果,希望能给国内的研究者和学生以及部分有一定基础的爱好者一点有针对性的参考。

在现代发育生物学研究中,模式动物的研究作为一种研究思路已成为目前发育生物学研究中绝对的主流,以果蝇、斑马鱼、爪蟾、鸡、小鼠等为代表的模式动物各自具有相应的优势,在理论与实验操作上各有不同但是又可互为借鉴,并且很多最新技术(如转基因、RNA 干扰等)在各种模式动物研究平台中可以移植。迄今为止,几乎所有重大的现代发育生物学成就都是从研究模式动物获得的。从这个意义上说,在应用到人体的研究尚不成熟的今天,现代发育生物学的研究在目前这个阶段或可看成就是模式动物的研究。因而,这也是本书所介绍的重点。

本书既介绍了现代发育生物学最基本的理论和实验方法,如化学诱变这种经典的研究手段,又涉及到近年来研究最多、发展最快的一些新技术,如 RNA 干扰。全书力求理论性和实用性相结合,在书中会侧重提出一些重要的理论和概念,而一些实验中的技巧和注意事项也专门列出供读者参考。全书共分为三部分:第一部分主要介绍模式动物全基因组的基因突变方法与突变基因的克隆等技术;第二部分主要介绍基因在整体生物水平的表达与功能研究;第三部分则主要是介绍与发育模型及发育研究相关的内容。笔者所在的研究中心自 1995 年起开始大规模筛选心脏发育的相关基因,利用模式动物研究人类心脏发育的基因调控机理,并取得了一定的进展,我们将工作中的一些经验也编入本书。

本书是由湖南师范大学心脏发育研究中心的教师与研究人员协力完成的,在此特表感谢,并对本书的出版给予了关心和帮助的各位领导、各界人士一并致以谢意。

由于编者水平有限和编写时间紧迫,疏漏及不妥之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

吴秀山

二〇〇五年八月于长沙

目 录

上篇 基因突变与基因操作

实验 1	利用化学诱变法建立果蝇基因突变系	1
实验 2	利用化学诱变法建立斑马鱼突变体	9
实验 3	利用化学诱变法建立小鼠突变体	15
实验 4	利用 P 转座子插入突变法建立果蝇突变系	20
实验 5	利用转座子插入突变法建立小鼠突变体	28
实验 6	果蝇 P 转座子插入突变基因的克隆	37
实验 7	果蝇基因位点特异性敲除	44
实验 8	鼠胚的收集和培养	55
实验 9	小鼠基因敲除	62
实验 10	小鼠条件基因敲除	75
实验 11	鸡胚培养和处理技术	87
实验 12	哺乳动物细胞培养	98
实验 13	利用逆转录病毒建立脊椎动物细胞突变株	103
实验 14	DNA 定点诱变	115
实验 15	聚合酶链反应-银染单链构象多态性分析	122
实验 16	mRNA 差异显示技术	127

中篇 基因表达与基因功能

实验 17	利用 UAS/GAL4 异位表达系统研究果蝇基因的功能	133
实验 18	利用 COPAS 技术分析果蝇荧光成虫盘	142
实验 19	利用胚胎免疫组织化学技术分析果蝇基因的表达与功能	150
实验 20	利用原位杂交技术分析基因的表达与功能	155
实验 21	利用小鼠双色整体原位杂交技术分析基因的表达与功能	168
实验 22	利用反义寡核苷酸技术研究基因功能	181
实验 23	利用 RNA 干扰技术研究果蝇基因的功能	191
实验 24	利用 RNA 干扰技术研究鸡基因的功能	200
实验 25	利用 RNA 干扰技术研究小鼠基因的功能	206
实验 26	利用酵母双杂交技术分离调控基因的相互作用蛋白	212
实验 27	利用泛素分离双杂交系统分离跨膜基因的相互作用蛋白	219
实验 28	利用蛋白质组学技术分离相互作用蛋白	228
实验 29	利用体内足迹法分析蛋白质-DNA 的相互作用	241
实验 30	利用抗体技术鉴定鸡胚基因的表达与功能	251
实验 31	利用 RNA 酶保护法进行基因表达分析	255

