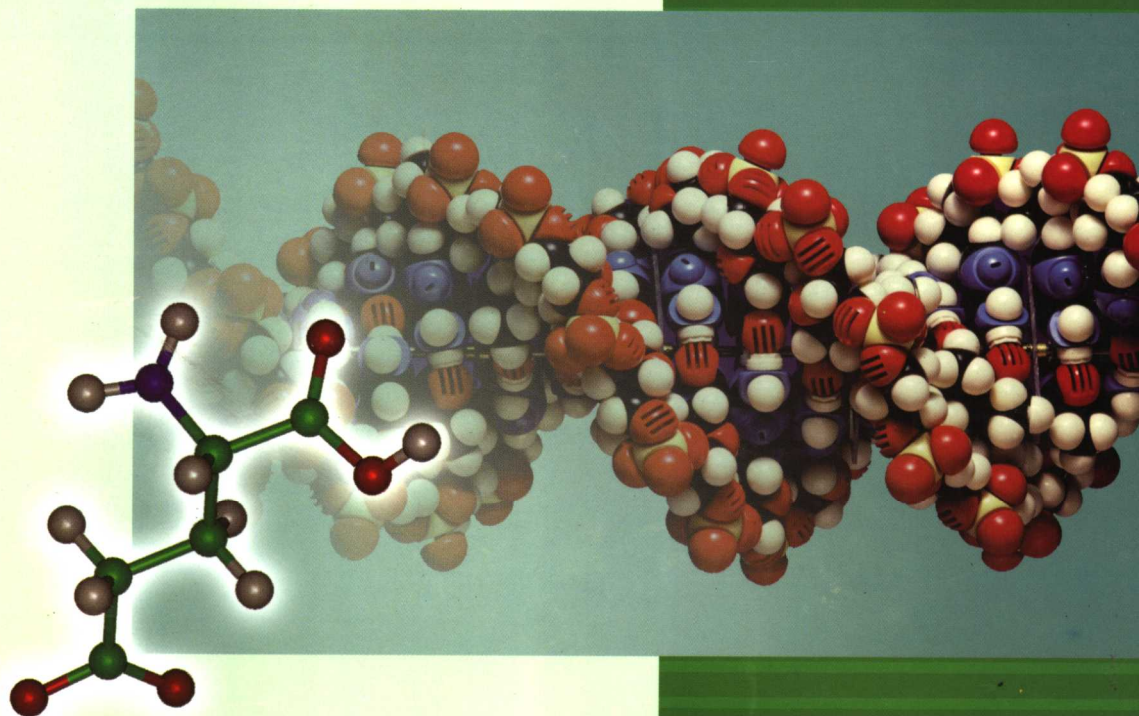




遗传学实验原理与技术

YICHUANXUESHIYANYUANLIYUJISHU

主编 刘桂丰



东北林业大学出版社

遗传学实验原理与技术

主编 刘桂丰

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

遗传学实验原理与技术/刘桂丰主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004.1

ISBN 7-81076-528-0

I. 遗... II. 刘... III. 遗传学—实验—高等学校—教材 IV. Q3-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 006137 号

责任编辑: 孙立夫

封面设计: 彭 宇



NEFUP

遗传学实验原理与技术

Yichuanxue Shiyān Yuanlǐ Yú Jìshù

主编 刘桂丰

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 8 字数 184 千字

2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-528-0

Q·101 定价: 13.00 元

《遗传学实验原理与技术》编委会

主 编	刘桂丰			
委 员	冯 欣	宋晓双	李同华	那冬晨
	侯英杰	姜 莹	姜 静	赵 鑫
	常万霞	程贵兰	詹立平	蔡智军

前 言

进入 21 世纪的初期, 生命科学已经向世人展现出更加无穷的魅力。克隆技术、生物芯片、蛋白质分子结构、人类基因组计划、生物制药等, 生命科学开始越来越多地进入人们的生活之中。20 世纪 50 年代, 随着 DNA 双螺旋结构的发现、分子生物学的诞生, 从本质上将生命活动的各个层次有机地结合起来, 使传统生物学的面貌焕然一新。展望新世纪, 将是多学科相互交叉、相互渗透、高度综合、整体化与系统化发展的重要时代。生命科学是探索生命本质的科学, 在多学科发展的过程中将成为科学研究的重要核心。

遗传学是生命科学各个分支学科中较为重要的基础学科, 它是研究生物遗传和变异的科学, 它的研究对象是植物、动物、微生物和人类。遗传学是实践性很强的科学, 很多遗传和变异现象及规律是从生产实践中总结发现的, 因此, 遗传学又被用来指导生产实践。

