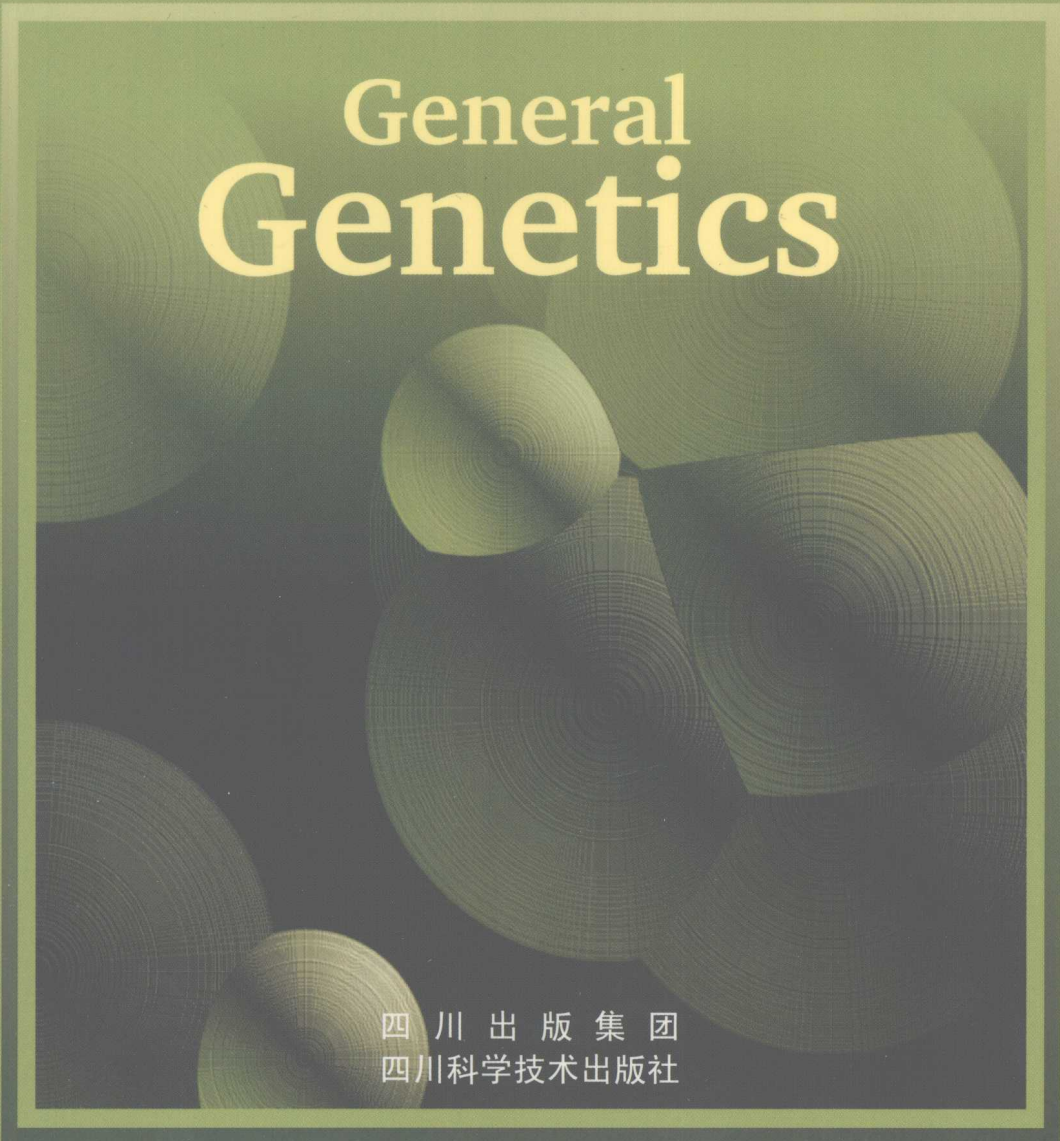


高等农林院校教材

普通遗传学实验教程

帅素容 主编



General
Genetics

四川出版集团
四川科学技术出版社

高等农林院校教材

普通遗传学实验教程

主 编 帅素容

副主编 杨先泉 王小蓉

编 委 (以姓氏笔画为序)

王小蓉 王米力 帅素容 刘海峰 杨先泉
宋 薇 张雅新 周兰英 赵 勤

四川科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

普通遗传学实验教程/帅素容主编. - 成都:四川科学技术出版社,2003.8(2008.1重印)

ISBN 978-7-5364-5292-3

I. 普… II. 帅… III. 实验遗传学-教材
IV. Q3-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 055910 号

高等农林院校教材

普通遗传学实验教程

主 编 帅素容
责任编辑 李蓉君
封面设计 韩健勇
版面设计 杨璐璐
责任校对 刘生碧 王初阳 翁宜民
责任出版 邓一羽
出版发行 四川出版集团·四川科学技术出版社
成都市三洞桥路12号 邮政编码 610031
成品尺寸 185mm×260mm
印张 8 字数 180 千
印 刷 四川省地质矿产局测绘队印刷厂
版 次 2003 年 8 月成都第一版
印 次 2008 年 1 月成都第二次印刷
定 价 13.00 元