实验 32	利用 RT-PCR 技术分析基因的表达	261
实验 33	利用定量 PCR 技术分析基因的表达	268
实验 34	利用绿色荧光蛋白分析基因的表达与亚细胞定位	274
实验 35	利用报道基因系统分析基因的功能	279
实验 36	GFP 和其他报道基因分析	288
实验 37	单克隆抗体的制备	301
实验 38	非洲爪蟾胚胎的激光共聚焦观察	310
实验 39	胚胎微注射免疫荧光标记分析	317
实验 40	DNA 甲基化分析	321

下篇 发育模型与基因调控

实验 41	转基因果蝇模型的建立	333
实验 42	转基因斑马鱼模型的建立	342
实验 43	转基因鸡模型的建立	348
实验 44	转基因鼠模型的建立	360
实验 45	利用逆转录病毒技术追踪鸡心脏细胞分化命运	372
实验 46	利用动态标记技术研究鸡胚命运图	378
实验 47	斑马鱼胚胎命运图的细胞示踪分析	385
实验 48	斑马鱼胚胎启动子分析	392
实验 49	人鼠嵌合血管发生模型	400
实验 50	胚胎血管形成的分析	407
实验 51	利用鸡模型研究心脏发育的调控蛋白	417
实验 52	利用移植嵌合体技术分析鸟类的发育机制	433
实验 53	利用果蝇模型研究脊椎动物信号调控	439
实验 54	体外心脏间叶细胞的特化分析	445
实验 55	小鼠心脏形态发生研究	450
实验 56	利用腺病毒研究小鼠胚胎心血管系统的发育	460
实验 57	小鼠胚胎对称性缺陷的检验	468
实验 58	小鼠胚胎干细胞基因捕获技术鉴别发育调控基因	473
实验 59	脊椎动物心脏左右定位分析 (心管位置和心管手性)	487
实验 60	利用超声多普勒诊断仪检测小鼠胚胎的心脏功能	497
实验 61	软骨发育异常小鼠模型的建立	502
实验 62	细胞凋亡分析	510

上篇 基因突变与基因操作

实验 1 利用化学诱变法建立果蝇基因突变系

1.1 实验原理

(1) 果蝇作为模式动物的优势

自 1910 年遗传学泰斗 Thomas Hunt Morgan 发现其第一个突变体白眼果蝇以来, 其作为模式生物的历史已有 90 多年。正是以它为模式生物, Morgan 和他的学生们才从有关性连锁 (sex linkage)、性染色体和伴性遗传等遗传规律发现中提出了基因论, 奠定了现代遗传学的基础, 并由此使 Morgan 获得了 1933 年的诺贝尔医学与生理学奖。也是从那时开始, 生物学家才普遍认识到模式生物在生命科学研究中的重要作用。

创立基因学说和奠定分子发育生物学基础的两代遗传学和发育生物学大师之所以用果蝇做出了突出贡献, 是因为果蝇自身具有作为模式生物的许多优点。

- ① 果蝇的生命周期短, 在实验室条件下, 一般 12d 就可完成一次世代交替。
 - ② 果蝇产生的卵数量大: 饲养良好、健康的雌果蝇可产卵 2~3 枚/h。
 - ③ 个体小 (成虫的长度仅为 2mm), 给予很少一点适宜食物在实验室就能饲养一大群。
 - ④ 具有几十个易于诱变分析的遗传特征, 并保持有大量的突变体。
 - ⑤ 由比较简单的染色体组成, 只有 4 对染色体, 且唾液腺细胞中含有巨大的多线染色体 (polytenic chromosome)。
 - ⑥ 卵子发生过程中已为早期胚胎发育积累了充分的养料, 且产出的卵子大, 易于观察, 易于收集。
 - ⑦ 对果蝇卵操作方便, 易于微注射: a. 卵椭圆形, 大小轴分别为 $420\mu\text{m}$ 和 $150\mu\text{m}$; b. 细胞膜周围有一层薄而坚硬的卵黄膜, 外表有一层坚硬的蛋白质卵壳, 可以用物理方法或化学处理将其除掉, 以使微注射所用的细注射针头可以穿过。
 - ⑧ 胚胎发育速度快, 前 13 次卵裂每次只间隔 9min, 细胞核成倍增加成为一个合胞体 (syncytium), 发育过程中的胚胎是观察分析卵裂、早期胚胎发生和躯体模式形成等发育调控机制的绝佳材料 (图 1.1)。
 - ⑨ 幼虫存在变态过程, 是分析成虫盘 (imaginal disc) 细胞增殖机制的理想模型。
- 由于果蝇具有以上优点, 近年来仍然被广泛用作分子发育生物学研究的模型。在其胚胎发育的梯度假说被证实后, 已鉴定出了一些在卵子中形成梯度、调节细胞定位和分化并决定

