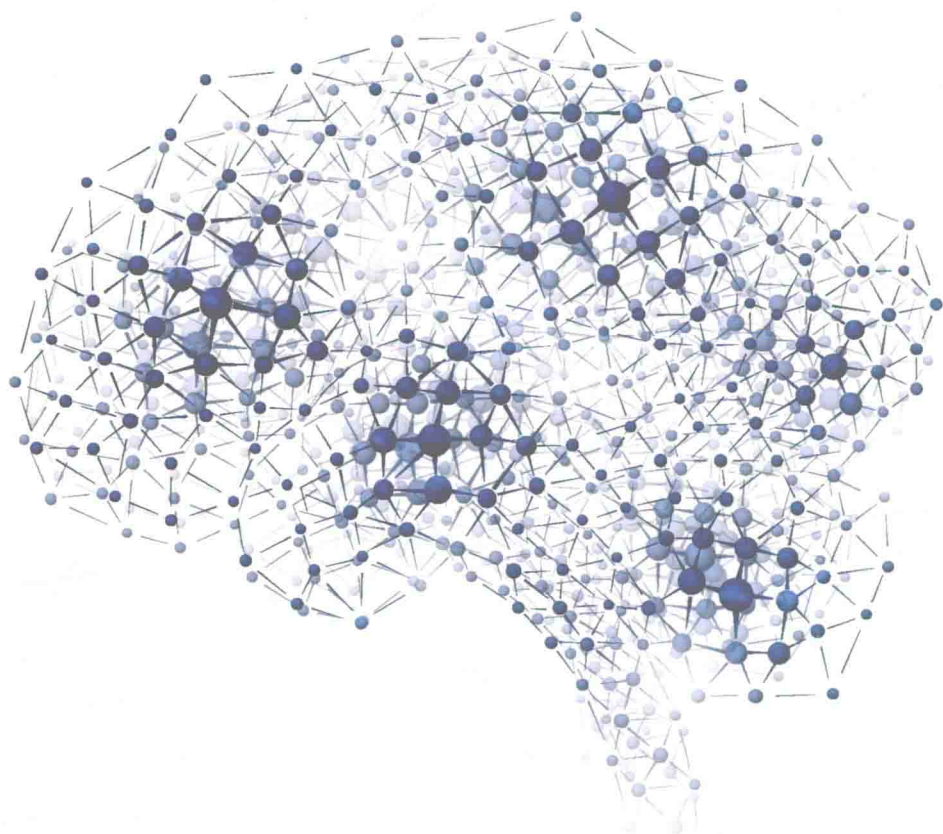


南开大学示范精品课程

遗传学 实验指导

主编 白艳玲 王宏刚



南开大学出版社

遗传学实验指导

主 编 白艳玲 王宏刚



南开大学出版社

天 津

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验指导 / 白艳玲, 王宏刚主编. —天津:
南开大学出版社, 2016.11

ISBN 978-7-310-05200-4

I. ①遗… II. ①白… ②王… III. ①遗传学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q3—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 210316 号

版权所有 侵权必究

南开大学出版社出版发行

出版人: 刘立松

地址: 天津市南开区卫津路 94 号 邮政编码: 300071

营销部电话: (022)23508339 23500755

营销部传真: (022)23508542 邮购部电话: (022)23502200

*

天津泰宇印务有限公司印刷

全国各地新华书店经销

*

2016 年 11 月第 1 版 2016 年 11 月第 1 次印刷

260×185 毫米 16 开本 11 印张 275 千字

定价: 28.00 元

如遇图书印装质量问题, 请与本社营销部联系调换, 电话: (022)23507125

《遗传学实验指导》编写人员

主编

白艳玲 王宏刚

编者（以姓氏汉语拼音为序）

陈成彬 宋文芹 王春国

徐海津 赵素然 朱玉山

目 录

第一部分 经典遗传学

实验一 果蝇的饲养与性状观察	3
实验二 果蝇杂交实验	9
实验三 果蝇 X 染色体隐性致死突变的检出	17
实验四 环境因素对果蝇发生量的影响	21
实验五 杂种后代数量性状的分析	26
实验六 数量性状的遗传参数——遗传率的估计	28
实验七 粗糙链孢霉的分离和交换	34

