



• 生命科学实验指导系列教材 •

遗传学与基因工程 实验指导

EXPERIMENTS OF
GENETICS AND GENE ENGINEERING

李建粤 崔永兰 崔丽洁 开国银 编著



科学出版社

学实验指导系列教材

遗传学与基因工程 实验指导

李建粤 崔永兰 崔丽洁 开国银 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是一本实用性较强的遗传学与基因工程实验教材。在每个实验中,通过实验原理及预备知识介绍,使读者能够更好地了解与该实验相关的原理及背景知识;并且在大多数实验步骤中,还插入了一些在实验操作中拍摄的照片,使读者能够更容易地把握其中的技术要领并观察实验结果。本书共编著了 19 个实验,实验 1 至实验 10 为经典遗传学实验内容,实验 11 至实验 19 为基因工程实验内容。

本书可供高等院校中生物科学、生物技术、科学教育、园艺或医药等专业的师生使用,同时也可作为中学生物教师的教学参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学与基因工程实验指导 / 李建粤等编著. —北京: 科学出版社, 2014. 3

生命科学实验指导系列教材

ISBN 978-7-03-039764-5

I. ①遗… II. ①李… III. ①遗传学—实验—高等学校—教材②基因工程—实验—高等学校—教材 IV. ①Q3-33②Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 026693 号

责任编辑: 朱 灵 陈 露 封 婷
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 靓

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

上海欧阳印刷厂有限公司印刷

科学出版社出版 各地新华书店经销

*

2014 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2014 年 3 月第一次印刷 印张: 4 3/4 插页: 2

字数: 99 000

定价: 16.80 元

前 言

尽管遗传学诞生较晚,但它在生命科学领域中是一门发展非常迅速的学科。随着遗传学研究从细胞水平向分子水平的深入,它已成为当今生命科学前沿的核心学科。基因工程属于遗传学的一项应用技术,如今也已成为分子生物学研究领域的重要方法之一。

在高等院校中与生物学相关的专业,如生物科学、生物技术、科学教育、园林等的课程设置中,遗传学和基因工程都会被列为重要的基础课程。而且,有些高等院校在分子生物学实验课程中,也会选择与基因工程相关的实验内容。为了使教师和学生能有一本更实用的教材,我们尝试编写了本书。

本书内容主要包括经典遗传学实验和基因工程实验两大部分,共 19 个实验。其中,实验 1、实验 3、实验 5、实验 6、实验 8 至实验 11 由崔永兰编写,实验 12、实验 13、实验 14 和实验 17 由崔丽洁和开国银编写,其他实验由李建粤编写。

编者之所以能够在较短时间内顺利完成本书的编写,首先要感谢曾在上海师范大学生物系遗传教研室工作过、目前已退休的李玉莺副教授、周根余教授和阮家超副教授。本书的实验 1 至实验 9 是在这三位教师编写或完善的《遗传学实验讲义》基础上编写的。

本书的最大特点是在大多数实验步骤中,插入了照片,使读者能够更容易地把握其中的技术要领并观察实验结果。这些照片主要是在 2009 级和 2010 级生物科学专业的学生上实验课时,由编者或学生拍摄的。在此,向为本书编写提供实验照片的学生们表示由衷地感谢!同时也感谢科学出版社在本书出版过程中给予的支持和帮助!

由于经验和水平有限,本书难免存在一些问题,敬请读者给予批评指正,谢谢!

李建粤

2013 年 11 月 8 日

目 录

前言

实验 1	细胞的有丝分裂	1
实验 2	植物小孢子减数分裂过程观察	4
实验 3	果蝇的培养与性状观察	9
实验 4	分离规律实验	14
实验 5	人类染色体组型分析	18
实验 6	巴氏小体的制备与观察	22
实验 7	小鼠骨髓细胞染色体制片法	25
实验 8	数量性状的生物统计分析	29
实验 9	唾腺染色体的制备和观察	33
实验 10	植物多倍体诱导及鉴定	38
实验 11	植物核酸提取、DNA 纯化以及纯度和含量分析	41
实验 12	碱法抽提大肠杆菌质粒 DNA	45
实验 13	质粒载体 DNA 的限制性内切酶酶切	48
实验 14	PCR 技术扩增 DNA	51
实验 15	用琼脂糖凝胶电泳法进行 DNA 片段的分离和纯化	54
实验 16	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	57
实验 17	DNA 片段的连接反应	61
实验 18	大肠杆菌感受态细胞制备及遗传转化实验	63
实验 19	转基因水稻 β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因表达产物的检测	66
参考文献		69
彩色图版		

实验 1 细胞的有丝分裂

【实验目的】

1. 初步学会植物根尖压片的基本技术。
2. 了解细胞有丝分裂的整个过程以及染色体在各个时期的动态变化。

【实验原理与预备知识】

有丝分裂是体细胞分裂的主要方式。高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎尖等器官的分生组织区,其中根尖是最常用的实验材料。有丝分裂期在整个细胞周期中所占的时间相对较短,是一个没有明显界限的动态的连续过程,但是可以根据一定的标志将它们划分为 4 个时期(图 1-1):前期(prophase),中期(metaphase),后期(anaphase)和末期(telophase)。在细胞分裂前的间期(interphase),遗传物质 DNA 完成复制,并形成染色单体。