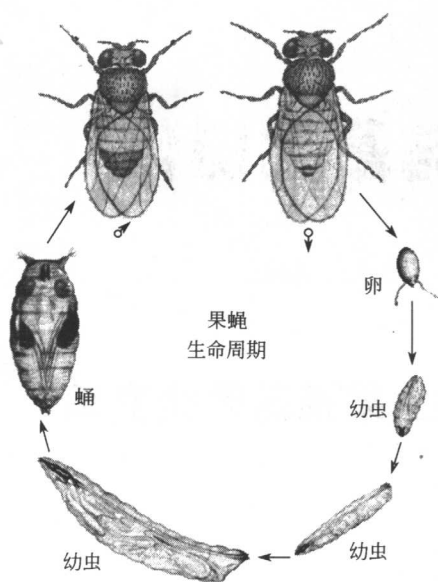


图 1.1 果蝇生命周期

胚胎发育方式的成形因子 (morphogen); 在位于卵子的后极和生殖细胞的细胞质 (germ plasm) 中发现了为种系细胞导向的蛋白因子。有趣的是, 胚胎发育的梯度假说在 1997 年和 1998 年连续两年被《科学》杂志称为当年十大重要突破成就之一。关于调控生物昼夜节律生物钟基因的研究也多半是在果蝇中完成的。

果蝇的基因组大约为 180Mb, 其常染色质部分约为 120Mb。到 2000 年 3 月, 常染色质部分的全部碱基序列已基本确定, 其基因组大约编码 13600 个基因。这样也方便人们用于研究。

(2) 化学诱变剂

早在 1948 年, Gustafsson 等曾用芥子气处理大麦获得突变体。1967 年 Nilan 用硫酸二乙酯处理大麦种子培育成了矮秆、高产品种 Luther。此后化学诱变剂及其应用就逐渐发展起来。目前公认的最有

效和应用最多的是烷化剂和叠氮化物两类。

烷化剂是指具有烷化功能的化合物, 带有一个或多个活性烷基, 该活性烷基转移到一个电子密度较高的分子上, 可置换碱基中的氧原子, 碱基被烷化后, DNA 在复制时会导致配对错误, 产生突变。其中以甲磺酸乙酯 (EMS)、硫酸二乙酯 (DES) 和乙烯亚胺 (EI) 等类型的化合物应用较多。

叠氮化物是一种动植物的呼吸抑制剂, 它可以使复制中的 DNA 的碱基发生替换, 从而导致突变发生, 是目前诱变率高而安全的一种诱变剂。其中以叠氮化钠 (NaN_3) 的研究和应用较多。

化学诱变剂的特点如下:

- ① 诱发突变率较高, 染色体畸变较少, 诱变范围广。
- ② 对处理的材料损伤轻, 有的化学诱变剂的作用只限于在 DNA 的某些特定部位发生变异。
- ③ 大部分有效的化学诱变剂较物理诱变剂的生物损伤大, 容易引起生活力和可育性下降。

(3) 果蝇化学诱变法

化学诱变是诱变果蝇基因的传统方法, Ghristiane、Nusslein-Volhand 和 Eric Wiechans 曾经利用化学诱变剂诱发果蝇体节发育的基因突变, 得到并鉴定了十几个与体节发育有关的基因突变, 从而荣获 1995 年的诺贝尔医学与生理学奖。

果蝇中常用的化学诱变剂有甲磺酸乙酯 (EMS)、三乙烯胺三嗪 (TEM) 以及甲醛等。EMS 是果蝇基因组诱变中使用最广泛的诱变剂, 它是一种致癌性烷化剂, 通过诱导 DNA 形成 O^6 -乙基鸟嘌呤等 DNA 损伤, 导致 GC 到 AT 的转变。EMS 诱变率高, 浓度为 0.025mol/L 的 EMS 能使 X 染色体产生 30% 的隐性致死突变, 而在常染色体中诱变率则高达 60%; 但 EMS 作为诱变剂也存在不足之处, 许多突变在第一轮筛选时难以确定。TEM 常用作诱发小片段的缺失和点突变, 过去 TEM 主要是用于注射到成体果蝇腹部, 而现在采

