

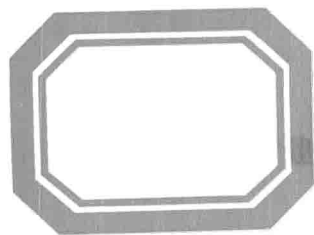
遗传学实验教程

Experimental Course of Genetics

主编 牛炳韬 孙英莉



兰州大学出版社



设基金资助出版

遗传学实验教程

Experimental Course of Genetics

主 编 牛炳韬 孙英莉
副主编 陆 卫 李晓峰 牛 月



兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程 / 牛炳韬, 孙英莉主编. —兰州:
兰州大学出版社, 2014. 3

ISBN 978-7-311-04427-5

I. ①遗… II. ①牛… ②孙… 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(2014)第 057824 号

策划编辑 濮丽霞
责任编辑 郝可伟
封面设计 李鹏远

书 名 遗传学实验教程
作 者 牛炳韬 孙英莉 主编
出版发行 兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路 222 号 730000)
电 话 0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心)
0931-8914298(读者服务部)
网 址 <http://www.onbook.com.cn>
电子信箱 press@lzu.edu.cn
印 刷 兰州德辉印刷有限责任公司
开 本 787 mm × 1092 mm 1/16
印 张 14
字 数 300 千
版 次 2014 年 4 月第 1 版
印 次 2014 年 4 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-311-04427-5
定 价 25.00 元

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

前 言

遗传学是研究生命体遗传与变异规律的科学,是当代生命科学领域的核心和前沿学科之一。现代遗传学的迅速发展对遗传学的理论和实验教学工作提出了更高的要求。实验教学不仅能拓宽学生的基础知识面,更重要的是培养学生的实践操作技能、分析问题和解决问题的能力以及科研创新意识。因此,遗传学实验是遗传学教学中非常重要的组成部分。我们结合多年来在实验教学中积累的经验和实验素材、科研成果以及近几年的教学改革实践,参考国内外的有关文献资料和部分遗传学实验教材,编写了《遗传学实验教程》一书。

本书集基础性实验、综合性实验和设计性实验为一体,兼顾实用性和可操作性。其内容包括果蝇遗传分析、微生物遗传分析、高等植物遗传分析、群体遗传学和生物进化分析四个部分,共二十四个实验。每个实验包括实验目的、实验原理、实验用品、实验操作程序、预期实验结果与分析、要点及注意事项、作业与思考题、参考文献等内容。附录部分收录了实验室常用培养基、果蝇培养基和粗糙链孢霉培养基的配制,实验室常用溶液、染色液和缓冲液的配制, χ^2 检验和部分模式生物资源网址等资料,以方便读者使用。本书在设计 and 编写过程中,以突出遗传学分析和解决遗传学问题为主线,实验内容中尽量避免与细胞生物学和分子生物学等实验课程的重复,既有针对经典遗传学基础实验方法的训练和基本规律的验证,也涉及了分子标记技术分析动、植物的遗传多样性领域,还涵盖了一部分设计性与创新性实验和综合性实验,同时引入了新的研究方法和技术,使学生在了解遗传学研究的不同层次水平的同时,培养学生科学思维的方法、探索精神以及创新意识,以适应新形势下创新型人才培养的要求。各学校可根据教学内容和实验条件选择可行的实验内容。

本书的编写与出版得到“国家基础学科人才培养基金”、“教育部特色专业综合改革试点项目(生态学)”、“兰州大学教材建设基金”的资助,以及兰州大学教务处、兰州大学生命科学学院的领导和兰州大学出版社的大力支持,在此表示感谢!本书编写过程中,王新宇教授和王崇英教授在百忙中给予了热情的关心与帮助,指导基本框架设计与实验内容编排,并审阅和修改书稿;武振华博士提供了部分图片,参与本书编写的老师们也付出了辛勤

的劳动和心血,在此一并致以深深的谢意!

