

新世纪高等院校实验教程系列

遗传学

实验教程

YICHUANXUESHIYANJIAOCHENG

○ 彭正松 刘小强 主编 ○

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



西南师范大学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

无机化学

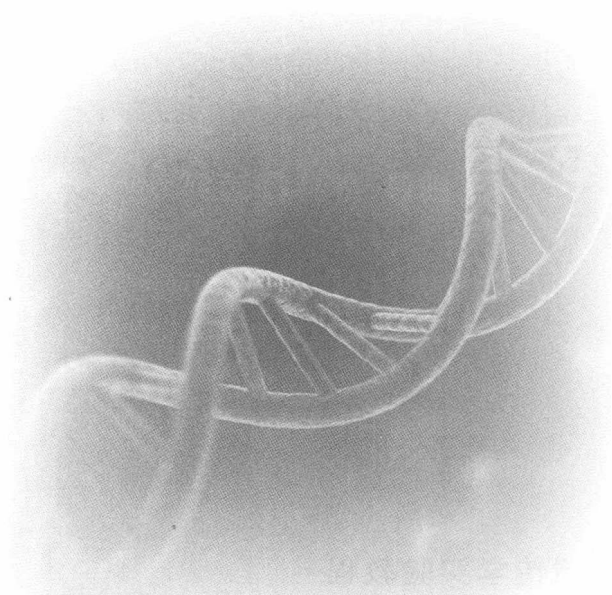
实验教程

王德成 王德成 王德成



化学工业出版社

新世纪高等院校实验教程系列



遗传学实验教程

YICHUANXUE SHIYAN JIAOCHENG

○ 彭正松 刘小强 主编 ○

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



西南师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程/彭正松,刘小强主编. —重庆:
西南师范大学出版社,2012.6
ISBN 978-7-5621-5812-7
I. ①遗… II. ①彭… ②刘… 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(2012)第 121026 号