前期:是有丝分裂过程的开始阶段,细胞核内染色质丝开始浓缩,经过螺旋化、折叠和包装等过程,逐渐缩短变粗,形成光学显微镜下可见的染色体结构。在前期结束时,核仁消失,核膜崩解。

中期:核膜完全消失,全部染色体排列在细胞中央赤道板上,出现纺锤丝,并与每个染色体的着丝粒相连。

后期:由于纺锤丝微管收缩,着丝粒纵向分裂,每个染色体的两个染色单体分别向两极移动。由于着丝粒在每个染色体上位置的不同,可呈现不同的形状。染色单体就成为子染色体。

末期:分裂后的两套染色体开始在两极聚集,染色体开始解螺旋,恢复在间期伸展的状态。纺锤丝消失,核仁、核膜重新形成。此时,核分裂完成,每个细胞有两个细胞核。

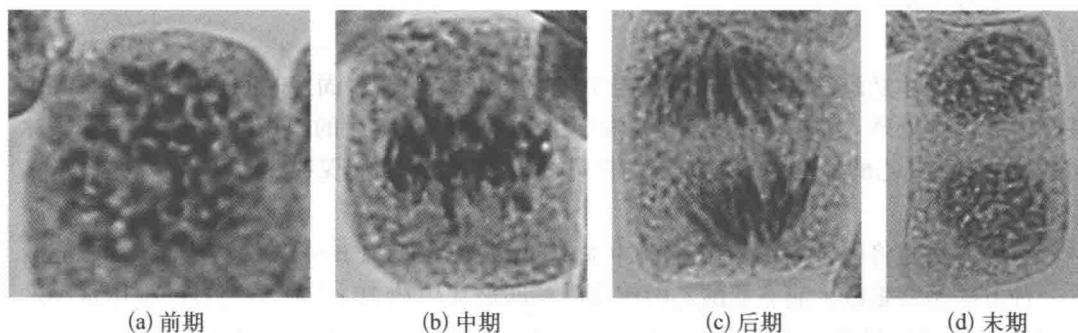


图 1-1 洋葱根尖细胞有丝分裂的基本过程

有丝分裂制片的主要目的是进行染色体鉴定,以便观察到更多分裂相,所以通常需要对材料进行预处理。预处理主要通过抑制和破坏纺锤丝的形成获得更多的中期分裂相。常用的预处理方法有物理法、化学法、混合处理法等。本实验使用化学药剂秋水仙素进行

预处理。

另外,植物细胞的细胞壁对细胞形态和结构起支撑和保护作用,分生组织的细胞壁结构将分生细胞结合成一个整体,因此在压片之前需要采用适当的方法软化或部分分解细胞壁,使细胞间易于分离,呈单细胞状态,这一操作称为解离。同时,解离也可适当清除部分细胞质,使细胞质背景趋于透明化,便于观察染色体。常用的解离方法主要有酸解法和酶解法。本实验使用盐酸进行解离。

【实验用品】

1. 材料

洋葱(*Allium cepa*, $2n=2X=16$)根尖。

2. 用具

显微镜、小刀片、镊子一把、解剖针一支、试管一只、载玻片、盖玻片,酒精灯、吸水纸。

3. 药品及配制

醋酸洋红染液: 100 mL 45%醋酸(45 mL 冰醋酸加水稀释至 100 mL)加 1 g 洋红,煮沸(回流装置)约 2 h,冷却 2 天后过滤即可用。如发现染液过浓可用 45%醋酸稀释。

秋水仙素溶液: 称取 200 mg 秋水仙素溶于 100 mL 0.85% NaCl。

冰醋酸乙醇固定液: 95%乙醇 3 份加冰醋酸 1 份(3:1)。

1 mol/L HCl: 量取 82.5 mL 浓盐酸(相对密度 1.18)加蒸馏水 917.5 mL。

盐酸乙醇解离液: 95%乙醇 1 份加浓盐酸 1 份(1:1)。

【实验步骤】

1. 取材

将洋葱根部浸入盛水广口瓶上,使根萌发,当根长至 1~2 cm 时,切下 1 cm 左右的根进行预处理。

2. 预处理

经预处理的根,细胞分裂被抑制在中期,染色体缩短便于计数。方法是将切下的根放在 0.04%~0.2%的秋水仙素溶液里浸泡 2~5 h,水洗数次;或者将根放入蒸馏水中于 0~3℃条件下保存 24 h。

3. 固定

将根放入冰醋酸乙醇固定液中固定 3~24 h(如急需观察,固定时间可缩短至 10 min,甚至可省去预处理,直接在醋酸洋红染液中染色压片),固定后的根用 95%的乙醇洗去冰醋酸,移入 70%乙醇保存液。经固定的根可放入冰箱 4℃长期保存。