本书内容新颖、图文并茂,适合作为综合性大学、农林院校、医学院校以及师范院校生物及相关专业师生的实验教学用书,也可供相关专业研究生、科研及实验技术人员参考。

由于编者的水平有限以及时间仓促,书中难免存在不妥和错误之处,我们真诚地希望读者不吝批评指正,以便再版时修订和改进。

编者

2014年3月

目 录

第一部分 果蝇遗传分析	1
实验一 果蝇的雌雄鉴别和原种培养	1
实验二 果蝇杂交及其遗传分析	7
I 果蝇的单因子遗传分析	7
II 果蝇的双因子遗传分析	11
III 果蝇的伴性遗传分析	15
IV 果蝇基因间的互作分析	18
V 基因的连锁与交换分析	22
VI 果蝇的三点测交和基因定位	27
VII 果蝇的多因子综合遗传分析	31
实验三 果蝇唾腺染色体制片与观察	38
实验四 果蝇同工酶的遗传分析	44
实验五 果蝇数量性状的遗传分析	49
实验六 果蝇的 RAPD 遗传分析	54
第二部分 微生物遗传分析	59
实验七 细菌的培养及生长曲线测定	59
实验八 大肠杆菌杂交及基因定位	63
实验九 大肠杆菌的遗传转化	68
实验十 紫外线对枯草芽孢杆菌的诱变效应	72
实验十一 λ 噬菌体感染及其效价测定	75
实验十二 λ 噬菌体 DNA 的分离与分析	80
实验十三 细菌的局限性转导	85
实验十四 细菌的普遍性转导	90
实验十五 粗糙链孢霉顺序四分子分析	96
第三部分 高等植物遗传分析	103
实验十六 蚕豆根尖细胞的微核检测	103
实验十七 发根农杆菌介导的植物遗传转化	108
I 植物转化受体材料的准备	108
II 发根农杆菌介导的基因转化	110
III 转化根的分子鉴定	115

IV 转化根的悬浮培养及其次生代谢产物的定量分析	120
实验十八 拟南芥突变体诱导及其基因功能分析	124
I 拟南芥培养及其遗传性状分析	124
II 拟南芥EMS和T-DNA插入诱变及其突变体筛选	128
III 拟南芥T-DNA插入突变体的遗传分析	133
IV 拟南芥外源基因表达产物的定位	140
实验十九 植物基因组SSR多态性分析	143
第四部分 群体遗传学和生物进化分析	147
实验二十 人类体细胞性染色体的检测	147
实验二十一 人类ABO血型和部分单基因性状的遗传分析	153
实验二十二 人类DNA指纹分析	162
实验二十三 哺乳动物线粒体进化分析	170
实验二十四 人类Y染色体单核苷酸多态性分析	175
附 录	180
附录一 果蝇培养基的配制	180
附录二 粗糙链孢霉培养基的配制	182
附录三 常用的植物组织培养基配方	184
附录四 微生物培养常用培养基的配制	189
附录五 常用抗生素的配制及使用浓度	194
附录六 实验室常用溶液的配制	195
附录七 实验室常用染色液的配制	200
附录八 实验室常用缓冲溶液的配制	203
附录九 χ^2 检验	211
附录十 部分模式生物资源网址	214

第一部分 果蝇遗传分析

实验一 果蝇的雌雄鉴别和原种培养

实验目的

1. 了解果蝇生活史各个发育阶段的形态特点。
2. 掌握果蝇雌雄成虫及常见突变性状的主要鉴别方法。
3. 学习实验果蝇的饲养管理、实验操作及培养基的配制等方法和技术。

实验原理

果蝇(fruit fly)是双翅目(Diptera)果蝇属(genus *Drosophila*)昆虫,全世界已记载的种类约有3 000多种,我国已发现800多种。大部分的物种以腐烂的水果或植物体为食,少部分则只取用真菌、树液或花粉为其食物。果蝇的遗传学研究广泛而深入,尤其在基因分离、连锁互换等方面十分突出,为遗传学的发展做出了突出贡献。直至今日,果蝇仍然是遗传学、细胞生物学、分子生物学以及发育生物学等研究中常用的模式动物之一。

通常用作遗传学实验材料的是黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)。用果蝇作为实验材料有许多优点:

- (1)饲养容易。以玉米粉等做饲料就可以生长、繁殖。
- (2)生长迅速。在常温下,十二天左右就可完成一个世代,每个受精的雌蝇可产卵400~500个,因此在短时间内就可获得大量的子代,便于遗传学分析。
- (3)染色体数少。只有4对。
- (4)唾腺染色体制作容易。横纹清晰,是细胞学观察的好材料。
- (5)突变性状多,而且多数是形态突变,便于观察。
- (6)基因组测序已于2000年完成。

1. 果蝇的生活史(图1-1)

果蝇为完全变态类昆虫,其生活史包括卵、幼虫、蛹、成虫四个连续的发育阶段:

(1)卵:成熟的雌蝇交尾后2天将卵产在培养基的表层。果蝇的卵为白色,长椭圆形,长约0.5 mm,在背面的前端伸出一对触丝,它能使卵附着在柔软的食物上,不至于深陷到食物中去。

(2)幼虫:幼虫从卵中孵化出来后,经过两次蜕皮发育成3龄幼虫,体长可达4~5 mm。

在解剖镜下观察可见一端稍尖为头部,并且有一黑点即口器;稍后有一对半透明的唾腺,每条唾腺前有一条唾腺管向前延伸,然后会合成一条导管通向消化道。神经节位于消化道前端的上方。

(3) 蛹: 幼虫生活 4~5 天左右即化蛹,化蛹前从培养基中爬出附在瓶壁上,渐次形成一个梭形的蛹。起初颜色淡黄、柔软,以后逐渐硬化,变为深褐色,这就显示即将羽化了。

(4) 成虫: 刚羽化出的果蝇,身体狭长,翅还没有展开,身体较白嫩,通过腹部体壁,可以看到黑色的消化系统。不久,蝇体变为粗短椭圆形,双翅展开,体色加深。果蝇羽化 10~12 小时后才开始交配,成体果蝇在 25℃ 条件下可存活 1 个月左右。

实际上,果蝇的生活史长短与温度有密切关系。一般来说,30℃ 以上温度能使果蝇不育或死亡,低温能使生活史延长,生活力下降,饲养果蝇的最适温度为 20~25℃。

2. 果蝇成体的外部形态

果蝇成体分为头、胸和腹 3 个部分。头部的前端钝而平突,有 1 对大的红色复眼、3 个单眼和 1 对触角,触角芒呈羽毛状。胸部有 3 对足、1 对翅膀和 1 对平衡棒。腹部背面为有色素带的背板,腹面有腹板。外生殖器位于腹部末端(图 1-2、图 1-3)。

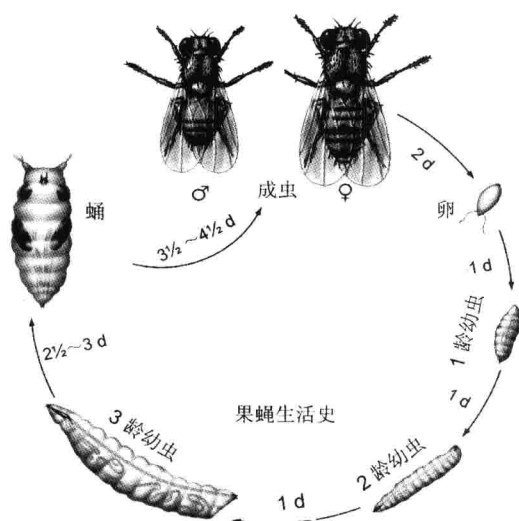
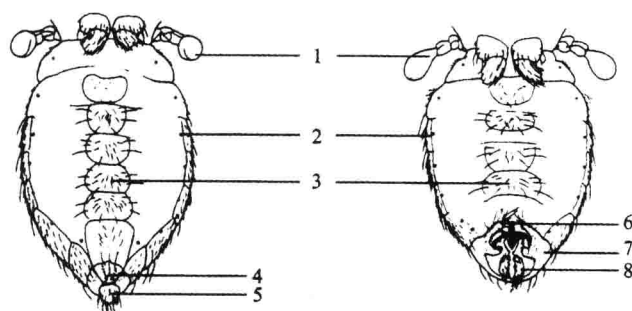


图 1-1 果蝇的生活史和各发育阶段的经过时间
(引自 Leland H. Hartwell et al, 2000)