遗传学实验教程

彭正松 刘小强 主编

责任编辑:杜珍辉

封面设计:戴永曦

照 排:文明清

出版发行:西南师范大学出版社

重庆·北碚 邮编:400715

网址:www.xscbs.com

印 刷 者:重庆东南印务有限责任公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:11.75

字 数:280 千字

版 次:2012 年 9 月 第 1 版

印 次:2012 年 9 月 第 1 次印刷

书 号:ISBN 978-7-5621-5812-7

定 价:22.00 元

编委会 / BIAN WEI HUI

主 编：彭正松 刘小强

副主编：魏淑红 唐正义 葛方兰

参 委（按姓氏拼音排序）

葛方兰 四川师范大学

龚慧明 重庆师范大学

姜立春 绵阳师范学院

刘小强 西南大学

彭正松 西华师范大学

唐正义 内江师范学院

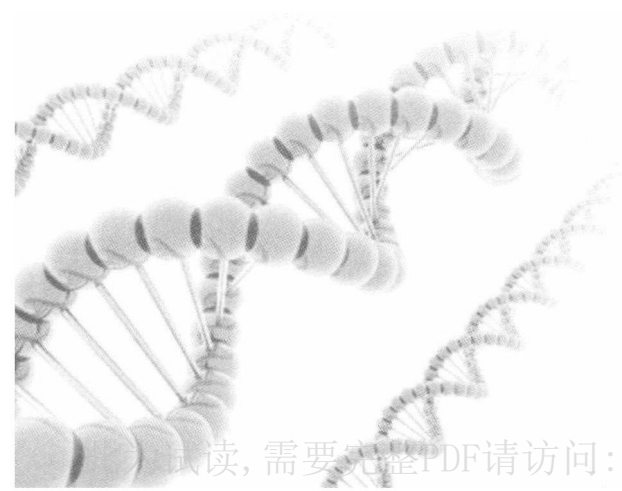
魏淑红 西华师范大学

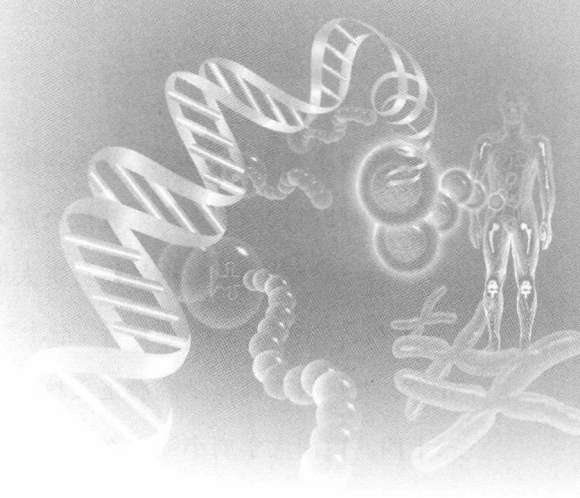
闫秋洁 绵阳师范学院

杨随庄 西南科技大学

杨在君 西华师范大学

赵丽华 西昌学院





前言 / QIAN YAN

1900 年重新发现孟德尔规律,标志着遗传学的诞生。回顾 100 多年的发展历史,遗传学经历了从简单到复杂、从宏观到微观的发展历程。19 世纪末美国细胞学家萨顿和德国实验胚胎学家博韦里根据对减数分裂的观察结果提出了遗传的染色体学说,推动了 20 世纪细胞遗传学的繁荣。20 世纪中叶,美国分子遗传学家沃森和英国分子生物学家克里克提出了 DNA 分子结构的双螺旋模型,开创了研究遗传物质结构与功能的分子遗传学新时代。进入 21 世纪以来,线虫、果蝇、水稻等动植物和人类基因组测序的完成以及基因功能解析工作的开展,日益凸显出遗传学在生命科学中的核心和前沿地位。而遗传学不断发展的重要基础,就是大量设计周密的遗传学实验。同样,在遗传学教学中,实验教学是非常重要的环节。遗传学实验可以帮助学生更加深刻地理解和灵活掌握抽象的遗传学概念和原理,进一步培养学生的科学思维及探索生命科学的兴趣。为此,我们结合多年来的实验教学改革经验,组织从事遗传学一线教学科研工作的教师编写了这本《遗传学实验教程》。

本教程将动物、植物、微生物、人类遗传学的实验内容进行了整合,内容涵盖经典遗传学、细胞遗传学、微生物遗传学和分子遗传学领域,压缩了简单验证性实验,增加了综合性和设计创新性实验。基础性实验主要培养学生遗传学研究的基本方法和基本技能。综合性实验的目标是综合运用已掌握的基本原理和技术,研究和探索遗传学基本问题,培养学生解决问题的系统思维能力和综合分析问题的能力。设计创新性实验主要针对遗传学发展的一些先进理论和先进实验技术,由学生自行设计实验方案并实施实验,旨在培养学生的独立研究能力和创新精神。

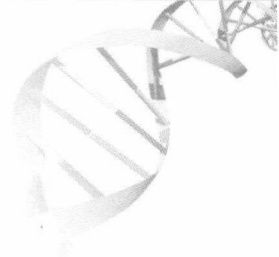
西华师范大学彭正松教授对该书实验内容的确定、实验项目的编写等做了整体规划

设计,并对全文进行了统稿、修改与审定。西南科技大学杨随庄研究员编写实验一、三十三。四川师范大学葛方兰副教授负责大纲修订,并编写实验二、四、二十五。西华师范大学生命科学学院魏淑红副教授负责大纲修订、协助统稿、修改、样稿等,并编写实验三、十二、十八、二十三、二十六、三十、三十二以及附录。绵阳师范学院闫秋洁老师编写实验五、八、九。内江师范学院唐正义教授负责大纲修订,并编写实验六、十一、十七、二十二、三十四。西南大学刘小强副教授负责大纲修订,并编写实验七、二十四、二十七、二十九、三十五、三十九。西华师范大学杨在君博士编写实验十、十九、二十八。西昌学院赵丽华老师编写实验十三、三十一、三十六。绵阳师范学院姜立春博士编写实验十四、十五、三十八。重庆师范大学龚慧明老师编写实验十六、二十、二十一、三十七。

