

遗传学实验指导

朱云国编

同济大学生命科学与技术学院

2020 版

目 录

实验一、果蝇遗传综合实验（P3-20）

实验二、细胞分裂综合实验（P21-30）

实验三、DNA 指纹的遗传分析（P31-36）

实验四、小鼠骨髓细胞染色体制片与观察（P37-41）

实验一、《果蝇遗传综合实验》之

——①黑腹果蝇的雌雄鉴别及突变体性状的观察

一、教学要求

- 1、熟练区别雌雄成虫果蝇；
- 3、掌握果蝇的饲养及麻醉方法；
- 4、了解遗传学实验常用的果蝇品系特征及常见的突变类型。

二、教学内容

1. 果蝇概述

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 在分类学上属于昆虫纲双翅目。其中 *Drosophila* 是属名, *melanogaster* 是种名, 是“黑色消化道”的意思。在这类果蝇的幼虫腹部一侧可见到黑色的消化道, 由此称之为黑腹果蝇。

果蝇属于双翅目昆虫, 与其他目昆虫的成体不同处是: 其他目昆虫具有两对翅膀, 也就是有四支翅膀, 双翅目昆虫只具有一对, 也就是两支翅膀, 另外的一对翅膀退化成为平衡棒。



黑腹果蝇体积小、繁殖力强、世代周期短、容易饲养、染色体数目少、突变体多、遗传背景清楚。因此, 自 20 世纪以来, 一直是遗传学、细胞生物学、分子生物学、发育生物学、基因组学等多学科和多领域研究的最为理想而经典的实验材料和模式生物。

2. 成体果蝇性别的主要区分特征

在果蝇的杂交实验中, 正确区分果蝇的性别是十分重要的。必须反复练习, 做到非常熟练地进行雌雄果蝇的区分。

■ 雌雄成体果蝇的区分主要从以下几个方面进行:

观察点	雌蝇	雄蝇	观察方法	图示
体形	稍大，颜色浅	稍小，颜色深	肉眼	图 2、3
腹部体节数目	6	4	放大镜	图 4
外生殖器	较简单，有阴道板和肛上板等结构	较复杂，有生殖弧、肛上板、阴茎等结构	解剖镜	无
腹部背面	有五条黑条纹	三条黑条纹，最后一条极宽，并延伸到腹面	肉眼	图 1
尾部	腹部底部为产卵管，呈圆锥状凸出，末端较尖	腹部底部为交尾器，呈黑色圆形外观，末端较钝	肉眼	图 4
前肢第二节（跗节）	无性梳	有性梳	解剖镜	图 5



图 1：雌雄果蝇侧面观

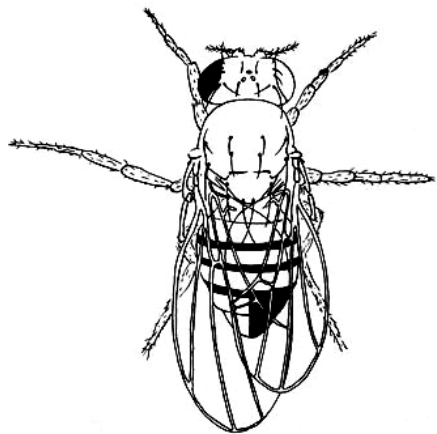


图 2：雌雄嵌合体果蝇，示雌雄果蝇背面观

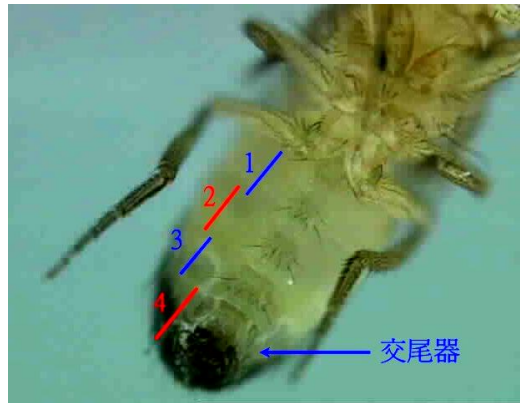
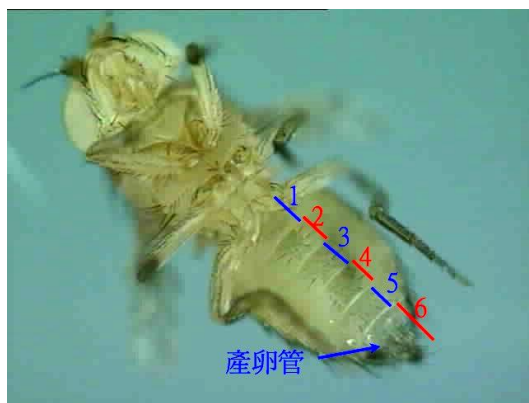