ISBN 978-7-5364-5292-3

■ 版权所有·翻印必究 ■

■ 本书如有缺页、破损、装订错误,请寄回印刷厂调换。

■ 如需购本书,请与本社邮购组联系。

地址/成都市三洞桥路12号 电话/(028)87734081

邮政编码/610031

网址:www.sckjs.com

前言

“遗传学之所以被一些学生看做是生物学中最难的课程之一,主要是因为遗传学学习过程中不得不加以思考和想象。相比之下,对于学习昆虫学的学生来说,只要昆虫不穿鞋子,它们有六只脚就是一个显而易见的事实。……产生遗传规律的染色体结构与遗传物质传递过程却几乎是不可见的。”这是 P. C. Winter 等对遗传学的描述,它生动地反映了遗传学的一个重要特点——抽象性。

遗传学既抽象,又具有相当强的理论性,而且与实践紧密结合,应用广泛,是生物、医学、农林类等专业的专业基础课程,也是动物、植物育种的理论基础。遗传学的基本概念、基本原理来自于人类生产、生活和科学研究的实践,实验教学可使学生更易理解和接受遗传学抽象的概念和原理,因此实验是遗传学教学中不可缺少的重要环节。通过实验可以掌握从群体、个体、细胞以及分子水平来研究生物质量性状和数量性状的遗传变异现象及其规律的实验技术和试验结果的分析方法。所以说,遗传学的教学过程不仅是一个知识传授的过程,而且是一个探索生物遗传奥秘的过程,一个分析问题、解决问题的过程。遗传学应用的一个重要方面是指导动植物、微生物的遗传改良,通过实验也可以了解遗传学理论与技术在生物遗传改良等方面应用的基本原理和方法。

普通遗传学实验是与普通遗传学相配套的课程,是我校加强实践环节教学改革的尝试之一。普通遗传学课程以经典遗传学为基础,同时介绍细胞遗传学、分子遗传学、数量遗传学、群体遗传学等遗传学分支学科的基本理论,为继续深入学习这些分支学科奠定基础。普通遗传学实验教学内容也应包括遗传学研究的基本原理、技术与方法,培养和提高学生实验操作技能与分析问题、解决问题的能力。为此,我们组织多年从事遗传学理论与实验一线教学科研工作、经验丰富的教师编写了这本《普通遗传学实验教程》。本教程是在总结多年开设遗传学实验课的基础上,广泛汲取兄弟院校遗传学实验教学的宝贵经验,参阅有关文献资料,进一步整理编写而成。

本实验教材包括五个部分共 30 个实验,其内容安排主要以杨业华、朱军分别主编的面向 21 世纪教材《普通遗传学》(高等教育出版社,2000 年)和《遗传学》(中国农业出版社,2000 年)的内容为依据,并适当编入了一些有关细胞遗传学、数量遗传学和群体遗传学方面的实验。鉴于本教程的篇幅及针对本科生的要求,涉及分子遗传学部分的实验未纳入本教程。

为了使学生了解遗传学实验室的操作规范和必要守则,认真作好实验前后的各项工作,教程首先编入了实验室工作规程。同时,为了便于准备实验材料、



用具和配制药品,在本教程的最后列出了八个附录,以供参阅。由于各院校开设遗传学课程的教学时数和实验条件各有不同,对本教程所列实验内容可根据具体情况选择开设,或开设遗传学大实验,或进行示教实验。

在本实验教材编写过程中,得到了四川农业大学教务处的大力支持,并承汤浩茹教授、傅体华教授指导,在此谨表谢意。

本书完稿后,承任正隆教授、林文君教授仔细审阅,并提出宝贵意见,特此致谢。

由于编撰时间有限,编者才疏学浅,本教程难免存在某些疏漏和不足,敬请有关专家和广大读者提出宝贵意见与建议。

编者于四川省雅安
2003.7

目 录

遗传学实验室工作规程	1
第一部分 染色体标本的制作、观察与分析	4
一、细胞周期与有丝分裂	4
二、减数分裂	5
三、染色体标本的制备方法	7
四、染色体分析方法	7
实验一 植物分生区细胞染色体制片与有丝分裂过程的观察	9
实验二 细胞减数分裂制片与减数分裂过程的观察	14
实验三 体细胞巨染色体制片与观察	18
实验四 小鼠和鸡骨髓细胞染色体制备与观察	20
实验五 哺乳动物外周血淋巴细胞培养与染色体制备	23
实验六 永久片的制作	25
实验七 显微摄影技术	26
实验八 核型分析	31
实验九 哺乳动物 X 小体、Y 小体检测	33
实验十 染色体制片、观察与分析综合实验	35
第二部分 质量性状的遗传分析	37
一、分离定律与一对相对性状的遗传分析	37
二、自由组合定律及其应用	38
三、连锁遗传规律与性状连锁分析	39
四、质量性状遗传分析的统计检验方法	40
五、植物有性杂交技术	40
实验十一 植物一对相对性状的遗传分析	41
实验十二 果蝇一对相对性状的杂交试验及遗传分析	45
实验十三 玉米两对相对性状的遗传分析与基因互作	46
实验十四 果蝇两对相对性状的杂交实验及遗传分析	49
实验十五 玉米籽粒性状基因连锁遗传分析	51
实验十六 基因的连锁、交换与定位	53
实验十七 果蝇的伴性遗传	55
实验十八 红色面包霉子囊孢子的分离和交换	56
实验十九 质量性状遗传分析综合实验	60
第三部分 遗传变异的分析	62
一、基因重组	62
二、染色体结构变异	63