4. 解离

一种方法是将固定后的根经流水冲洗 10 min,在 60℃ 1 mol/L 盐酸中解离 10 min;另一种方法是将根放入滴有盐酸乙醇解离液的凹玻片内约 10 min。解离过的根用水冲洗 2~3 次。解离的目的是溶解细胞之间的果胶质,使根尖细胞在压片时更容易分散。

5. 染色

用刀片切取根尖 2~3 mm 的分生组织生长区,滴 1 滴醋酸洋红染液,放置 10~15 min,加盖玻片,用解剖针尖或柄轻轻敲击盖玻片,使细胞分散,用吸水纸吸去多余的染液,然后用拇指用力按压。为了增加染色效果,可将载玻片在酒精灯上迅速通过数次。

6. 在显微镜下观察压片

先用低倍镜($10\times$)寻找有分裂相的视野,然后选择染色体分散的细胞在高倍镜($40\times$)下仔细观察,寻找有丝分裂的各个时期,进行染色体计数和拍照。

7. 制成永久装片

装片如需要长期保存,可经脱水、透明、封片等步骤制成永久片。方法是将临时片扣置于 70%乙醇中,令其盖玻片自行脱落;然后经 95%乙醇,无水乙醇脱水(3~5 min),再经二甲苯透明(3~5 min),最后用中性树胶封片,贴上标签,注明材料名称、有丝分裂典型时期、制片时间、制作者等信息。

【问题与思考】

1. 什么是染色单体?子细胞中的染色体与母细胞中的染色体是否相同,为什么?有丝分裂有什么生物学意义?

2. 在有丝分裂后期,着丝粒分裂是否由于纺锤体的牵拉引起?

【作业】

1. 每人制作两张洋葱根尖细胞分裂的临时压片。

2. 绘制所观察到有丝分裂典型时期的染色体图像,并简要说明各时期染色体的变化和特征。

实验2 植物小孢子减数分裂过程观察

【实验目的】

1. 了解小孢子形成过程及减数分裂中染色体的动态变化。
2. 掌握制作细胞染色体压片的基本技能。

【实验原理与预备知识】

减数分裂是一种特殊的有丝分裂,在减数分裂的过程中染色体分裂一次而细胞分裂两次。因此,一个含双倍染色体($2n$)的孢母细胞便形成了四个含单倍染色体(n)的四分孢子。生物体以染色体的减半来调节受精作用增加的染色体,保证了物种染色体的稳定性。

在花粉母细胞中的 $2n$ 个染色体, n 个来自父本, n 个来自母本, n 对染色体虽各不相同,但每对的形态完全一样,称为同源染色体。例如,玉米有 10 对共 20 个染色体,10 个来自父本,10 个来自母本。大麦有 7 对共 14 个染色体,7 个来自父本,7 个来自母本。减数分裂不仅使染色体数目减半,还包含父母同源染色体的配对,非姐妹染色单体的交换重组以及非同源染色体的自由组合。染色体的这种行为和遗传的传递规律是一致的。

减数分裂又可分为第一次细胞分裂和第二次细胞分裂,过程简述如下。

前期 I: 减数第一次细胞分裂的前期较长,一般又可以分为五个时期。

细线期——核膜内呈现丝状染色体,绕作一团,头尾不明,不便计数。此时期核仁明显。

偶线期——同源染色体开始配对。

粗线期——配对后的染色体缩短变粗,有些生物在此期可清楚地看到特殊形状的 n 对染色体。每条染色体含两个染色单体,由一个着丝粒相连,每对配对的同源染色体其非姐妹染色单体之间进行了局部交换。

