

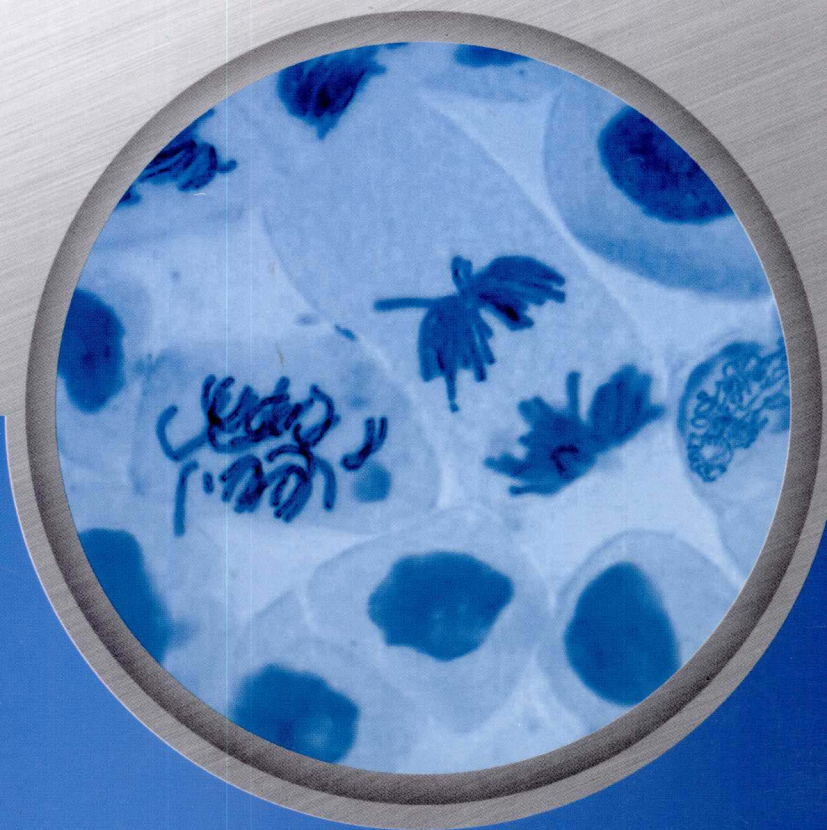


生物科学专业 **6+x** 简明教程系列·配套实验教材

遗传学实验教程

Genetic Experimental Course

闫桂琴 王华峰 主编



科学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

遗传学实验教程

Genetics Experiments

第二版 2008.05



遗传学实验教程

生物科学专业“6+X”简明教程系列·配套实验教材

遗传学实验教程

闫桂琴 王华峰 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书全面系统地讲述了普通遗传学和现代遗传学的相关实验技术原理,在内容和结构编排上注重循序渐进,在实验性质上注重独立性、设计性和创新性,有助于培养学生的综合实验能力。全书共计 30 个实验,涵盖了经典孟德尔遗传、细胞遗传、数量遗传、微生物遗传、分子遗传和基因工程等内容。

本书适合普通高等师范院校和非师范院校生物学相关专业学生使用,也可供其他相关专业的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验教程/闫桂琴,王华峰主编. —北京:科学出版社,2010
生物科学专业“6+X”简明教程系列·配套实验教材
ISBN 978-7-03-029412-8

I. ①遗… II. ①闫…②王… 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(2010)第 214033 号

责任编辑:席 慧 王国栋 刘 晶 / 责任校对:邹慧卿
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京天时彩色印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年12月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年12月第一次印刷 印张:10 1/4

印数:1—3 500 字数:240 000

定价:27.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《遗传学实验教程》编委会名单

主 编 闫桂琴 王华峰

副主编 郜 刚 王祎玲

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

柏文琴 曹建斌 高爱保 郜 刚

那冬晨 宋 芸 王华峰 王祎玲

卫新菊 闫桂琴 杨鲁红

前 言

遗传学是生命科学中最富综合性的中心学科，也是生命科学中发展最为迅速的前沿学科。遗传学的发展离不开大量的实验研究，因此，遗传学实验是开展遗传学研究的重要基础。本书是为了使学生加深对遗传学现象、原理和规律的认识而编写的遗传学实验研究教程。