由于编撰人员水平有限,书中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

2012年3月28日



目 录

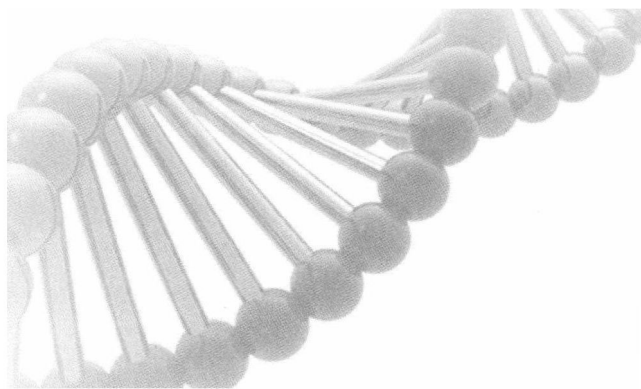
CONTENTS

第一部分 基础性实验	001
实验一 植物细胞有丝分裂及染色体行为的观察	003
实验二 减数分裂过程中染色体行为的观察	006
实验三 人体 X 染色质的制备与观察	010
实验四 果蝇的饲养、果蝇的形态和生活史观察	013
实验五 果蝇唾腺染色体的制备和观察	017
实验六 动植物染色体畸变检测技术	021
实验七 大肠杆菌紫外诱变与营养缺陷型的筛选	025
实验八 粗糙链孢霉杂交结果观察——四分子分析	029
实验九 植物的有性杂交	034
实验十 小麦数量性状统计与遗传力的估算	039
实验十一 多基因遗传的人类皮肤纹理分析	043
实验十二 遗传平衡定律(Hardy-Weinberg 定律)分析	047
实验十三 DNA 的提取及检测	049
实验十四 质粒 DNA 的提取及检测	053
实验十五 总 RNA 的提取及反转录 PCR(RT-PCR)	056
第二部分 综合性实验	061
实验十六 果蝇杂交实验与遗传分析	063
实验十七 植物染色体核型分析	068
实验十八 人类染色体的识别及核型分析	071
实验十九 荧光原位杂交实验	074
实验二十 小鼠骨髓细胞染色体的制备和观察	077
实验二十一 小鼠骨髓细胞染色体的分带技术	080
实验二十二 植物多倍体细胞的诱发及鉴定	083
实验二十三 环境对果蝇基因表达的效应	087

实验二十四	大肠杆菌基因的互补测验	089
实验二十五	大肠杆菌杂交与基因定位	092
实验二十六	P ₁ 噬菌体介导的普遍性转导	096
实验二十七	大肠杆菌 λ 噬菌体的局限性转导分析	100
实验二十八	蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	103
实验二十九	PCR 方法鉴定人类性别	106
实验三十	随机扩增多态性 DNA 分析	110
实验三十一	目的基因片段回收与纯化	114
实验三十二	DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其目的片段的回收	117
实验三十三	重组质粒的构建、转化和筛选	120
第三部分 设计性实验		123
实验三十四	人类正常遗传性状的调查	125
实验三十五	植物基因的连锁交换和基因定位	130
实验三十六	植物群体遗传多样性的分子检测	133
实验三十七	mRNA 差异显示技术分离差异表达基因	139
实验三十八	目的基因的原核表达及检测	142
实验三十九	植物转基因实验	146
附录 I	常用试剂的配制	153
附录 II	遗传学实验室常用溶液配制	154
附录 III	常用缓冲液的配制	158
附录 IV	常用培养基配制	164
附录 V	分子遗传学实验常用试剂的配制	168
附录 VI	核酸电泳常用试剂及缓冲液	172
附录 VII	蛋白质电泳相关试剂及缓冲液	174
附录 VIII	FISH 相关溶液的配制	175
附录 IX	探针的生物素标记	176
附录 X	卡方分布临界值表	177
主要参考文献		179

