



国家级实验教学示范中心建设成果  
浙江大学农业与生物技术学院组织编写  
高等院校实验实训系列规划教材

# 农学基础实验指导 ——遗传育种分册

Basic Experiments of Agronomy:  
Genetics and Crop Breeding

主编◎肖建富 樊龙江

国家级实验教学示范中心建设成果  
浙江大学农业与生物技术学院组织编写  
高等院校实验实训系列规划教材

# 农学基础实验指导

——遗传育种分册

**Basic Experiments of Agronomy:  
Genetics and Crop Breeding**

肖建富 樊龙江 主编



浙江大学出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

农学基础实验指导. 遗传育种分册 / 肖建富, 樊龙江  
主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2014. 9

ISBN 978-7-308-13845-1

I. ①农… II. ①肖… ②樊… III. ①农学—高等学校—教材 ②遗传育种—高等学校—教材 IV. ①S3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 210303 号

## 农学基础实验指导

——遗传育种分册

肖建富 樊龙江 主编

---

丛书策划 阮海潮 (ruanhc@zju.edu.cn)  
责任编辑 阮海潮  
封面设计 续设计  
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 杭州中大图文设计有限公司  
印 刷 杭州杭新印务有限公司  
开 本 787mm×1092mm 1/16  
印 张 13.25  
字 数 331 千  
版 次 2014 年 9 月第 1 版 2014 年 9 月第 1 次印刷  
书 号 ISBN 978-7-308-13845-1  
定 价 29.80 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联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxcs.tmall.com>

## 序

浙江大学农业与生物技术学院有着百年发展历史。无论是在院系调整前的浙江大学农学院时期,还是在院系调整后的浙江农学院、浙江农业大学时期,无数前辈为农科教材的编写呕心沥血、勤奋耕耘,出版了大量脍炙人口、影响力大的精品。仅1956年,浙江农学院就有13门讲义被教育部指定为全国交流讲义;到1962年底,浙江农业大学有16种教材被列为全国试用教材;1978年主编的15门教材被指定为全国高等农业院校统一教材,全校40%的教师参加了教材的编写工作;1980—1998年,浙江农业大学共出版61部教材,其中11部教材为全国统编教材。这些教材的普及应用为浙江大学农科教学在全国农学领域树立声望奠定了坚实的基础。

1998年,浙江农业大学回到浙江大学的大家庭,并由原来的农学系、园艺系、植物保护系、茶学系等合并组建了农业与生物技术学院,在浙江大学学科综合、人才会聚的新背景下,农业学科的本科教学得到了进一步的发展。学院实施了“名师、名课、名书”工程,所有知名教授都走进了本科课程教学的讲堂;《遗传学》、《园艺产品储运学》、《植物保护学》、《环境生物学》、《生物入侵与生物安全》等5门课程被评为国家级精品课程,《生物统计学与试验设计》被评为国家级双语教学课程,《茶文化与茶健康》、《植物保护学》已被正式列入中国大学视频公开课;2000—2010年,学院共出版教材39部,其中《遗传学》等9部教材入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材。学院非常重视本科实验教学,建院初期就对各系所的教学实验室进行整合,成立了实验教学中心,负责全院的实验教学工作。经过十多年建设,中心已于2013年正式被教育部命名为“农业生物学实验教学示范中心”。目前中心每年面向农学、园艺、植保、茶学、园林、应用生物科学等10多个专业开设90门实验课程,450个实验项目。

所有实验指导教师也都是来自科研一线的教师,其中具有正高职称的教师的比例接近一半,成为中心实验教学的一大亮点。

为了鼓励教师及时更新实践教学内容,将最新的学科发展融入教材,2012年初学院组织各个学科的一线实验指导教师编写《农业与生物技术实验指导丛书》,并邀请了多位浙江大学的著名教授和浙江大学出版社的专家进行指导,力争出版的教材能很好地反映我院多年来的教学和科研成果,争取出精品、出名品。现在丛书的首批10部实验教材终于陆续付梓,在此我们感谢为该丛书编写和出版付出辛勤劳动的广大教师和出版社的工作人员,并恳请各位读者和教材使用单位对该丛书提出批评意见和建议,以便今后进一步改正和修订。