三、染色体数目变异·····	63
四、基因突变·····	64
实验二十 染色体结构变异的细胞学观察·····	66
实验二十一 染色体数目变异的细胞学观察·····	68
实验二十二 植物同源多倍体的人工诱发与鉴定·····	69
实验二十三 植物单倍体的人工诱发与鉴定·····	73
实验二十四 诱变物质的微核检测技术·····	76
实验二十五 大肠杆菌诱变处理与营养缺陷型筛选·····	80
第四部分 数量性状的遗传分析 ·····	84
一、数量性状及其基本遗传特征·····	84
二、数量遗传研究的基本统计方法·····	85
三、性状加性—显性遗传模型与群体变异分析·····	85
实验二十六 植物性状遗传率估算·····	86
实验二十七 动物性状遗传率估算·····	88
实验二十八 性状杂种优势与显性程度估算·····	91
实验二十九 控制性状最少基因数目估算·····	93
第五部分 群体遗传分析基础 ·····	95
实验三十 人群中 PTC 味盲基因频率的测算·····	95
附 录 ·····	98
附录 I 常用遗传实验材料的准备与保存·····	98
附录 II 主要经济植物染色体数目及预处理的时间、效果·····	103
附录 III 常用试剂的配制·····	106
附录 IV 常用染色液的配制·····	109
附录 V 常用缓冲液的配制·····	112
附录 VI 常用显影液和定影液的配制·····	113
附录 VII 常用培养基配制·····	114
附录 VIII χ^2 值表·····	117
主要参考文献 ·····	118
图版 I 细胞有丝分裂各时期染色体形态图·····	119
图版 II 细胞减数分裂各时期染色体形态图·····	120
图版 III 果蝇唾液腺及巨染色体结构图·····	121

遗传学实验室工作规程

为保证遗传学实验能正常进行并获得理想的实验结果,避免在实验过程中发生差错和意外事故,实验操作者必须严格遵守实验室规则,认真做好实验前后和实验过程中的各项工作。

一、基本规则

1. 实验前必须预习,明确本次实验的目的、原理、内容和方法。实验时须保持安静,按实验教材和指导教师的要求进行操作,并详实记录实验中出现的情况和获得的实验结果,对资料进行整理分析,得出结论,写出实验报告。
2. 实验室、工作台、各种仪器、用具、玻璃器皿等必须保持清洁整齐,工作台要严防酸、碱腐蚀。各种化学药品、试剂等必须贴上标签,分门别类,放置一定位置,便于取用。
3. 正确使用显微镜及各种仪器,切勿使染料或试剂沾污镜头、镜台和所用仪器。如有沾污,须立即用镜头纸擦拭干净。
4. 取用药品时,所用各类量具必须分开,严禁混用,用后须立即冲洗干净。称量固体药品时,必须在秤盘上铺垫清洁白纸或蜡光纸,调试平衡后再称,以防药品腐蚀秤具。称量纸要做到一称一换,以防药品混杂,导致所配试剂不纯。
5. 遵守化学实验的操作要求,注意药品配制和使用时的安全。
6. 实验完毕,须做好清洁整理工作,所用仪器、物品应放还原处。实验过程中如有损坏或丢失仪器用具,应如实填写报告单,视情况进行相应处理。
7. 全班实验结束后,值日生安排整个实验室的全面清理打扫。离开实验室前,必须关闭所用仪器和灯具的电源,关紧水龙头和门窗。

二、显微镜的清洁和保养

显微镜是遗传学实验的重要仪器,使用时必须防尘、防高温、防湿、防药品侵蚀,在清洁保养中要做到以下几点:

1. 取镜时必须一手提镜臂,一手托镜底,防止显微镜滑落损坏。
2. 取出显微镜后,先用软毛刷、纱布拂擦镜身的防尘污物,用洗耳球吹去缝隙及镜头上的灰尘和纤维等物,再用镜头纸擦拭物镜和目镜,最后用细白丝绸把镜头再擦一次。
3. 镜检时物镜只能由低倍镜到高倍镜,在高倍镜下只能用微调螺旋调焦,细心操作,以防压碎玻片,损坏镜头。
4. 若发现镜头被药物或脏物污染,立即用擦镜纸蘸少许二甲苯(以刚湿润纸为度)擦掉污物,再用擦镜纸擦干。
5. 用完显微镜后进行清洁整理,将载物台放至最低处,转动物镜使之不要对着聚光镜,将显微镜放回原处。