用与 EMS 一样的方法, 用 TEM 饲养果蝇, 0.2mmol/L TEM 在 X 染色体中引起 10%~12% 的隐性致死突变, 其缺失类似于 X 射线引起的突变。甲醛是过去经常使用的化学诱变试剂, 一般通过处理幼虫引起点突变和染色体畸变 (如缺失、重复等), 因此当需要引起多种突变特别是缺失时, 常使用甲醛作诱变剂。三种化学诱变剂各有利弊, 但 EMS 有较高的诱变率, 并且操作简单, 所以实验室常用 EMS 诱变野生型果蝇。

(4) 果蝇平衡致死系

带有致死基因的品系本来是不容易保存的。因为纯合品系是真实遗传的, 所以一般品系都以纯合品系的形式保存下来。例如果蝇的白眼品系, 在培养瓶中, 每只雌体都是 w/w , 每只雄体都是 w/Y ; 每产生一代新个体时, 几乎全是纯合的。但致死基因不能以纯合状态保存, 因为纯合个体是致死的, 所以只能以杂合状态保存。例如果蝇中第三染色体上的 D (dichaete, 展翅) 是个显性基因, 但也是个隐性致死基因。要培养这个品系, 只能把 $D/+ \text{♀} \times D/+ \text{♂}$ 交配, 下一代是 $2/3$ 的 $D/+$, $1/3$ 的 $+/+$ (本来应当是 $1:2:1$, 但 $1/4 D/D$ 个体死亡)。在保存这个品系时, 必须把每代个体逐个观察, 把 $+/+$ 个体淘汰, 只让 $D/+$ 个体留种。如果不这样选择, 则培养瓶中必然进行着自然选择, 因为 $D/+ \text{♀} \times D/+ \text{♂}$ 所产生的子代数只有 $+/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$ 所产生子代数的 75%。所以如果不把 $+/+$ 个体人工淘汰, 则饲养瓶中 $D/+$ 个体数必然每代降低, 几代之后饲养瓶中就只有 $+/+$ 个体, 而没有 $D/+$ 个体, 也就是说, D 这个基因遗失了。

但是每一代都要逐个观察是极费人力和时间的, 尤其在保存果蝇品系较多时。因此 Morgan 的学生 Muller 想出一个巧妙的办法, 就是用另一致死基因来“平衡”, 不过这第二个致死基因必须与第一个致死基因不发生交换重组才行。例如可用 Gl (glued, 粘胶眼) 来“平衡”, Gl 也是第三染色体上的显性基因, 但纯合致死。把 D 个体与 Gl 个体交配, 挑选后代中既表现 D 又表现 Gl 的雌雄个体传代, 后代全是 $D+/+Gl$, 而不会有分离。其实并不是真正不分离, 不过分离出来的纯合个体全致死而已。这种永远以杂合状态保存下来, 不发生分离的品系, 叫永久杂种 (permanent hybrid), 也叫做平衡致死品系 (balanced lethal system)。不过前提是 D 与 Gl 之间必须不发生交换才行。如果发生交换, 则除 DGl 染色体之外, 还有 $++$ 染色体, 则后代中就会出现 $++/++$ 个体; 几代之后就会把 D 和 Gl 这两个基因都淘汰掉。但因为 D 与 Gl 在连锁图上位置极近, 都在“41”那个图距附近, 两者间几乎没有交换。可是并不是每个致死基因都能由它附近的另一个致死基因来平衡, 但利用倒位就可解决这个问题。例如果蝇第二染色体上倒位品系 Cy (curly, 卷翅) 在 II (第二染色体左臂) 有个倒位, 在 II (第二染色体右臂) 也有个倒位, 几乎把整个第二染色体的交换全部抑制。而 Cy 的纯合是致死的, 因此第二染色体上任何致死基因都可用 Cy 来平衡。要保持一个平衡致死系统, 必须满足下面两个条件:

- ① 一对同源染色体的两个成员各带有一个座位不同的隐性致死基因;
- ② 这两个非等位的隐性致死基因始终处于各个同源染色体上。

要满足第二个条件, 通常要有一个“交换抑制因子”, 使两个非等位的致死基因不致由于交换而集中在一个染色体上。

因此, 通常染色体平衡系具有以下特点: 同一染色体内的多重倒位 (倒位的遗传效应即抑制重组子的产生), 一个或更多的显性标记, 通常 2~4 个隐性标记, 以及一个纯合致死基因。果蝇的每条染色体都具有其特有的一套平衡系。表 1.1 列举了一部分每条染色体的主要平衡系及与其相连的显性标记。较小的 4 号染色体没有平衡系, 该染色体一般不发生或很少