第一部分

基础性实验



实验一 植物细胞有丝分裂及染色体行为的观察

一、实验目的

1. 学习并掌握植物细胞有丝分裂制片技术。
2. 观察植物细胞有丝分裂过程中染色体的形态特征及染色体的行为动态变化。

二、实验原理

有丝分裂(也称间接分裂或核分裂)是植物细胞进行分裂的基本方式,其目的是增加细胞的数量,并通过细胞分化以实现组织发生和个体发育。在有丝分裂过程中,细胞核内的遗传物质(脱氧核糖核酸,DNA)能准确地进行复制,然后有规律地均匀地分配到两个子细胞中去,使子细胞有与母细胞保持完全一致的遗传物质。有丝分裂是一个连续过程,可分为分裂间期和分裂期,分裂期又可分为前期、中期、后期和末期。植物细胞有丝分裂主要在根尖、茎间、芽的生长点、幼叶叶缘及茎间形成层等分生组织进行,将生长旺盛的植物分生组织经过取材、固定、解离、染色、压片等处理,就可以观察到植物细胞的有丝分裂现象。由于植物根尖易于取材、操作方便,经常被用来进行植物细胞有丝分裂过程的观察。

三、实验材料、器具及试剂

1. 材料

蚕豆(*Vicia faba*, $2n=12$)。

2. 器具

恒温培养箱、镊子、直头剪刀、单面刀片、培养皿、水浴锅、光学显微镜、载玻片、盖玻片、烧杯、量筒、滤纸等。

3. 试剂

卡诺氏固定液(95%乙醇:冰乙酸=3:1)、改良品红、1mol/L 盐酸、95%乙醇、冰乙酸。



四、实验方法

1. 生根

选取饱满、成熟、完好的蚕豆种子,用温水浸泡 24h,然后转入铺有双层滤纸或纱布的培养皿中,上面盖双层湿纱布,置于 25℃ 培养箱中暗培养,每天用清水冲洗 1~2 次。

2. 取材

当根长到 2cm 左右时,最好于当日上午 9~11 时或下午 15~17 时剪下距根尖 0.5cm 的部分备用。

3. 固定

将剪下的根放入卡诺氏固定液中固定 3~20h(固定后的材料可转入 70% 酒精中,在 4℃ 冰箱中冷藏 4~6 个月)。

4. 解离

将固定后的材料用蒸馏水漂洗 2~3 次,然后置于滤纸上吸去表面水分,再将这些材料放入已经在 60℃ 水浴中预热的加有 1mol/L 盐酸溶液的小烧杯中,在 60℃ 恒温下解离 8min 左右,倒掉盐酸溶液,用蒸馏水漂洗 3~4 次。

5. 染色与压片

用镊子取上述根尖置于载玻片中央,用单面刀片切掉根冠,切取根尖分生组织,移去其他组织,加一滴改良品红染液,5min 后盖上盖玻片,将滤纸放在盖玻片上,用拇指用力按压盖玻片,再用手固定住盖玻片,同时用铅笔的橡皮头在材料部位垂直轻敲几下,使材料分散均匀。

6. 镜检

将压好的片子先放在低倍镜下观察,寻找分裂时期典型的细胞分裂相,然后,再转换成高倍镜观察,注意观察细胞间期和细胞分裂期各个时期核内染色体的结构特点,选择典型的细胞分裂相绘图或拍照。

