

高等院校生物类专业系列教材

遗传学实验

EXPERIMENTS IN GENETICS

教程

主 编 边才苗

副主编 陆文妹 孙长森



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

中国地质大学（北京）地质工程研究所

遗传学实验

教程

主编：陈国祥
副主编：陈国祥、陈国祥

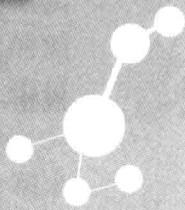


高等院校生物类专业系列教材

遗传学实验

EXPERIMENTS IN GENETICS

教程



主 编 边才苗

副主编 陆文妹 孙长森



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

内容简介

本书是集综合性和设计性为一体的遗传学实验教材,包括细胞遗传学、模式生物遗传学、微生物与分子遗传学和群体遗传学4个部分,共34个实验。每个实验都有较为系统的背景知识介绍、注意事项、课后思考题和参考文献等;在附录中又有常用试剂配置、染色方法和永久标本制作介绍等。本书可作为高等院校遗传学实验的教材或参考书。

遗传学是一门实验性很强的学科,许多重点高校都编制了相应的实验教材。这些教材的综合性强,普通高校学生独立完成里面的实验有一定的难度。本教材注重实验的背景知识和操作要点介绍,突出了实验操作的规范性,又兼顾了实验的综合性和设计性,适合于普通高校学生使用,也可作为中学教师的参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程 / 边才苗主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2014. 8

ISBN 978-7-308-13334-0

I. ①遗… II. ①边… 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 118633 号

遗传学实验教程

边才苗 主编

丛书策划 季 峥

责任编辑 季 峥

封面设计 杭州林智广告有限公司

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州林智广告有限公司

印 刷 杭州杭新印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 9

字 数 230 千

版 印 次 2014 年 8 月第 1 版 2014 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-13334-0

定 价 25.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话: (0571) 88925591; <http://zjdxcs.tmall.com>

前 言

遗传学是生命科学中发展最为迅速的一门学科,在生命科学领域中占有重要的地位。遗传学是在实验研究的基础上建立的,属于实验性科学,在实验课时,突出实验操作的规范性,并注重培养学生分析问题和解决问题的能力,对于提高学生的科研素质具有重要意义。为此,我们总结以往的工作经验,编写了《遗传学实验教程》一书,以期供本学科及相关学科的师生参考。

在本书的编写过程中,得到了台州学院教务处和生命科学学院领导和老师的大力支持;台州第一中学的陆文妹老师主要编写了细胞遗传学系列实验;台州学院生命科学学院遗传教研组的孙长森副教授参与了部分实验的编写工作;王锦文老师对附录部分加以整理,提高了本书的应用性。在此一并表示深深的感谢。

由于作者的水平有限,本书中可能存在一些不足之处,真诚希望使用本书的同行给予批评指正。

编 者

2014年4月于台州

目 录

第一章 细胞遗传学系列实验	1
实验 1 小鼠骨髓细胞染色体的标本制备.....	1
实验 2 植物染色体压片法.....	5
实验 3 植物染色体分带技术.....	8
实验 4 人类外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备.....	12
实验 5 人类染色体核型分析.....	15
实验 6 果蝇唾腺染色体的制备和观察.....	18
实验 7 人类染色体的荧光原位杂交.....	22
实验 8 动植物细胞的减数分裂.....	27
实验 9 动物细胞融合.....	31
实验 10 人体 X 染色质的观察与分析.....	34
实验 11 微核试验法检测水环境污染.....	37
实验 12 植物多倍体的人工诱发与鉴定.....	40
实验 13 体骨髓细胞姊妹染色单体色差方法.....	43
实验 14 植物原生质体的分离与培养.....	45
实验 15 水稻花药离体培养诱导单倍体植株.....	48
第二章 模式生物遗传学系列实验	51
实验 16 果蝇的外部形态观察及饲养技术.....	51
实验 17 果蝇的杂交试验.....	55
实验 18 果蝇的伴性遗传.....	59
实验 19 植物的有性杂交技术.....	62
实验 20 拟南芥的有性杂交.....	64
实验 21 秀丽线虫的遗传分析.....	67
实验 22 粗糙脉孢霉的顺序四分子分析.....	70
第三章 微生物和分子遗传学系列实验	74
实验 23 大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选.....	74
实验 24 大肠杆菌的转化实验.....	78
实验 25 酿酒酵母的杂交实验.....	81