6. 严禁将显微镜与化学药品混藏。

三、玻璃器皿的清洁

实验室所用玻璃器皿的清洁与否直接影响实验结果,实验前必须对玻璃器皿彻底清洗。

(一) 初用玻璃器皿的清洗

1. 新购置的玻璃器皿表面常附有游离的碱性物质,可先用肥皂水或去污粉洗刷,再用清水冲洗干净,然后用1%~2%的盐酸浸泡4h以上,再用清水冲洗后用蒸馏水冲洗2~3次,100℃~130℃烘干备用。

2. 新载玻片和盖玻片分别在盐酸乙醇[70%~95%工业乙醇(C_2H_5OH)100ml加浓盐酸(HCl)2ml]中浸泡4h,流水冲净,蒸馏水荡涤、晾干,置95%乙醇中加盖,以便随时取用。

(二) 使用过的玻璃器皿的清洗

1. 使用过的器皿应在未干前洗涤,如不能及时清洗,应浸在凉水中。洗涤方法:放入洗衣粉水中煮沸半小时,刷洗,清水冲净,蒸馏水荡涤,晾干或烘干;或在洗涤液中浸泡半小时,清水冲洗,蒸馏水荡涤,晾干或烘干。

2. 对移液管、滴定管、量筒、量器等,使用后应立即浸泡于凉水中,避免残留的溶液干涸,难以清洗。工作完毕后用流水冲洗,除去附着的试剂、蛋白质等物质,晾干后浸泡在铬酸洗液中4~6h或过夜,再用清水充分冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~4次,风干后备用。

注:铬酸洗液配制方法 重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$) 20g,浓硫酸(H_2SO_4 ,工业用,比重1.84)或废硫酸100ml,清水100ml。先将重铬酸钾溶于温水,冷却后徐徐加入浓硫酸,避免发热。此液呈红色,加盖防氧化变质,反复使用至变蓝黑色为止。器皿玻片洗净后再用此液浸泡,可延长其使用时间。

3. 陈旧或用过的永久制片的玻片,可先在肥皂水中煮沸5~10min,或将玻片微热后浸入二甲苯中脱胶,洗去残留的树胶和糨糊,并用清水冲洗干净。然后放入洗液中浸泡30min,再用清水冲洗掉残留的洗液,最后用蒸馏水洗净,置95%乙醇中保存备用。

四、玻璃器皿的干燥和灭菌

遗传学实验中以微生物为实验材料时,实验所用的玻璃器皿必须干燥和高温灭菌,防止杂菌污染。

(一) 干燥

干燥的方法有自然晾干和烘干两种。自然晾干所需时间长,但器皿上无水渍。烘干是将器皿及其他用具置60℃~80℃烘箱中干燥,但器皿上可能留有水渍,因此在干燥之前应尽可能除去器皿上的水滴。

(二) 灭菌

因高温能使微生物蛋白质变性,所以高温处理能达到灭菌的目的。高温灭菌的方法有



干热灭菌法和湿热高压灭菌法两种。

1. 干热灭菌法

将器皿及用具置 160°C 2h, 即可利用热空气杀死所有微生物及芽孢。在干热灭菌过程中要注意:

(1) 烘箱内忌放易燃、易挥发物品, 物品不能装得太满, 棉塞等物品不能接触烘箱壁, 以免发生燃烧事故。

(2) 烘箱温度达 100°C 以上后, 切忌打开烘箱玻璃门, 否则新鲜空气进入会引起燃烧, 或因剧烈的冷热变化而使玻璃器皿爆裂。

2. 湿热高压灭菌法 此法高温与高压结合, 蒸汽传热均匀, 灭菌时间短, 效果好。常用各种高压蒸汽灭菌锅进行灭菌。一般当蒸汽压力达 $15 \sim 20 \text{ lb/in}^2$ 、温度达 $121^{\circ}\text{C} \sim 125^{\circ}\text{C}$ 时, 保持 $20 \sim 40 \text{ min}$ 即可达到满意的效果。用此法灭菌应注意:

(1) 灭菌锅内水量要适当, 过少会烧干而发生事故, 过多会导致消毒物品水湿。

(2) 灭菌开始时打开放气阀, 加热使蒸汽将锅内的冷气排出, 然后再关上放气阀继续加热。否则灭菌效果不好。

(3) 灭菌加热时要随时注意压力变化, 如压力指针超过红色警戒线而安全阀仍未放气, 则可能是安全阀失灵, 应立即停止加热, 以防爆炸。

(4) 溶液或培养基灭菌后不能立即放气, 以免器皿炸裂或溶液喷出, 需待其自然冷却, 压力降至零时才可打开放气阀, 揭开锅盖。



第一部分 染色体标本的制作、观察与分析

生物之所以能表现出复杂的生命活动,主要是由于生物体内遗传物质表达,推动生物体内新陈代谢过程的结果。生命之所以能世代延续,也是因为遗传物质延绵不断传递给后代的缘故。真核生物的遗传物质在细胞中主要以染色质的形式存在于细胞核内,在细胞分裂期形成染色体。染色体是基因的载体,其形态特征和数目因物种不同而各有差异,同一物种的染色体数目及形态特征是相对稳定的,真核细胞染色体的数目和结构是重要的遗传指标之一。染色体的形态特征在细胞分裂过程中呈周期性变化,要对染色体的形态、结构和数目进行研究,必须熟悉细胞分裂过程以及染色体的行为变化,掌握染色体标本的制作技术。最常见的高等生物细胞分裂包括有丝分裂和减数分裂。