发生同源重组。这些平衡系用数字编号并分别具其独有的显性标记和隐性标记，尽管有些平衡系是早期平衡系的改良系且常共有同样的标记。

表 1.1 果蝇染色体上的平衡系及显性标记

	染色体平衡系	显性标记		染色体平衡系	显性标记
1	FM3	B;棒眼	3	TM1	Me;波纹
	FM4	B;棒眼		TM2	Ubx;平衡棒上刚毛
	FM6	B;棒眼		TM3	Sb;短刚毛
	FM7a,FM7b,FM7c	B;棒眼		TM6	Ubx;平衡棒上刚毛
2	CyO	Cy;弯翅		TM6b	Hu;肱骨,Tb;短粗体
	SM1	Cy;弯翅		TM6c	Tb;短粗体
	SM2	Cy;弯翅		TM8	DTS;显性暂时敏感性,Sb;短刚毛
	SM6	Cy;弯翅		TM9	DTS;显性暂时敏感性,Sb;短刚毛
	SM6a,SM6b	a;弯翅, b;弯翅和糙眼			

(5) 缺失品系

第二和第三染色体的缺失品系是利用遗传方法使染色体产生缺失，通过筛选和遗传分析，鉴定出缺失的区域。目前果蝇品系中心有覆盖第二和第三染色体的一系列染色体缺失系。利用系列缺失系测定突变基因，可迅速确定突变基因的细胞遗传学位点。

1.2 实验材料

(1) 器材

体视镜，光学显微镜，培养箱，培养瓶，毛笔，镊子等。

(2) 果蝇品系

- ① 野生型果蝇：红眼，直翅，长刚毛，正常体长。
- ② 果蝇染色体平衡系（表 1.1）。
- ③ 果蝇第二、第三染色体双平衡系：W, DF (2R) WMG S /SM6a-TM6b，可以同时平衡第二和第三染色体，平衡染色体标记为卷翅和短体，隐性致死基因标记为星眼。
- ④ 第二和第三染色体的缺失品系。

(3) 培养基

① 玉米培养基

配方：水 150mL，琼脂 1.5g，蔗糖 13g，玉米粉 17g，酵母粉 1.4g，丙酸 1mL。

配法：

- a. 取应加水量的一半，加入琼脂，煮沸，充分溶解，加糖。
- b. 取另一半水混合玉米粉加热，调成糊状。
- c. 将上述两者混合，煮沸。
- d. 待稍冷后，加入酵母粉及丙酸。

充分混匀，分装，按上述配法每次可配制饲料 200mL 左右。

② 葡萄汁培养基

配方：葡萄汁 150mL，琼脂 12g，水 144mL。

配法：煮沸，冷却至 60℃ 后，加入 3mL 无水乙醇、3mL 冰醋酸，混匀，分装于小培养皿。

(4) 试剂

变性试剂：常用于果蝇诱变的化学诱变试剂是 EMS。用于果蝇诱变通常配成 EMS-1% 蔗糖溶液，即蔗糖 1g、EMS 0.26mL、H₂O 100mL。

1.3 实验方法

(1) 果蝇的培养

① 配制果蝇饲料 玉米饲料用于常规培养。

② 原种培养 在做新的留种培养时，应先检查一下果蝇有无混杂，亲本的数目一般为每瓶 5~10 对。原种果蝇 2~4 周换一次培养基（依温度而定，10~15℃ 4 周 1 次、20~25℃ 2 周 1 次）。每一原种培养至少保留两套，培养瓶的标签上要标明突变名称、日期等。作原种培养时，温度可控制在 10~15℃，培养时避免日光直射。

③ 果蝇品系的扩增 果蝇繁殖速度很快，成蝇十几天以后就可产生大量的幼蝇，这时需要分装，通常是在星期一把培养瓶中的成果蝇倒出分装成几瓶，然后在星期三、星期五、下周一、下周三、下周五同样分装成几瓶。此后，原培养瓶就可以处理掉，这样就达到果蝇品系扩增的目的了。