浙江大学农业与生物技术学院

2014年6月24日

# 前 言

遗传学(包括生物信息学)和作物育种学是两个紧密相关的学科,遗传学为作物育种学提供基本的理论指导,而作物育种学为遗传学提供基本的实验方法和实验材料。多年来我们一直有将这两门课程的实验合在一起编写一部实验指导书的想法,现在借学院组织出版实验系列教材的机会将想法付诸实施,实感欣慰!值得注意的是,这部教材的内容主要是收集了近年来我院农学专业开设的实验课程内容,以基础实验和综合性实验为主,在内容上不追求“全”,而追求“新”,追求启发性和创新意识的培养。

这部教材在编排上具有一定的新颖性,主要体现在以下几个方面:

第一,遗传学实验和作物育种学实验部分都重点写了相关实验的背景知识。我们认为,背景知识对学生深入理解与掌握实验原理和技术是必要的。学生有了较多的相关背景知识,在实验中才会有深入观察的要求、判断推理的基础、准确解释结果的可能;同时,一个好的背景知识讲解也会促进学生对实验学习的兴趣。本书中遗传学实验部分的背景知识写得有独到之处,插入了一些具有“颠覆性”、好奇心或带有伦理思考的案例,能使学生有“眼前一亮”的感觉。如学生都知道摩尔根是遗传学的创始人之一,但几乎没有学生知道摩尔根在早期用果蝇做试验的初衷是想在完全黑暗的环境条件下培养出“瞎”果蝇,以证明环境条件的改变是生物个体性状发生改变的主导,从而为反对遗传学提供充足的依据;但最终他不但没有培养出“瞎”果蝇,反而在发现一个白眼性状突变后证明了孟德尔的分离规律,并促使他本人逆转为一个遗传学的坚定的支持者。在果蝇实验中写入这样一个背景知识介绍,可以让学生不仅明白果蝇实验的起因和作用,更让他们增加了做果蝇实验的兴趣和动力。又如,在植物染色体带型分析实验中,我们在背景知识中植入了与大熊猫分类有关的案例,讲述了100多年来关于大熊猫分类争论的细节,最终通过G带染色,证明了大熊猫的部分染色体是由熊科的祖先染色体长臂发生易位融合进化而来,从而解决了100多年来悬而未决的问题。学生可以从这个案例中很好地领会染色体核型分析的原理和作用,还可以对染色体组的概念有更深刻的理解。

第二,在每个实验的后面精心设计了一些带有探究性的问题。这些问题是我

们近年来实行探究性实验教学的结晶,大多是书本上没有、平时不容易想到、知识性和趣味性都较强的问题,对于学习成绩好、上进心强的学生来说无异于是学习上的“琼浆玉液”,对于提高学生的思考能力和创新意识具有较大的帮助。比如为什么根尖用秋水仙碱处理的时间一般都定在常温下 4h? 为什么在显微镜中看到的中期分裂相总是比较少? 为什么有丝分裂中期看到的染色体有细长型、短粗型、X 型等各种不同形态? 为什么封片时材料要依次在不同酒精浓度中脱水? 等等,这些问题一般书上都没有提及,也没有现成答案,但具有较高的遗传学价值,涉及较深的遗传学或其他学科的原理,很容易激起潜伏在学生内心深处的爱探究、爱追根刨底的习性。最有意思的是,在做果蝇三点测验实验时,我们通常先以预习测验的形式花几分钟让学生回答“如果换用野生果蝇的处女蝇做母本和三隐性雄蝇做父本配置组合是否可行”,并要求说明原因,多年来累计上千名学生居然没有人能圆满解答这个问题! 而在老师讲解后学生发现这并不是一个太复杂的问题,留给他们的也只有“拍”自己脑袋的份了! 通过这样的训练,学生思考的主动性和敏锐性必然会增强。

第三,在每个实验最后以单页形式附上“实验记录和报告”,增加教材的实用性。把实验报告附在实验指导书中是当前编写实验指导书开始流行的一种形式,它方便对实验报告的收集、管理和保存,对学生来说,把自己的实验过程和实验结果写在“书”上更能体现成就感,可以提高学生做实验的认真程度。若干年后,当学生“功德圆满”时,再来翻开这本书,必有一番别样的感受!