实验 26	质粒 DNA 的提取与纯化	85
实验 27	植物 DNA 的提取与纯化	87
实验 28	植物细胞总 RNA 的提取	90
实验 29	PCR 扩增技术	92
实验 30	DNA 的限制性内切酶酶切	95
第四章 群体遗传学系列实验		98
实验 31	数量性状的统计分析与遗传力的估算	98
实验 32	人类 ABO 血型的群体遗传学分析	102
实验 33	人类 PTC 味盲基因的遗传学分析	104
实验 34	多基因遗传的人类指纹峰分析	108
附 录		114
附录一	常用试剂及其性质	114
附录二	常用染色液的配制	117
附录三	常用试剂的配制	119
附录四	染色体的染色方法	122
附录五	常用缓冲液的配制	122
附录六	植物组织和细胞培养常用培养基	130
附录七	常见生物的染色体数目	132
附录八	永久玻片标本的制作	135
附录九	微生物营养缺陷型的检测方法	136

第一章 细胞遗传学系列实验

染色体(chromosome)是遗传物质的载体。各种生物的染色体数目是相对恒定的,这是物种的基本特征。一种生物正常配子中所包含的染色体称为染色体组(genome),用 n 表示。一个染色体组内每个染色体的形态和功能各不相同,但它们相互协调,共同控制生物的生长和发育、遗传和变异。因此,研究染色体的数目和结构变异,探讨其发生和发展的规律和机制,有利于实现人工控制和改造生物的目的,这也是生命科学研究的核心内容。

1921年,Belling 创立了醋酸洋红染色法,为细胞遗传学研究奠定了技术基础。随后,低渗处理技术、细胞培养技术和秋水仙素的应用,促进了人类细胞遗传学的发展。1956年,Tjio 和 Levan 首次确认了人类体细胞的染色体数目 $2n=46$ 。1960年,Denver 会议上确定了人类染色体的统一国际标准。1968年,Caspersson 等建立了染色体荧光显带(Q带)技术;随后又出现了 Giemsa 分带(G显带)和 R 显带(与 G 带相反)技术,以及适用于染色体特定区段分析的 T 显带(末端带)和 C 显带(着丝点带)技术,显著提高了染色体鉴别的精确度,使染色体形态结构研究进入了快速发展时期。1969年,Pardue 和 Gall 建立了原位杂交技术(*in situ* hybridization, ISH),用一段带标记的已知 DNA 序列作为探针,与经变性处理的染色体 DNA 杂交,把某一 DNA 片段精确地定位到染色体的特定区带上,首次实现了细胞遗传学与分子遗传学的结合。

细胞遗传学实验涉及材料准备、材料处理、装片制作与观察等步骤。本章的主要内容是观察细胞分裂过程中染色体的数目和结构及其变化,包括染色体标本的制作技术、分带技术和染色单体色差技术等;以及染色体的异常行为观察,如 X 染色质观察和微核试验。另外,还设置了原生质体的分离与培养、细胞融合和单倍体培养等实验。

实验 1 小鼠骨髓细胞染色体的标本制备

一、实验目的

1. 初步掌握动物骨髓细胞染色体标本的制备方法(直接法)。
2. 熟悉小白鼠染色体的数目和形态特征。

二、实验原理

染色体是细胞在有丝分裂(mitosis)时遗传物质的一种存在形式。染色体的形态是重要的遗传学指标。染色体标本的制备是细胞遗传学最基本的技术之一,优良的染色体



制片也是染色体显带(chromosome banding)、组型分析(karyotype analysis)和原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)等技术的基础。

依据染色体的行为变化,有丝分裂可分为前期、中期、后期和末期。在中期(metaphase),染色体处于最粗、最短的状态,形态稳定,且着丝粒均匀排列在赤道面上;这是研究染色体形态和数目的最佳时期。所有的分裂组织都能用于染色体标本的制备;动物多采用骨髓细胞、短期培养的血淋巴细胞和长期培养的成纤维细胞等。在骨髓细胞中,造血干细胞是生成各种血细胞的原始细胞,具有旺盛的分裂增殖能力,有丝分裂指数高,染色体标本的制备可采用直接法(direct preparation method)。