图 1-2 雌雄果蝇背部观
(引自 Leland H. Hartwell et al, 2000)



1.平衡棒 2.腹部背板 3.腹部腹板 4.产卵器 5.肛下板
6.阴茎 7.生殖背板 8.肛尾叶

图 1-3 雌雄果蝇腹部观

(引自张文霞等,2007)

3. 果蝇的雌雄鉴别

能够准确而迅速地辨认果蝇性别,是果蝇杂交中挑选处女蝇的必要条件。果蝇的雌雄性别在幼虫期较难区别,但是到了成虫期区别相当容易。其特点如下:

(1)体型:雌果蝇体型较大,雄果蝇体型较小。

(2)腹部末端:雌性腹部椭圆,末端稍尖,雄性末端钝圆。

(3)腹部背面:雌性有明显的5条黑色环纹,雄性只有3条,前两条细,后一条宽,延至腹面,肉眼看其腹部末端呈现一明显黑斑。

(4)腹部腹面:雌性有较明显的6个腹片,雄性有4个腹片。

(5)性梳:雄性第一对足的跗节基部外侧有黑色鬃毛状性梳(Sex combs),雌性则无。性梳的有无,是鉴别果蝇雌雄性别的明显标志之一(图1-4)。

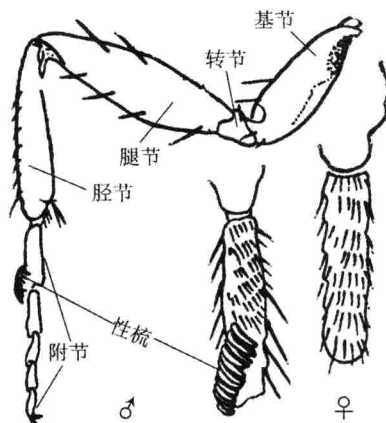


图 1-4 雄果蝇右前足第一跗节上的性梳

4. 果蝇常见突变性状

野生型果蝇为灰体、红眼、长翅、直刚毛。本实验中选用的果蝇突变性状一般都可肉眼鉴定,例如黑体、白眼、残翅等。而另一些性状可在解剖镜下鉴定,如焦刚毛等。果蝇一些常见的突变性状及其相关基因列表如下(表1-1)。

表 1-1 黑腹果蝇常见突变性状

影响部位	突变性状	基因符号	性状特征	染色体座位
体色	黑檀体(ebony)	e	体呈乌木色,黑亮	Ⅲ-70.7
	黑体(black)	b	体呈黑色,较黑檀体深	Ⅱ-48.5
	黄体(yellow)	y	体呈浅橙黄色	X-0.0
复眼	白眼(white)	w	复眼呈白色	X-1.5
	褐眼(brown)	bw	复眼呈褐色	Ⅱ-104.5
	猩红眼(scarlet)	st	复眼呈明亮猩红色	Ⅲ-44.0
	棒眼(bar)	B	复眼呈狭窄垂直棒状,小眼数少	X-57.0
翅型	残翅(vestigial)	vg	翅退化,部分残留,不能飞	Ⅱ-67.0
	小翅(miniature)	m	翅短小,长度不超过身体	X-36.1
	卷翅(curly)	Cy	翅向上卷曲,纯合致死	Ⅱ-6.1
	展翅(dichaete)	D	双翅向两侧展开,纯合致死	Ⅲ-40.7
刚毛	焦刚毛(singed)	sn	刚毛卷曲如烧焦状	X-21.0
	叉毛(forked)	f	毛和刚毛分叉且弯曲	X-56.7

注:焦刚毛的基因符号为 sn^3 ,本书简写为 sn。

实验用品

1. 材料

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)野生型及不同突变品系。

2. 试剂和培养基

(1)乙醚、乙醇、水、琼脂、蔗糖、玉米粉、酵母粉、丙酸。

(2)果蝇培养基(玉米粉培养基或玉米红糖培养基):配方和灭菌条件见附录一,具体配制方法见本实验操作程序 1。

3. 器具

恒温培养箱、双目解剖镜、高压灭菌锅、白瓷板、镊子、毛笔、解剖针、无菌麻醉瓶、无菌果蝇培养瓶(三角瓶和平底试管)、死蝇盛留器、海绵垫、脱脂棉、医用纱布、标签纸、牛皮纸、棉线绳、橡皮筋、酒精灯等。