《遗传学实验原理与技术》是配合遗传学理论教学而设置的一门实验课程, 通过实验课的教学, 力求使同学们能够对遗传学的基本理论和概念有更加深刻的认识, 激发同学们对探索遗传的本质、遗传学的基本规律的浓厚兴趣。更为重要的是, 在实验过程中培养同学们观察问题、分析问题和解决问题的能力, 锻炼同学们实际操作能力。

本教材是我们在多年的教学过程中对原有的遗传学实验讲义进行修改、补充、完善而编写的。

本教材主要的特点是:

1. 实验原理讲解清楚, 实验操作步骤叙述详细, 特别是对实验中应该注意的地方及学生在实验过程中易出现的问题给予提示。
2. 引用了广而新的参考文献, 较准确地反映了最新发展动态。

本书适用于生物科学、林学、农学、园林、森保等有关专业本科和专科大学生遗传学实验课用。

由于时间仓促和我们经验不足, 理论水平有限, 某些实验的安排、设计和编写可能有不妥, 甚至错误之处, 敬请读者加以批评指正。

编著者

2004 年 1 月于哈尔滨

目 录

实验 1 植物有丝分裂的观察	(1)
实验 2 植物减数分裂的观察	(9)
实验 3 植物多倍体诱导及细胞学观察	(15)
实验 4 人类巴氏小体的观察	(20)
实验 5 植物总 DNA 的提取	(24)
实验 6 大肠杆菌质粒 DNA 的提取	(29)
实验 7 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(39)
实验 8 DNA 的酶切技术	(43)
实验 9 基因的重组连接技术	(49)
实验 10 聚合酶链式反应	(52)
实验 11 大肠杆菌感受态细胞制备及转化	(55)
实验 12 杨树花药培养及单倍体植株的诱导	(59)
实验 13 小黑杨花粉植株的遗传转化	(67)
实验 14 转基因杨树的 PCR 及 Southern 检测	(73)
实验 15 植物有性杂交技术	(79)
实验 16 果蝇的生活史与饲养	(84)
实验 17 果蝇唾液染色体的制备与观察	(90)
实验 18 果蝇的单因子实验	(94)
实验 19 果蝇的两对因子的自由组合	(98)
实验 20 果蝇的伴性遗传	(101)
附录	(107)

实验 1 植物有丝分裂的观察

1. 概述

具有自我复制能力是生命的一个基本特征。单细胞生物可以通过细胞分裂直接复制自身,而多细胞生物从受精卵开始,经过有丝分裂使细胞不断增殖并经过一系列复杂的变化过程形成新一代个体。从细胞分裂中染色体的行为推断出基因位于染色体上,使人们对于遗传因子(Genetic factor)的认识提高到一个新的水平。

一般来说,只要是能够进行细胞分裂的植物组织或单细胞都可以作为观察染色体的材料,如植物的顶端分生组织(根尖和茎尖)、居间分生组织(禾本科植物的幼茎及叶壳)、愈伤组织和胚乳、萌发的花粉管等,这些组织不断进行着细胞分裂。只要我们适时地取材,并加以固定、离析、染色等处理后制成染色体玻片标本,即可利用显微镜对有丝分裂过程和染色体进行观察。这是细胞遗传学中最基本和常用的方法,植物染色体观察在物种亲缘关系鉴定、染色体变异和杂种分析等工作中有着广泛的用途。

2. 实验目的

学习植物组织及细胞的固定、离析和压片方法,借以观察植物有丝分裂的过程和染色体的动态变化。

3. 实验材料、主要仪器及试剂

(1)材料

大蒜根尖或洋葱根尖。

(2)主要仪器

显微镜、刀片、载玻片、盖玻片、皮头吸管、小滴瓶(30 ml 棕色)、烧杯(50 ~ 100 ml)、纱布、滤纸、绘图纸、铅笔、镊子。

(3)主要试剂

①固定液

I. 卡诺固定液

配方 A: 95% 酒精 15 ml + 冰醋酸 5 ml (3:1)。

配方 B: 纯酒精 30 ml + 氯仿 15 ml + 冰醋酸 5 ml (6:3:1)。

配方 A 应用最为广泛, 配方 B 常应用于某些含油脂类物质较多的材料以及某些需

要更加硬化的组织的固定。

II. 纳瓦申固定液

配方 A: 甲液: 铬酸 1.5 g + 冰醋酸 10 ml + 蒸馏水 90 ml。

乙液: 福尔马林 40 ml + 蒸馏水 60 ml。

配方 B: 甲液: 1% 铬酸水溶液 30 ml + 10% 醋酸 20 ml。

乙液: 福尔马林 10 ml + 蒸馏水 40 ml。

临用前, 取等量的甲、乙液混合。在植物研究应用方面, 尤其对一般细胞学及组织学是一种优良的固定液。

III. FAA 固定保存液

配方: 50% 酒精 89 ml + 福尔马林 5 ml + 冰醋酸 6 ml。

用于一般植物组织及胚胎学材料, 同时也是优良保存剂。用以保存材料时, 可加入 5% 甘油以防止蒸发及材料变硬。

② 染色液

I. 醋酸洋红染色固定液

取 90 ml 冰醋酸加入 110 ml 蒸馏水中, 配成 200 ml 45% 冰醋酸溶液, 加热至沸, 溶入洋红 (Carmin) 粉末 1 g, 轻微搅动, 加回流继续煮沸 0.5 ~ 1 h, 放冷过滤后保存在有玻璃塞的棕色试剂瓶中, 存放在避光冷凉处, 用前分装到小滴瓶中。