大型动物通常采用对胫骨或胸骨穿刺吸取红骨髓,小型动物多采用剥离股骨以获取骨髓细胞,一般需经过若干次离心,以分离骨髓细胞;但不需要体外培养,也不需要无菌操作,且得到的染色体又是机体在自然或实验条件下的真实反映。因此,直接法可用于药品检验、环境监测和食品检验,以及致畸和致突变等研究。

染色体标本的制备要点有:①用一定剂量的秋水仙素(colchicine)溶液处理,可抑制纺锤体的形成,使细胞分裂停留在中期,增加适宜于染色体形态观察的中期细胞数;还能使处于中期的染色体进一步凝聚,减少染色体间的重叠性,有助于准确计数和鉴定。②采用低渗处理,分裂细胞在低渗溶液中吸水膨胀,再经预冷玻片的刺激,细胞易破碎,中期细胞的染色体分散良好。

三、实验器材

1. 实验材料

成年小白鼠(*Mus musculus* Linnaeus),雌雄均可,体重 20~22 g。

2. 实验仪器

生物显微镜、离心机、离心管、恒温水浴锅、托盘天平、1 ml 和 5 ml 注射器、冰箱或冰浴、载玻片、烧杯、滴管、酒精纱布和解剖器械 1 套。

3. 实验试剂

(1) 0.04%秋水仙素:秋水仙素 0.04 g,用 0.85% NaCl 溶液定容到 100 ml。

(2) KCl 溶液(0.075 mol/L):KCl 5.6 g,用蒸馏水定容到 1000 ml。

(3) 卡诺固定液:甲醇 3 份,冰醋酸 1 份。

(4) 10% Giemsa 染液:10 ml Giemsa 原液(见附录二),用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH 6.8~6.9)(见附录五)定容到 100 ml。

四、实验步骤

1. 取材和低渗

在取材前 3~4 h,于小白鼠腹腔内注入 0.04%秋水仙素 0.1 ml/10 g 体重,以积累中期分裂相。用断颈椎法处死小白鼠,取其股骨,去除肌肉后用酒精纱布擦干净,再剪去股骨两端少许骨髓及骨皮质,暴露出骨髓质,用注射器抽取 KCl 溶液 5 ml 冲洗骨髓腔,获得的骨髓细胞液收集到 5 ml 离心管中,反复冲洗,至骨髓腔变为灰白色;用滴管将骨髓细

胞液吹打均匀后,置于 37 ℃ 恒温箱中低渗处理 20 min。

2. 预固定

取低渗后的离心管,加入 2~3 滴新配制的固定液,立即吹打均匀,用天平平衡后,800 r/min 离心 5 min,去上清,留沉淀物。

3. 固定一

加固定液 5 ml 于离心管中,将沉淀物用滴管吹打均匀,室温下固定 10 min 后,1000 r/min 离心 5 min;去上清,留沉淀细胞。

4. 固定二

再加固定液 5 ml 于离心管中,吹打均匀,室温下固定 10 min 后,1000 r/min 离心 5 min,倾去上清液,加入少量固定液(约 0.5 ml,加入量视沉淀物多少而定)。

5. 滴片

将沉淀物吹打均匀,制成细胞悬液;取冰浴中预冷的载玻片,快速将细胞悬液滴在载玻片上,每片 1~2 滴(滴片高度 30~40 cm,滴面不要重叠),用口将滴片上的细胞悬液轻微地往一个方向吹开,使细胞和染色体分散;将滴片用酒精灯文火干燥,或室温晾干,使细胞和染色体粘附在玻片上。

6. 染色和观察

加 1~2 滴 10% Giemsa 染液,染色 15 min,倾去染液,用蒸馏水缓缓冲去残剩的染液;或用自来水背面冲洗,直接去除游离的染色液。再用吸水纸拭干玻片后,在显微镜下观察和统计小鼠细胞的染色体形态与数目。