本书主要是汇集编者多年来的教案资料编撰而成的,遗传学和作物育种学实验部分主要由肖建富完成,生物信息学实验部分主要由樊龙江完成。同时农学系的张宪银副教授、吴建国教授(现为浙江农林大学教授)分别提供了细胞流线仪和近红外分析仪的使用方法和案例,王煜和叶楚玉博士参与了生物信息学实验部分的编写,本科生裘立、唐昕蓓、俞锦科、高健、徐雯丽、卜汉杰参与了部分作物育种学实验的编写,在此一并表示感谢! 本书最后虽然列出了参考文献,但本书内容大多来自陈年积累的资料,文献出处肯定会有遗漏,从而导致本书所列文献不全,编者对由此造成的过失向有关作者表示深深的歉意!

为了方便教学,提高教学质量,遗传学实验部分可参考网址 <http://jpkc.zju.edu.cn/k/531/>,并提宝贵意见。

由于编者的经验和水平有限,书中肯定存在一些不足之处,真诚地希望得到前辈专家及诸位同行的指正,更希望使用本书的同学们能给我们一些反馈意见,以利于我们今后进一步改进。E-mail:jfxiao@zju.edu.cn。

肖建富 樊龙江  
2014年6月于杭州

# 目 录

<b>第一部分 遗传学实验</b> .....	1
实验 1 植物细胞有丝分裂的观察与永久片制作	/1
实验 2 植物细胞减数分裂的观察与永久片制作	/10
实验 3 果蝇的性状观察与伴性遗传	/17
实验 4 果蝇的基因定位	/23
实验 5 植物染色体的核型分析	/27
实验 6 植物染色体的结构变异和数量变异	/33
实验 7 植物染色体的显带技术	/39
实验 8 四倍体西瓜的诱导与鉴定	/46
实验 9 植物核 DNA 的提取与定性鉴定	/52
实验 10 植物近缘种属的 RAPD 分析	/58
实验 11 植物染色体荧光原位杂交(FISH)	/63
实验 12 人类 X 染色质标本的制备与观察	/71
<b>第二部分 作物育种学实验</b> .....	76
实验 13 小麦杂交技术	/76
实验 14 水稻杂交技术	/81
实验 15 棉花的自交与杂交技术	/87
实验 16 油菜的杂交和自交技术	/91
实验 17 玉米的自交与杂交技术	/97
实验 18 甘薯杂交技术	/101
实验 19 稻米糊化温度和胶稠度的测定分析	/106
实验 20 甜玉米籽粒糖分含量测定方法	/112
实验 21 油菜品质分析和系谱法育种	/116
实验 22 转 <i>cry1Ab</i> 基因抗虫水稻的 PCR 检测	/121
实验 23 水稻白叶枯病抗性的鉴定	/128
实验 24 小麦赤霉病抗性的鉴定	/133
<b>第三部分 生物信息学实验</b> .....	137
实验 25 文献检索与管理	/137
实验 26 常用分子生物学数据库检索与使用	/141



---

实验 27	真核生物基因结构预测	/148
实验 28	蛋白质结构与功能预测	/157
实验 29	多序列联配	/166
实验 30	分子进化分析	/169
<b>附 录</b>	.....	173
附录 I	常用试剂的配制	/173
附录 II	常用培养基的配制	/176
附录 III	不同自由度下的 $\chi^2$ 值和 $P$ 值表	/178
附录 IV	数码生物显微镜的使用方法	/180
附录 V	遗传学实验中几个重要的注意事项	/182
附录 VI	常用生物信息学网站	/183
<b>“问题讨论”参考答案</b>	.....	184
<b>主要参考文献</b>	.....	202

# 第一部分 遗传学实验

## 实验 1 植物细胞有丝分裂的观察与永久片制作

### 1.1 背景知识及实验原理

一颗小小的种子为什么能长成参天大树？为什么一个小小的受精卵能发育成人？这些问题对于 200 年前的人们是很难回答的，甚至在上千年的时间里人们一直以为种子或受精卵本身就是缩得很小的植物或人体。一直到施莱登(M. J. Schleiden)和施旺(T. A. H. Schwann)在 1838—1839 年总结了前人的工作，提出了细胞学说，人们才明白整个植物体和动物体都是从细胞繁殖和分化发育而来的。1882 年，福莱明(W. Flemming)改进了固定和染色技术，首先精确地描述了细胞的有丝分裂过程，并把细胞分裂命名为有丝分裂(mitosis)；斯特拉斯布格(E. A. Strasburg)根据染色体的行为把有丝分裂分为前期、中期、晚期、末期。他们两人用植物和动物材料分别表明：细胞核从一代细胞传到下一代细胞中，保持着物质上的连续性。