第二部分 细胞遗传学

实验八 人外周血细胞培养及染色体制备	41
实验九 人染色体 G 显带与核型分析	44
实验十 从组织细胞中制备染色体	47
实验十一 小鼠骨髓细胞染色体制片技术	49
实验十二 间接免疫荧光观察细胞有丝分裂过程	51
实验十三 染色体端粒荧光原位杂交	54
实验十四 双翅目昆虫幼虫唾腺染色体的制片与观察	57
实验十五 摇蚊多线染色体的转录实验	59
实验十六 姊妹染色体区分 (SCD) 着色与姊妹染色单体交换 (SCE)	63
实验十七 染色体的复制顺序	66
实验十八 动物与植物染色体银染技术	68
实验十九 去壁低渗法制备植物染色体标本	71
实验二十 染色体畸变(一) 植物多倍体的诱发	74
实验二十一 染色体畸变(二) 植物染色体结构变异的诱发	77
实验二十二 植物与昆虫减数分裂标本的制备与观察	79
实验二十三 小鼠减数分裂标本的制备与观察	82
实验二十四 人 X 染色质检测	84
实验二十五 染色质的组成成分分析	86
实验二十六 动物细胞核的分离	89
实验二十七 植物叶绿体分离	92
实验二十八 线粒体分离	95

第三部分 分子遗传学

实验二十九 质粒 DNA 的提取	99
实验三十 聚合酶链式反应 (PCR)	106
实验三十一 DNA 的酶切与连接	109
实验三十二 琼脂糖凝胶电泳	112
实验三十三 大肠杆菌转化实验	114
实验三十四 大肠杆菌普遍性转导	117
实验三十五 大肠杆菌的杂交	123
实验三十六 基因转染、蛋白表达与细胞器定位	126
实验三十七 衣藻核遗传转化实验	129
实验三十八 叶绿体离体转化	133
实验三十九 线粒体离体转化	136
实验四十 大肠杆菌 <i>Mu</i> 转座突变文库的构建	139

附 录

附录 1 光学显微镜的介绍	145
附录 2 其他类型的显微镜的介绍	155
附录 3 电子显微镜的介绍	160
附录 4 实验室守则	162
附录 5 学生实验守则	163
附录 6 实验室常用试剂的配制	164
附录 7 实验室常用染色液的配制	166
附录 8 消毒与灭菌	167
主要参考文献	169

第一部分
经典遗传学

实验一 果蝇的饲养与性状观察

【目的与意义】

1. 了解果蝇及其生活史。
2. 熟练掌握果蝇雌雄性别的特征，能用肉眼快速进行鉴定。
3. 观察常见突变种的性状。



果蝇的麻醉与观察

【实验原理】

果蝇是重要的模式生物，其分类属于动物界、节肢动物门、六足亚门、昆虫纲、有翅亚纲、双翅目、芒角亚目、果蝇科、果蝇属、黑腹果蝇种。果蝇也称为黑腹果蝇，拉丁名是 *Drosophila melanogaster*，英文名为 fruit fly 或 vinegar fly。

目前，已有 1000 多个果蝇物种在全球温带及热带地区被发现，其多以腐烂水果滋生的酵母菌为食，少数果蝇的食物来自其他真菌、植物液汁或花粉。

黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 是在 1830 年被首次描述，1901 年被动物与遗传学家威廉·恩斯特·卡斯特 (William Ernest Castle) 首次作为实验材料用于生命科学研究。1910 年美国进化生物学家、遗传学家和胚胎学家汤玛斯·亨特·摩尔根 (Thomas Hunt Morgan, 1866—1945) 首次将发现的第一只白眼突变雄果蝇与红眼野生型雌果蝇进行了成功的杂交，通过对子一代 (F_1) 红眼果蝇、子二代 (F_2) 中红眼雌果蝇和再现的白眼雄果蝇实验结果的分析与研究，证明了白眼突变基因位于 X 染色体上，从而提出了经典遗传学中的第三大定律——伴性遗传与连锁互换。

在现代生物学研究中果蝇仍然是人们青睐的重要生物实验材料，在真核生物的基因表达与调控、发育与进化生物学以及帕金森氏病、老年痴呆症等疾病的研究中发挥了重要的作用。

果蝇生活周期的长短与气温的关系密切相关，低温会造成生活周期延长和生活力降低，30℃以上的高温则将造成果蝇的不孕和死亡，果蝇的最适培养温度为 20~25℃ 之间。果蝇的生活周期和各个发育阶段所经过的时间，见表 1 和图 1。