7. 永久制片的制作

将制作好的片子放在冻片机上或液氮容器中,将片子冻透,然后迅速用单面刀片将盖片揭开,在空气中干燥后用二甲苯透明,再用中性树胶或加拿大树胶封片。

五、实验结果与分析

有丝分裂包括分裂间期和分裂期,分裂期又分为前期、中期、后期和末期四个时期,见图 1-1。

1. 间期:细胞核内染色质分布均匀,核形态明显,核内可见 1~2 个染色很深的核仁。

2. 前期:核膨大,核膜破裂,核仁逐渐消失,核内染色质浓缩成纤细的染色丝,并逐渐缩短变粗,形成染色体。

3. 中期:染色体排列在细胞中央平面上(赤道部)形成赤道板,染色体已纵裂成两条染色单体,但依然由一个着丝粒相连。

4. 后期:着丝粒纵裂,染色体分为数量相等的两群,在纺锤丝的牵引下移向两极。

5. 末期:移到两极的染色体解旋、伸长变细成为染色丝,最后形成染色质。核膜、核仁重新出现。细胞中央赤道部形成细胞板,进而形成细胞壁,最终成为两个子细胞。

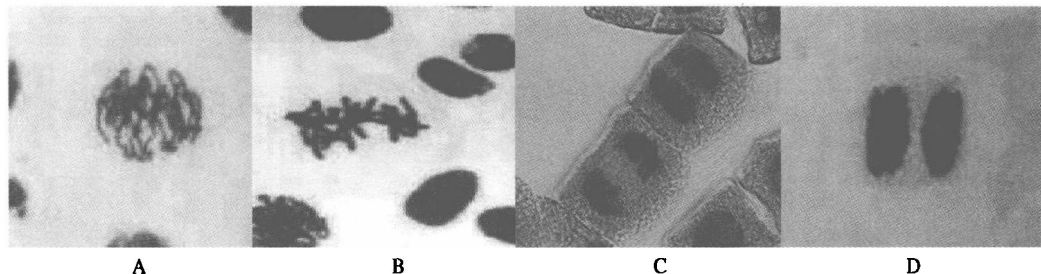


图 1-1 蚕豆根尖细胞有丝分裂各时期

A. 前期 B. 中期 C. 后期 D. 末期

六、实验作业

1. 有丝分裂制片一张。
2. 绘出所观察到的有丝分裂各个时期的分裂图像,完成实验报告。



思考题

1. 简述细胞有丝分裂的生物学意义。
2. 染色体染色的方法有多种,请你列举 2~3 例,并简述各自的特点。
3. 你在高倍镜下观察到的所有细胞中,处于什么时期的细胞数量最多? 为什么?

【注意事项】

1. 解离的时间要根据材料来确定,解离时要注意观察,如果解离时间过长,分生组织会与伸长区脱离,这时分生区已经被解离过软,很难操作,而且染色效果不好。
2. 冻片子时至冻透为止,切不可时间过长,否则细胞会冻裂。封片时要注意胶量不宜过多,塑胶既能达到盖玻片的边缘又没有多余是最适量的。



实验二 减数分裂过程中染色体行为的观察

一、实验目的

1. 通过观察动植物细胞减数分裂过程中染色体行为的动态变化,了解细胞减数分裂的过程,以及动物生殖细胞的形成过程。
2. 掌握制备动植物细胞减数分裂玻片标本的技术和方法。

二、实验原理

减数分裂是进行有性生殖的生物形成配子的过程中出现的一种特殊分裂方式,也叫成熟分裂。其特点是染色体复制一次,连续进行两次细胞分裂,最后形成4个子细胞,每个子细胞中的染色体数目是母细胞的一半。在细胞分裂过程中发生了同源染色体的配对、同源染色体非姐妹染色单体的互换、同源染色体的分离、非同源染色体的自由组合等。