一、细胞周期与有丝分裂

有丝分裂是多细胞生物体细胞增殖的主要方式,细胞经过有丝分裂,一个细胞分裂为两个子细胞;核内染色体准确地复制、均等地分配到两个子细胞中,子细胞染色体组成与母细胞完全一样。

从细胞上一次分裂完成到下一次分裂结束的这段历程称为一个细胞周期(Cell Cycle),一个细胞周期包含一个分裂间期和一个分裂期。

(一) 分裂间期(interphase)

一次细胞分裂结束到下一次细胞分裂开始之间的一段时期。此时,在光学显微镜下看不到染色体,只能看到均匀一致的细胞核及染色较深的染色质。实质上间期核处于高度活跃的生理生化代谢阶段,为细胞继续分裂准备条件。

(二) 分裂期(mitosis)

有丝分裂期是一个连续过程,为了便于研究和描述,通常将有丝分裂期划分为前期、中期、后期和末期。有丝分裂期在整个细胞周期中约占10%,而其余大部分时间是处于细胞两次连续分裂之间的间期。细胞有丝分裂各时期染色体的行为变化与形态特征简述如下:

1. 前期(prophase)

核内染色质开始逐渐螺旋化,浓缩为细长而卷曲的染色体,并逐渐缩短变粗。每条染色体含两个染色单体,拥有一个共同的着丝点。核仁和核膜逐渐模糊不明显。动物细胞的中心体一分为二,并向细胞两极移动,周围出现星射线,形成纺锤丝;高等植物直接从细胞两极放出纺锤丝。这个时期又可细分为三个时期:

(1) 早前期 染色体细而长,染色质螺旋卷曲形成大小不同、着色较深的染色粒。一般制片染色线不可见,镜检时仅见核内充满大小不一、深浅不同的染色粒。核仁染色较深,仔细观察便可见到。

(2) 中前期 染色体继续收缩,染色线周围基质不断增加,染色加深,染色体呈连续的线状。此时,染色体仍扭曲很长,并互相缠绕,犹似一团搅乱的粗麻线。这时仍可见核膜、核仁,但在普通生物显微镜下核膜一般不易见到,核仁隐约可见。

(3) 晚前期 染色体进一步螺旋化缩短变粗,明显可见每一染色体含有两个染色单体,染色体趋向中央赤道板,但仍然相互缠绕,核膜、核仁逐渐消失。

2. 中期 (metaphase)

染色体高度螺旋化,核仁、核膜均已消失,纺锤丝与染色体的着丝点相连形成纺锤体(因纺锤丝不着色,在光学显微镜下不可见,但有时会因纺锤丝影响细胞质着色微粒的排列,可隐约见到纺锤丝分布位置)。由同一着丝点相连的两个姊妹染色单体非常清晰,具有典型、稳定的形态特征。着丝点位置清晰(在染色体某个地方出现的不着色透明点即着丝点,它将染色体分成两段),且排列在赤道面上,染色体臂自由伸展,分布于赤道面两侧。中期侧面观染色体排列图像形似轮辐条状;极面观犹似某种菊花状。此期是采用适当制片技术进行染色体形态和数目鉴别的最佳时期之一。

3. 后期 (anaphase)

染色体着丝点纵裂为二,姊妹染色单体在纺锤丝牵引下互相分开,各成为一条独立染色体移向细胞两极;每极有一组染色体,其数目和母细胞染色体数目相同。

4. 末期 (telophase)

分开后的两组染色体到达细胞的两极,纺锤体解体,染色体解螺旋化,逐渐变得松散细长,核仁、核膜重新出现。植物细胞赤道板处形成膜体,并形成细胞板,将细胞一分为二;动物细胞则通过细胞质缢缩,细胞膜在赤道板处向内凹陷,形成两个子细胞。细胞质随着核和子细胞形成相继随机分配到两个子细胞中。

高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎生长点及幼叶等部位的分生组织,植物染色体标本可利用这些组织,经过一定预处理压片而得。由于根尖取材容易,操作和鉴定方便,所以一般采用根尖作为观察植物有丝分裂的材料。获得动物染色体标本最常用的途径是从骨髓细胞、血淋巴细胞和组织培养的细胞中制备。

二、减数分裂 (meiosis)

减数分裂是一种特殊方式的有丝分裂,发生在配子形成过程中。减数分裂过程的特点是:染色体复制一次而细胞连续分裂两次,形成四个子细胞,每个子细胞所含染色体数目只有母细胞染色体数目的一半。除此之外,还有一个特点是前期特别长,且染色体行为变化复杂,包括同源染色体配对、同源染色体非姊妹染色单体的交换、联会复合体的解体与分离等。