与人类的染色体不同,小鼠的染色体全部是端着丝粒染色体, $2n=40$ (图 1-1)。



图 1-1 小鼠骨髓细胞中期染色体

五、注意事项

1. 秋水仙素一定要注射到腹腔内,否则中期分裂相减少;秋水仙素浓度不能过高,否则虽能获得较多的中期分裂相,但染色体过于粗短,不利于计数和分析。

2. 低渗处理时间不宜过长,以免造成分裂细胞的破裂,在离心后出现一层透明的薄膜,留在低渗液中不沉淀。低渗处理后,需要足够的固定液和充分的固定时间,以利于除去中期分裂相中残存的蛋白,使染色体分散良好;若染色体的分散不理想,可再固定 1 次。

3. 在离心前,必须将沉淀吹打均匀,以提高离心去杂质的效果;离心后弃上清要细心,避免将细胞带走。另外,对于骨髓细胞较少的小型两栖类动物,可用少量低渗液挤出骨髓,直接滴片,以避免反复离心丢失细胞。



4. 制作染色体标本时,载玻片须放在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 的冰水中预冷,使其表面附有一层水膜,有利于细胞悬液分散;同时,滴在载片上的细胞悬液要向一个方向吹,也有利于染色体分散。但吹气不能过猛,以免分裂相中个别染色体的丢失。

5. Giemsa 染液浓度与 pH 的影响:若染液浓度高,染色时间应缩短;否则染色体的着色过深,形态结构不清,裂隙和断裂的检出可能减少。pH 偏碱,染色体着色发蓝,色泽不鲜;pH 稍偏酸(如 pH 6.8),染色体呈玫瑰色,形态结构比较清晰,有利于染色体数目的统计和畸变的检出。

6. 染色后装片的冲洗可用自来水,但水流不宜太大,也不能直接冲洗滴液面;用蒸馏水在滴液面冲洗,应将水滴在材料上方,且要控制滴液的速度,至流出液无色。

六、实验作业

1. 验交小鼠骨髓细胞染色体标本 1 张,要求有染色体分散良好的中期分裂相。
2. 明确染色体标本制作的原理和操作要领。
3. 观察小鼠骨髓细胞染色体的数目和形态,并绘制染色体图。

七、思考题

1. 在动物染色体制片过程中,为何要先低渗后固定?
2. 试说明本实验中 KCl 溶液、秋水仙素溶液和载玻片预冷的作用。
3. 试简述影响小鼠骨髓细胞染色体制片质量的因素。

▶▶▶▶ 参考文献 ◀◀◀◀

1. 蔡有余,吴雯.小型哺乳动物骨髓细胞染色体标本直接制作方法[J].遗传,1981,3(3):43-44.
2. 吴政安.两栖类骨髓细胞的染色体标本制作法[J].遗传,1982,4(1):38-39.
3. 刘涌涛,马全祥,刘慧娟.小鼠骨髓细胞染色体标本制备中的失败与对策[J].生物学通报,2003,38(6):53-54.
4. 黄燕,赵小平,余红,等.动物骨髓细胞染色体标本制备失败的原因分析[J].生物学通报,2006,41(1):52-53.
5. 唐桂容,石红艳.两栖动物骨髓细胞的染色体标本制作方法的改进[J].绵阳师范学院学报,2008,27(8):78-81.

实验2 植物染色体压片法

一、实验目的

1. 学习植物组织细胞的固定、解离方法和染色体压片法。
2. 了解洋葱和蚕豆等植物的染色体形态及其核型特征。

二、实验原理

染色体的形态结构是细胞遗传学的核心内容。有丝分裂(mitosis)是体细胞的主要分裂方式,由 W. Flemming(1882)首次发现于动物和由 E. Strasburger(1880)发现于植物。这种分裂的实质是核内丝状物(染色体)的形成及其向两个子细胞的平均分配,以保证子细胞具有与母细胞相同的遗传信息。在间期,染色体呈染色质状态;在分裂期,染色体具有一定的形态,中期是染色体最粗、最短的时期。在生长旺盛的根尖分生组织,分裂细胞的数量多,取材方便,是观察植物细胞染色体的理想材料。