双线期——染色体进一步缩短,之前联会配对的染色体开始互相排斥分开。由于配对后同源染色体间发生过局部交换,因此在一定距离间出现交叉结。

终变期——染色体继续缩短变粗,可以清楚地看到 n 个双价染色体的结构。

中期 I: 核膜、核仁消失,成对双价染色体排列在赤道板上,形成纺锤体。

后期 I: 由于纺锤丝的牵引,成对染色体分向两极,但双价染色体的着丝粒尚未分裂,姐妹染色单体仍在一起。在此时期,花粉母细胞染色体数减半。

末期 I: 分至两极的染色体开始解螺旋,在赤道板上形成细胞壁。由于末期 I 的时间极短,分裂间期也不明显,有时和第二次分裂前期的界限很难区分。

间期: 在两次细胞分裂之间,有些生物,如玉米有一个短暂的间期,有些生物则没有此时期。

前期 II: 时间极短,和末期 I 相似。

中期 II: 染色体又缩短变粗,排列在赤道板上,两个姐妹染色单体相互排斥,着丝粒尚未分开。

后期Ⅱ：着丝粒分裂，每一染色体的姐妹染色单体因此分为两个子染色体，分别趋向两极，两极各有 n 个子染色体。

末期Ⅱ：和一般有丝分裂末期相同，小孢子母细胞完成减数分裂后形成四个子细胞，称为四分孢子，以后发育成花粉粒。

花粉母细胞减数分裂过程中染色体的动态变化参见图 2-1。

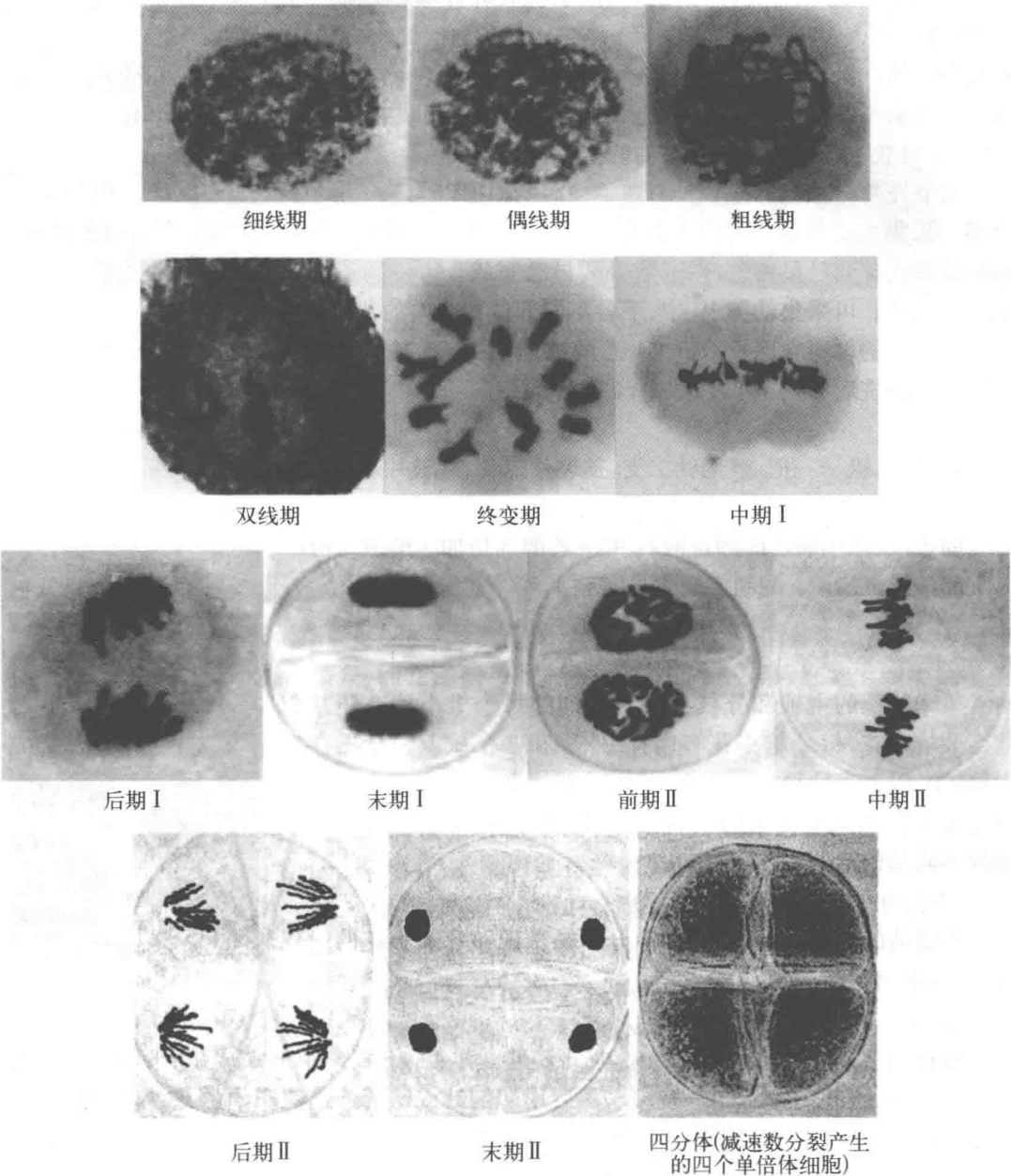


图 2-1 花粉母细胞减数分裂过程

(部分引自李雅轩和赵昕, 2006)

【实验用品】

1. 材料

孕穗期的玉米幼穗(或大麦)雄花序。

取材处理:玉米为单性花,雌雄同株。雄穗着生于植株的顶端,为圆锥花序;雌穗着生于植株中部的叶腋内,为肉穗花序。早熟种玉米孕穗期在具 10~11 片叶(晚熟品种为 15~16 片叶)时。顶叶尚未抽出时,用手抚其叶片喇叭口的下端,即有孕穗所致柔软之感,纵剖后从内部小心取出花序。不同玉米品种之间细胞分裂最旺盛时间稍有差异,但取材时间一般在上午 9~10 时相对较好。如果花药呈白色,花丝尚未伸长,即可供用。玉米雄穗上各朵小花成熟程度是不一致的,自上而下发育成熟。因此,可从不同部位花蕾中取花药,即可获得减数分裂各个时期的材料。