本书着重从个体、细胞、分子三个水平验证与探究遗传学的基本现象与规律，使学生加深对遗传学基本原理的理解，并通过综合性、研究性实验设计，帮助学生在牢固掌握经典遗传学研究方法与技术的基础上，进一步掌握现代分子遗传学实验操作技能，熟悉遗传学分析方法及有关计算程序，初步具备遗传学及其相关专业综合性项目设计与研究的能力与素质。

目前各高校实验室均有一定程度的开放，因此在实际的教学过程中，教师通常根据课时要求，遵循因材施教的原则，在大部分验证性实验的基础上，对学生进行设计性和创新性实验的训练。本书结合这一特点，在大部分实验内容后面增加了设计性和创新性实验提示，有助于学有余力的学生掌握高级实验技能，进一步提升科研素质。

本书适合普通高等师范院校和非师范院校生物学相关专业学生使用，也可供其他相关专业科技人员参考。

限于编者的知识水平和写作能力，本书难免存在差错和不足，恳请有关专家和广大读者批评指正。

编 者

2010年9月

目 录

前言

实验 1	果蝇的饲养及生活史	1
实验 2	果蝇的性别及突变性状的鉴别	7
实验 3	果蝇的单因子杂交	11
实验 4	果蝇的双因子杂交	17
实验 5	果蝇的三点作图与基因定位	21
实验 6	环境对果蝇表型的作用	25
实验 7	果蝇唾腺染色体制片	28
实验 8	植物有丝分裂的观察	32
实验 9	减数分裂的观察	42
实验 10	植物染色体组型分析	47
实验 11	人工诱导植物多倍体	51
实验 12	大肠杆菌的诱变与遗传分析	55
实验 13	粗糙脉孢菌四分子分析	61
实验 14	紫外线对乳酸杆菌产生乳酸的诱变效应	66
实验 15	人类细胞中巴氏小体的观察	70
实验 16	人类质量性状的调查与分析	73
实验 17	人类数量性状遗传力的估算	76
实验 18	人群嗅觉性状的遗传测量与分析	83
实验 19	拟南芥的培养及生活史观察	86
实验 20	拟南芥的杂交与采种	91
实验 21	玉米、小麦有性杂交及农艺性状观察	95
实验 22	小麦、玉米室内考种及数量性状遗传分析	101
实验 23	植物基因组 DNA 的提取	104
实验 24	细菌质粒制备	113
实验 25	目的基因转化大肠杆菌	118
实验 26	植物 RNA 制备与检测	125
实验 27	植物目的基因的制备	131
实验 28	拟南芥基因组多态性的分子标记分析(AFLP 和微卫星分子标记)	139
实验 29	转基因的表达与检测	144
实验 30	根癌农杆菌介导的植物基因转化技术(创新性实验一例)	154
	参考文献	157

实验 1

果蝇的饲养及生活史



实验目的

1. 熟悉并掌握果蝇的饲养技术与果蝇的生活史。
2. 了解一些常用的果蝇饲养方法。



实验原理

果蝇 (fruit fly) 是双翅目 (Diptera) 昆虫, 属果蝇属 (*Drosophila*), 约有 2500 个种。通常用做遗传学实验材料的是黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)。约在 1909 年, 摩尔根 (Thomas H. Morgan) 开始用果蝇做遗传学实验。在前后 30 余年的时间里, 他与他的学生、同事利用这种昆虫解决了一系列重大的遗传学问题。摩尔根等的成功, 很大一部分得益于他的选材。

用果蝇作为实验材料有许多优点, 如下所述。

- (1) 饲养容易。在常温下, 以玉米粉等作饲料就可以生长、繁殖。
- (2) 生长迅速。12 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。

正因为如此, 果蝇至今仍是遗传学、细胞学、发育生物学等研究中最好的模式动物。

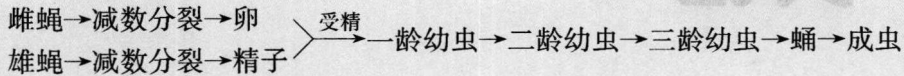
果蝇的生活史:

果蝇的生活周期长短与温度有密切关系。一般来说, 30℃ 以上的温度能使果蝇不育或死亡; 低温能使其生活周期延长, 生活力下降; 饲养果蝇的最适温度为 20~25℃ (表 1-1)。