(2) EMS 化学诱变

① 收集一天内羽化的野生型果蝇，25℃ 培养 3 天。

② 配制变性溶液与 EMS-1% 蔗糖溶液。

③ 把野生型雄果蝇（100 只/瓶）装入瓶底有 2 张滤纸的培养瓶，然后用 10mL 注射器注入 1.1mL 的 EMS-1% 蔗糖溶液，使滤纸饱和，但果蝇不粘在滤纸上，然后在 25℃ 培养 24h。

④ 把果蝇转入有培养基的培养瓶，25℃ 培养 24h。

⑤ 准备杂交。

(3) EMS 化学诱变隐性致死基因平衡系的建立

① 用双平衡系建立平衡致死系 收集双平衡系处女蝇，以 3 只/瓶装入指管，然后往每个指管内加入一只已经诱变的野生型雄果蝇，25℃ 杂交培养。F₁ 代选择 1 只白眼、正常眼、弯翅、短体的雄果蝇与双平衡系处女蝇（3 只/瓶）杂交，25℃ 培养。重复 F₁ 代杂交过程。F₃ 代果蝇选择白眼、正常眼、弯翅、短体的果蝇自交，观察 F₃ 代果蝇性状。F₄ 代如果没有分离，即不出现直翅或正常体，则为所需的隐性致死基因双染色体平衡系。图 1.2 所示即为 EMS 化学诱变隐性致死基因双染色体平衡系。

② 建立隐性致死基因第二染色体或第三染色体平衡系 收集第二染色体或第三染色体平衡系的处女蝇与 EMS 化学诱变隐性致死基因双染色体平衡系雄果蝇杂交，25℃ 培养，F₁ 代果蝇选择白眼、弯翅的雌雄果蝇自交 [图 1.3(a)]，或选择白眼、短体的雌雄果蝇自交 [图 1.3(b)]，观察 F₂ 代果蝇性状。F₂ 代如果没有分离，即不出现野生型的直翅 [图 1.3(a)] 或正常体长 [图 1.3(b)]，则为所需的平衡系。

(4) 诱变基因的细胞遗传学定位

① 一步法定位 收集隐性致死平衡系处女蝇，与一系列第二染色体缺失系或第三染色体缺失系雄蝇分别杂交，观察 F₁ 代果蝇性状，若其中一个杂交组合的 F₁ 后代中无野生型