那么，细胞分裂的整个过程是怎样的呢？当时，由于在显微镜下明确地观察到染色体有规律地变化，对有丝分裂之外的细胞生化事件了解甚少，误认为细胞的增殖活动主要发生在形态变化明显的有丝分裂期，因而将细胞活动分为分裂期和静止期(后来称为间期)。1953 年，Howard 和 Pelc 用<sup>32</sup>P 的磷酸盐作为标记物浸泡蚕豆实生苗，然后在不同时间取根尖做放射自显影，结果发现有丝分裂必需的遗传物质 DNA 的复制发生在静止期中的一个区段，这一区段与有丝分裂期的前后存在两个间隙。因此他们明确地提出细胞周期的概念，并将细胞周期划分为 4 个时期：S 期(DNA 合成期)、M 期(有丝分裂期)、G<sub>1</sub> 期(M 期结束到 S 期之间的间隙)和 G<sub>2</sub> 期(S 期结束到 M 期之间的间隙)。细胞在细胞周期中顺序经过 G<sub>1</sub>→S→G<sub>2</sub>→M 而完成其增殖。

G<sub>1</sub> 期是 DNA 合成的准备时期。染色体已解螺旋成伸展的染色质，核中 DNA 含量保持在原来二倍体细胞中的量，以 2C 表示。各种 RNA、蛋白质和 DNA 复制所需的酶类开始合成。

S 期是 DNA 合成期。真核生物染色体很长，含有许多复制单位并能同时复制，但也并非都绝对同步。常染色质为早复制部分，异染色质为晚复制部分。Richard(1978)认为，复制时染色体高度伸展，组蛋白八聚体先解离成两个四聚体，进而四聚体的各个分子又分开，随之 DNA 双螺旋失去超卷曲状态呈线状伸展。八个组蛋白分子只与 DNA 一条链接触，当双螺旋被解旋酶打开时复制就开始。DNA 的复制与组蛋白的合成是同步进行的，新的组蛋白只在

新的 DNA 链上排列,旧的组蛋白仍与旧的 DNA 链结合。复制后在组蛋白作用下 DNA 又重新超螺旋化,恢复核小体结构。但是,Laskey 等(1978)分离到了一种相对分子质量为 29000 的酸性蛋白,它能把组蛋白装配成八聚体,运送到 DNA 上去,故称为装配蛋白。复制后核内 DNA 含量由 2C 增至 4C。

G<sub>2</sub> 期即有丝分裂准备期。核内 DAN 含量稳定在 4C 水平。RNA 和蛋白质合成继续进行。与染色体螺旋化有关的蛋白和组成纺锤体的微管蛋白开始形成。

M 期是有丝分裂期。间期复制好的染色单体在此期间向两个子核分配,最后形成两个子细胞。在 M 期中 DNA 相对含量从 4C 水平变为 2C 水平。细胞有丝分裂是一个连续过程,不过通常根据有丝分裂过程中染色体的动态变化,将其分为前期、中期、后期和末期四个时期(图 1-1)。

**前期(prophase):**核内染色质逐渐凝缩为细长而卷曲的染色体,每条染色体由两条染色单体组成。两条染色单体由共同的着丝点相连,并以螺旋的形式互相缠绕,一般情况下难以分清。前期末核仁消失,核膜破裂。

**中期(metaphase):**纺锤体在细胞质内出现,各个染色体分别独立地向纺锤体的赤道面移动,并最终有规律地排列在赤道板上。此时两极的纺锤丝分别与各染色体的着丝点相连,并且与从水平两侧作用于染色体上的力量持平。这个时期染色单体的螺旋消失,染色单体已不再相互缠绕,是鉴别染色体形态和数目的适宜时期。

**后期(anaphase):**各染色体的着丝点分裂为二,其每条染色单体相应地分开,并各自随着纺锤丝的收缩而移向两极。着丝点分裂的动力并非来自与两极相连的纺锤丝的张力,因为在用秋水仙碱处理破坏纺锤丝微管的情况下,两条单体也可以分裂开来。

**末期(telophase):**到达两极的染色体由聚缩状态向伸展状态转变,随即被新生的核膜包围形成两个子核。核仁在核仁组织区产生。在细胞质中央赤道板处形成新的细胞壁,使细胞分裂为二,形成两个子细胞。末期结束也就是有丝分裂一个周期的结束,紧接着新的细胞周期又开始了。