图 3 雌雄果蝇腹面观，示体节数和尾部不同。（左图为雌果蝇，右图为雄果蝇）

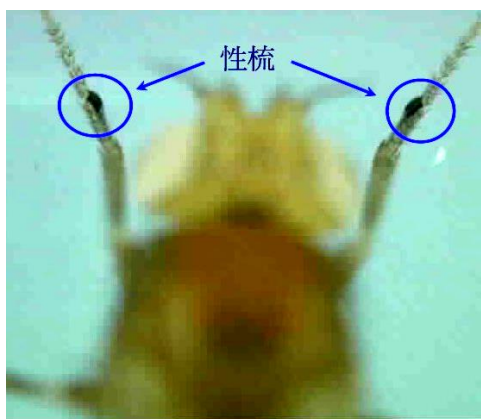


图 4：雄性果蝇的性梳：果蝇的性梳是一个决定雌雄果蝇的第二性征。性梳着生在雄果蝇的第一对前足的第一个跗节上，因形状与梳头的梳子非常相似，又与性别有关而得



图 5：玉米培养基所用材料

3. 果蝇培养基和饲养

果蝇因经常在果园和水果上见到而得名，但它并不是以水果为生，而是食用生长在水果上的**酵母菌**。因此，凡是能做为酵母菌发酵的基质都可以作为果蝇的培养基。目前常用的果蝇培养基有**香蕉培养基**（多在南方使用）和**玉米粉培养基**（多在北方使用）。果蝇体型小。可在三角瓶、试管等容器中进行培养。配方如下：以 100ml 为例：

配方 1			配方 2		
成分	数量	作用	成分	数量	作用
水	80 ml	溶 剂	水	100 ml	溶 剂
玉米粉	8.2 g	基本成分	玉米粉	10 g	基本成分
绵白糖	6.2 g	基本成分	红糖	13.5 g	基本成分
琼脂条	0.62 g	固 化 剂	琼脂粉	0.8 g	固 化 剂
丙 酸	0.5 ml	防 腐 剂	丙 酸	0.5 ml	防 腐 剂
酵母粉	少量	菌 种	酵母粉	少量	菌 种

配制时，先将水分成两份，其中一份用于溶解琼脂和糖，另一份煮玉米粉，待两份分别溶解或煮好后再合到一起煮沸，去火后再加入丙酸，然后将粘稠的培养基充分搅拌之后再分装培养瓶中，厚度约 2 厘米（25~30ml）。待培养基冷却后（瓶内不要积水），在培养基表面洒上一层酵母粉，插上一片灭菌的滤纸片作为幼虫化蛹的干燥场所。待 1—2 天后见到培养基表面有一层白色菌膜出现时，就可用接种果蝇了。冷却后，瓶壁上会产生冷凝水，需要放置 1~2 天，待冷凝水消除，培养基发酵后接种果蝇。一般情况下，每个 100 ml 的饲料瓶中接种 5~10 对果蝇为宜。

4. 成体果蝇的麻醉

无论是做杂交实验还是做性状观察，都要先麻醉果蝇，使它保持静止状态。常用的麻醉方法有二氧化碳麻醉法和乙醚麻醉法。操作步骤如下：

方法 1——取出麻醉法：先轻轻敲打培养瓶，让果蝇落倒培养瓶的底部，取下麻醉瓶和培养瓶塞，然后迅速将培养瓶口向下扣在麻醉瓶口上，使两瓶口对正对严，以防飞逸。用左手紧握上下已对准的两瓶的对口处，并用右手拍打上瓶使果蝇落入麻醉瓶里（图 6），取一个磨口广口瓶，在瓶盖下方的凹窝里，紧塞一团包着纱布的棉花，或钉一团棉花在橡皮塞下方。在棉花上浸以少量乙醚，立即盖住瓶盖。瓶内很快充满乙醚气体，约半分钟后就可以起到麻醉效果（图 7），所有的果蝇都因麻醉而躺倒不动。但在**使用麻醉之前必须检查瓶内不得有乙醚液体**，如有就必须将乙醚液体到入瓶盖的棉塞中，否则会使果蝇致死，这一点很重要。

果蝇对乙醚很敏感，极易麻醉，应根据实验的要求来掌握果蝇的麻醉程度。如果被麻醉的果蝇只是用来识别雌雄性别或其它性状的观察，这些果蝇要深度麻醉直至死亡，否则在实验未做完之前果蝇便苏醒过来，影响观察。观察完毕后的死亡果蝇倒入煤油或酒精的瓶中处理掉。如果用来选择杂交实验亲本的果蝇，不能过度麻醉，否则会影响果蝇的生活力。果蝇的麻醉状态和麻醉后死亡的区别以**翅膀是否外展**为依据。麻醉状态的果蝇两个翅膀仍然重叠在背腹上。而死亡的果蝇翅膀离开腹部呈外展状态，不管外展程度如何，都按死亡果蝇对待，切不可选这种状态的果蝇做杂交用的亲本。