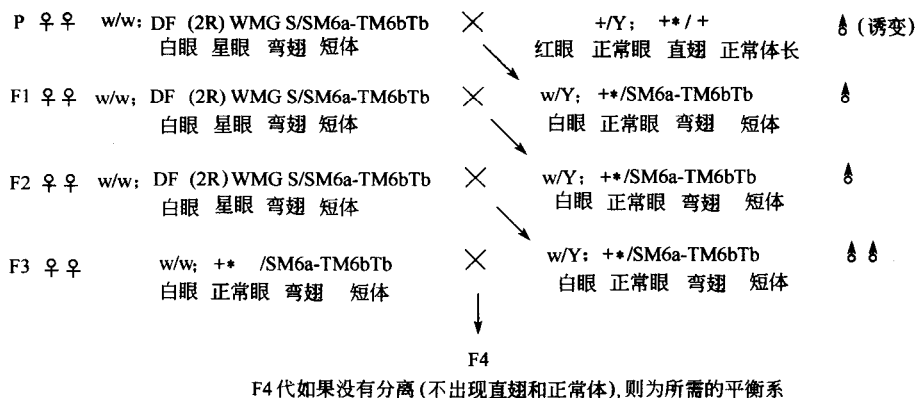


图 1.2 EMS 化学诱变隐性致死基因双染色体平衡系

* 表示在第二染色体或第三染色体的隐性致死基因

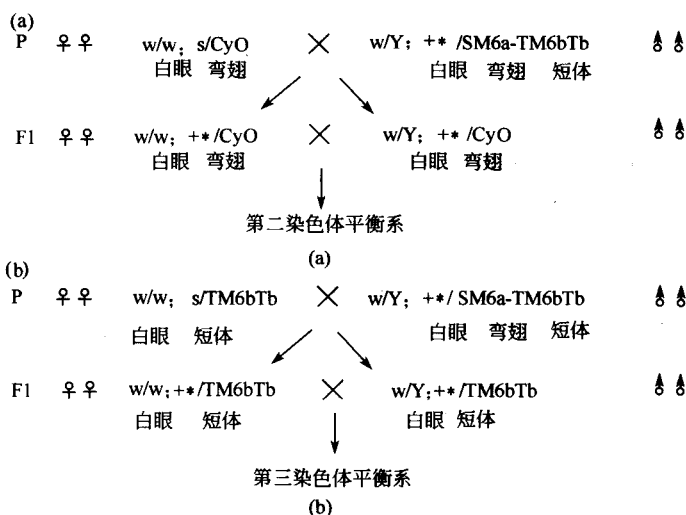


图 1.3 隐性致死基因第二染色体或第三染色体平衡系的建立平衡

* 表示在第二染色体或第三染色体的隐性致死基因, s 表示隐性致死基因

果蝇出现, 则隐性致死基因位于该测交缺失系的染色体缺失区内 (图 1.4)。

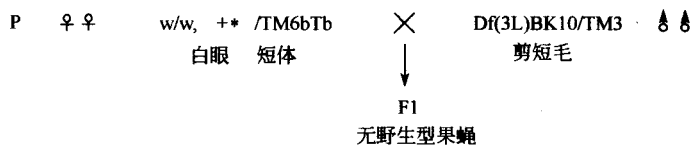


图 1.4 突变基因的缺失系测交

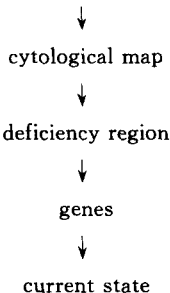
若 F1 后代中无野生型果蝇出现, 则隐性致死基因位于测交缺失系的染色体缺失区内 (71B~71F)。* 表示在第二染色体或第三染色体的隐性致死基因

② 进一步缩小缺失区域 根据已经得出的遗传学位点, 在 Flybase (网址: <http://flybase.bio.indiana.edu>) 中的细胞遗传学图谱上查找与已知区段重叠的缺失区, 并用相应的

缺失品系与原突变体品系杂交, 再根据后代分离情况将该突变品系的缺失区域定位在更小的区段。

③ 查找缺失区域内的候选基因 在果蝇数据库内, 先找到突变品系所在的缺失区域, 然后在该区段内查找类似突变表型的候选基因。然后从果蝇品系中心购买这些候选基因品系, 与 EMS 化学诱变隐性致死基因测交, 以确定致死基因的身份。查找途径如下:

<http://flybase.bio.indiana.edu>



1.4 注意事项

(1) 影响化学诱变效应的因素

① 温度 温度影响诱变剂的水解速度。低温有利于保持化学物质的稳定性。升高温度, 可促进诱变剂在材料内的反应速度和作用能力。

② 溶液 pH 值及缓冲液使用 一些诱变剂在不同 pH 下分解的产物不同, 从而产生不同的诱变效应。处理前、处理中都应校正溶液 pH 值。使用一定 pH 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 可提高诱变剂在溶液中的稳定性, 浓度不应超过 0.1mol/L。

③ 浓度 在使用的时候要注意化学诱变剂的剂量, 并不是剂量越大越好, 选择合适的剂量才能得到良好的诱变效果。高浓度处理, 生理损伤大; 低温、低浓度、长时间处理, 存活率高, 突变率也高。

(2) 诱变后的处理

诱变处理后的材料, 用清水反复冲洗, 以降低残留, 避免生理损伤。一般要冲洗 10~30min 或更长时间。

(3) 生物安全

一般化学诱变使用的诱变剂对人体的危害都很大, 建议在通风橱里操作, 同时戴手套、口罩, 穿着实验服。实验完成后所使用的所有器皿以及白大褂都应用 10% 的硫代硫酸钠溶液浸泡处理, 以消除毒性。

(4) 化学诱变剂的保存

大多数化学诱变剂容易分解, 所以保存的时候要注意避光, 同时有些容易吸潮, 需要在干燥器中保存, 还有一些高温容易分解, 所以要低温保存。

(李 静 袁葵洲 吴秀山)