实验操作程序

1. 果蝇培养基的配制

(1)果蝇是以酵母菌作为主要食料的,因此实验室内凡能发酵的基质,都可用作果蝇的饲料。常用的饲料有玉米饲料、米粉饲料、香蕉饲料等。配方见附录一。

制作方法(以本实验室一直使用的玉米红糖培养基的配制方法为例):

① 按配方称量各种成分。

- ② 取应加水量的一半,加入琼脂,煮沸,使充分溶解,加糖,煮沸溶解。
- ③ 取另一半水混合玉米粉,加热,调成糊状。
- ④ 将上述两者混合煮沸。以上操作过程中要持续搅拌,以免沉积物烧焦。
- ⑤ 待稍冷后加入酵母粉及丙酸,充分调匀,分装。

丙酸的作用是抑制霉菌污染,用量为6 mL/L。如无酵母粉,也可用酵母菌液代替,但用法不同。酵母菌液在饲料分装到培养瓶中后再加入,每瓶加数滴。

(2) 培养瓶

培养果蝇用的培养瓶可用三角瓶或大、中型平底试管,用海绵或纱布包的棉花球做瓶塞(因海绵塞防止水分蒸发的作用较棉花塞差,故推荐使用自制棉花塞)。实验室中保存原种常使用三角瓶,而杂交实验中以平底试管为宜。培养瓶用前要消毒,然后再装入饲料(每瓶2 cm厚即可),待饲料冷却后用牛皮纸包扎,室温下干燥1周后使用。

2. 果蝇遗传性状的观察

(1) 肉眼观察:先用肉眼观察瓶内不同发育阶段果蝇的形态。

(2) 果蝇麻醉:对果蝇进行检查时,常用乙醚麻醉,使果蝇处于昏迷状态。先将生长果蝇的培养瓶在海绵垫上轻轻磕,使果蝇全部震落在培养瓶底部,然后迅速打开培养瓶的棉塞,把果蝇倒入去盖的麻醉瓶(灭菌的平底试管)中,并立即塞上棉塞。然后将乙醚(2~3滴)滴到脱脂棉上,从麻醉瓶塞侧面塞入麻醉瓶中(注意不要让乙醚流进瓶内),麻醉瓶要保持干燥,否则会粘住果蝇翅膀,影响观察。待果蝇全部昏迷后,倒在白瓷板上观察。

果蝇的麻醉程度依实验要求而定,对仍需培养的果蝇,以轻度麻醉为宜。但对不再需要培养,只进行性状观察的果蝇可以深度麻醉,甚至致死(果蝇翅膀外展45°角,说明死亡)。检查完毕,把不需要的果蝇倒入盛有煤油或乙醇或水的死蝇盛留器中。

(3) 显微观察:将麻醉状态下的果蝇倒在白瓷板上,放到双目解剖镜下观察。

3. 原种培养

在做新的留种培养时,应事先检查一下果蝇有没有混杂,以防原种丢失。亲本的数目一般每瓶5~10对,移入新瓶时,须将培养瓶横卧,然后用毛笔将麻醉的果蝇从白瓷板上轻轻扫入,待果蝇苏醒后再把培养瓶竖起,以防果蝇粘在饲料上。原种每2~4周换一次培养基(依温度而定,10~15℃约4周换一次,20~25℃约2周换一次)。每一原种培养至少保留2套,培养瓶的标签上要写明突变名称、培养日期等。原种培养的温度可控制在10~15℃,培养时避免日光直射。

果蝇在适宜条件下会产生子代,在肉眼能看到幼虫时就可把亲本倒掉,再继续培养几天后,新的成蝇就羽化了。待成蝇有了足够保种的数量后,要调换培养瓶,将它们作为下一代的亲本,继续培养。

原种果蝇培养过程中常会遭遇饲料发霉。发霉的原因很多,如用具没有彻底灭菌、空气污染、亲本不及时倒掉等。严重的霉菌污染会影响果蝇的生长。饲料中加丙酸可以抑制霉菌生长,但并不能完全防止。发现培养瓶中有少量霉点时可用烧过的解剖针挑出。若大量霉菌污染,可把果蝇全部倒入一个无菌的空平底试管中,让它活动2~3小时,再换一支