表 1-1 果蝇生活周期长短与饲养温度的关系

	10℃	15℃	20℃	25℃
卵→幼虫			8天	5天
幼虫→成虫	57天	18天	6天	4天

果蝇在 25℃ 时，从卵到成蝇需 10 天左右，成虫可活 26~33 天。果蝇的生活史如下。



仪器调试

高压蒸汽灭菌锅

高压蒸汽灭菌锅是生物实验中经常使用的设备，尤其在微生物实验中是必不可少的。其在使用时应注意以下几点。

- (1) 不能使用高压灭菌锅消毒任何易燃易爆物质、破坏性材料和含碱金属成分的物质，以免爆炸或腐蚀内胆和内部管道，以及破坏垫圈。
- (2) 含有盐分的液体漏出或溢出时，一定要及时擦干净，否则会腐蚀容器和管道。
- (3) 在打开盖子前，确认压力已归于零以下。
- (4) 不要在爆炸性气体附近使用该仪器。
- (5) 不要随意触动电源线，不要把重物压在电源线上，损坏的电线或金属丝暴露会导致断电或着火。
- (6) 除蒸馏水外，不要倒任何液体于容器内。
- (7) 不要将高压蒸汽灭菌锅用于其他目的的消毒。
- (8) 检查盖子的垫圈有无异物粘连，如有异物要及时清除，否则会导致蒸汽泄漏。
- (9) 请使用配套的工具，不要使用其他筐筐于高压蒸汽灭菌锅内。
- (10) 如有异常发生（如有声音发出、闻到气味、冒烟），请立即切断电源，排除异常后再继续使用。
- (11) 移动此仪器时请将盖子锁上。移动盖子时，不要拉盖子的手柄，否则盖子会变形，难以盖严。

试材及其他

1. 生物材料：不同品系的黑腹果蝇，也可野外采集当地果蝇。
2. 器皿：麻醉瓶、解剖镜、培养瓶、毛笔、镊子、量筒（500ml）、烧杯、滤纸、天平、脱脂棉、电磁炉、铁锅。
3. 试材：玉米粉、琼脂、酵母、乙醚、丙酸、蔗糖。

实验步骤

一、果蝇的培养

1. 果蝇的野外采集

果蝇的采集及培养直接关系到整个实验的成败。通常的方法是：在一个空瓶子中放入一些发酵的水果（如酸败的苹果或香蕉），引诱果蝇；待果蝇进入瓶中后，以瓶塞盖上瓶口，带入实验室进行培养观察。然而在实验教学实践过程中使用该方法时很多学生却没有成功。但是，如果做了如图 1-1 所示的改进，就可以采集到大量的果蝇，这里改进的关键在于瓶口之处加了一个“V”字形的收集器。这个“V”字形的收集器既可以用纸卷成，也可以直接将塑料瓶的上半部截取，然后倒插入采集瓶口中。增加了“V”字形收集器，使果蝇易进难出，从而可以在很短的时间里轻易诱捕到大量果蝇。

2. 果蝇饲料的配制

果蝇在水果摊或果园中经常见到，但它并不是以水果为生，而是食生长在水果上的酵母菌，因此，实验室内凡能发酵的基质，均可作为果蝇的饲养物质。常用的饲料有玉米饲料、米粉饲料、香蕉饲料等，配方如表 1-2 所示。



图 1-1 诱捕果蝇的“V”字形收集器

表 1-2 果蝇饲料的几种配方

	玉米饲料	米粉饲料	香蕉饲料
水/ml	200	100	50
琼脂/g	1.5	2	1.6
蔗糖/g	13	10	—
香蕉浆/g	—	—	50
玉米粉/g	17	—	—
米粉/g	—	8	—
麸皮/g	—	8	—
酵母粉/g	1.4	1.4	1.4
丙酸/ml	1	1	0.5~1

(1) 玉米饲料：取应加水量的二分之一，加入琼脂，煮沸，使充分溶解，加糖，煮沸溶解。取另一半水混合玉米粉，加热，调成糊状。将上述两者混合，煮沸。以上操作都要搅拌，以免沉积物烧焦。待稍冷后加入酵母粉及丙酸，充分调匀，分装。按表 1-2 用量配制，可得饲料 200ml 左右。