大麦花粉母细胞的减数分裂在孕穗后期抽穗以前的幼穗中完成,上午 7~9 时分裂最旺盛。采集大麦最后一剑叶开始抽出的幼穗材料,剥开幼穗外的叶鞘,露出白色幼穗。如果幼穗内花药已呈黄色,则减数分裂早已完成。大麦同一幼穗各花朵内雄蕊的发育也是不一致的。可采集幼穗上、中、下各不同部位花朵内的花药进行制片观察。

将采集的材料立即投入 3:1 乙醇冰醋酸混合的固定液中固定 1~24 h,然后采用 95%乙醇清洗后移入 70%乙醇中,4℃冰箱保存。

2. 用具

显微镜、镊子一把、解剖针二支、盖玻片二片、载玻片二片、酒精灯、吸水纸。

3. 药品及配制

固定液(冰醋酸乙醇固定液):95%乙醇 3 份加冰醋酸 1 份(3:1)。

醋酸洋红染液:配制方法参见实验 1。

【实验步骤】

1. 取材

玉米雄穗的主轴和分枝上成对排列的每个雄小穗有颖片包住两朵雄小花,每朵雄小花有内稃、外稃和 3 个雄蕊。从保存液中取出一段玉米幼穗(图 2-2),蒸馏水洗去乙醇。由于在一朵花内无法观察到减数分裂的全过程,因此,可用镊子在一段玉米幼穗的不同部位选取 2~3 朵小花。

2. 分离花药

在清洁的载玻片上,用解剖针分开雄小穗颖片及小花的内稃和外稃,取出花药。

3. 染色及压出花粉母细胞

将花药移至清洁的载玻片中央,加 1 滴醋酸洋红染液[图 2-3(a)]。用解剖针将花药从中部剖开,撕破花药[图 2-3(b)],然后用解剖针或镊子压出花药中的花粉母细胞。经充分染色后(5~10 min)用镊子除去花药壁组织及碎片。

4. 压片处理

盖上盖玻片。此时如染液偏少,要少量添加,防止产生气泡。但需注意染液不要太多,以免花粉母细胞逸出盖玻片边缘。



图 2-2 玉米部分幼穗

将载玻片在酒精灯火焰上迅速通过4~5次(图2-4),使花粉母细胞自行散开。在盖玻片上盖上吸水纸,用大拇指均匀用力压一下。

通过火焰时注意不能使染液煮沸。压片时注意勿使盖玻片移动。

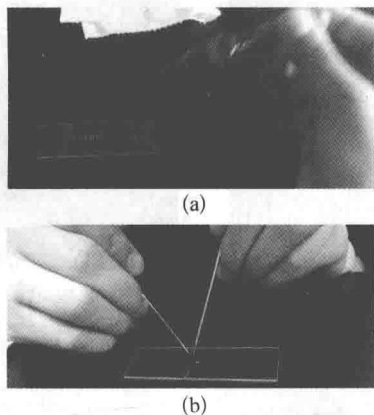


图2-3 染色及压出花粉母细胞花药(a)在染液中被剖开(b)



图2-4 玻片在酒精灯火焰上迅速过火

5. 显微镜观察玻片

先使用低倍镜($4\times$)寻找视野,再依次换中倍镜($10\times$)和高倍镜($40\times$)查找花粉母细胞、两分体细胞、四分体细胞、花粉粒及各个分裂时期的细胞。

如染色过深,可用45%的醋酸褪色。如需做成永久片可经脱水透明,然后用加拿大树胶封片后长期保存。

在显微镜下观察玉米花粉母细胞,大多呈现为较大的长圆形,也有少量呈圆形,细胞壁薄,细胞边缘没有明显的棱角;而花药壁细胞一般呈长方形或方形,细胞边缘有明显的棱角[图2-5(b)、彩图1(b)]。

图2-5(彩图1)是在普通显微镜下比较容易观察到的玉米小孢子发育的各个时期。中期I和中期II细胞,染色体都排列在赤道板上,但中期II阶段的两个子细胞(即两分体)一般都紧密挨在一起,细胞比例偏长,而且包裹在两个子细胞外的透明胼胝质壁是连在一起的。如花粉母细胞在载玻片上展开较好,还能够观察到纺锤丝[图2-5(c)、彩图1(c)]。

【问题与思考】

1. 减数分裂与有丝分裂有何区别?
2. 子代与亲代的差异是由哪一种细胞分裂方式造成的?
3. 减数分裂中,染色体减半是在哪个时期?
4. 如何操作才有可能实现在一张制片中能够观察到更多减数分裂的不同时期?