压片法(squash method)就是将经固定的材料置于载玻片上,盖上盖玻片,再用拇指垂直下压,使细胞均匀分散成一薄层,在显微镜下可观察到比较完整的细胞。这是 Belling 1921年创立的植物染色体标本制备技术。前处理,常用秋水仙素溶液浸泡,以阻断纺锤体的形成,使分裂细胞停留在中期,可观察到更多的中期分裂相;还可使染色体缩短、变粗,降低细胞质的黏滞度,有利于染色体的分散。另外,植物细胞有细胞壁,制片前材料需要解离,以除去细胞间的果胶层,使细胞在压片时分散开来;还可清除部分细胞质,使压片后的染色体获得透明的背景,有利于染色体的观察。

三、实验器材

1. 实验材料

洋葱(*Allium cepa* Linn.)和蚕豆(*Vicia faba* Linn.)根尖。

2. 实验仪器

剪刀、解剖针、镊子、载玻片、盖玻片、无色试剂瓶(带胶头滴管)、刀片、吸水纸、纱布、酒精灯、培养皿、火柴、烧杯、广口瓶、显微镜、量筒、细玻璃棒、小刀、指管(5 cm)、温度计、滴瓶。

3. 实验试剂

- (1) 混合酶液(1%): 果胶酶 1 g,纤维素酶 1 g,蒸馏水或缓冲液 98 ml。
- (2) 卡诺固定液: 乙醇 3 份,冰醋酸 1 份。
- (3) 0.04%秋水仙素溶液。
- (4) 改良石炭酸品红染色液(见附录二)。
- (5) 其他: 95%酒精、蒸馏水、中性树胶、石蜡、石炭酸、盐酸和 45%的醋酸。



四、实验步骤

1. 材料准备

(1) 洋葱根尖的制备: 取鳞茎, 剪去其老根, 置于盛有清水的烧杯上, 使水浸到鳞茎的基部, 在室温或 25 °C 下用清水培养, 每天更换水; 当不定根长到 2 cm 左右, 于 8:00 换水, 10:00—12:00 切取 0.2 cm 的根尖处理。

(2) 蚕豆根尖的制备: ① 将种子在清水中浸泡 8~12 h, 浅埋在装有湿沙的花盆中, 每天浇水, 在子叶出土后, 取侧根的根尖处理; ② 在种子吸胀后, 平铺在垫双层湿滤纸的培养皿中, 室温或 25 °C 下培养萌发, 待侧根长到 2 cm 时, 于 16:00—17:00 取根尖处理。

2. 预处理

将根尖在 0.04% 秋水仙素溶液中浸泡 3~4 h, 以获得更多的中期分裂相。

3. 固定和保存

(1) 固定是用药液将细胞迅速杀死, 并保持其原有形态; 通常用卡诺固定液, 在室温下固定 3~24 h。

(2) 保存常用 70% 乙醇溶液, 在 4 °C 冰箱中保存。

4. 解离

主要有酸解法和酶解法。

(1) 酸解法是用盐酸水解根尖, 步骤简便, 容易掌握; 广泛应用于染色体计数、核型分析和染色体畸变等研究。通常采用室温酸解, 浓盐酸-乙醇解离液 (1:1), 室温 7~12 min; 或采用热酸解, 1 mol/L HCl, 在 58~60 °C 下恒温 14~15 min。

(2) 酶解法是用纤维素酶和果胶酶的混合酶液解离, 常用于染色体显带技术或染色体单体交换等研究。在载玻片上切取根尖的前端部分 (约 4 mm), 在小烧杯内浸入混合酶液中, 室温 40 min 或 28 °C 恒温 20 min。

5. 染色

用吸管吸取根尖到载玻片, 用蒸馏水漂洗两三次, 再用刀片切去根冠和伸长区部分, 只留下 1~2 mm 分生区; 滴加改良石炭酸品红染色液, 室温下染色 0.5~1 h。

6. 压片

包括盖片、压片和敲片。

(1) 将根尖分割成若干小块, 分别放置在两 three 张载玻片上; 在补充适量的染色液后加盖盖玻片 (将盖玻片的一侧与染液接触, 并与载玻片约呈 45° 逐渐放平)。