试管,再活动1~2小时,而后倒入一支新的培养瓶中继续培养,这样可以防止霉菌扩散。

原种保存遇到的另一个问题是混杂。几个不同品系的果蝇在一起培养,一定要防止混杂。培养瓶的塞子要做得紧些,不使果蝇逃出。调换培养瓶时,要防止果蝇飞散。外逃的果蝇要杀死。发现了混杂的原种,要根据原种果蝇的全部特征,挑出数对雌雄蝇饲养,进行筛选,直到完全没有性状分离为止。这样做,费时费力,只是在不得已时才采用。一般混杂时,只要方便,可以重新引种,将混杂种弃去。

要点及注意事项

1. 配制培养基时,煮沸后应保持沸腾几分钟,否则,培养基容易稀松发霉。
2. 加入丙酸时注意屏住呼吸,防止酸遇热挥发,刺激呼吸道。
3. 转移果蝇时动作不可太猛,防止培养基滑落,导致果蝇死亡。
4. 麻醉时注意掌握深度,特别是杂交用果蝇,麻醉过度常导致异常发育。

作业与思考题

1. 通过观察果蝇的形态特征,你认为在鉴别雌雄果蝇时,应抓住哪些主要特征?
2. 本实验室现有以下五个黑腹果蝇品种,如果要求你用这些品种设计实验来验证遗传学三大定律以及伴性遗传规律,你如何设计实验?

- (1)野生型(+);
- (2)黑体(b,2号染色体);
- (3)白眼(w,X染色体);
- (4)残翅(vg,2号染色体);
- (5)三隐(白眼(w),小翅(m),焦刚毛(sn),X染色体)。

参考文献

1. 刘祖洞,江绍慧. 遗传学实验[M].2版. 北京:高等教育出版社,1987.
2. 王金发,戚康标,何炎明. 遗传学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2008.
3. 周洲,程罗根. 遗传学实验[M].北京:科学出版社,2013.
4. 朱睦元,王君晖. 现代遗传学实验[M].杭州:浙江大学出版社,2009.
5. 乔守怡. 遗传学分析实验教程[M].北京:高等教育出版社,2008.
6. 张文霞,戴灼华. 遗传学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2007.

(孙英莉)

实验二 果蝇杂交及其遗传分析

揭示基因在生物世代之间的传递方式和表达规律,并以此指导动、植物和微生物的育种实践是遗传学的核心任务之一。1865年,孟德尔(Mendel G.)在长达八年的豌豆(*Pisum sativum*)杂交试验的基础上,按杂交后代系谱记载、分析单位性状的传递规律,提出了“遗传因子假说”,并揭示了性状遗传的两个普遍规律——分离定律与自由组合定律。1900年,孟德尔规律的重新发现标志着遗传学学科的诞生。1903年,苏顿(Sutton W. S.)和波维利(Boveri T.)基于核内染色体的行为与基因(即孟德尔所说的“遗传因子”)的行为相互平行的现象,先后提出“遗传的染色体学说”(Chromosome theory of inheritance),认为染色体是遗传物质的载体,等位基因分别位于一对同源染色体的对应位置上。这一学说将孟德尔规律与细胞学取得的成就结合起来。1909年,摩尔根(Morgan, T. H.)等人用果蝇遗传试验证实并发展了遗传的染色体学说,同时提出了遗传学的第三定律——连锁遗传定律,揭示了位于一对同源染色体上的非等位基因在世代间传递时的相互关系,并在此基础上创立了基因论。迄今为止,三大遗传规律依然是生物细胞核基因及其控制性状遗传分析最基本和不可动摇的基础。它们同时揭示了生物产生遗传变异的一个重要来源——基因重组。

需要指出的是,虽然三大遗传基本规律是在相对性状差异明显,群体性状变异表现间断分布的质量性状遗传研究的基础上获得的,但从本质上说,控制连续变异数量性状的核基因在世代间传递依然遵循这些规律,只是由于数量性状表现的特殊性,需要借助更多的数理统计方法进行遗传分析。