减数分裂过程中染色体的形态、结构也呈周期性变化,且在特定时期呈现稳定的形态特征,因而也是进行染色体形态、结构与数目鉴定的有利时期。同时,由于减数分裂过程中染色体出现同源配对、非姊妹染色单体间片段交换、同源染色体相互分离等一系列独特行为对遗传物质的分配和重组产生了重大影响。因此,观察减数分裂过程对认识染色体形态、结



构、数目的动态变化,鉴定染色体结构、数目变异以及分析染色体(组)间亲缘关系等都有重要作用;熟悉减数分裂过程,掌握减数分裂染色体制片方法,也是从事遗传研究与育种工作的基本技能之一。现将减数分裂各时期染色体的行为变化、形态特征简述如下。

(一) 减数第一分裂

1. 前期 I (prophase I, P I) 此期又可分为 5 个时期:

(1) 细线期 (leptonema, P I₁) 核内染色质螺旋化呈长线状,互相缠绕,形似线团,难以辨别成双的染色体。

(2) 偶线期 (zygonema, P I₂) 染色体进一步螺旋化,缩短变粗,同源染色体相互纵向靠拢配对,称为联会。联会的一对同源染色体称为二价体。由于每条染色体各含两个姊妹染色单体,故又称之为四分体。

(3) 粗线期 (pachynema, P I₃) 二价体继续缩短变粗,形成紧密相连的联会复合体,此时同源染色体的非姊妹染色单体间可能发生片段交换。

(4) 双线期 (diplonema, P I₄) 同源染色体相互排斥,联会复合体开始松散。若粗线期同源染色体的非姊妹染色单体间发生了交换,同源染色体在一定区段内会出现交叉结,可清楚地观察到同源染色体交叉的现象。

(5) 终变期 (diakinesis, P I₅) 染色体更加浓缩粗短,交叉结移向二价体的两极,核仁、核膜逐渐解体。此时二价体分散于核内,是染色体计数的好时期。

2. 中期 I (metaphase I, M I)

核仁、核膜解体,所有二价体排列在赤道面上,纺锤丝与着丝点相连,形成纺锤体,二价体两条染色体的着丝点分别趋向细胞的两极,此时最适于染色体计数和形态特征观察。

3. 后期 I (anaphase I, A I)

同源染色体开始分开,在纺锤丝收缩力的作用下分别向细胞两极移动,完成染色体数目减半的过程。注意,此时染色体的着丝点尚未分裂,每条染色体仍由两个姊妹染色单体构成。

4. 末期 I (telophase I, T I)

染色体移到细胞两极,松开变细,核仁、核膜重新出现,形成两个子核;细胞质随机分裂,在赤道面上形成细胞板,成为二分体。

(二) 减数第二分裂

减数第一分裂完成后有一短暂的间期,二分体中的核仁、核膜完全形成,但染色体螺旋并不完全解开,紧接着进入减数第二分裂。

1. 前期 II (prophase II, P II)

染色体又开始缩短变粗,两姊妹染色单体互相排斥分开,着丝点处仍相连形成剪刀状。

2. 中期 II (metaphase II, M II)

染色体显著缩短变粗,着丝点排列在两子细胞的赤道面上,且与纺锤丝相连,形成纺锤体。

3. 后期 II (anaphase II, A II)

染色体的着丝点纵裂为二,姊妹染色单体分开成为独立的染色体,在纺锤丝牵引下分别

移向两极。

4. 末期 II (telophase II, T II)

分向两极的染色体聚合,解螺旋形成新核,核仁、核膜重新形成,细胞质也分隔为二,从而使一个母细胞分裂为四个子细胞,称为四分体。每个子细胞内所含染色体数只有母细胞($2n$)的一半(n)。

高等动、植物的性母细胞($2n$)在形成雌雄配子(n)时必须经过减数分裂。在观察减数分裂过程时,无论动物或植物均以雄性较为方便。在适当的时机采集植物花蕾(花序)或动物精巢,经适当技术处理后制片,就可以在显微镜下观察到细胞的减数分裂过程。

三、染色体标本的制备方法

优良的染色体制片是其他技术(如显带、原位杂交等)的先决条件,制备染色体标本无疑是遗传学研究最基本的技术。染色体标本的制备原则上可以从所有发生有丝分裂的组织或细胞悬液中得到。因此,熟悉细胞有丝分裂全过程,掌握有丝分裂细胞染色体标本制作方法,是从事遗传研究的基本功之一。制备染色体标本的方法主要有压片法和空气干燥法两种。

(一) 压片法

压片法是指将处于有丝分裂状态的组织或细胞(如植物根尖、茎尖生长点及幼叶的分生组织)经预处理、固定、解离(酶解或酸解)后,用人工外加的机械压力使染色体分散在载玻片上的一种染色体制片技术。此法操作快速、简便,节省材料,植物染色体标本制作常用此方法。具体操作见相关实验。

(二) 空气干燥法

空气干燥法简称气干法,是将细胞经过秋水仙素处理、低渗处理、充分固定、滴片(又叫染色体分散)等步骤之后,在载玻片上得到染色体标本的制片技术。该方法操作稍繁,但染色体易于展开而不易导致染色体变形。动物染色体标本的制作常用此法。对含较多成熟组织的材料(如芽、幼叶等)或细胞含染色体数目多而小(如多种果树)的植物,可将材料经预处理→前低渗→酶解离→后低渗等处理后制备细胞悬液,再行固定→滴片→空气(或火焰)干燥→Giemsa 染色制成染色体片,其制片效果明显优于压片法。