表 1 果蝇的生活周期

温度	10℃	15℃	20℃	25℃
卵——幼虫期			8 天	5 天
幼虫——成虫期	57 天	18 天	6.3 天	4.2 天

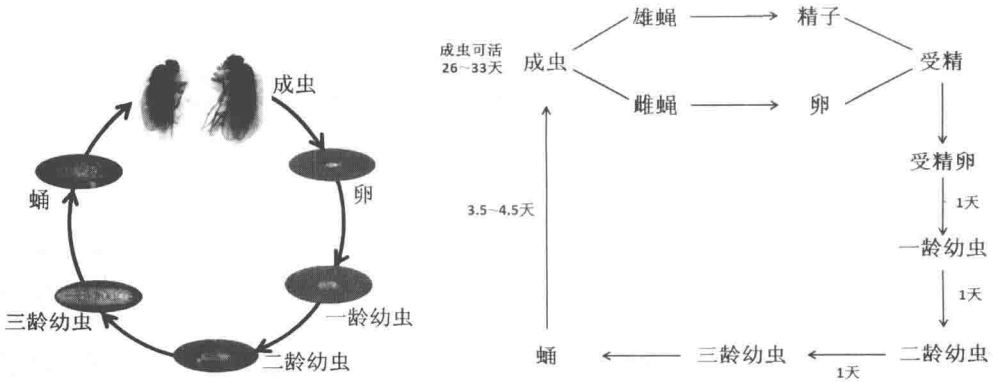


图1 果蝇生活周期

从表1可见, 10℃时生活史约两个月, 而25℃时仅需10天。果蝇通常培养在恒温恒湿培养箱内, 以保证果蝇能在稳定的环境下生长。

果蝇在水果上或果园里常可见到, 但它并非是以水果为生, 而是以生长在腐败水果上面的酵母菌为主要食料, 因此实验室内凡能发酵的基质, 均可作为果蝇的培养基。在做新的原种培养时, 应首先检查一下果蝇有无混杂, 以防止原种丢失之危险。亲体的数目一般以每瓶5~10对为宜。移入新瓶时须将果蝇进行浅麻醉, 并使培养瓶横卧, 然后将果蝇挑入, 待果蝇复苏后, 再把培养瓶立起, 目的是防止果蝇粘在培养基上。

原种至少每隔2~4周更换一次培养基(依培养温度而定)。每一种性状的果蝇至少要培养二瓶, 培养时间不可保持太长。旧瓶不用时应立即清洗干净, 以免果蝇污染体外寄生虫, 给保种工作带来极大的麻烦。培养瓶上应贴有标签, 注明品种名称和转移日期。如不作实验仅作原种保存, 则温度可控制在10~15℃之间, 目的是适当地延长生活周期, 以节省人力和物力。

野生型果蝇体型较小, 身长3~5 mm, 具有硕大的红色复眼。雌雄果蝇的性状在体长、腹部条纹、性梳等多个方面有较大差别, 鉴别较为简单, 雌雄果蝇的性状特点见表2。

表2 雌雄果蝇性状特点

雌蝇	雄蝇
(1) 体形较大。	(1) 体形较小。
(2) 腹部背面有明显的五条黑纹(图2)。	(2) 腹部背面有三条黑纹, 前两条细, 后一条宽并且延续至腹端, 用肉眼观察其腹部可见末端有明显的黑点(图2)。
(3) 无性梳。	(3) 前足附节基部表面有黑色鬃毛即性梳(sex comb, 图4)。
(4) 腹部膨大饱满, 末端稍尖。	(4) 腹部呈圆筒形, 末端钝圆。
(5) 腹部明显的有六个腹片(图3)。	(5) 腹部有明显的四个腹片(图3)。
(6) 外生殖器外观比较简单, 用低倍镜可明显地看到阴道板和肛上片。	(6) 外生殖器外观比较复杂, 用低倍镜可较明显地(刚羽化的幼蝇更清楚)看到生殖弧、肛上板和阴茎。

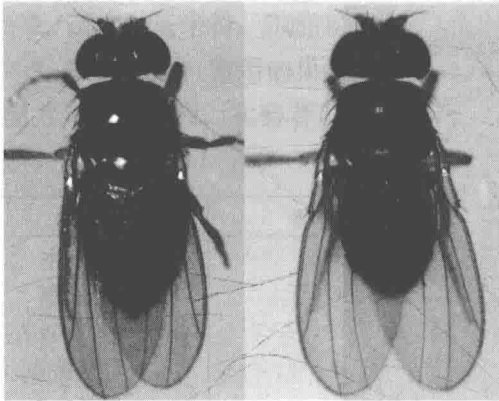


图2 雌雄果蝇背视图

(左: 雌果蝇; 右: 雄果蝇)