通过本部分实验,我们将学习、掌握利用三大遗传规律对生物质量性状及其相互关系进行遗传分析,揭示不同性状遗传行为的基本原理和方法。通常经典遗传学在对某一单位性状进行遗传分析时,首先需要确定该性状是受一对基因控制的还是受多对基因控制的,然后确定每一对基因与其他已知基因间的相互关系;对于受多对主效基因控制的质量性状,可能还需要分析各对基因共同作用时表现的互作关系类型;为了进一步确定基因在染色体上的具体位置(基因定位, gene mapping),往往还需要选择一些位置已知并与所研究基因间连锁较紧密的基因作为参照点来进行连锁分析,绘制连锁遗传图谱。

I 果蝇的单因子遗传分析

实验目的

1. 掌握果蝇的杂交技术。
2. 记录杂交结果和掌握统计分析方法。

3. 验证并加深理解分离定律。

实验原理

分离定律又称为孟德尔第一定律。控制相对性状的一对等位基因在杂合子中各自保持其独立性,在配子形成时,彼此分开,随机地进入不同的配子中。在正常情况下, F_1 杂合子的配子分离比为1:1, F_2 代的基因型分离比是1:2:1。如果相对性状间呈完全显性关系,则具有一对相对性状差异的两纯合亲本杂交, F_1 杂合子表现显性性状,其测交子代(即 F_1 杂合子与隐性纯合亲本回交的子代)和自交子代(F_2)都只有显性和隐性两种表型,前者比例为1:1,后者比例为3:1。如果相对性状间呈不完全显性或并显性,则 F_1 表现两亲本的中间性状,其测交和自交子代表型分离比就等同于基因型分离比。因此可以根据杂交的配子类型及比例、 F_1 、 F_2 以及测交子代群体表型类型与比例等对相对性状进行遗传分析。

野生型果蝇为红眼、灰体、长翅、直刚毛,与这些性状对应的突变性状很多,其中长翅(+)与残翅(vg)是一对相对性状,且长翅对残翅为完全显性,控制这对相对性状的基因位于第二号染色体(II 67.0)上。用具有这对相对性状的两纯合亲本进行杂交,性状的遗传行为应符合分离定律(表2-I-1)。

表 2-I-1 果蝇的单因子遗传分析(长翅-残翅)

世代	正交			反交		
P	♀长翅 × 残翅♂ (+//+) ↓ (vg//vg)			♀残翅 × 长翅♂ (vg//vg) ↓ (+//+)		
F_1	♀长翅 × 长翅♂ (+//vg) ↓ (+//vg)			♀长翅 × 长翅♂ (+//vg) ↓ (+//vg)		
F_2	3长翅 +//+	1残翅 +//vg	1残翅 vg//vg	3长翅 +//+	1残翅 +//vg	1残翅 vg//vg
	1	2	1	1	2	1

实验用品

1. 材料

黑腹果蝇(*D. melanogaster*)的长翅品系(+//+)和残翅品系(vg//vg)。

2. 试剂和培养基

(1)乙醚、乙醇、玉米粉、酵母粉、琼脂、蔗糖、红糖、丙酸、蒸馏水。

(2)果蝇培养基(玉米粉培养基或玉米红糖培养基):配制和灭菌方法见附录一。

3. 器具

恒温培养箱、双目解剖镜、高压灭菌锅、电子天平、白瓷板、镊子、毛笔、解剖针、无菌麻醉瓶、无菌果蝇培养瓶(三角瓶和平底试管)、死蝇盛留器、海绵垫、脱脂棉、医用纱布、标签纸、牛皮纸、棉线绳、橡皮筋、酒精灯等。

实验操作程序

1. 原种果蝇培养

于杂交实验开始前2周,20℃条件下分别培养长翅和残翅果蝇品系。待每个培养瓶幼虫化蛹之后,移去培养瓶中的成蝇,准备从羽化不超过12h的果蝇中挑选杂交亲本。

2. 挑选杂交亲本果蝇

选长翅和残翅果蝇为亲本,做正交和反交组合。由于雌蝇生殖器官中有贮精囊,一次交配可保留大量精子供多次排卵受精用,因此做杂交实验前必须收集未交配过的处女蝇。刚羽化的雌蝇在12h内一般无交配能力,因此在杂交实验开始前放出亲本培养瓶中的所有成蝇,然后每隔10~12h收集一次刚羽化出的成蝇,并将雌雄蝇分开饲养。收集处女蝇数量的多少根据需要而定,通常不少于5只。