醋酸地衣红的配制方法同上, 将洋红改成地衣红 (Orcein) 即可。

II. 苏木精染液

取 0.5 g 苏木精放在棕色瓶中, 加入 95% 酒精 1 ~ 5 ml 以加速溶解, 然后加入蒸馏水到 100 ml。取 2 ~ 4 层纱布包扎瓶口, 通气防尘, 放在窗前, 经 4 ~ 5 周后当溶液变成深棕红色时, 则表明完全成熟, 过滤后即可使用。用软木塞或玻璃塞封好瓶口, 在冰箱内可保存半年。

苏木精溶液也可以用纯酒精配成 10% 的基液, 经 1 个月的“成熟”即可使用。基液满装在棕色磨口瓶中, 在低温下可较长时间保存, 用时取 5 ml 基液放入 95 ml 蒸馏水中稀释成 0.5% 即可。

此染料必须成熟方可使用, 成熟即氧化成氧化苏木色素的过程。为了加速成熟, 可用以下方法处理:

A: 在新配制的苏木色素溶液中, 加入数毫升 H_2O_2 , 不可过多, 一起沉淀时即失去效用。

B: 在配成的 0.5% 染液中每 100 ml 加入 0.1 g 碘酸钠, 溶后即可使用。

C: 将蒸馏水煮沸, 加入适量苏木精, 待稍冷却后约需 0.5 h, 即可使用。

III. 铁矾媒染剂

用蒸馏水配制 4% 的铁明矾液, 过滤后备用。注意须用淡紫色的硫酸铁铵结晶, 去掉表面的白绿色粉末。配好的溶液最好保存在 18℃ 以下的阴凉处, 否则会由于氧化铁的形成在瓶壁上生出黄色薄膜, 使用前必须过滤。最好使用前临时配制。

IV. 卡宝品红染色剂

原液 A: 称取 3 g 碱性品红结晶溶于 100 ml 70% 乙醇中 (此液可以无限期的保存)。

原液 B: 取 10 ml 原液 A 加入到 90 ml 5% 苯酚水溶液中, 充分混匀, 置 37℃ 温箱中温溶 2~4 h (此液不稳定, 限 2 周内使用)。

原液 C: 取原液 B 55 ml, 加入冰乙酸和甲醛各 6 ml, 充分混匀。

染色液: 取原液 C 10~20 ml, 加入 90~80 ml 45% 乙酸和 1 g 山梨醇 (Sorbitol)。

该染色液配制后为淡红色, 如果立即使用, 染色较淡。放置 2 周之后, 染色能力会明显增强; 而且放置的时间越久, 染色效果会越好。此液可在常温下存放 2 年而保持稳定不变质。卡宝品红对染色体的染色效果, 与盐酸的解离条件密切相关。当解离时间太短时, 细胞质也不同程度地着色, 易导致分色不清晰。当解离过度时, 背景虽无色, 但染色体着色浅淡甚至不着色。只有在合适的解离条件下, 才可获得最佳的染色效果, 即染色体呈紫红色, 细胞质无色或只有极浅的红色。不同的植物需要不同的解离条件, 应通过试验加以确定。此外, 盐酸解离之后, 务必用蒸馏水将材料中的残余盐酸彻底洗净, 否则, 卡宝品红将不易染色。其染色操作与铁—乙酸洋红染色法相同, 既可以滴染, 也可以预先整体染色后用 45% 乙酸浸润压片。

V. Schiff 试剂

这是孚尔根反应的染色剂。它的基本原理是细胞经过温和的酸水解作用, 使 DNA 上的嘌呤—脱氧核糖的糖苷键上的嘌呤除去, 从而使脱氧核糖的醛基游离, 这些游离的醛基再与 Schiff 试剂反应, 形成紫红色的加成复合物。