参 考 文 献

1 刘祖洞. 遗传学. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1979

- 2 Grigliatti T Mutagenesis. In: Roberts D B (Ed) *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986. 39~58
- 3 Peter D Keightley, Ohmi Ohnishi. EMS-Induced Polygenic Mutation Rates for Nine Quantitative Characters in *Drosophila melanogaster*. The Genetics Society of America, 1998
- 4 Alyssa Bentley, Bridget MacLennan, Jonathan Calvo, Charles R Dearolf. Targeted Recovery of Mutations in *Drosophila*. The Genetics Society of America, 2000
- 5 Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 6 Chen Y, Yee D, Dains K, Chatterjee A, Cavalcoli J, et al. Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2000, 24: 314~317
- 7 Dearolf C R, Hersperger E, Shearn A. Developmental consequences of *awdb3*, a cell-autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by hybrid dysgenesis. *Dev Biol*, 1988, 129: 159~168
- 8 Glickman B W, Horsfall M J, Gordon A J, Burns P A. Nearest neighbor affects G : C to A : T transitions induced by alkylating agents. *Environ Health Perspect*, 1987, 76: 29~32
- 9 Greenspan R J. *Fly Pushing*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997
- 10 Klungland A, Laake K, Hoff E, Seeberg E. Spectrum of mutations induced by methyl and ethyl methane sulfonate at the *hprt* locus of normal and tag expressing Chinese hamster fibroblasts. *Carcinogenesis*, 1995, 16: 1281~1285
- 11 Lewis E B, Bacher F. Methods of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros Inf Serv*, 1968, 43: 193

实验 2 利用化学诱变法建立斑马鱼突变体

2.1 实验原理

(1) 斑马鱼

斑马鱼是一种生长在印度的硬骨鱼类，是一种常见的热带鱼，容易饲养，3个月即可达到生殖成熟期，一条性成熟雌鱼每星期可产卵200个。斑马鱼的受精和胚胎发育在体外完成，胚胎发育同步且速度快，胚胎透明，神经、肌肉、心脏、血管等在显微镜下可清晰观察，用肉眼和/或显微镜可观察斑马鱼胚胎发育过程，因而是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料。经过30多年的研究应用和系统发展，已有约20个斑马鱼品系，斑马鱼基因数据库里有相关的资料可查询和下载，研究较方便。斑马鱼的细胞标记技术、组织移植技术、突变技术、单倍体育种技术、转基因技术、基因活性抑制技术等已经成熟，且有数以千计的斑马鱼胚胎突变体，它们是研究胚胎发育分子机制的优良资源，有的还可作为人类疾病模型。斑马鱼胚胎发育机制与哺乳动物非常相似，许多重要的调控蛋白质的表现位置与时间也都与哺乳动物相似，利用斑马鱼的胚胎发育作为模型来研究脊椎动物的胚胎发育。斑马鱼已成为研究癌症、心血管疾病、器官发育、脊椎动物胚胎发育、神经发育、细胞凋亡的重要模式，在药物毒性的筛检中也扮演重要角色（图2.1）。

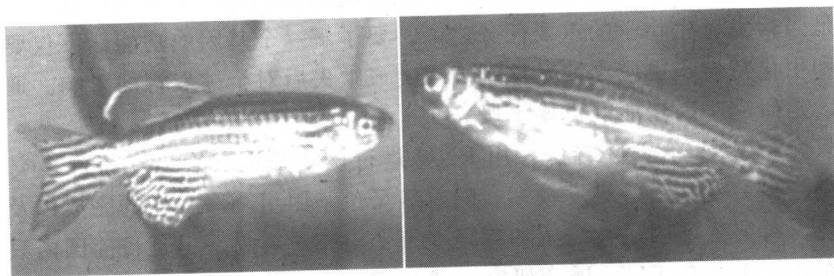


图 2.1 斑马鱼

(2) 常用诱变方法

目前常用的产生斑马鱼突变的方法有3种： γ 射线或X射线照射、插入诱变、ENU(N-ethyl-N-nitrosourea, N-乙基-N-亚硝基脲)化学诱导。射线照射会导致染色体大片段的缺失或染色体的重排，产生的突变率高达1%，但由于其突变常累及多个基因，突变的表型通常是若干个基因功能改变的共同结果，因此不利于进行致突变基因的功能分析。而插入诱变以逆转录病毒为载体，用显微注射法将目的基因片段导入斑马鱼的受精卵，整合到基因组中，干扰正常基因的表达，但其产生突变的效率较低，仅为ENU化学诱导法的1/10。ENU是一种DNA烷基化的化学诱变剂试剂，它通过对基因组DNA碱基的烷基化修饰，在生殖细胞减数分裂前诱导碱基对的替换，诱导DNA在复制时发生错配而产生突变。它主要诱发单碱基突变，造成单个基因发生突变（双突变的情况非常少），更接近于大多数的人类