(2) 将载玻片放在水平桌面上, 覆盖吸水纸, 用左手大拇指压住盖玻片一角, 右手大拇指用力向对角推压, 再将载玻片旋转 90°。重复上述操作, 使材料成薄薄一层。

(3) 将玻片放在水平桌面上, 下衬 1 张白纸; 用左手按住盖玻片, 再用铅笔钝头均匀地敲打材料较厚的区域, 使材料充分分散。

7. 镜检

在低倍镜下选择清晰的分裂相, 再用高倍镜观察细胞分裂各时期的特征和中期染色体的形态。

8. 封片

包括临时封片和永久封片。

(1) 在盖玻片四周各放置米粒大小的石蜡块,用烧红的解剖针迅速融化石蜡,使盖玻片四周严密封闭,可保存 2~3 d。

(2) 若要延长标本的保存时间,可采用永久封片。玻片经冰冻揭片后,用电吹风将玻片吹干,滴上油派胶后原位盖片;或经二甲苯透明后,滴加中性树胶后原位盖片。

五、注意事项

1. 植物细胞的分裂周期不尽相同,温度是其重要的影响因素;对于不熟悉的实验材料,最好在特定温度下长根,以掌握有丝分裂的高峰期,获得更多的分裂细胞。

2. 根尖材料的解离状况是影响染色体制片效果的重要条件。在酶解离时,混合酶液通常可重复使用两三次,但重复使用的处理时间要延长;新的酶液在解离 20 min 后要不断观察,以免解离过头。一般在根尖前端 1.5 cm 处乳白色部分(分生区)将要与呈白色部分断裂、脱离时,表明酶解时间较为适宜。

3. 细胞的着色不佳,大致有以下两种情况:

(1) 着色太浅,主要是漂洗不充分,解离液 HCl 残留,影响染料与 DNA 分子的结合;再者,解离(尤其是酸解离)过度也会影响染色体的着色效果。

(2) 着色过深、反差小,主要是染色时间过长,可用 45% 的醋酸分色;将醋酸滴加到盖玻片的一侧,在另一侧用吸水纸吸去多余的染液。另外,用特制的苯酚品红或醋酸铁矾苏木精染液(见附录二)染色,可避免长时间染色呈现的过染现象,具有操作简便、染色清晰等优点。

4. 压片所用的材料要适量,粗壮的根尖要分割,以避免细胞重叠,影响染色体的分散和观察;加盖玻片时染色液不能太少,以免影响材料的捣碎效果和装片中产生气泡。

5. 在敲打盖玻片时,载玻片应放在水平桌面上,用力要均匀;并用左手食指和中指按住盖玻片两个角,以免敲打时盖玻片移动。

六、实验作业

1. 熟悉植物根尖细胞染色体标本制作的原理、步骤和操作要领。

2. 观察有丝分裂各时期,并绘制分裂中期的染色体图像。

3. 验交染色体标本装片 1 张,要求细胞分散均匀,形态完整,中期分裂相中染色体数目齐全,互不重叠。

七、思考题

1. 植物染色体标本的制作为何多以根尖为材料?

2. 在植物染色体制片时,哪些操作有利于染色体分散?

3. 在植物染色体制片过程中,酸解离后为何要充分漂洗?

4. 在野外发现一种新植物,如何获取制作染色体装片的实验材料?



▶▶▶▶ 参考文献 ◀◀◀◀

1. 邱希慈. 植物根尖染色体的压片法[J]. 生物学教学, 1981, 1: 44-45.
2. 刘卫今, 杨大伟. 植物压片法操作中常见错误分析[J]. 怀化师专学报, 1996, 15(6): 200-202.
3. 赵惠玲, 王青. 改良植物根尖压片法观察染色体[J]. 太原师范专科学校学报, 2001, 3: 26-27.
4. 刘永安, 冯海生, 陈志国, 等. 植物染色体核型分析常用方法概述[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(1): 98-102.
5. 王敏琴, 彭振英, 蔡雁峰, 等. 一种获得分散良好的植物染色体压片技术[J]. 生物学通报, 2007, 42(4): 50.