有丝分裂的前期较长,中期、后期和末期较短(表 1-1)。中期的持续时间仅占有丝分裂总时间的 1/10 左右,如果以细胞周期计算,仅占 1%左右。

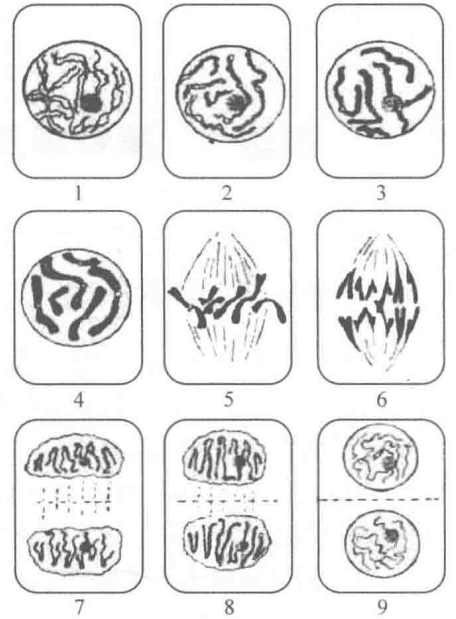


图 1-1 植物有丝分裂模式图

- 1. 极早前期; 2. 早前期; 3. 中前期; 4. 晚前期;
- 5. 中期; 6. 后期; 7. 早末期; 8. 中末期; 9. 晚末期

表 1-1 若干植物有丝分裂的持续时间

(单位: min)

植物	总时间	前期	中期	后期	末期
洋葱根尖	83.7	71.0	6.5	2.4	3.8
豌豆根尖	109.8	78.0	14.4	4.2	13.2
黑麦根尖	76~100	36~45	7~10	3~5	30~50
燕麦草柱头	78~110	36~45	7~10	15~20	20~35
豇豆胚乳	182	40	20	12	110
紫露草雄蕊毛	128	103	11	6	15
鸢尾胚乳	102~182	40~65	10~30	12~22	40~75

植物细胞周期的持续时间一般在十几小时到几十小时之间。S期最长，M期最短，G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>期变动较大。各期持续时间又因物种、细胞类型、温度、光照和其他外界因子而变化(表1-2)。

表 1-2 几种高等植物细胞周期的持续时间

(单位:h)

物种	温度(°C)	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	M	总周期
小麦	23	0.8	10.0	2.0	1.2	14.0
黑麦	20	1.0	6.0	-4.7-		11.7
小黑麦	25	2.8	5.3	-2.5-		10.6
大麦(二倍体)	25	1.9	4.5	3.0	1.0	10.4
大麦(四倍体)	25	1.3	5.8	3.2	1.1	11.4
玉米	20	0.5	4.3	-5.7-		10.5
洋葱	24	1.5	6.5	2.4	2.3	12.7
大葱	23	2.5	10.3	-6.0-		18.8
韭菜	23	2.5	11.8	7.5	9.5	31.3
向日葵	25	1.2	4.5	1.5	0.6	7.8
西葫芦	30	1.0	4.4	2.3	1.5	9.2
番茄	23	1.8	4.3	-4.5-		10.6
豌豆	23	5.0	4.5	3.0	1.2	13.7
蚕豆	23	4.0	9.0	3.5	1.9	18.4
烟草	23	3.0	3.8	1.4	0.8	9.0
短叶松	22	15.3	7.6	1.4	1.4	25.7

观察植物的有丝分裂要制备染色体的标本。Belling(1921)首先提出染色体涂片法,把细胞涂抹在载玻片上然后固定和染色。后来人们发现植物细胞或组织先固定和染色然后压片效果更好,并形成一种常规技术沿用至今。它包括取材、预处理、固定、解离、染色、压片和封片等程序。

**取材:**植物体的生长依赖于三个特定区域中分生组织的细胞分裂,即根尖的分生组织、茎尖(包括侧芽)的分生组织,以及茎中和根中的形成层分生组织。由于根尖取材容易,操作和鉴定方便,故一般采用根尖作为观察植物有丝分裂的材料。根尖可以取自盆栽或大田种植的植物,但在适宜条件下生长的种子的根尖分裂更旺盛,更容易获得分裂相丰富的制片。种子发芽时发芽床必须始终保持湿润,但又不能有太多的水分,以种子接触湿润介质、种子周围有足够空气为宜。大多数植物的种子一般采用光照条件下发芽,光照强度为750~1250lx。不同植物种子发芽的适宜温度不同,一般夏季作物较高,冬季作物较低(表1-3)。