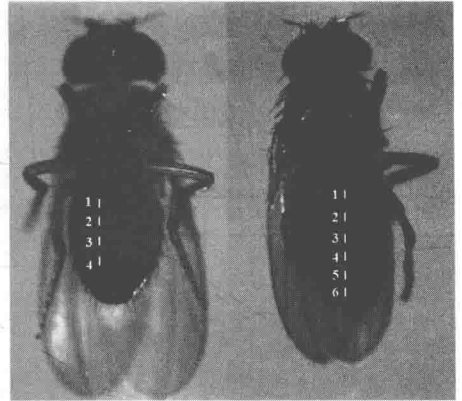


图3 雌雄果蝇腹面图

(左: 雄果蝇; 右: 雌果蝇)

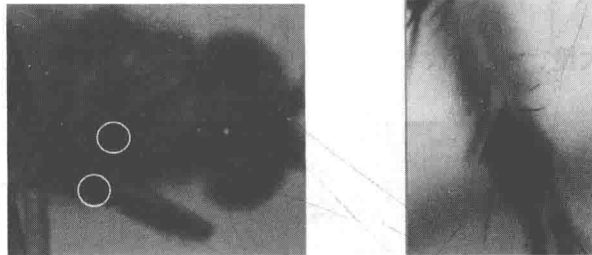


图4 雄果蝇的性梳

作为一种在基因功能研究中常用的模式生物，果蝇有着种类众多的突变体，包括眼色、翅形、体色等（表3）。

表3 野生型和突变型果蝇常见表型列表

基因符号	名称	表型特征	所在染色体位置
+	野生型 (wild type)	复眼圆大呈红眼，小眼多	
<i>b</i>	棒眼 (bar eyes)	狭窄垂直棒状复眼，小眼数少	X: 5.70
<i>cy</i>	卷翅 (curly wings)	翅膀卷曲	I: 6.1
<i>e</i>	黑檀体 (ebony body)	体色发黑	III: 70.7
<i>vg</i>	残翅 (vestigial wings)	翅膀部分残缺	II: 67.0
<i>w</i>	白眼 (white eyes)	复眼呈白色	X: 1.5
<i>y</i>	黄体 (yellow body)	体色呈浅橙黄色	X: 0.0
<i>sn³</i>	焦刚毛 (singled bristles)	刚毛烧焦状卷曲	X: 21.0
<i>m</i>	小翅 (miniature)	翅膀长度与身体等长	X: 36.1

【仪器与用具】

1. 仪器：双目解剖镜、恒温恒湿培养箱（图5）。



图5 恒温恒湿培养箱

2. 用具：放大镜、麻醉瓶、毛笔、数蝇板、死果蝇盛留瓶（图6）。



图6 果蝇实验常规用具

【材料与试剂】

1. 材料：野生型 (+)、白眼 (w)、黑檀体 (e)、残翅 (vg)、三隐性 (w, sn^3, m) 果蝇（图7）。

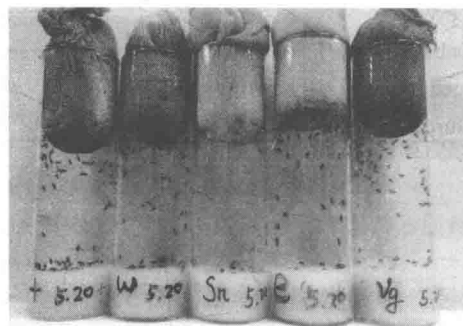


图7 实验用果蝇品系

2. 试剂：玉米粉、琼脂粉、蔗糖、丙酸、酵母粉、乙醚（或氯仿）、50% 酒精。

3. 试剂配制：常用的果蝇培养基为玉米培养基、香蕉培养基和米粉培养基等，具体配方见表 4 所列，实验者可根据当时当地的条件选择配制使用。

表 4 常用果蝇培养基配方

配方	香蕉培养基	玉米培养基	米粉培养基
水 (mL)	47.8	150	100
琼脂 (g)	1.0	1.2	0.9-1.5
红糖 (g)	-	13	10.0
香蕉浆 (g)	50.0	-	-
玉米粉 (g)	-	17	-
米粉 (g)	-	-	16.0
麸皮 (g)	-	-	16.0
酵母粉 (g)	1.4	1.4	1.4
丙酸 (mL)	1	1	1

