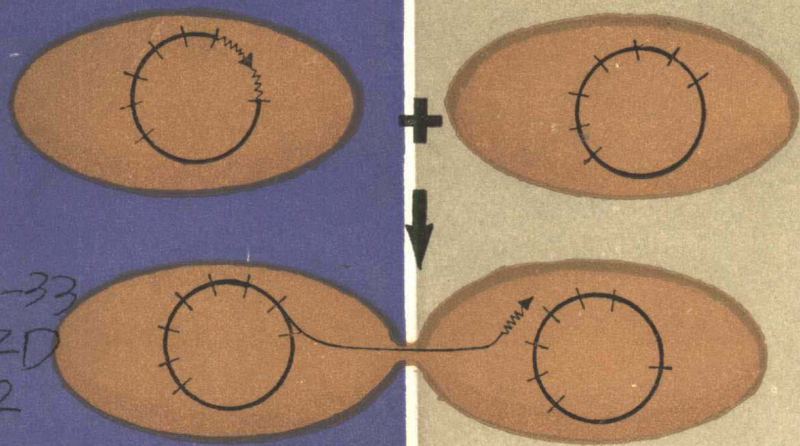


● 高等学校教材

遗传学实验

● (第二版) 刘祖洞 江绍慧 编

● YICHUANXUE SHIYAN



高等教育出版社

Q3-33
LZD
=2

高等学校教材

遗传学实验

(第二版)

刘祖洞 江绍慧 编

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是在1979年出版的《遗传学实验》基础上,根据学科和实验技术的发展,以及教学中出现的问题重新编写的。修订本增添了许多新的实验内容,共收集了36个实验,许多属于是分子水平的,实验技术都比较先进。鉴于各校的实验课时和实验设备材料不同,各校可根据具体情况酌情选择。

责任编辑 杨松涛

高等学校教材

遗 传 学 实 验

(第二版)

刘祖洞·江绍慧 编

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷一厂印刷

*

开本850×1168 1/32 印张8.75 字数208 000

1979年10月第1版

1987年11月第2版 1991年7月第6次印刷

印数36 013—40 724

ISBN 7-04-000073-3/Q·5

定价2.80元

再 版 前 言

《遗传学实验》自 1979 年出版以来,已经过五年了。在这五年中,各高等院校已先后开设了遗传学实验课。由于遗传学科的迅速发展和技术的进步,原书已不能满足教学需要。为此,我们重新编写了这本遗传学实验教材,作为第二版供教学使用。

在这次改编中,不仅增加了一些新的实验,而且还在我们自己工作的基础上,对原有的实验内容做了较大的修改和补充。各位老师 and 同学在使用本教材的过程中,如发现有不妥和不足之处,或应修改和补充的地方,欢迎大家提出宝贵意见。

刘祖洞 江绍慧

上海复旦大学生物工程系

一九八五年一月

前 言

根据 1977 年 10 月成都综合性大学生物学教材会议的决定，我们在编写“遗传学”教材的同时，又编写了这本“遗传学实验”。目的是为了使学生们更好地掌握遗传学基本理论和有关的研究技术，因而在内容上尽可能配合遗传学的教学。

实验内容包括两个方面：一是验证遗传学的基本规律，例如果蝇的单因子遗传和伴性遗传，链孢霉的分离和交换，细菌的转导，细菌和酵母菌的营养缺陷型(生化突变)的筛选等。二是与遗传学有关的实验技术，这又可分两类：一类是沿用已久，但目前仍有广泛用处的，如石蜡切片法、压片法、植物的杂交、植物多倍体的诱发等；另一类内容较新，是近一、二十年内发展起来的，但在研究工作上很有用处，如外周血的培养、二倍体细胞培养、植物单倍体培养、鼠伤寒菌微粒体系统的诱变检测法、姊妹染色单体的色差方法等。希望学生们做了这些实验后，既能巩固所学的遗传学知识，又能掌握遗传学研究中的一些实验技术。