表 1-3 若干植物种子发芽的适宜温度

(单位:℃)

植物	洋葱	油菜	大豆	棉花	大麦	小麦	水稻	玉米	西瓜	花生
温度	20~25	20~25	25~30	25~30	20~25	20~25	25~30	25~30	25~30	25~30

**预处理:**为了获得较多的中期分裂相,通常用阻止纺锤体形成的化学药品处理数小时,使细胞分裂停止在中期阶段。此类药物有:0.01%~0.4%秋水仙碱(colchicine),饱和的对二氯苯(p-dichlorobenzene,pDB),0.002~0.004mol/L 8-羟基喹啉(8-hydroxyquinoline)等。切取1~2cm根尖浸于上述溶液,或连同种子一起浸泡。化学药物处理时的温度以10~20℃为宜,温度过高则染色体易粘连,难以压散。用低温(0~4℃)预处理,即使不加任何化学药物也能获得较好的中期分裂相,且制片时染色体易分散,近年来已被广泛采用。低温处理时间一般在12~30h。

**固定:**固定液可把细胞迅速杀死,并保持细胞内各种结构的原有状态。最常用卡诺氏(Carnoy)固定液,它由3份无水乙醇和1份冰醋酸组成。固定时间2~24h,小材料可短些,材料大的宜处理长一些。最好在冰箱中固定材料,若24h后不制片,需更换至70%酒精中保存。

**解离:**为了使组织软化和细胞离散开,常用酸液水解材料。如1mol/L盐酸中60℃恒温处理5~10min,45%冰醋酸60℃恒温下处理20~30min等。还能将材料置于25℃温度下用3%纤维素酶和3%果胶酶混合液浸泡1~3h,待材料软化后即可染色。但这些酶价格昂贵(质量好的每克1000元以上),不是特别需要一般不采用。

**染色:**一些染色剂能与细胞中的DNA或某些分子基团发生化学反应并使其着色。如醋酸洋红、醋酸地衣红、改良苯酚品红、席夫(Schiff)试剂、吉姆莎(Giemsa)染液等。其中,席夫试剂能专一性地与从DNA上游离出的醛基发生反应而出现紫红色,可用于DNA的定量分析;而改良苯酚品红染色液对大部分的染色体均可着色,细胞质着色很浅或基本不着色,所以应用较广泛。有些物种不易被品红或洋红染色,可考虑用铁明矾苏木精染色,但操作较繁,制片时间较长。

**压片:**压片时要尽量剔除非分生组织的材料,使得用于压片的材料较少,细胞容易分散开。因此要先用刀片切除根冠和伸长区部分(约0.5~1mm,根据材料而定),仅保留之后的分生组织(1mm左右)用于压片。

**封片:**刚压好的片子仅能用于观察1h左右,时间一长里面的水分就要收缩产生气泡影响观察。用石蜡、甘油胶冻或指甲油将盖玻片的四周封固制成临时片,可保存观察一周左右。但时间过长也会导致物像收缩、颜色变深而难以观察。因此要长期保存,就要脱去材料中的水分,用封藏剂进行封片。

## 1.2 实验目的和要求

(1)了解细胞周期的概念及在细胞周期中染色体的动态。

(2)掌握制作有丝分裂染色体标本的方法,观察和了解植物根尖细胞有丝分裂各个时期染色体的主要特征。

(3)学会用数码显微镜在电脑上进行显微照相的方法。

(4)掌握永久制片的制作方法。

### 1.3 实验材料

- (1) 洋葱(*Allium cepa*,  $2n=16$ )的鳞茎。
- (2) 玉米(*Zea mays*,  $2n=20$ )的种子。
- (3) 裸大麦(*Hordeum vulgare*,  $2n=14$ )的种子。

### 1.4 实验用具和药品

#### 1.4.1 仪器用具

数码显微镜、普通显微镜、光照培养箱、冰箱、电子天平、水浴锅、指形管、酒精灯、培养皿、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、解剖针、吸水纸、滤纸、标签、铅笔。