四、染色体分析方法

对染色体的数目、大小、形态特征等进行综合分析的方法称为核型分析。核型又称染色体组型,是指一个个体或一组相关个体的特有染色体组,通常以有丝分裂中期染色体的数目和形态来表示。根据染色体的结构,按照长度、着丝点的位置及其他特征排列而成的图形称为核型图。核型分析的内容包括染色体总数、染色体组数(x)、每一染色体的形态结构、异染色质和 DNA 的含量、核型对称程度等。染色体的形态、结构用染色体长度(绝对长度和相对长度)、臂指数或着丝粒指数等指标来描述。不同物种、不同品种,甚至同种生物不同



个体的核型均有差异。

染色体(臂)绝对长度(μm) = [放大的染色体(臂)长度(mm)/放大倍数] $\times 1000$

相对长度(%) = (某染色体长度/单套染色体组全长) $\times 100\%$ (植物)

或: 相对长度(%) = [某染色体长度/(单套常染色体 + X 染色体)的总长] $\times 100\%$ (动物)

臂比 = 长臂长度/短臂长度

长度比 = 最长染色体长度/最短染色体长度

着丝粒指数 = (短臂长度/染色体全长) $\times 100$

表 1-1 着丝粒位置的确定(Levan 1964 年的标准)

臂 比	或着丝粒指数	着丝粒位置	简 写
1.0	50.0	正中部着丝粒	M
1.0 ~ 1.7	50.0 ~ 37.5	中部着丝粒	m
1.7 ~ 3.0	37.5 ~ 25.0	亚中部着丝粒	sm
3.0 ~ 7.0	25.0 ~ 12.5	亚端部着丝粒	st
大于 7.0	12.5 ~ 0.0	端部着丝粒	t
∞	0	正端部着丝粒	T

核型分析能明确识别各个染色体的特征,有助于基因定位,是细胞遗传学的一项基本技术,也是染色体工程、细胞分类学和进化理论的重要研究手段。不同物种的核型分析参照的标准各有差异,动物核型分析都参照人类核型分析的标准进行,植物核型分析有植物核型分析的标准。

(一) 人类核型分析标准

人类细胞的正常核型是含有 $2n = 2x = 46$ 条染色体,相互配对构成 23 对,其中有 22 对常染色体和 1 对性染色体,男性为 46,XY;女性为 46,XX。

根据州佛(1960)、伦敦(1963)、芝加哥(1966)会议提出的标准,即按照染色体的长度依次减少和着丝点的位置及其他特征,可把人类体细胞中的 23 对染色体分为七群。

A 群:包括第 1、2、3 三对染色体,体积大,中央着丝粒,易区别。第 2 对的着丝粒略偏离中央。

B 群:包括第 4、5 两对染色体,体积大,亚中部着丝粒,彼此不易区分。

C 群:包括第 6 ~ 12 对常染色体和 X 染色体,中等大小,具亚中部着丝粒,彼此间难以区分。第 6 对染色体的着丝粒靠近中央,X 染色体大小介于第 6 与第 7 对之间。第 9 对染色体长臂上有次缢痕,第 11 对染色体的短臂较长,第 12 对染色体的短臂较短。

D 群:包括 13、14、15 三对染色体。中等大小,近端着丝粒,有随体,彼此间不易区分。

E 群:包括 16、17、18 三对染色体。中等大小,第 16 对有中央着丝粒,长臂上有次缢痕,易于区别。第 17 和第 18 对有亚中部着丝粒,难于区分,后者短臂较短。

F 群:包括 19、20 两对染色体。体积小,具中部着丝粒,彼此间难于区分。

G 群:包括 21、22 两对常染色体和 Y 染色体。常染色体体积小,具近端着丝粒,有随体,长臂常呈分叉状,彼此不易区分。Y 染色体较前两对略大,也是具近端着丝粒,无随体,长臂常彼此平行,根据这些特点可加以识别。

(二) 植物核型分析的基本原则

高等植物属异源多倍体的种类较多,进行核型分析时不能完全按染色体大小进行排列,而应事先根据系统发育的来源进行分组,然后才在各组内按染色体大小、着丝点位置、随体的有无等特点进行排列组型。如人工培育的小黑麦,其染色体组来自普通小麦(AA BB DD)和黑麦(RR),核型分析时不仅要把RR染色体组分开,而且也要把AA、BB、DD染色体组分开,在各染色体组内进行分析。常见的植物如棉花、烟草、马铃薯以及许多果树、蔬菜、花卉等均存在多倍体品种,核型分析时应特别注意。植物核型分类标准如表1-2。

表 1-2 植物核型分类标准

染色体长度比	臂比>2:1的染色体的百分比			
	0	1~50	51~99	100
<2:1	1A	2A	3A	4A
2:1~4:1	1B	2B	3B	4B
>4:1	1C	2C	3C	4C