(2) 米粉饲料：配制方法与玉米饲料相同，用米粉代替玉米粉。

(3) 香蕉饲料：将熟透的香蕉捣碎，制成香蕉浆。将琼脂加到水中煮沸，使其充分溶解。将琼脂溶液加入香蕉浆，煮沸，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，用量参照表 1-2，每 200ml 饲料约加 1ml。如无酵母粉，也可用酵母菌液代替，但用法不同，酵母菌液通常在饲料分装到培养瓶中以后再加入，每瓶加数滴。

3. 培养瓶的消毒

培养果蝇用的培养瓶可用牛奶瓶，或大、中型指管，用海绵或纱布包的棉花球做瓶塞。实验室中保存原种及杂交实验以中指管为宜。培养瓶用前要消毒，然后再装饲料（每瓶 2cm 厚即可），待饲料冷却后，用酒精棉擦瓶的内壁，然后插入消毒过的吸水纸，做幼虫化蛹时的干燥场所。

4. 果蝇的麻醉和接种

先将果蝇用乙醚麻醉（或放入冰箱，低温麻醉；不得麻醉过度，如果果蝇两翅展开并且肢体僵硬，说明已经致死）。取一麻醉瓶，瓶口应与培养瓶大小相仿，取一棉花塞，在塞入瓶口的一面滴加三滴乙醚，将果蝇转入麻醉瓶内，翻转麻醉瓶使其瓶口朝上，迅速将滴有适量乙醚的棉塞盖住麻醉瓶。大约 1min 后，果蝇倒卧于瓶底，此时即可将果蝇倒出进行操作。

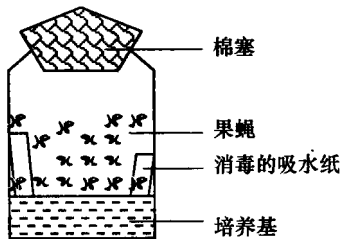


图 1-2 培养中的果蝇

抓紧时间将果蝇移入新培养瓶中，可将培养瓶横卧，用干净的毛笔把果蝇挑入，待果蝇清醒后，再竖立加塞，以防止果蝇粘在培养基上。培养中的果蝇如图 1-2 所示。

5. 原种培养

在作新的留种培养时，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，需将培养瓶横卧，然后用毛笔将麻醉的果蝇从白瓷板上轻轻扫入，待果蝇醒过来后再把培养瓶竖起，以防果蝇粘在培养基上。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两套，培养瓶的标签上要写明突变名称、培养日期等。进行原种培养时温度可控制在 10~15℃，并避免日光直射。

果蝇在适宜条件下会产子代，在肉眼能看到幼虫时就可把亲本倒掉，几天以后，新的成蝇便产生，待成蝇有了足够保种的数量后，要调换培养瓶，作为下一代的亲本，继续培养。

原种果蝇培养遇到的麻烦是饲料发霉。发霉的原因很多，如用具没有灭菌、空气污染、亲本不及时倒掉等，都会引起饲料发霉。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，但并不能完全制止。发现培养瓶中有少量霉点时可用烧过的解剖针挑出。若为大量霉菌污染，可把果蝇全部倒在一个消毒过的空试管中，让它们活动 2~3h，换一支试管，再活动 1~2h，而后倒入一支新的培养瓶中继续培养，这样可以

防止霉菌污染。

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，防止果蝇逃出。调换培养瓶时，要防止果蝇飞散，外逃的果蝇要打死。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，直到完全没有分离为止，但这样做费时费力，只是在不得已时才采用。一般混杂时，只要方便就可以重新引种，将混杂种弃去。

二、果蝇的生活史观察

1. 卵

成熟的雌蝇交尾后（2~3天）将卵产在培养基的表层，用解剖针的针尖在果蝇培养瓶内沿着培养基表面挑取一点培养基将其置于载玻片上，然后滴上一滴清水，用解剖针将培养基展开后放在显微镜低倍镜下仔细进行观察。果蝇的卵为椭圆形，长约0.5mm，腹面稍扁平，前端伸出的触丝可使卵附着在培养基表层而不陷入深层。