#### 1.4.2 药品试剂及配制方法

无水酒精、95%酒精、70%酒精、1mol/L 盐酸、0.1mol/L 盐酸、1%醋酸洋红、卡诺氏固定液(1份冰醋酸+3份无水酒精)、铁钒(硫酸亚铁)、秋水仙碱、对氯二苯、碱性品红、冰醋酸、苯酚、福尔马林、山梨醇、纤维素酶、果胶酶、0.1mol/L 醋酸钠、0.002mol/L 8-羟基喹啉、改良苯酚品红染色液。

各种酒精浓度和不同浓度的酸碱溶液配制方法见附录 I。

0.01%~0.4%秋水仙碱溶液:先以少量 95%酒精将 1g 秋水仙碱溶解,再加蒸馏水至 100ml 配成 1%的母液,贮存于棕色瓶中,置于冰箱中保存。需要时可量取一定量的母液,按比例稀释即可。

对氯二苯饱和水溶液:取 10g 对氯二苯加蒸馏水 100ml。

0.002mol/L 8-羟基喹啉水溶液:用电子分析天平称 0.2901g 8-羟基喹啉,用蒸馏水定容于 1000ml 容量瓶中,在 60℃下溶解后备用。

0.1mol/L 醋酸钠缓冲溶液(pH4.5):称取 2.95g 醋酸钠和 3.8ml 冰醋酸,用蒸馏水定容至 1000ml。

酶液:称取 2g 纤维素酶和 0.5g 果胶酶溶于 100ml 0.1mol/L 醋酸钠溶液(pH4.5)中,配成 2%纤维素酶和 0.5%果胶酶的混合液。

改良苯酚品红染色液:

A 液:称 3g 碱性品红,溶于 100ml 70%酒精中(此液可长期保存);

B 液:量 10ml A 液,加入 90ml 5%苯酚水溶液中(此液限 2 周内使用);

量 45ml B 液,加入 6ml 冰醋酸和 6ml 37%福尔马林,即制成苯酚品红染色液;

量 10ml 苯酚品红染色液,加入 90ml 45%醋酸和 1g 山梨醇,即制成改良苯酚品红染色液(山梨醇稍多,会出现结晶,影响制片效果)。

### 1.5 实验方法和步骤

#### 1.5.1 取材

(1) 洋葱根尖:将已过休眠期的洋葱鳞茎放在盛满清水的烧杯上,放入 25℃光照培养箱中发根,待根长约 2cm 时剪取根尖进行预处理。

(2) 玉米、裸大麦根尖:在干净的培养皿中放 2 张滤纸,倒入蒸馏水将滤纸完全浸湿,再将水倒出,仅在滤纸下保留少量水;将种子用水洗净后排入培养皿中(种子间距大于 1.5cm),放

入 25℃光照培养箱中发根,待根长约 2cm 时剪取根尖进行预处理。

**注意:**种子发芽生根过程中水分的多少很重要,既不能让种子接触不到水分,又不能水分太多,否则即使表面上看根长得很好,但压片时却只能得到大量处于前中期的分裂细胞,而处在正中期的分裂细胞会很少。至于其中的原因,目前还不明确。

### 1.5.2 预处理

采用以下任一方法进行:

(1)将根尖放入装有预冷冰水的指形管中,再将指形管放入 1~4℃ 的冰箱中处理 20h 左右。

(2)在 0.01%~0.4%秋水仙碱水溶液中处理 2~4h。

(3)在对二氯苯饱和水溶液中处理 3~4h。

(4)在 0.002mol/L 8-羟基喹啉水溶液中处理 3~4h。

**注意:**用以上各种药剂处理时,温度不能过高,以 10~15℃ 为宜。

### 1.5.3 固定

取出根尖用蒸馏水清洗干净后,用卡诺氏固定液进行固定处理。处理时间随温度而定:室温下处理 4h 左右即可,但以在低温(1~4℃ 冰箱)下处理 24h 的效果较好。如果经过固定的根尖不立即使用,可用 95%酒精清洗后换到 70%酒精中于 4℃ 下保存。如果保存时间太久,需要重新固定后再用。

### 1.5.4 解离

采用以下任一方法进行:

(1)根尖换入蒸馏水中洗净,取出后放在干净的吸水纸上把水分吸去,马上放入预热的 1mol/L 盐酸溶液中,并在 60℃ 下解离 8~10min。用席夫试剂染色时必须用这一方法解离。