减数分裂在遗传上具有重要的意义。首先,保证了有性生殖生物个体世代之间染色体数目的稳定性。通过减数分裂导致了性细胞(配子)的染色体数目减半,即由体细胞的 $2n$ 条染色体变为 n 条染色体的雌雄配子,再经过两性配子结合,合子的染色体数目又重新恢复到亲本的 $2n$ 水平,使有性生殖的后代始终保持亲本固有的染色体数目,保证了遗传物质的相对稳定。其次,为有性生殖过程中创造变异提供了物质基础。通过非同源染色体的随机组合,各对非同源染色体之间以自由组合进入配子,形成的配子可产生多种多样的遗传组合,雌雄配子结合后就可出现多种多样的变异个体,使物种得以繁衍和进化,为人工选择提供丰富的材料。通过非姐妹染色单体片段的交换,在减数分裂的粗线期,由于非姐妹染色单体上对应片段可能发生交换,使同源染色体上的遗传物质发生重组,形成不同于亲代的遗传变异。

三、实验材料、器具及试剂

1. 材料

大葱(*Allium fistulosum* $2n=16$)雄花序、雄性蝗虫(*Oxya chinensis* $2n=23, 22+X$)。

2. 器具

镊子、解剖针、载玻片、盖玻片、培养皿、染色板、吸水纸、显微镜。

3. 试剂

改良苯酚品红、醋酸洋红、Carnoy 固定液。

四、实验方法

(一)植物细胞减数分裂行为的观察

1. 取材:选取处于减数分裂期的葱花,剪下花序。
2. 固定:用卡诺氏固定液固定 12~24h,之后用 95%酒精冲洗,再转入 70%酒精中,可于 4℃冰箱保存。
3. 制片:用镊子小心拨开花药壁,挤出花粉母细胞,涂于载玻片上,用镊子或解剖针轻轻捣击,使分散。用改良苯酚品红染色 3~5min,盖上盖玻片。
4. 镜检:用低倍镜找到分裂期细胞,再转用高倍镜仔细观察。

(二)蝗虫精巢细胞减数分裂行为的观察

1. 取材和固定

蝗虫雌性个体大、腹部末端为产卵瓣,雄性个体小,腹部末端为下生殖板,其后呈圆锥形向上弯曲,从外部容易区别。将捕捉或购回的雄性蝗虫,放入 Carnoy 固定液中固定 24h,再将固定好的材料放入 70%酒精中,溶液保存于 4℃冰箱中。

2. 染色

在蝗虫翅基部后方(腹部两侧的前端),用解剖剪将其体壁剪开,可见在上方两侧各有一块黄色的团块,这便是蝗虫的精巢。它由许多精细小管组成。取 1~2 条精细小管置于载玻片上,滴一滴醋酸洋红,染色 15min。

3. 压片

把盖玻片一端浸入染液,倾斜 45°轻轻放下盖玻片,盖在精细小管上。在盖玻片上盖 2 层吸水纸,吸取多余染液,再用左手拇指和食指卡住盖玻片,防止盖玻片移动,然后用右手大拇指按压盖玻片,再用解剖针另一端轻敲盖玻片,使材料均匀分开,呈薄雾状即可。

4. 镜检

先在低倍镜下找到目标,再转换高倍镜观察。

五、实验结果与分析

细胞的减数分裂包括减数第一次分裂(减数分裂Ⅰ)和减数第二次分裂(减数分裂Ⅱ)。

1. 减数分裂Ⅰ

(1)前期Ⅰ

细线期:染色体很细很长,呈细线状在核内交织成网。每一染色体含两个染色单体,但显微镜下看不到双线结构,染色体呈丝状结构。

偶线期:染色体的形态与细线期差别不大,同源染色体配对,形成二价体,每个二价体有两个着丝点,染色丝比细线期粗。

粗线期:染色体螺旋化,进一步缩短变粗,显微镜下可明显看到每个染色体的两个姐妹染色单体。二价体由四个姐妹染色单体和两个着丝粒组成,这时非姐妹染色单体间可能有交换的发生。