2. 幼虫

果蝇的受精卵经过一天的发育即可孵化为幼虫。幼虫在培养基内及瓶壁上都有，培养基内的幼虫一般要小一些，这是因为果蝇的幼虫从一龄幼虫开始经两次蜕皮，形成二龄和三龄幼虫，随着发育而不断长大，三龄幼虫往往爬到瓶壁上来化蛹，其长度可达4~5mm。幼虫一端稍尖为头部，黑点处为口器。幼虫在培养基内和瓶壁上蠕动爬行。

3. 蛹

幼虫经过4~5天的发育开始化蛹。蛹一般附着在瓶壁上，颜色淡黄。随着发育的继续，蛹的颜色逐渐加深，最后为深褐色。在瓶壁上看到的几乎透明的蛹是已经羽化完而遗留的蛹的空壳。

4. 成虫

刚羽化出的果蝇虫体较长，翅膀也没有完全展开，体表未完全几丁质化，所以呈半透明状。随着发育的继续，身体颜色加深，体表完全几丁质化。羽化出的果蝇在8~12h后开始交配，成体果蝇在25℃条件下的寿命为37天。



注意事项

1. 为安全起见，高压蒸汽灭菌锅使用时一定要在老师的指导下进行。
2. 配制果蝇培养基时，在煮沸溶解琼脂的过程中，注意添补因大量蒸发而消耗的水。
3. 使用新鲜配制的果蝇培养基效果较好。
4. 在培养过程中，要防止果蝇品种混杂。



思考题

1. 配制果蝇培养基时应注意什么问题?
2. 果蝇的生活史分几个阶段, 你所观察到的不同类型的果蝇在整个生活史各阶段有什么差异?

(王华峰)

实验 2

果蝇的性别及突变性状的鉴别



实验目的

1. 熟悉并掌握果蝇的性别鉴别。
2. 了解一些常见的果蝇突变性状。



实验原理

果蝇的每一体细胞有 8 个染色体 ($2n=8$), 可配成 4 对, 其中 3 对在雌、雄果蝇中是一样的, 称常染色体, 另外 1 对性染色体, 在雌果蝇中是 XX, 在雄果蝇中是 XY。为了准确地配制果蝇的杂交组合和进行果蝇遗传性状分析, 必须能够正确辨别果蝇的性别。果蝇的性别在幼虫期较难区别, 但到了成虫期区别相当容易。

雌性: 体型较大, 腹部椭圆形, 末端稍尖, 腹部背面 5 条黑纹 (图 2-1), 无性梳。

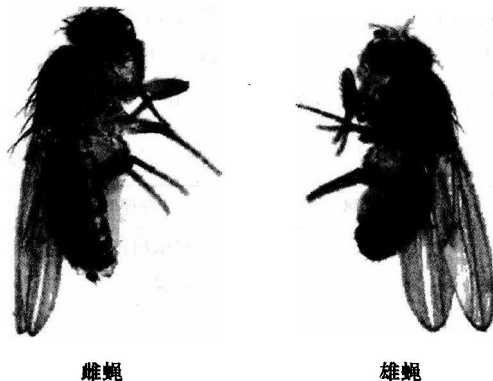


图 2-1 一对雌雄果蝇

雄性: 体型较小, 腹部末端钝圆, 腹部背面 3 条黑纹, 最后一条延伸至腹面成一黑

斑（图 2-1）。第一对足第一跗节有性梳（图 2-2）。在雌雄差异中，以性梳的差异最为准确。

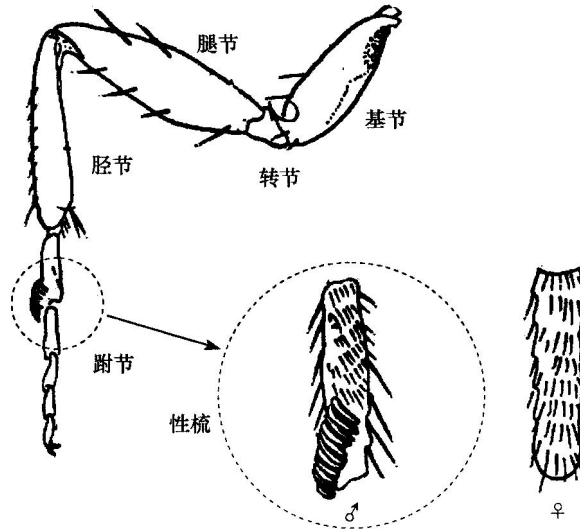


图 2-2 雄果蝇的性梳示意图

可以着重从以下几个方面观察雌雄果蝇的主要差异，见表 2-1。

表 2-1 雌雄果蝇主要差异比较

项目	雌蝇	雄蝇
体型	体型较大	体型较小
腹部	腹部椭圆形，末端稍尖	腹部末端钝圆
黑纹	腹部背面 5 条黑纹	腹部背面 3 条黑纹 最后一条延伸至腹面成一黑斑
性梳	无性梳	第一对足第一跗节有性梳