实验3 植物染色体分带技术

一、实验目的

1. 明确染色体分带技术的原理及其意义。
2. 初步掌握植物染色体 C 带技术, 熟悉 C 带的主要类型。

二、实验原理

植物分带技术(chromosome banding)是 20 世纪 70 年代建立的染色体精细分辨技术。显带技术主要是借助于酸、碱、盐、酶等溶液对染色体标本进行处理后,再经过某些特殊的染色方法,使染色体的一定部位呈现出深浅、宽窄不同的条纹,即所谓“带”。目前,植物染色体分带以 C 带和 N 带技术为主。

植物染色体用 Giemsa 染料染色后所呈现的带型属于 C 带(即着丝点带),而不是 G 带;但除着丝点及其附近可显示 C 带外,在染色体的其他部位也可以显带。一般植物染色体的显带包括以下几种:① 着丝点带(centromeric band, C 带)。在植物染色体的着丝点及其附近显带。大麦、小麦、黑麦、小黑麦、蚕豆等植物的着丝点带比较清楚,而玉米和水仙的全部染色体和小麦的 D-染色体则不显示着丝点带。② 末端带(telomeric band, T 带)。在染色体的长臂或短臂末端显示的带。黑麦、洋葱最为典型;玉米的一部分染色体显示清晰的末端带;而大麦和蚕豆完全不显示末端带;小麦一部分染色体显示较小的末端带,与黑麦的末端带很容易区别开。③ 中间带(intercalary band, I 带)。位于着丝点和末端之间的带。这部分带表现复杂,不是所有植物染色体都有,而只在一部分染色体上有中间带。④ 核仁缢痕带(nucleolar constriction band, N 带)。只在部分具有核仁的染色体上才显示,如黑麦的第 7 对染色体和蚕豆的第 1 对染色体。

植物染色体 C 带目前尚无统一的国际化标准,通常用带头字母代表,以记录 C 带的

显示情况,简要说明如下:

1. 完全带类型

一种植物的染色体能呈现 4 种类型的带,用字母 CITN 表示,黑麦染色体 C 带属于此型。

2. 不完全带类型

一种植物的染色体只呈现 3 种以下类型的带,可分为 4 种。

(1) CIN 型: 缺少末端带型,如大麦、小麦和蚕豆的染色体 C 带。

(2) CTN 型: 缺少中间端带型,如洋葱的染色体 C 带。

(3) TN 型: 只有末端带和缢痕带,如玉米的染色体 C 带。

(4) N 型: 只有缢痕带。

除 C 带以外, T 带、I 带、N 带还有分布在哪个臂上的问题。通常在短臂上,用“+”写在字母的右上角;在长臂上,用“-”写在字母的右下角。如果若干条染色体具有同类带型,则在字母符号前放一系数;不显带的染色体仅用数字表示。

【例 1】 蚕豆 $2n=12=\text{CIN 型}=2\text{CI}^+ + 8\text{CI}_+ + 2\text{CIN}$

表示 1 对染色体具有着丝粒带和短臂上中间带, 4 对染色体具有着丝粒带和长臂上中间带, 1 对染色体具有着丝粒带、两臂的中间带和缢痕带。

【例 2】 玉米 $2n=20=\text{TN 型}=6\text{T}^+ + 2\text{T}_+ + 2\text{N}_+ + 10$

表示 3 对染色体具有短臂上末端带, 1 对染色体具有长臂上末端带, 1 对染色体具有长臂的缢痕带, 以及 10 条或 5 对染色体不显带。

三、实验器材

1. 实验材料

蚕豆(*Vicia faba* Linn.)和洋葱(*Allium cepa* Linn.)根尖。

2. 实验仪器

显微镜、天平、恒温培养箱、恒温水浴、量筒、烧杯、载玻片等。

3. 实验试剂

(1) Giemsa 原液(见附录二)。

(2) $2\times\text{SSC}$ 溶液(0.3 mol/L 氯化钠 + 0.03 mol/L 柠檬酸钠): 称取氯化钠 17.532 g 和柠檬酸钠 8.823 g , 置于容量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容至 1000 ml 。