Schiff 试剂的配制方法: 将 0.5 g 的碱性品红 (Basic fuchsin) 溶于 100 ml 煮沸的蒸馏水中, 充分搅拌使之溶解。冷却到 58℃ 后, 将其过滤到一棕色瓶中, 待滤液冷却到 26℃ 再加入 10 ml 摩尔浓度为 1 mol/L 的盐酸和 0.5 g 无水亚硫酸氢钠, 振荡使其溶解, 然后将瓶口密封, 置于黑暗和低温处 12~24 h 后进行检查, 呈淡黄色或近于无色便可以使用。若有不同程度的红色, 可加入 0.5 g 的优质活性炭, 不断摇动染色瓶, 在 4℃ 下静置过夜, 过滤后可使用。保存时需盖紧瓶塞, 外包黑纸, 储存于 4℃ 冰箱中 (可保存数月或更长时间)。如液体变红则不宜再使用。

③ 水解分离液

1 mol/L HCl: 取 8.25 ml 的浓盐酸加水 100 ml。

4. 实验方法及步骤

(1) 材料准备

选取发育良好的蒜头 (或洋葱) 放入盛有湿沙的托盘中 (亦可水培), 保持沙子的湿润, 温度在 20~25℃。待蒜根长到约 1 cm 时, 在每天上午的 9:00~10:00 时有丝分裂的高峰期将蒜根剪下进行预处理。

(2) 大蒜根尖的预处理

为了便于对有丝分裂中染色体的观察和计数, 在固定之前实验材料应该用理化因素 (温度或药物) 进行预处理, 这样可以改变细胞质的黏度, 抑制和破坏纺锤丝的形成, 促使染色体缩短和分散等。通常预处理是在分裂高峰前处理 1.5 h 以上。常用的处理方法如下:

①秋水仙碱水溶液

常用浓度为 0.05% ~ 0.2%，室温下处理 2 ~ 4 h。这样对抑制纺锤体活动的效果明显，易于获得较多的分裂相，并且染色体收缩较直，有利于对染色体结构的研究。

②对二氯苯饱和水溶液

室温下处理 3 ~ 5 h，对防止纺锤体活动和缩短染色体效果也较好，对染色体小而多的植物而言，计数染色体制片效果最好。

③8-羟基喹啉水溶液

有效浓度在 0.002 ~ 0.004 mol/L 之间，一般认为它将引起细胞黏滞度的改变，进而导致纺锤体活动的受阻。通常处理 3 ~ 4 h，可使中期的染色体在赤道面保持其相应的排列位置；另一优点是处理后的缢痕区较为清晰。一般认为，对中等或长染色体的植物比较适用。

④低温处理

将长 0.5 ~ 1 cm 的大蒜根尖置于冰水混合物中，放置到 1 ~ 4℃ 冰箱中，处理 20 ~ 24 h，取出后立即固定。此方法处理的优点是无污染且操作简便易行，该方法对某些禾本科植物效果良好。

植物细胞有丝分裂的周期，常因植物种类和培养条件而不同。因此在预处理和随后固定的时间上最好掌握在高峰前，且大多数细胞在分裂中期为宜。据前人经验总结出表 1-1。

表 1-1 几种植物不同预处理方法的比较

植物名称	染色体数 (2n) /条	处理因素	处理时间	温度	效果
小麦	42	0.2%秋水仙素水溶液	9:00 ~ 11:00	25℃	+++
小麦	42	对二氯苯饱和水溶液	10:00 ~ 4:00	室温	+++
小麦	42	1 ~ 4℃ 冰箱	20 ~ 24 h	1 ~ 4℃ 冰箱	+++
小黑麦	56	对二氯苯饱和水溶液	10:00 ~ 4:00	室温	+++
豌豆	14	对二氯苯饱和水溶液	10:00 ~ 1:30	室温	+++
烟草	48	对二氯苯饱和水溶液	8:30 ~ 11:30	室温	+++
蚕豆	12	0.05% ~ 0.1%秋水仙素水溶液	20:00 ~ 3:00	室温	+++
蚕豆	12	0.05% ~ 0.1%秋水仙素水溶液	14:30 ~ 7:30	8℃	+++
洋葱	16	0.05% ~ 0.1%秋水仙素水溶液	7:30 ~ 11:30	15℃	+++
茄子	24	0.002 mol/L 8-羟基喹啉	9:00 ~ 13:00	15℃	+++
大麦	14	秋水仙素水溶液	8:00 ~ 11:00	25℃	++

注：+++ 表示优；++ 表示良。

(3) 固定

固定的目的是借助于物理方法或化学药剂的作用,迅速透入组织和细胞将之杀死,并且使其结构和内含物,如蛋白质、脂肪、糖类以及核物质与细胞器等,在形态结构上尽可能保持生活时的完整和真实状态,同时更易于染色,可以较清楚地显现细胞在生活时不易看清的结构。