果蝇中有许多突变类型，据不完全统计，突变性状有 400 多种，这些突变型大多属于形态突变，如白眼、残翅、黄体等，因此很容易进行观察。

果蝇中的一些突变性状和控制该性状的基因如表 2-2 所示。

表 2-2 果蝇中的一些突变性状和控制该性状的基因

突变型	基因符号	表现特征	基因所在染色体
白眼	<i>w</i>	复眼白色	X
棒眼	<i>B</i>	复眼条形 小眼数少	X
褐色眼	<i>bw</i>	复眼褐色	II
猩红眼	<i>st</i>	复眼猩红色	III
黑檀体	<i>c</i>	身体乌木色	III
黄体	<i>y</i>	身体浅橙黄色	X
焦毛	<i>sn</i>	刚毛卷曲烧焦状	X

续表

突变型	基因符号	表现特征	基因所在染色体
黑体	<i>b</i>	颜色比黑檀体深	II
匙形翅	<i>nub2</i>	翅小匙状	II
残翅	<i>vg</i>	翅退化, 不能飞	II
翻翅	<i>Cy</i>	翅向上翻卷, 纯合致死	II
短翅	<i>m</i>	翅膀短小, 不超过身体	X



仪器调试

解剖镜

双目镜筒中的左右两光束不是平行的, 而是具有一定夹角(一般为 $12^{\circ}\sim 15^{\circ}$) 的, 因此成像具有三维立体感; 像是直立的, 便于操作和解剖, 这是在目镜下方的棱镜把像倒转过来的缘故; 虽然放大率不如常规显微镜, 但其工作距离很长; 焦深大, 便于观察被检物体的全层。



试材及其他

1. 生物材料: 不同品系的黑腹果蝇。
2. 器皿: 麻醉瓶、培养瓶、毛笔、镊子、滤纸、脱脂棉。
3. 试材: 乙醚。



实验步骤

1. 麻醉

对果蝇实施麻醉是为了便于性状观察和转移果蝇, 因此, 麻醉时一定要根据实验目的而确定麻醉的深度。如果只是进行观察, 可以将果蝇麻醉至死, 死亡时表现为翅膀与身体呈 45° 角; 但如果是麻醉鉴别后再进行转移培养, 就应避免麻醉至死。麻醉时, 在麻醉瓶的瓶盖内塞入沾有乙醚的棉花, 待乙醚气体在瓶内充满后将果蝇培养瓶的瓶口与麻醉瓶口对准, 将果蝇转入麻醉瓶内, 盖好瓶盖。观察果蝇的表现, 若果蝇从瓶壁上纷纷落到瓶底, 表示麻醉已生效。转移麻醉后的果蝇时, 应用毛笔的笔尖粘取。

2. 果蝇性别的鉴别

将麻醉后的果蝇放在解剖镜下仔细观察, 区别雌雄的差异。在雌雄差异中, 以性梳的差异最为准确。如刚羽化出的果蝇(图 2-1), 身体都较长, 颜色很浅, 此时, 根据性梳的有无就可以很快地将雌雄分开, 在熟练操作几次后, 就可以不必借助解剖镜也能很快区分雌雄。在观察性梳时可以用解剖镜观察, 也可以用低倍显微镜观察。

3. 突变型观察

将果蝇麻醉后, 在解剖镜下仔细辨认各种突变类型。与野生型果蝇作对照, 观察突

变型果蝇的性状表现，如残翅、黑身、黄身、白眼等。经过一段时间的练习，可以直接区别各种不同的性状。



思考题

1. 绘制果蝇的性梳示意图。
2. 描述所观察到的各个果蝇突变体的形态特征。

(王华峰 闫桂琴)