实验一 植物分生区细胞染色体制片与有丝分裂过程的观察

[实验目的]

1. 学习并掌握根尖或叶片材料处理、染色、压片及制片观察的方法。
2. 观察有丝分裂各时期染色体的形态变化,了解有丝分裂全过程。

[实验原理]

熟悉有丝分裂过程、掌握有丝分裂染色体制片方法与技术是研究染色体形态结构、检查染色体数目、进行核型分析与带型分析的基础。

高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎尖生长点及幼叶等器官的分生组织(分生区);这些分生组织均可以用作制片材料;另外,愈伤组织、悬浮培养物等也可用作制片材料。其中根尖是最常用的材料,其原因有以下几个方面:①根尖取材容易,操作和鉴定也比其他器官与组织方便。②实验室内采用种子萌发后所长出的新鲜幼嫩根尖,不受植物生长季节的影响和限制,并且可以大量获得。③对于某些珍贵而又稀少的试验材料,取用自然条件下生长植株的根尖,比取用茎尖、花器等对材料的伤害要小得多。④采用实验室内种子发根,切取根尖后的种苗通常还可以进行正常种植,利于进行后续研究。

对于特别珍稀的材料,如转基因植株花药或花粉培养诱导出的花粉植株、孤雌生殖植株,以及通过克服远缘杂交的不亲和性和远缘杂种的不育性所获得的宝贵材料,没有种子或种子数目非常稀少,有时剪取幼根也会影响植株的生活力。另外,有些植物根尖小、取材不方便或根尖压片较难(如高粱)。这些情况下采用叶片压片法对材料的伤害是最小的,取材也非常方便,而且可以免去实验室发根工作。



有丝分裂期在整个细胞周期中所占的时间相对较短,有丝分裂制片的主要目的是进行染色体鉴定,希望观察到更多分裂相,尤其是分裂中期相,通常要对材料进行不同的预处理。预处理主要通过抑制和破坏纺锤丝的形成来获得更多的中期分裂相;同时,预处理还可改变细胞质的粘度,促使染色体缩短和分散,便于压片和观察。常用的预处理有物理法、化学法、混合处理法等。

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方法软化或部分分解细胞壁使细胞间易于分离,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。

酸解法步骤简便、容易掌握。根尖分生组织经过酸解和压片后,都呈单细胞,但大部分分裂细胞的染色体还包在细胞壁中间。酸解法广泛用于染色体计数、核型分析和染色体畸变的观察及相关分析。

酶解法常用于染色体显带技术或姊妹染色单体交换研究。通过解离和压片,分生细胞的原生质体能够从细胞壁里压出,使染色体周围不带有细胞质或仅有少量细胞质,让后续制片处理直接作用于染色体。果树染色体的制备常用酶解法。

在普通光学显微镜下观察染色体形态结构还需要对材料进行染色,通常采用染色体染色效果好而细胞质着色少的碱性染料、酸性染料或孚尔根试剂染色。

[实验材料]

蚕豆(*Vicia faba*, $2n = 2x = 12$)、黑麦(*Secale cereale*, $2n = 2x = 14$)、大麦(*Hordeum sativum*, $2n = 2x = 14$)、普通小麦(*Triticum aestivum*, $2n = 2x = 42$)、玉米(*Zea mays*, $2n = 2x = 20$)、豌豆(*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$)、洋葱(*Allium cepa*, $2n = 16$)等根尖或幼叶,红橘(*Citrus reticulata*, $2n = 2x = 18$)、梨(*Pyrus communis*, $2n = 2x = 34$)等的幼叶或其他分生组织。

[实验器具、药品]

显微镜、恒温箱、水浴锅、计时器、培养皿、酒精灯、小烧杯、试管、载玻片、盖玻片、镊子、剪刀、刀片、解剖针、吸水纸、纱布、标签、铅笔、橡皮等常用工具。

醋酸洋红、醋酸地衣红、铁矾-苏木精、改良苯酚品红等染液,0.1%秋水仙碱,0.002~0.004mol/L 8-羟基喹啉,饱和对二氯苯溶液或饱和 α -溴萘,卡诺氏固定液,FAA固定液,冰乙酸,甲醇,无水乙醇,95%乙醇,0.1%升汞,1mol/L盐酸,1%果胶酶与1%纤维素酶混合液等。

[实验方法]

一、植物根尖压片法

1. 发根

将蚕豆、玉米、黑麦等植物种子用0.1%升汞消毒10min,经流水冲洗,温水浸种浸泡1~2d后,置25℃恒温箱中发根。待主根长到2cm左右时剪去主根(须根系植物的种子发出的主根不需剪掉),让其充分长出侧根。待侧根长到1~2cm时,于适宜时间用蒸馏水洗净,将水吸干,剪取根尖0.5~1cm进行预处理。若以洋葱为材料,将洋葱鳞茎置于盛水的烧杯口上,使洋葱鳞茎与水相接,在25℃下发根。为获得尽可能多的分裂相,蚕豆根尖以上午9~10时剪取为宜,洋葱根尖以中午12:30~13:30切取为宜。