【作业】

1. 制作2~3张玉米花粉母细胞压片。
2. 在显微镜下观察压片,识别并记录观察到的各个时期。在第一和第二两次分裂时期中,各绘出两个阶段的细胞图。

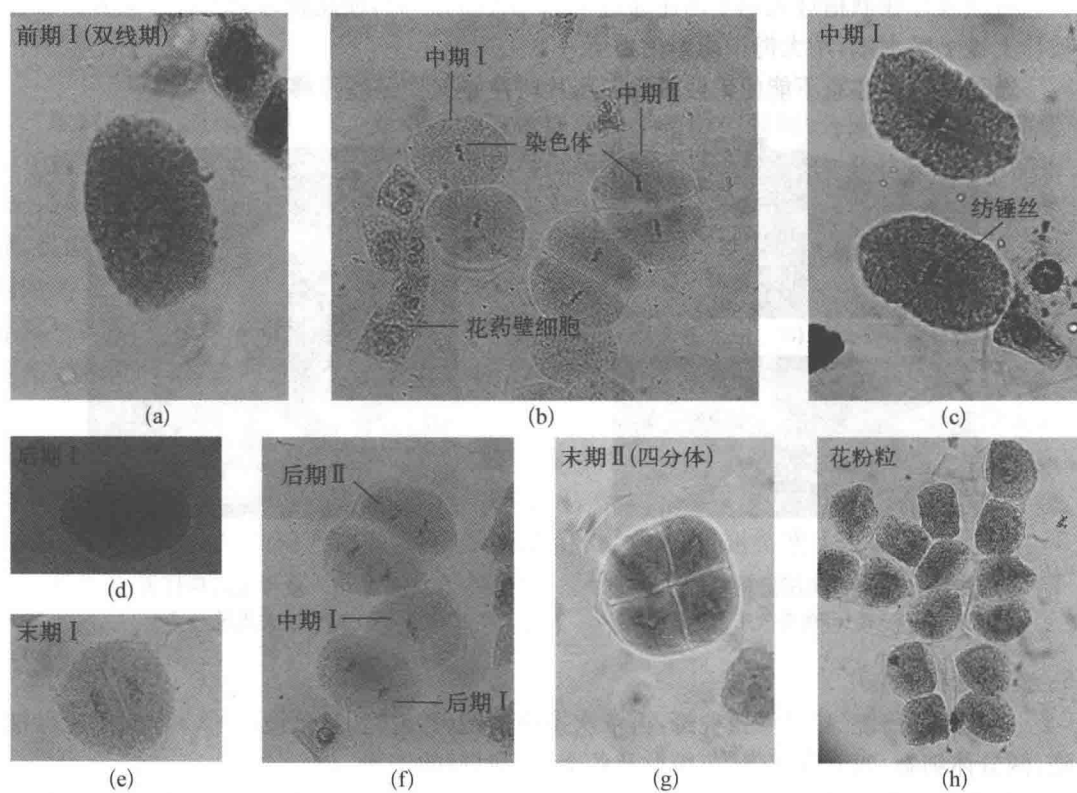


图 2-5 比较容易观察到的玉米小孢子发育的各个时期(40×)

实验 3 果蝇的培养与性状观察

【实验目的】

1. 掌握人工饲养果蝇的方法。
2. 了解果蝇的生活史以及雌雄鉴别方法。

【实验原理与预备知识】

果蝇(*Drosophila melanogaster*, $2n=8$)中文名为黑腹果蝇,属于节肢动物门,昆虫纲,双翅目,果蝇科,果蝇属。果蝇的生活史短,是遗传学研究中的经典材料。果蝇作为遗传学研究材料的优点:① 生活史短,20~25℃条件下由幼虫发育为成虫只需要 10~14 天(表 3-1);② 繁殖率高,一对果蝇可产卵 400~500 个;③ 饲养方法简便;④ 突变率高,易得大量突变体;⑤ 形态容易辨认。

表 3-1 果蝇生活史长短与温度的关系

天 数 不同时期	温 度				
	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
幼虫	57	17.3	7.7	5.8	4.1
蛹	不能生活	13.7	6.3	4.2	3.4
成虫	120.5	92.4	40.2	28.5	13.6

果蝇的生活史与一般昆虫相同,经历卵→幼虫→蛹→成虫四个阶段,每个阶段的持续时间随着温度的不同而不同。

从表 3-1 可以看出,果蝇由幼虫发育为成虫的时间在 25℃时约为 10 天,20℃时约为 15 天,低温将使果蝇的生活周期延长,生活力降低,但 30℃以上的连续高温会使果蝇不孕和死亡。果蝇培养的最适温度为 20~25℃,应注意酵母发酵会产生热量,使培养瓶内温度略高于瓶外(培养室)。

卵: 果蝇卵背面较后端圆,腹部略扁,外围是一层由细胞组成的呈六角形小格的包膜——卵壳,背面的前端伸出一对触丝,使产在柔软食物上的卵不致下沉。当卵经过子宫时,精子由卵前端的锥形突出部小孔或卵孔进入。虽然能进入卵中的精子很多,但正常情况下只有一个精子发生受精作用,其余的精子在交配时被雌体储藏起来。

幼虫期: 从卵中孵化出的幼虫要经过两次蜕皮。幼虫包括三个阶段(龄),最后一个阶段或第三龄幼虫长约 4.5 mm。幼虫性别容易区别,因雄性幼虫的睾丸要比雌性幼虫的卵巢大得多,透过透明的体壁可以看到较大的睾丸或并不显著的卵巢。