本实验指导包括各类实验 21 个，数目较多，而实验时间有限，不可能都做，所以可以根据具体情况，酌情选择。此外还有附录三个，供教师准备实验时参考。至于一些分子水平上的实验技术，限于时间而未收集，有待以后补充。

在编写过程中，承王文华、顾惠娟、吕群、邱信芳、陈佩芬、赵寿元、乔守怡、金建中等同志的大力支持，提供实验方法，编写部分实验，除在有关实验后注明外，在此谨表谢意。

刘祖洞 江绍慧

1979.3

目 录

再版前言

前言

实验一	减数分裂	1
实验二	果蝇唾腺染色体	9
实验三	果蝇的单因子实验	14
实验四	果蝇的伴性遗传	19
实验五	果蝇的二对因子的自由组合	25
实验六	基因的连锁与交换	30
实验七	果蝇的三点试验	35
实验八	果蝇同工酶的遗传学分析	42
实验九	数量性状实验	56
(附录一)	果蝇的饲养	63
实验十	粗糙链孢霉的杂交	67
实验十一	酵母菌的杂交	79
实验十二	大肠杆菌的杂交	86
实验十三	大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选	94
实验十四	啤酒酵母菌营养缺陷型菌株的筛选	103
实验十五	细菌转导(局限性转导)	110
实验十六	大肠杆菌的重组子遗传分析	118
实验十七	质粒 DNA 的扩增与提取	127
实验十八	大肠杆菌转化实验	136
实验十九	化学诱变物的细菌检测试验(Ames 法)	142
实验二十	人的外周血淋巴细胞培养	150

实验二十一	姊妹染色单体色差方法	158
实验二十二	活体骨髓细胞姊妹染色单体色差方法	164
实验二十三	活体精原细胞姊妹染色单体色差方法	171
实验二十四	二倍体细胞株培养	176
实验二十五	单细胞克隆的分离	181
实验二十六	染色体分化染色技术	184
实验二十七	体细胞融合及选择、鉴定技术	196
(附录二)	206
实验二十八	植物染色体压片法	208
实验二十九	植物染色体组型分析	213
实验三十	植物染色体分带技术	219
实验三十一	植物单倍体的诱发	228
实验三十二	人工诱发多倍体植物	237
实验三十三	植物有性杂交技术	242
实验三十四	植物细胞的脱分化和分化培养	256
实验三十五	诱变物质的微核测试	261
实验三十六	植物同工酶技术	267

实验一 减数分裂

一、实验原理

减数分裂是一种特殊方式的细胞分裂，仅在配子形成过程中发生。这一过程的特点是：连续进行两次核分裂，而染色体只复制一次，结果形成四个核，每个核只含单倍数的染色体，即染色体数减少一半，所以称作减数分裂。另外一个特点是前期特别长，而且变化复杂，包括同源染色体的配对、交换与分离等。

二、实验目的

1. 了解动、植物的生殖细胞的形成过程。
2. 掌握制片方法。

三、实验材料

蚕豆(*Vicia faba*)花蕾

短角斑腿蝗(*Catantops brachycerus*)精巢

四、实验器具和药品

1. 用具：镊子，解剖针，载玻片，盖玻片，大培养皿，立式染缸，酒精灯，量筒，吸水纸，显微镜。

2. 药品：无水乙醇，冰醋酸，洋红(carmine)，甘油，松香石蜡。

Carnoy 固定液：无水乙醇 3 份，冰醋酸 1 份。

醋酸洋红：45% 醋酸 100 毫升，加洋红 1 克，煮沸(沸腾时间

不超过 30 秒)，冷却后过滤即成。也可以再加 1—2% 铁明矾水溶液 5—10 滴，色更暗红。

封蜡：用等量的松香(balsam)和 52°C 石蜡加热混合而成，所以又称松香石蜡。

五、实验说明

在植物花粉形成过程中，花药内的一些细胞分化成小孢子母细胞 ($2n$)，每个小孢子母细胞进行二次连续的细胞分裂(第一次减数分裂和第二次减数分裂)。每一小孢子母细胞产生四个子细胞，每个子细胞就是一个小孢子。小孢子内的染色体数目是体细胞的一半(图 1-1)。