比较常用的固定液是卡诺(Carnoy)固定液,它是由Carnoy于1886年发明使用的。该固定液配制简单,操作简便,不涉及腐蚀性和有毒药品。

固定时在三角瓶内放入卡诺固定液约5 ml,将经过预处理的大蒜根尖,直接放入三角瓶,用塑料膜封口,在室温下固定24 h,固定液用量应为材料体积的15倍以上。经过固定的材料如果近期内不进行观察,应转入70%的酒精中,置于0~4℃冰箱内长时间保存,进行观察前可以换用固定液再处理一次效果较好。

(4) 水解分离

水解分离的作用是使胞间层的果胶类物质以及部分细胞质分解,使细胞分散而便于观察,也可使细胞壁适度软化而易于压片。水解分离所需时间的长短,依材料和解离液的成分而不同,时间短则细胞不易压散,时间过长细胞则容易被压碎并影响染色。

水解分离的方法是:取固定好的大蒜根尖,放在小指管内加水解分离液(1 mol/L HCl)室温放置10 min。此外,还可使用0.5%的果胶酶和0.5%纤维素酶的等量混合液,在25℃下处理2~3 h,在37℃恒温箱内只需0.5~1 h。较难压片的植物材料可以先在1 mol/L HCl中水解几分钟,经水洗后再移到1%果胶酶和纤维素酶混合液中处理。

解离后用蒸馏水反复冲洗4~5次,目的是洗去材料中的酸以利于染色。适度的水解分离使材料呈白色微透明,状似豆腐,以解剖针能轻轻压碎为好。

(5) 染色及压片

① 醋酸洋红染色法

将上述经过解离、软化和水洗的大蒜根尖,切取其分生组织放在染色皿中,加几滴0.5%醋酸洋红溶液(切不可多加染色液,否则,细胞易在压片操作时随多余的染色液逸出盖玻片之外),染色0.5~1 h。然后用解剖针将根尖移到载玻片上,纵横切作2~4段,分置到几张载片上,加1滴45%醋酸后盖片,覆盖吸水纸,用解剖针或铅笔的橡皮头轻敲几下,再用拇指适当用力下压,注意不可使盖片移动,压好的片子中细胞刚好分散成一薄层,随即进行镜检,或者将处理好的材料,切取分生组织的一段(约1 mm),同样分割成2~4块,移到不同载片上,各加1~2滴醋酸洋红,静置5~10 min,然后在酒精灯上缓慢往复3~4次,轻微加热可促进着色,但不可使其沸腾,以载片上出现水汽又刚好消失为度,随即用解剖针将材料拨碎,加盖玻片。也可以用醋酸地衣代替洋红,细胞质着色很少,效果也好。

② 铁矾-苏木精染色法

将上述处理过的根尖放入新配制的4%铁矾水溶液中媒染20~30 min,流水冲洗10~20 min,洗净附着的铁矾后转入0.5%苏木精液中染色30~120 min,使染色稍深,染后经自来水洗几次,水中可加几滴氨水,以使着色蓝化。这时材料变的较硬且脆,因此需要放在45%醋酸中进行软化及分色,据材料的大小、染色深浅和软硬程度一般需1~

4 h, 应随时镜检。取染色适度的根尖置于载片上, 如前切取分生组织且移置到几张载片上, 各加 1 滴 45% 的醋酸, 用解剖针切压弄碎, 加盖片, 覆以吸水纸, 用上述方法压片镜检。

③卡宝品红染色法

固定好的材料经解离用蒸馏水洗过后, 将材料转置载玻片上, 用刀片将根冠和伸长区切除, 只留分生区部分, 然后加 1 滴染液 (切不可多加染色液, 否则, 细胞易在压片操作时随多余的染色液逸出盖玻片之外), 染色 5 ~ 10 min 即可。注意用卡宝品红染色时一定要把握好盐酸解离的时间, 解离时间过长或过短都不利于染色。染色结束后进行常规压片。

④Schiff 试剂染色法

固定好的材料用蒸馏水洗过后, 将材料放入已预热至 60℃ 的 1 mol/L HCl 中保温 10 min, 然后用冷 1 mol/L HCl 洗 1 次, 最后把材料转入 Schiff 试剂中, 在 10℃ 黑暗条件下染色 1 ~ 5 h。染色结束后将材料转到蒸馏水中或 45% 的醋酸中。

(6) 永久片的制备

将较好的临时压片材料做成永久玻片标本, 制作的方法很多, 下面列举 2 种主要方法:

①叔丁醇法

a. 选取临时压片反转, 使盖玻片向下放入盛有 45% 醋酸 + 95% 酒精 (1:1) 的培养皿中。一端垫上一玻棒, 使玻片稍微倾斜, 过 5 ~ 10 min, 可见盖玻片和载玻片分离。用小镊子轻轻取出载玻片和盖玻片, 用吸水纸吸去多余的醋酸酒精液。

b. 有材料的一面向上, 放入盛有 95% 酒精 + 叔丁醇 (1:1) 的培养皿中 3 min。

c. 换入纯叔丁醇中 3 min, 最后用加拿大胶 (溶于叔丁醇) 封片。

若用苏木精染色的标本, 直接从 b 开始, 不能放入 a 中, 以免褪色。为避免材料收缩, 也可在 a ~ b 两步骤之间经过 95% 酒精 + 叔丁醇 (2:1) 和 b ~ c 两步骤之间加入 95% 酒精 + 叔丁醇 (1:2), 不过步骤加多也增加了材料脱落的机会, 因此, 动作要细心轻巧。

②冰冻脱片封片法

制成的临时玻片可以直接放在液氮或冰冻制冷器中进行冷冻, 然后用刀片插入盖玻片和载玻片之间的一角, 轻轻将盖玻片揭开, 将载玻片和盖玻片同时放入 37℃ 的温箱中烘干。然后取出在二甲苯中浸泡 10 ~ 20 min, 用中性树胶封片即可。

5. 结果观察

(1) 间期 (Interphase)

细胞核着色均匀, 看不到染色体。间期又可以分为 G_1 期 (Gap_1)、S 期 (Synthesis) 和 G_2 期 (Gap_2)。 G_1 期是从上次细胞分裂结束到下次染色体复制开始这段时间, 此期内主要进行细胞生长和制造一些细胞功能物质。 G_1 期的时间长短变化很大。如胚胎期细胞 G_1 期只有几小时, 而成熟的脑细胞在此期处于停滞状态 (G_0), 一般不再进行分

裂。S期细胞进行DNA复制,经过S期染色体DNA含量加倍。 G_2 期是从染色体DNA复制结束到细胞开始进行分裂。因此,间期是细胞为分裂而进行物质和能量的准备期,表面上看似乎细胞处在静止状态,实际上进行着活跃的DNA复制和蛋白质合成活动(图1-1)。

(2) 前期 (Prophase)

染色质经螺旋化逐步折叠浓缩成染色体,因此,在光学显微镜下可以看到。由于经过了染色体复制,在前期的较晚阶段每条染色体包含了两条染色单体的结构,共同连接在同一着丝粒处(图1-2)。

(3) 中期 (Metaphase)

细胞核膜和核仁的解体是进入中期的标志。中期的染色体浓缩得很短,形态特征典型。所有染色体以其着丝粒排在赤道面上,染色体两臂排在赤道面两侧。如果制备细胞染色体标本时,是从细胞极面压片而成,则可以看到中期染色体排成一个环状结构。由于中期的染色体高度浓缩,同时形态清晰,因此,是进行染色体分析的最佳时期(图1-3)。

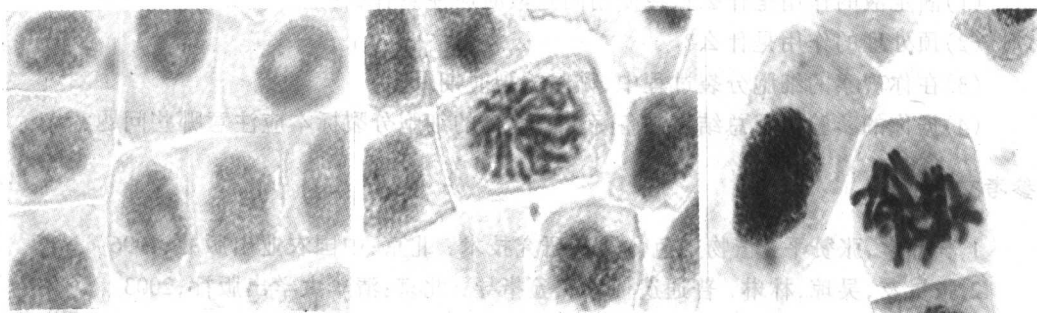


图1-1 有丝分裂的间期

图1-2 有丝分裂的前期

图1-3 有丝分裂的中期

(4) 后期 (Anaphase)

染色体在着丝粒处分裂,分开的染色体在纺锤丝的作用下有序地移向两极,分裂后的细胞每一极都得到原来细胞同样数目和质量的染色体(图1-4)。

(5) 末期 (Telophase)

染色体到达两极后,细胞重建核仁、核膜。浓缩的染色体逐渐失去高度螺旋化状态,分散在细胞核内(图1-5)。

(6) 胞质分裂 (Cytokinesis)

有丝分裂的最后阶段是进行胞质分裂。胞质分裂起始于有丝分裂后期,直到末期结束。胞质分裂使分到两极的细胞核形成两个独立的细胞,这一过程在动植物中是有差异的。植物胞质分裂时在赤道面形成细胞板,进而将细胞一分为二。而动物细胞的胞质分裂依赖于收缩环,它将细胞分成大致相等的两部分。在胞质分裂中,细胞质中的细胞器也被分到两个子细胞中。但是在细胞分裂过程中也有一些例外的情况发生,如细胞核分裂