3. 麻醉接种

用长翅果蝇与残翅果蝇杂交,正反交同时进行,即长翅♀×残翅♂,残翅♀×长翅♂。将所选处女蝇按品系分别麻醉,按不同杂交组合分别选取雌、雄蝇各6~10只移入杂交瓶中,为了防止昏迷果蝇被培养基粘住,可将培养瓶放倒,将果蝇置于瓶壁,待其完全苏醒后再将培养瓶直立,贴上标签。标明杂交亲本、杂交日期、实验人姓名。将杂交瓶放在25℃恒温箱内培养。

正交

♀长翅(+//+) × 残翅♂(vg//vg)

日期:

姓名:

反交

♀残翅(vg//vg) × 长翅♂(+//+)

日期:

姓名:

4. 去亲本

杂交培养7d后,亲本果蝇都已杂交产卵。在杂种幼虫化蛹羽化前,将亲本移出弃去,目的是防止亲本与F₁代成蝇发生回交(移去的果蝇最好处死)。

5. 观察杂种F₁代

继续培养7d,F₁代果蝇羽化为成虫后,经麻醉在白瓷板上用解剖镜观察和统计正反交F₁代个体的性状,判断F₁代个体的性状是否和预期结果一致。

6. 培养杂交F₂代

分别收集正反交F₁代果蝇6~10对放入一新培养瓶,在25℃恒温培养箱内继续培养7d后,移去F₁代果蝇。再培养7d,F₂代成蝇出现,观察并统计F₂代的性状表现类型及数目,并将观察结果填入表2-I-2。

7. 统计检验

用 χ^2 检验法对实验结果进行统计检验,验证分离定律。

表 2-I-2 正反交 F_1 代和 F_2 代果蝇翅型观察记录表

杂交组合	世代	表型及数目		
		长翅	残翅	总数
正交 ♀长翅 × 残翅 ♂	F_1			
	F_2			
反交 ♀残翅 × 长翅 ♂	F_1			
	F_2			

预期实验结果与分析

1. 观察和统计正反交 F_1 代果蝇的表型和个体数, 并将正反交的结果加以比较, 分析单因子杂交实验基因间的显隐性关系。

2. 观察和统计正反交 F_2 代果蝇的表型和个体数, 计算不同表型之间的比例, 根据实验观察和统计结果作 χ^2 检验(表 2-I-3)。

表 2-I-3 实验结果 χ^2 检验表

参 数	正 交			反 交		
	长翅	残翅	合计	长翅	残翅	合计
实际观察数(O)						
预期数 3:1(E)						
偏差($O-E$)						
$(O-E)^2/E$						
自由度(df) = $n-1$ $\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$						

在遗传实验中, 实际观察值一般不会跟理论预期值完全一致。那么, 实验观察值与理论预期值之间的偏差, 到底是由随机误差造成的还是由非偶然因素造成的? 这就需要运用生物统计学的方法加以检验。常用的一种检验方法称为 χ^2 检验(Chi-square test), 也称为适合度(goodness of fit)检验。其计算公式为:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$$

上式中 O 为实际观察数, E 为理论预期数, Σ 为各项总和。 χ^2 的自由度 df (即分离类型组数 n 减去 1) = $n-1$ 。根据自由度, 可从 χ^2 分布表查出 χ^2 的概率范围。一般要求 χ^2 的概率 $P > 0.05$ 时, 才可认为实验观察值与理论预期值相符, 即它们之间的偏差属于随机误差。

查 χ^2 表 ($df=2-1=1$), 若 $P > 0.05$, 表明实验观察数与预期数之间无显著性差异, 说明两者之间的偏差是没有意义的, 也就是说实验观察数符合理论假设; 若 $P < 0.05$, 说明实验观察数与预期数差异显著, 不符合理论假设。