在动物的有性生殖过程中，也有一个由双倍体到单倍体的减数过程。动物的精巢分化出精母细胞，精母细胞减数分裂，形成单倍染色体的精子(图 1-1)。

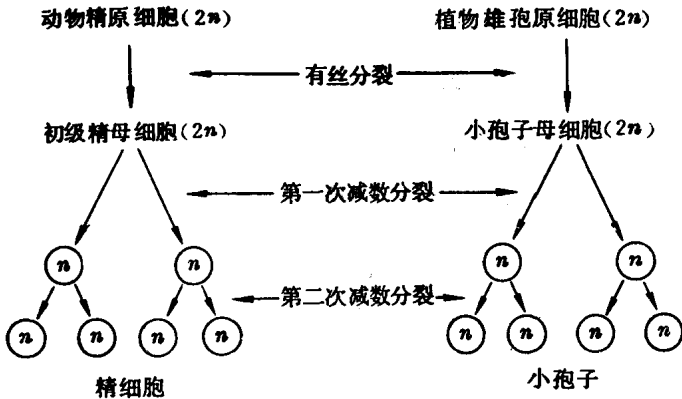


图 1-1 动植物雄性细胞各时期的对照

在适当的时机采集植物的花蕾或动物的精巢，经固定、染色压片后，就可以在显微镜下观察到细胞的减数分裂。整个减数

分裂可分为下列各个时期。下面图 1-2 至图 1-9 是以雄性雏蝗 (*Chorthippus brunneus*) 的减数分裂各个时期的照片。

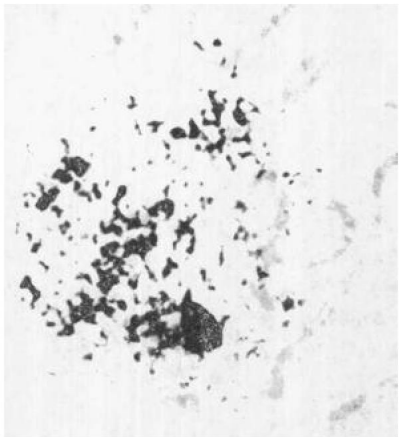


图 1-2 前期 I 细线期

第一次减数分裂

前期 I 细线期(见图 1-2): 第一次分裂开始, 染色质浓缩为几条细而长的细线。每一染色体已复制为二个单体, 但在显微镜下还看不出染色体的双重性。

偶线期(见图 1-3): 染色体形态与细线期没有多大变化, 同源染色体开始配对。

粗线期(见图 1-4): 同源染色体配对完毕, 这种配对的染色体叫双价体, 每个双价体含有四个染色单体; 但仅有两个着丝粒。染色体继续短粗。

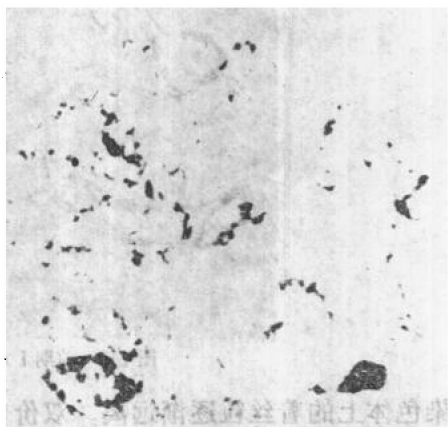


图 1-3 前期 I 偶线期

双线期(见图 1-5): 配对的同源染色体开始分开。由于染色单体间起过交换, 同源染色体有交叉现象。染色体螺旋化程度加深。

浓缩期: 又叫终变期, 交叉向染色体端部移动, 交叉数减少, 染色体变得更短粗。浓缩期末核膜消失。

中期 I 各个双价体排列在赤道上, 纺锤体形成, 两个同源



图 1-4 前期 I 粗线期



图 1-5 前期 I 双线期

染色体上的着丝粒逐渐远离。双价体开始分离。染色体数仍为 $2n$ ，但每一染色体含有两个染色单体(见图 1-6)。

后期 I 两条同源染色体分开，分别移向两极。每一染色体有一着丝粒，带着两个染色单体。每一极得到 n 条染色体。染色体数已减半(见图 1-7)。

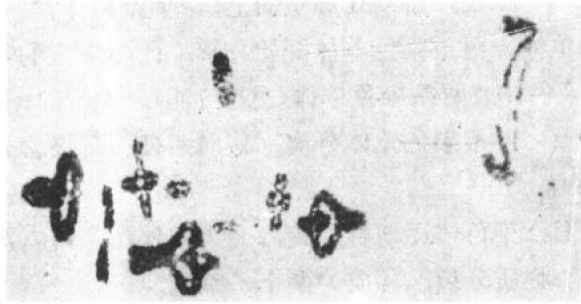


图 1-6 中期 I



图 1-7 后期 I

末期 I 染色体解旋，又呈丝状，核膜形成，胞质分裂，成为二个子细胞。

间期 在第二次分裂开始以前，两个子细胞进入间期。但有的植物如延龄草 (*Trillium*) 和大多数动物不经过末期和间期，直接进入第二次减数分裂的晚前期。

第二次减数分裂