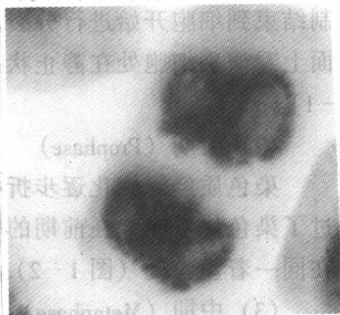
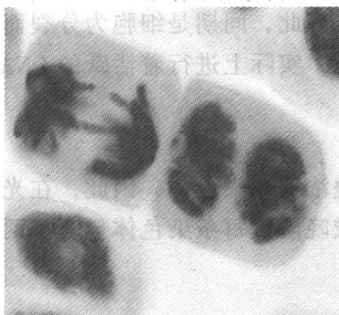


图 1-4 有丝分裂的后期 图 1-5 有丝分裂的末期 图 1-6 有丝分裂的胞质分裂而胞质不分裂,染色体复制但细胞核不分裂等情况(图 1-6)。

6. 思考题

- (1) 固定液的作用是什么? 在使用固定液时应注意什么?
- (2) 预处理的作用是什么?
- (3) 在你观察的细胞分裂过程中, 哪些分裂时期最多?
- (4) 据你的实验情况总结出制备好 1 张优良的细胞分裂标本应注意哪些问题?

参考文献

- 1 李懋学, 张赞平. 植物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1996
- 2 张贵友, 吴琼, 林琳. 普通遗传学实验指导. 北京: 清华大学出版社, 2003

实验2 植物减数分裂的观察

1. 概 述

减数分裂是形成生殖细胞的一种特殊方式的细胞分裂,它是遗传学中一个特别重要的事件,是维持大多数动植物品种染色体数目世代稳定传递的根本机制。同时,基因的分离、自由组合以及交换无不是通过减数分裂发生的,可以说减数分裂是经典遗传学的根本。深入了解、认识减数分裂对学习遗传学基本规律是极为重要的。因为动植物都是通过减数分裂形成配子,所以减数分裂通常以植物的花粉母细胞或动物精巢卵巢作材料进行观察。减数分裂的特点是:连续进行两次分裂,而染色体只复制1次,从而形成4个只含单倍数染色体的产物——生殖细胞(或配子)。

2. 实验目的

通过对大葱花粉母细胞减数分裂的观察,认识植物减数分裂过程中染色体行为变化及子细胞染色体数目与母细胞染色体数目的差异;掌握植物细胞减数分裂玻片标本的制作方法。

3. 实验材料、主要仪器及试剂

(1)材料

大葱花蕾。

(2)主要仪器

显微镜、载玻片、盖玻片、皮头吸管、小滴瓶(30 ml 棕色)、烧杯(50 ~ 100 ml)、纱布、酒精灯、量筒、吸水纸、铅笔、镊子。

(3)主要试剂

①无水乙醇

②卡诺固定液

无水乙醇3份,冰醋酸1份。

③卡宝品红染液

配方同实验1。

④封蜡

用等量的松香(Balsam)和52℃石蜡加热混合而成,所以又称松香石蜡。

4. 实验方法及步骤

(1) 取材

采集适当大小的花蕾。植物减数分裂的取材,一般以花粉母细胞为观察材料,因其数量大,取材方便且易于观察。减数分裂的取材,比一般体细胞压片的取材要复杂的多,并无共同的规律和标准可循,需根据不同植物的开花特点适时取材,这些特点主要是参照植物的开花时间和相应的某些形态特征。对于多年生的植物还要参照其物候期。如果取材的时间过早,观察不到减数分裂现象,而取材过晚则只能看到大量成熟的花粉粒。

(2) 固定

在卡诺固定液内固定 1~2 h。材料不能长时间地放在固定液中(24 h),待用的材料可换入 70% 的乙醇中。若需保存较久,可放在 70% 乙醇 1 份、甘油 1 份的溶液中。

减数分裂的材料,除非特殊目的,是不需或应避免如观察体细胞染色体那样进行预处理的。因为减数分裂所要观察的内容是全分裂过程中的染色体的结构和行为的变化。如经预处理则会破坏自然的结构和行为活动,导致产生假象。

(3) 染色

将载玻片和盖玻片擦拭干净,取已固定好的花蕾放置其上,用滤纸轻轻擦干载玻片上的液体后,立即滴 1 滴卡宝品红染液,用针或镊子挤压花蕾露出花药,弃除其他组织,继续挤压花药使其内部的细胞流入染液中。细胞很快就被染色。关于植物减数分裂染色剂的选择,实验表明,卡宝品红是首选的最好的染色剂,其优点是使用简便,染色体着色深,分色清晰。其次是地衣红和孚尔根染色。如需真实的显示减数分裂前期的核仁的数目和动态,则需用洋红染色或地衣红染色。卡宝品红和孚尔根染色均不能显示核仁。