(3) 饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液: 称取氢氧化钡 $5\sim 8\text{ g}$, 加入 100 ml 煮沸的蒸馏水搅匀, 冷却后过滤备用。

(4) 其他: 秋水仙素、纤维素酶、果胶酶、甲醇、冰醋酸和胰蛋白酶等。

四、实验操作

1. 染色体标本的制备

(1) 材料培养: 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养至根尖 2 cm , 在 $10:00$ 摘下根尖。

(2) 前处理: 目的是降低细胞质黏度, 使染色体缩短分散; 防止纺锤体形成, 使分裂



停留在中期。方法为用 0.02%秋水仙素浸泡 3~4 h。

(3) 固定和保存：目的是杀死细胞并维持细胞形态。方法是用卡诺固定液处理 8~24 h, 移到 70%乙醇溶液中保存。

(4) 解离：目的是使分生组织细胞间的果胶质分解, 细胞壁软化或部分分解, 植物细胞和染色体容易分散压平。将根尖放入 45%醋酸洋红中浸泡 12~24 h, 可使根尖软化, 还可使染色体染色, 便于镜检选择中期分裂相。

(5) 压片、冰冻揭片和干片：将材料放在载玻片中央, 切取根尖分生组织区, 滴加 1 滴 45%的醋酸, 盖上盖片后, 用拇指压片, 再用钢笔钝头均匀敲打材料厚处, 使之成为一薄层; 在显微镜下挑选染色体分散的片子, 4℃冻片, 保安刀片揭片, 盖片翻在载玻片上, 在无尘、干燥条件下放置 1~2 周。

2. 显带处理

(1) N 带显示法：染色体标本放在盛有 1 mol/L NaH_2PO_4 溶液, 温度为 93℃ 的染色缸中温浴 5~8 min, 蒸馏水冲洗后, 用 5% Giemsa 染液 (pH 7.2) 染色 30 min, 自来水冲洗, 空气干燥, 镜检。

(2) BSG (Barium hydroxide, Saline, Giemsa) 法：染色体标本用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 饱和溶液处理 5 min (20~25℃), 蒸馏水彻底清洗, 2×SSC 溶液 65℃ 恒温保持 2 h, 再经蒸馏水冲洗, 稍干后用 5% Giemsa 染液染色 30 min, 自来水冲洗, 空气干燥, 镜检。

(3) HSG (Hydrochloric acid, Saline, Giemsa) 法：染色体标本经 0.2 mol/L HCl 变性处理, 一般在室温下处理 30~40 min; HCl 处理时间因材料不同而异, 难显带的材料要适当延长变性处理时间。变性处理后的标本, 在 60~66℃ 的 2×SSC 溶液中保温 15~20 min, 再经蒸馏水冲洗, 稍干后用 10% Giemsa 染液 (pH 6.8) 染色 10 min, 自来水冲洗, 空气干燥, 镜检。

(4) 胰酶 Giemsa (Trypsin Giemsa) 法：染色体标本用 0.85% 生理盐水浸泡数秒, 再用 0.01% 胰蛋白酶 (0.85% 生理盐水配制) 处理 10~30 s, 0.85% 生理盐水冲洗 2 次, 30:1 Giemsa 染液 (pH 7.2) 染色 5~8 min, 自来水冲洗, 空气干燥, 镜检。

3. 带型分析

(1) 选择染色体数目完整的图像, 观察和测量各带纹的位置、宽窄和形状;

(2) 绘制染色体模式图, 记录和分析各植物的显带类型。

五、注意事项

1. 必须控制秋水仙素处理的时间与浓度, 以获得较多的中期分裂相。一般在分裂高峰期前 2~3 h 处理; 对于不同植物材料, 根尖浸泡的浓度也不相同。

2. 玻片标本需要在无尘、室温条件下干燥 1~2 周; 延长干燥时间, 可避免染色体在随后操作过程中脱落, 但时间过长会影响显带效果, 如染色体的末端带消失。

3. 根尖材料用醋酸洋红浸泡 (属于前染色), 容易褪色, 不影响分带效果; 同时使核仁也呈现正染色。

4. Giemsa 染色时可反复镜检, 若染色过深可用磷酸缓冲液褪色。