前期 II 染色体缩短变粗，染色体开始清晰起来。每个染色体含有一个着丝粒和纵向排列的两条染色单体。前期快结束，染

染色体更短粗，核膜消失。

中期 II 染色体排列在赤道面上，每个染色体含一个着丝粒、两条染色单体。两条染色单体开始分离。此时细胞的染色体数为 n ，每一染色体有两条染色单体(见图 1-8)。

后期 II 两条染色单体分离，移向两极，每极含 n 条染色体(见图 1-9)。

末期 II 染色体逐渐解螺旋，变为细丝状，核膜重建，核仁重新形成。胞质分裂，各成为两个子细胞。

减数分裂结束，一个细胞经减数分裂形成四个子细胞，每个子细胞中只有 n 个染色体。因为细胞分裂两次，染色体只复制一次。



图 1-8 中期 II



图 1-9 后期 II

六、实验步骤

(一) 蚕豆花的观察

1. 采集刚现蕾的花序置于固定液内固定三小时后，换入70%的乙醇中。若需保存较久，可放在70%乙醇一份、甘油一份的溶液中。

2. 取已固定好的花序，按其花蕾大小，排列在小培养皿中。

3. 剥开花蕾（先取中等大小的花蕾）取出花药，放在载玻片上。

4. 加一滴醋酸洋红在花药上。

5. 加上盖玻片，上面再放吸水纸，用拇指适当加压，把周围的染色液吸干。

6. 用封蜡封片，作成临时标本。

7. 显微镜下观察。

(二) 蝗虫精巢的观察

1. 随蝗虫物种的不同，采集时间有变化。上海地区一般在四月至十月都可采到蝗虫。

2. 采集方法可用手捉或用扫网捕捉。如短角斑腿蝗喜温暖，可在十月左右，在晴天阳光下的草地上用扫网捕捉。

3. 用镊子夹住雄虫尾部，向外拉。可见到一团黄色组织块，这就是蝗虫的精巢。剔除精巢上的其它组织，将其放到Carnoy固定液中固定1.5—2小时，再放入70%酒精溶液中。

4. 将醋酸洋红滴在染色板内，取固定好的精巢放入染液中染色十五分钟以上。

5. 用解剖针从精巢上挑取几条丝状物（精细管）放在载玻片上，加一滴染液，压片。

6. 用封蜡封片，作成临时标本。

7. 显微镜下观察。

(三) 制做永久片

上述压片所得到的片子,只能做临时观察,要长期保存时,可做永久片。步骤如下:

1. 用玻棒沾一点甘油蛋白(甘油1份+新鲜鸡蛋白1份)在载玻片上,用手指涂匀。将载玻片在酒精灯上烘一下(1—3秒)。

2. 挑取一条已染色的精细管,加一滴染液在载玻片上,加盖玻片,压片。

3. 压片后在酒精灯上烘一下,很快掠过,约5—6次。

4. 用封蜡封片。

5. 在显微镜下观察。

6. 如有分裂相多、染色良好的片子也可制作永久标本,方法如下:

皿内置一短玻棒,倒入约2/3的固定液。将选好的片子剔除封蜡,翻过来(有材料的面向下),一端搭在玻棒上,在固定液中浸泡。待盖玻片自然脱落后,与载玻片一起轻轻移入以下各缸:

95% 乙醇 $\xrightarrow{1\text{分钟}}$ 无水乙醇 $\xrightarrow{1\text{分钟}}$ 无水乙醇 $\xrightarrow{1\text{分钟}}$
加 Eupral 一滴,封片。贴上标签。

七、实验结果

绘制观察到的染色体图,同时也可拍摄显微照片。

参 考 文 献

刘祖洞、江绍慧,1979年,《遗传学》,人民教育出版社,北京。

(乔守怡)

实验二 果蝇唾腺染色体

一、实验原理

双翅类昆虫(摇蚊、果蝇等)幼虫期的唾腺细胞很大,其中的染色体称为唾腺染色体(salivary chromosome)。这种染色体比普通染色体大得多,宽约 $5\mu\text{m}$,长约 $400\mu\text{m}$,相当于普通染色体的100—150倍,因而又称为巨大染色体。唾腺染色体经过多次复制而并不分开,大约有1000—4000根染色体丝的拷贝,所以又称多线染色体(polytene chromosome)。多线染色体经染色后,出现深浅不同、密疏各别的横纹,这些横纹的数目和位置往往是恒定的,代表着果蝇等昆虫的种的特征。如染色体有缺失、重复、倒位、易位等,很容易在唾腺染色体上识别出来。

二、实验目的

1. 练习取出果蝇等幼虫唾腺的技术和制作唾腺染色体标本的方法。

2. 观察多线染色体的特征: *a.* 巨大; *b.* 体细胞配对,所以染色体只有半数(n); *c.* 各染色体的异染色质多的着丝粒部分互相靠拢形成染色中心(chromocenter); *d.* 横纹有深浅、疏密的不同,各自对应排列,这意味着基因的排列。

3. 把观察到的好图像画下来。

三、实验材料

黑腹果蝇的三龄幼虫。这种材料既易饲养,又易取得唾腺,但

为了得到更好的染色体标本,需要在 20—25°C 和营养良好的条件下饲养幼虫。选择行动迟缓、肥大,爬上管壁的三龄幼虫(就要化蛹了)做标本最佳。

四、实验器具和药品

1. 用具: 双筒解剖镜,显微镜,镊子,解剖针,载玻片,盖玻片,滤纸,绘图纸,煤气灯。

2. 药品: 1% 的醋酸洋红: 称 1 克洋红,溶解于浓度为 45% 的 100 毫升醋酸溶液中煮沸,冷却后过滤使用。

Ephrussi-Beacple 生理盐水: 称取 NaCl 7.5 克、KCl 0.35 克、CaCl₂ 0.21 克溶解于 1000 毫升蒸馏水中(注意: 要等先加入的药品充分溶解后再加下一种药品。尤其是 CaCl₂, 如在其他药品没有充分溶解时加入, 要产生沉淀!)。

松香石蜡(balsam paraffin): 用等量的松香和 52°C 石蜡, 放在蒸发皿内用小火煮(大火要烧起来!), 待两者充分混和成浓的米黄色, 取下来冷却凝固。使用时, 用烧热铁丝的前端沾有少量的溶解物, 封在载玻片周围。

五、实验步骤

1. 把载玻片置于双筒镜下。载玻片上滴加生理盐水一滴, 取三龄幼虫放在其中, 操作者两手各握一枚解剖针, 左手的解剖针压住幼虫后端 1/3 处, 固定幼虫。右手的解剖针按住幼虫头部, 用力向右拉, 把头部从身体拉开, 唾腺随之而出, 唾腺是一对透明的棒状腺体(图 2-1)。

2. 在载玻片上除去幼虫其他组织部分, 还要把唾腺周围的白色脂肪剥离干净, 再把唾腺移到干净的、预先准备的滴有醋酸洋红的载玻片上。