双线期:染色体进一步螺旋化,变得更为粗短,更为清晰可见,二价体中的两条同源染色体相互分开出现交叉现象,呈“X”、“V”、“∞”、“O”等形状。

终变期:染色体高度浓缩,染色体均匀分散在核膜附近。此时是检查染色体数的最好时期,这时核内有多少个二价体,就说明有多少对同源染色体。

核仁和核膜在前期 I 始终存在,在终变期时核仁、核膜开始消失。

(2)中期 I:核仁、核膜消失,二价体均匀排列在赤道板上,纺锤体形成,从纺锤体的侧面看,一个个二价体就像一列横队排列在细胞中,从纺锤体的极面看,一个个二价体分散在细胞质中。这时也是染色体计数的好时期。

(3)后期 I:二价体的两个同源染色体分开,由纺锤丝拉向两极。染色体又变成了染色丝状。

(4)末期 I:同源染色体分别到达细胞两极,染色体变成了染色质状,核膜、核仁重新出现,形成两个子核,每个子核染色体数目减半为 n 。同时细胞质分开形成两个子细胞,叫二分体。

2. 减数分裂 II

(1)前期 II:染色体呈线状,每条染色体具两个姐妹染色单体,共用一个着丝粒,二者间有明显互斥作用(分开趋势)。前期 II 快结束时核膜消失。

(2)中期 II:染色体排列在赤道板上,每条染色体有两个染色单体和一个着丝粒。

(3)后期 II:每条染色体从着丝粒处分裂为二,分别向两极移动。

(4)末期 II:移到两极的染色体解螺旋,出现核仁、核膜,形成单倍的子核,这时减数分裂 I 形成的两个单倍核形成四个单倍核,最后形成四个子细胞,叫四分体。

理想的细胞减数分裂玻片标本在显微镜下可观察到减数分裂各个时期的典型细胞。如图 2-1、图 2-2 所示。

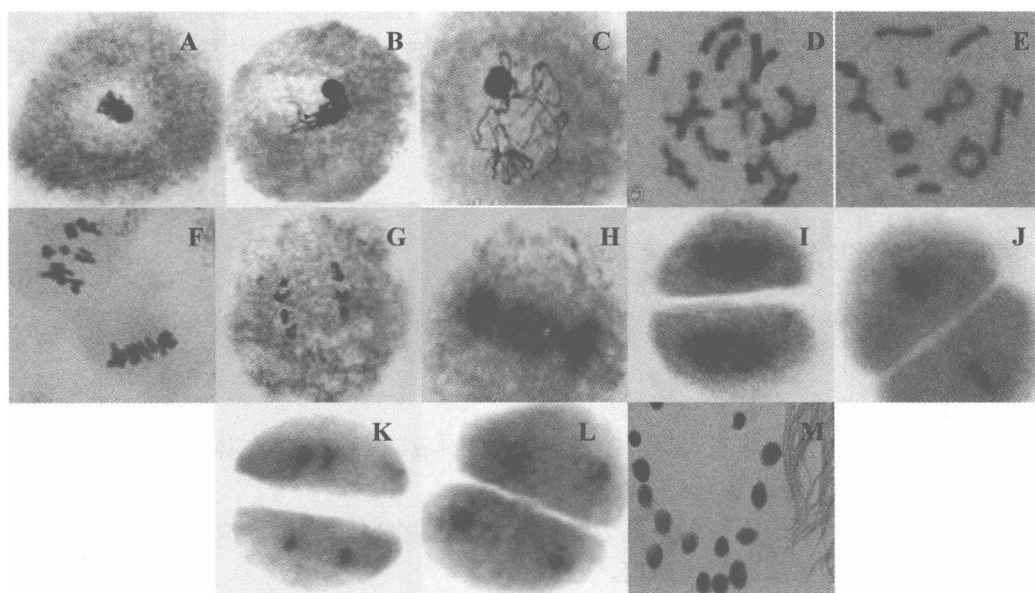


图 2-1 蝗虫精巢细胞减数分裂各时期

A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期 D. 双线期 E. 终变期 F. 中期 I
G. 后期 I H. 末期 I I. 前期 II J. 中期 II K. 后期 II L. 末期 II M. 精子