蛹化: 化蛹时,幼虫从培养基中爬出,附在较干燥的瓶壁表面(图 3-1)。化蛹过程在未龄幼虫的皮中进行,开始时软而色浅,后渐硬化且颜色变深(图 3-1),最终发育成成虫体形的个体,从蛹壳的前端挤出。

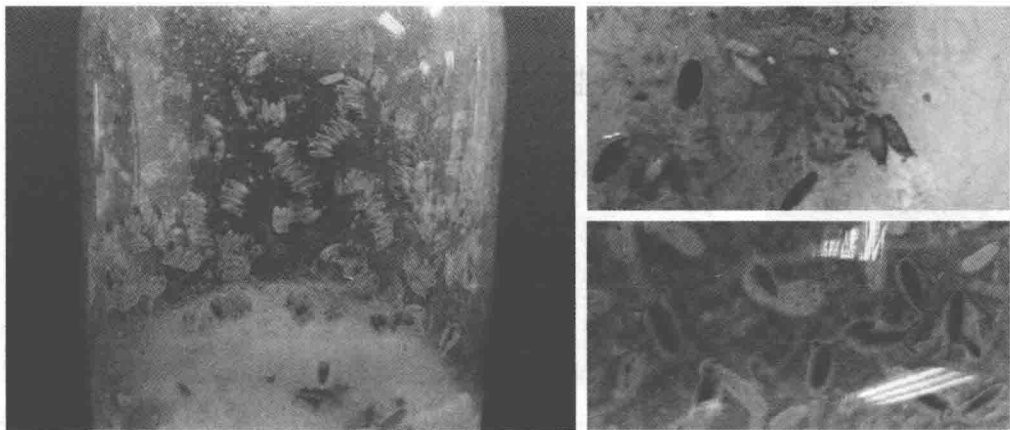


图 3-1 果蝇蛹化(不同发育时期的蛹颜色深浅不同)

【实验用品】

- 1. 材料
果蝇成虫。
- 2. 用具
体视镜(又称解剖镜)、广口瓶、麻醉瓶、解剖针、标签、天平、量筒、棉花、纱布、滤纸片、烧杯、玻璃棒、酒精灯、三脚架、石棉网。
- 3. 药品
琼脂、蔗糖、玉米粉(小麦粉)、酵母、乙酸、乙醚。

【实验步骤】

- 1. 果蝇培养容器的准备
果蝇培养的容器可采用无色透明的广口瓶(也可用大指管),经清洗后,倒置晾干。用纱布包裹普通棉花(非脱脂棉)制成与瓶口大小相等的瓶塞,瓶塞也可用海绵制作,或使用透明塑料纸制成的透气膜。果蝇培养容器制作完毕后与剪成小块的滤纸片一起进行高压蒸汽灭菌。
- 2. 果蝇培养基的配制
果蝇在水果摊或果园里常可见到,成熟的水果如葡萄、香蕉等,特别是成熟过度开始发酵的水果,常会招致大量果蝇,但它们不是以水果,而是以发酵果实上的酵母为生。因此,在实验室可以用一些发酵的基质作为果蝇的饲料。果蝇培养基种类很多,本实验采用的是玉米粉培养基(龚慧明,2007)和小麦粉培养基(陈综礼与延志莲,1994),具体配方在文献报道的基础上略有改动,见表 3-2。

表 3-2 果蝇培养基配方

培养基种类 \ 配方	水/mL	琼脂/g	蔗糖/g	小麦粉/g	玉米粉/g	乙酸/mL	酵母液
玉米粉培养基	750	10	80	—	100	5	数滴
小麦粉培养基	100	1.5	10	7	—	0.5	数滴

玉米粉培养基的配制方法：先将琼脂粉放入含 600 mL 水的烧杯中煮沸，将玉米粉用 150 mL 水调成糊状，待琼脂溶解后加入，最后加蔗糖，充分搅拌煮沸数分钟。为防止霉菌生长，可滴入 5 mL 乙酸，并搅拌均匀。

小麦粉培养基的配制方法：先将琼脂粉放入含 80 mL 水的烧杯中煮沸，将小麦粉用 20 mL 水调成糊状，待琼脂溶解后加入，最后加蔗糖，充分搅拌煮沸数分钟。为防止霉菌生长，可滴入 0.5 mL 的乙酸，并搅拌均匀。

将配制好的培养基，立即倒入灭菌后的容器（烧杯）中，并分装到培养瓶中，瓶中培养基高度为 2~2.5 cm，如图 3-2 所示。待培养基完全冷却后滴数滴酵母液（培养基装瓶时要防止培养基黏附在瓶口上，以免造成污染）。