【实验方法】

1. 果蝇培养基制备与分装

果蝇饲养常用的饲养瓶有牛奶瓶或玻璃直管。在分装培养基之前培养瓶和自制纱布棉塞须先经高压灭菌或紫外灯照射消毒。

根据具体用量按如下方法配制玉米培养基：

(1) 1/2 水调和玉米粉，1/2 水煮溶琼脂。

(2) 待琼脂全溶后加入蔗糖煮沸。

(3) 加入玉米粉溶液煮沸。

(4) 加入丙酸立即从火上取下并搅拌。

(5) 加入酵母粉搅拌。

(6) 稍凉按每管 2 cm 高度分装培养基。

(7) 待培养基冷却凝结后，用酒精棉球擦拭饲养瓶壁，目的是除去沾污在瓶上的培养基及水珠。然后插入消过毒的吸水纸，一为吸水，二可供幼虫化蛹所需之干燥场所。

(8) 用自制纱布棉塞塞紧瓶口。

在果蝇原种培养时，如果培养基发霉，在早期可采取挑除菌落的办法，如果已到不可挽救的地步，那么只好立即将果蝇移出。但不可直接放入新的作为种瓶的饲养瓶内，应先将果蝇引入盛有深度的丙酸水（1%）的指管中淋浴，然后再迁入瓶中饲养。

2. 果蝇的麻醉

在对果蝇进行性状观察之前，用乙醚或氯仿麻醉，使其保持安静状态。麻醉瓶是一种与培养瓶具有同样大小口径且带有侧管的小广口瓶，用脱脂棉塞入麻醉瓶的侧管内，用以吸收麻醉剂（详见图 6 右侧管）。果蝇对麻醉剂很敏感，极易麻醉，麻醉深度依实验要求而定；如作培养种蝇或杂交之用，则以轻度麻醉为宜，如作一般观察用则可深度麻醉甚至过度麻醉至死。当果蝇翅膀外展 45° 角时即表示已麻醉过度而不能复

苏。观察果蝇时，把果蝇放在白瓷板上或其他白色背景的板上。实验结束后，将其倒入盛有 50% 的酒精的死果蝇盛留瓶中。

3. 野生型和突变体果蝇的性状观察

观察野生型和突变型果蝇的各种性状，如：性别特征、眼形、眼色、体色、刚毛形态、翅膀长度与形状等，并列表记录。

【思考与作业】

1. 快速鉴别雌雄果蝇的标准是什么？
2. 根据自己的观察，绘制雄果蝇与雌果蝇的简图。
3. 列表记载所观察的突变种主要性状。

实验二 果蝇杂交实验

I. 一对因子杂交实验

【目的与意义】

1. 通过实验观察分离现象，验证遗传学的分离定律。
2. 掌握果蝇杂交技术和杂交后代分离比例的统计分析方法。

【实验原理】

孟德尔 (Gregor Johann Mendel, 1882—1884) 以闭花授粉的豌豆为材料，从不同纯系中挑选出花色、豆形等表型明显的 7 对单个性状进行单因子杂交实验，对杂交后代的性状进行细致观察和计数，并对大量实验数据数学分析，发现和证明了经典遗传学分离定律即孟德尔第一定律 (law of segregation 即 Mendel's first law)。孟德尔认为，实验中那些可遗传的性状是由颗粒状的因子决定的，来自亲本决定表型的成对因子在形成配子 (生殖细胞) 时彼此分开，随机进入不同的配子中。

一对因子杂交实验中，来自母方的因子与来自父方的相对因子伴随着精和卵的结合混合在一起。在杂种一代 (F_1) 形成配子时等位基因伴随着减数分裂而彼此分离分配到不同的配子中去。假如 F_1 交配是随机的，而且所形成的两种配子数目相等，受精能力相同就会产生一定比例的 F_2 ，当等位基因的一方对另一方是完全显性时，其比例就为 3:1。

在研究一种问题时，学者常有一种理想上的假定。例如，按孟德尔定律一对因子杂交 F_1 分离比例为 3:1，二对因子杂交后 F_2 代分离比例为 9:3:3:1，但实际观察结果常不能与理论上预期的事实恰好符合。此种差异是由随机误差造成呢？还是确实有所不同呢？这个问题，应于作结论前解决，判定理论预期与实际结果相符与否的方法，在生物统计方法中应用卡方检测法 (Chi-Square test 或 χ^2 test) 计算公式如下：