(2)用 0.1mol/L 醋酸缓冲液洗根尖 2 次,转入 2%纤维素酶和 0.5%果胶酶的混合酶液中,于 25℃ 恒温箱中处理 1~2h。

**注意:**随时观察根尖软化情况,不可让根尖太软。

(3)先用 1mol/L 盐酸在 60℃ 下解离 2min,再用 2%纤维素酶和 0.5%果胶酶的混合酶液在 25℃ 下处理 1h 左右。

### 1.5.5 染色和压片

常用的核染色剂有醋酸洋红、醋酸地衣红、改良苯酚品红、席夫(Schiff)试剂、吉姆莎(Giemsa)染液等。解离后的根尖置于载玻片上,用刀片切去根尖最前端约 0.5mm 的根冠和伸长区,接着切取约 1mm 的分生组织(其余根组织除去),并在材料上滴上一滴改良苯酚品红染色液,半分钟后盖上盖玻片,用手指按住盖玻片一角(手指下可先放几层滤纸),再用解剖针在材料上面垂直敲打盖玻片,最后盖上海纸用大拇指用力压片。

**提醒:**① 用于压片的材料不能太大块,通常操作正确的话有 1mm 大小就差不多了。材料太多压片时就不易把细胞压散,造成细胞重叠影响观察效果。有的同学总是不放心,怕切得太少会把分生组织漏掉,这时你可以多切几块(也是 1mm 大小),放在同一张载玻片但不同的盖玻片下压片,并可以比较一下观察的效果。② 敲打和压片时用力方向都要与玻片平面保持垂直,要用另一只手按住盖玻片一角,以防盖玻片与载玻片间发生移动。否则所有的细胞都会被拉长,变成一片片的“云彩”,从而严重影响细胞内染色体的观察!

### 1.5.6 镜检和显微照相

先用低倍镜寻找有丝分裂相的细胞,随机统计多个视野下的细胞,确定处于不同分裂时期的细胞百分率,然后用高倍镜仔细观察各时期染色体的形态特征。若发现有数目完整、分散好、染色体特征明显的中期分裂相细胞,就在数码显微镜中进行照相并将图片保存在电脑中(图片文件以自己的班级加姓名命名)。数码显微镜的使用方法请见附录IV。

### 1.5.7 制作永久片

制作永久片最简单的方法是将玻片放在液氮( $-197^{\circ}\text{C}$ )表面冷冻1min后,马上用刀片直接将盖玻片掀开,盖玻片和载玻片置盒中空气干燥7d后,再用中性树胶封片。若要马上封片,则一般采用脱水法,其方法是:制好玻片后,将盖玻片朝下,放入盛有I号液(1份45%醋酸+1份95%酒精)的培养皿中,将载玻片的一端搁在短粗玻棒上,呈倾斜状,让盖玻片自然滑落。盖玻片脱落后,分别取出盖玻片和载玻片,依次放入II号液(2份95%酒精+1份正丁醇)、III号液(1份95%酒精+2份正丁醇)和IV号液(正丁醇)各5min,然后取出盖玻片和载玻片置于滤纸上吸除多余的溶剂,在载玻片中央载有材料处滴上一滴中性树胶,将盖玻片盖回原来位置进行封片。封片后平放晾干,镜检后里面图像符合要求的就予以保留,并贴上标签,注明标本名称、作者姓名和制片日期。

## 1.6 实验作业

- (1)每人上交一张具有典型细胞分裂相的永久制片。
- (2)将观察到的各时期的典型细胞相保存在电脑的D盘中备查,并临摹在实验报告纸上。

## 1.7 问题讨论

- (1)为什么将秋水仙碱的处理时间定为2~4h?
- (2)为什么显微镜下看到的细胞中期分裂相很少?
- (3)为什么有丝分裂过程中看到的染色体有细长型、短粗型、X型等各种不同的形态?
- (4)为什么做永久制片时不能直接用纯酒精对材料脱水?



### 1.8 实验记录和报告

1.8.1 学生班级\_\_\_\_\_姓名\_\_\_\_\_

1.8.2 指导教师姓名\_\_\_\_\_

1.8.3 实验日期\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日

1.8.4 实验名称\_\_\_\_\_

1.8.5 原始记录

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---