在培养基上插入用灭菌过的小块滤纸做成的小酒杯，供幼虫化蛹（此步骤也可以省略）。将装有培养基的培养瓶在 25℃ 条件下放置 12 h，如无菌产生，即可将果蝇原种引入进行培养。每瓶引入雌雄果蝇成虫 5~6 对。在将果蝇成虫引入培养瓶之前，如发现培养瓶壁上有水珠，一定要用吸水纸吸去，以防弄湿果蝇翅膀造成死亡。

将已引入雌雄果蝇的培养瓶放置在 20~25℃ 的光照培养箱中，15~20 天后，便可进行雌雄果蝇性状观察。

3. 果蝇麻醉

果蝇引种培养或进行杂交实验前都要鉴别雌雄，这需要在果蝇麻醉后进行。

果蝇麻醉常用乙醚作为麻醉剂。方法：将果蝇培养瓶放置在桌面上保持静止，小心打开瓶盖，然后将果蝇麻醉瓶（图 3-3）的喇叭口倒置对准果蝇培养瓶瓶口，将果蝇麻醉瓶和培养瓶颠倒 180°，拍打培养瓶的底部，将果蝇转移至麻醉瓶中，并迅速用纱布和棉花制成的塞子塞住麻醉瓶的喇叭口；接着将乙醚滴加在麻醉瓶侧面的脱脂棉中（图 3-3），对果蝇进行麻醉。



图 3-2 果蝇玉米培养基



图 3-3 果蝇麻醉瓶

如果没有现成的麻醉瓶,也可自制。取与果蝇培养瓶瓶口一样大的广口瓶一只,在软木塞的前方安置一个螺丝钉,用线将脱脂棉缠绕于钉上,即可制成麻醉瓶。将果蝇引入自制麻醉瓶后,用乙醚湿润脱脂棉,盖在麻醉瓶口,果蝇即被麻醉。

在拍打培养瓶的底部以便将果蝇转移至麻醉瓶中时,一定要避免培养基跌入麻醉瓶中。

引种培养的果蝇以轻度麻醉为宜,当看到瓶内果蝇全部跌落于瓶底不动,麻醉即告完成,此时果蝇的翅膀是收紧的。长时间的麻醉会使果蝇死亡,果蝇翅膀外展 45℃ 表明麻醉过度已死亡。

4. 果蝇雌雄性状观察

将麻醉后的果蝇倒在解剖镜的白瓷板上,在解剖镜下观察,鉴别雌雄果蝇。雌雄果蝇可通过如下 5 个方面进行鉴别。

体型: 雌果蝇体型较大,雄果蝇体型较小(图 3-4)。

腹部末端: 雌果蝇腹部椭圆,末端稍尖;雄果蝇腹部末端钝圆。

腹部背面: 雌果蝇有 5 条明显的黑色条纹,雄果蝇有 3 条,前两条细,后一条宽,延至腹面。肉眼观察其腹部末端呈一明显黑点为雄性(图 3-5、彩图 2)。

腹部腹面: 雌果蝇有 6 个明显的腹片,雄果蝇只有 4 个腹片。

性梳: 雄果蝇在第一对足的跗足前端表面有一黑色鬃毛——性梳,雌果蝇无性梳(图 3-5)。

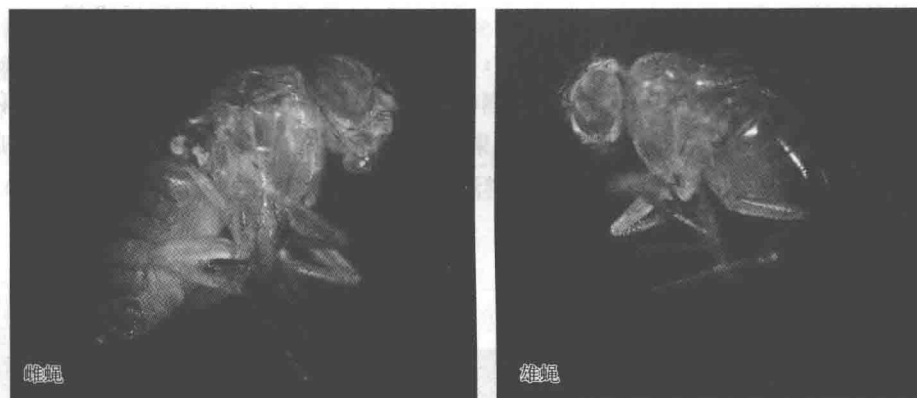


图 3-4 果蝇成虫

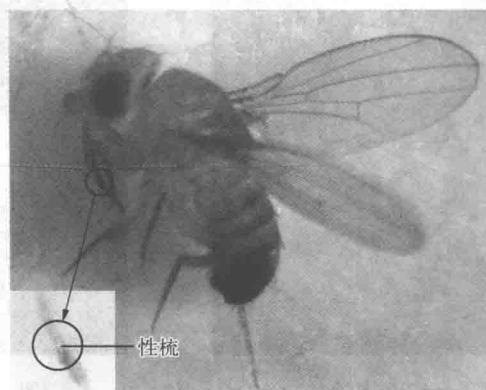


图 3-5 雄果蝇前足性梳(左下角显示放大的性梳)