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - T_i)^2}{T_i}$$

式中： O — 实际所得数值； T — 理论预期数值；

i — 统计的组数； Σ — 综合 (或相加) 的符号。

由公式可知由实际所得数值 (O) 与理论预期数值 (T) 越接近，则 χ^2 之值越小。反之，若实际所得数值与理论预期数值越远，则 χ^2 之值越大，按公式将 χ^2 值算出后，

可查统计学专门测算出来的弗雷氏 χ^2 表 (表 1), 找到对应的 α 值。统计学上规定, 当 α 小于 0.05 时, 即认为实际所得数值与理论预期数值不符合。

表 1 χ^2 值 (df 为自由度)

$\alpha \backslash df$	1	2	3	4	5	6	7
0.95	0.004	0.10	0.35	0.71	1.14	1.64	2.17
0.80	0.06	0.45	1.00	1.65	2.34	3.07	3.82
0.70	0.15	1.71	1.42	2.20	3.00	3.83	4.67
0.50	0.46	1.39	2.37	8.86	4.53	5.35	6.35
0.30	1.07	2.41	3.67	4.88	6.00	7.23	8.38
0.20	1.64	3.22	4.64	8.99	7.29	8.56	9.80
0.10	2.71	4.60	6.25	7.78	9.24	10.65	12.02
0.05	3.84	5.99	7.82	9.49	11.07	12.59	14.07
0.02	5.47	7.82	10.49	11.07	13.39	15.03	16.62
0.01	6.64	9.21	11.34	13.28	15.09	16.81	18.48

当查弗雷氏 χ^2 表时, 第一栏内为自由度 (df), $df=k-1$ 。自由度即是独立变数的数目, 当一对因子杂交, F_2 分离表型的独立变数的数目为 $2-1=1$ 。

以如下例题演算说明如何确定 3:1 比例。

例 设红蕃茄与黄蕃茄杂交。在杂种第二代出现红果植株 310 株, 黄果植株 90 株, 问是否符合 3:1 比例?

	红果	黄果	总数
实际所得数 (O)	310	90	400
3:1 的理论预期数 (T)	$400 \times 3/4 = 300$	$400 \times 1/4 = 100$	400
$(O-T)^2/T$	$(310-300)^2/300=0.33$	$(90-100)^2/100=1.00$	

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - T_i)^2}{T_i} = 0.33 + 1.00 = 1.33$$

查表 1 得知 $\chi^2=1.33$ 时其显著水平 α 在 0.3 和 0.2 之间, 故它的 α 值大于所规定的 α 值, 故以为实际所得数值与理论预期数值是符合的, 即这个 310:90 的分离数字是符合 3:1 比例的。

【仪器与用具】

1. 双目体视镜 (图 1)。
2. 用具: 果蝇实验所需的一般用具 (见实验一)。



图1 Olympus SZ61 体视显微镜

【材料与试剂】

1. 材料：残翅 (*vg*)、黑檀体 (*e*)、和野生型 (+) 果蝇。
2. 试剂：配制果蝇培养基所需试剂 (见实验一)。

【实验方法】

1. 杂交亲本与杂交组合

按摩尔根学说对果蝇的性状和基因分析，选取果蝇的第 II、III 号染色体上已发生突变的类型与野生种 (原种) 进行杂交，本次实验准备用以下几种类型：野生种 (+)，残翅 (*vg*)、黑檀体 (*e*)。

本次实验采用下列组合，每一组合要有二个重复。

I. 正交 $++\text{♀} \times vgvg\text{♂}$ ；反交 $vgvg\text{♀} \times ++\text{♂}$

II. 正交 $++\text{♀} \times ee\text{♂}$ ；反交 $ee\text{♀} \times ++\text{♂}$

2. 选取亲蝇和杂交

杂交实验所用的雌蝇，必须是贞蝇 (处女蝇) 实验结果才能正确，故应特别仔细选取贞蝇。

(1) 选贞蝇

先将原培养瓶内的成虫转移到另一瓶中，瓶内不能留有任何果蝇，再隔 4~6 h 后观察孵化的成虫，麻醉后观察和分辨雌雄。由于通常在孵出后 10~12 h 内幼蝇并不进行交配，故在此时间段内所挑选的雌蝇均是未曾交配的贞蝇。

(2) 果蝇杂交

选出贞蝇后，将分出的贞蝇与实验所需要的杂交组合性状雄蝇一起放入新培养瓶中，进行杂交实验，每一实验组至少需要 2 对杂交亲本蝇。瓶外标签上须注明亲本蝇基因型、杂交日期和实验者姓名，放入 25℃ 温箱中培养，若在 7 天之内去除亲本蝇之