(4) 压片

将载玻片和盖玻片夹成 45°角,缓缓盖上,在盖玻片上垫一小片滤纸,压去多余的染料,初步镜检。若要了解染色体数目(如终变期、中期 I),用筷子适当敲打,直到染色体分散,清晰可辨。

(5) 永久封片的制作

上述压片所得到的片子,只能做临时观察用,要长期保存时,可做永久片。将较好的临时压片材料做成永久玻片标本,制作的方法很多,下面列举 3 种主要方法:

① 叔丁醇法

a. 选取临时压片反转,使盖玻片向下放入盛有 45% 醋酸 + 95% 酒精(1:1)的培养皿中。一端垫上一玻棒,使玻片稍微倾斜,过 5~10 min,可见盖玻片和载玻片分离。用小镊子轻轻取出载玻片和盖玻片,用吸水纸吸去多余的醋酸酒精液。

b. 有材料的一面向上,放入盛有 95% 酒精 + 叔丁醇(1:1)的培养皿中 3 min。

c. 换入纯叔丁醇中 3 min,最后用加拿大胶(溶于叔丁醇)封片。

若用苏木精染色的标本,直接从 b 开始,不能从 a 开始,以免褪色。为避免材料收缩,也可在 a~b 之间经过 95% 酒精 + 叔丁醇(2:1)和 b~c 之间加入 95% 酒精 + 叔丁醇(1:2)两步,不过步骤加多也增加了材料脱落的机会,因此动作要细心轻巧。

②冰冻脱片封片法

制成的临时玻片可以直接放在液氮或冰冻制冷器中进行冷冻,然后用刀片插入盖玻片和载玻片之间的一角,轻轻将盖片揭开,将载片和盖片同时放入 37℃ 的温箱中烘干。然后取出在二甲苯中浸泡 10~20 min,用中性树胶封片即可。

③封蜡封片法

a. 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(1~3s)。

b. 挑取 1 条已染色的精细管,加 1 滴染液在载玻片上,加盖玻片压片。

c. 压片后在酒精灯上烘一下,很快掠过,5~6 次即可。

d. 用封蜡封片。

5. 实验结果与观察

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 2 次连续的细胞分裂(第 I 次减数分裂和第 II 次减数分裂)。每一小孢子母细胞产生 4 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。

在适当的时机采集植物的花蕾,经固定、染色、压片后,就可以在显微镜下观察细胞的减数分裂。整个减数分裂可分为下列各时期:

(1)第 I 次减数分裂

细线期:染色体呈细长的线状,常绕成比较紧密的一团,也称为凝线期。每一染色体已复制为两个单体,但在显微镜下还看不出染色体的双重性(图 2-1)。

偶线期:此期由于同源染色体的联会,二价体形成,故染色体比细线期明显增粗,而且染色体也明显松散开来。这是与细线期相区别的两大外观特征(图 2-2)。

粗线期:同源染色体配对完毕,这种配对的染色体叫二价体,每个二价体含有 4 个染色单体,但仅有两个着丝粒。配对或联会的染色体随着螺旋化的加强而明显缩短变粗,个体性也趋明显,首尾可辨(图 2-3)。

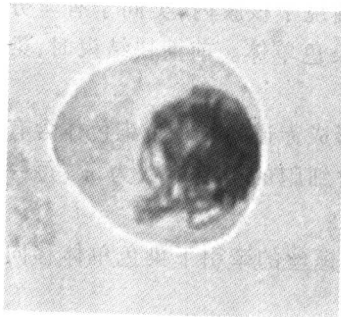


图 2-1 减数分裂的细线期

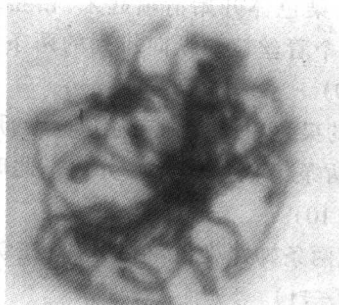


图 2-2 减数分裂的偶线期

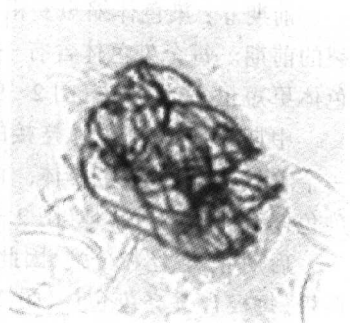


图 2-3 减数分裂的粗线期