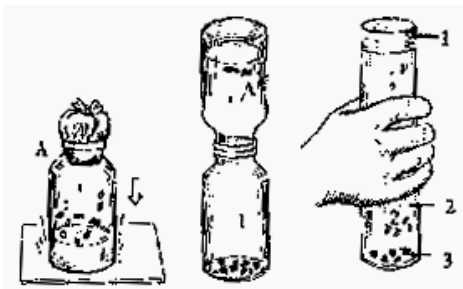


图 6：将果蝇从饲料瓶中移至麻醉瓶中。

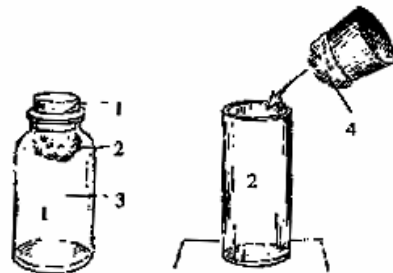


图 7：果蝇的麻醉。示瓶盖上的棉花

约半分钟后，将已麻醉的果蝇，倒在方法 2 中的果蝇微麻醉操作台（或百瓷板上，也可使用白纸），用毛笔和解剖镜观察性状、性别、计数或挑选处女蝇，准备杂交。

杂交时，将空的饲料瓶平放（注意瓶壁上不能有水或其他黏着物），将麻醉后的果蝇放入空瓶中后，应等到果蝇苏醒之后再**将瓶子直立**。否则果蝇在未苏醒之前落到培养基上，或粘住翅膀而死亡。

方法2——直接麻醉法：即直接在饲料瓶中对果蝇进行麻醉。这一方法可用二氧化碳进行麻醉或乙醚麻醉。有商品化的麻醉装置出售，但价格较贵，可以自制一套简易的麻醉装置如图8所示。

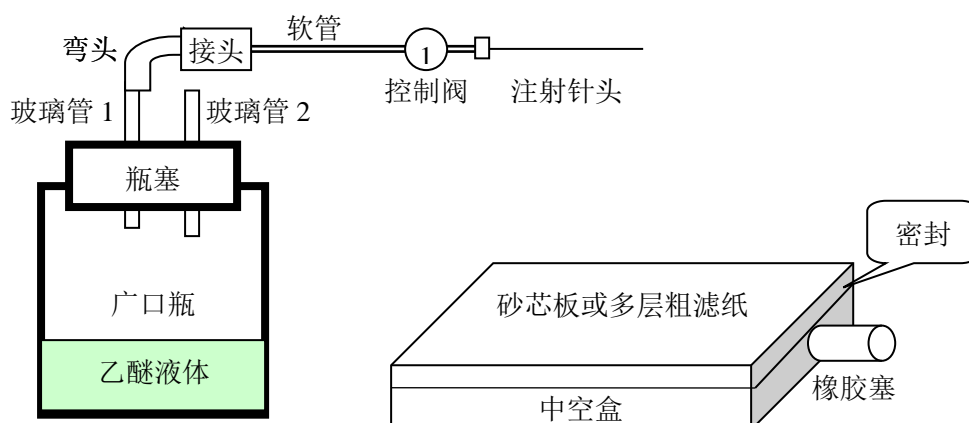


图8：简易麻醉装置示意图。左图示简易乙醚气体发生器，乙醚液体装入广口瓶中（也可用抽滤瓶代替），在密封的橡皮塞上打孔并安装2根玻璃管，玻璃管1通过软管与带有控制阀的针头相连，针头的大小和粗细根据饲料瓶的情况而定，玻璃管2则与手动鼓气装置相连；右图示果蝇微麻醉操作台，在一个长方形的中空盒子上密封一块具有一定透气性的砂芯板或几层粗滤纸，在盒子侧面设置可一个插入针头的橡胶塞子，或与简易乙醚气体发生器相连的管子。

使用时，将注射针头通过饲料瓶与瓶塞之间的缝隙插入瓶中，打开控制阀，同时使用手动鼓气装置向简易乙醚气体发生器充气，使得乙醚气体通过软管和针头进入饲料瓶中，达到使果蝇麻醉的效果。

约30~40秒后，取掉饲料瓶的塞子，将麻醉的果蝇倒在果蝇微麻醉操作台上，用毛笔和解剖镜观察性状、性别、计数或挑选处女蝇，准备杂交。如果操作时间较长但不能处死果蝇，可将针头插入操作台侧面的橡皮塞，打开控制阀，使得乙醚气体缓慢进入，保持果蝇的麻醉状态。**但一定要注意进气量，以免果蝇因麻醉过度而死亡。**

再麻醉：观察或计数过程中，果蝇可能苏醒，可准备一玻璃培养皿，内以胶带贴一小块棉球，滴入适量乙醚，培养皿口朝下置于一旁备用，如见果蝇翻身走动可将培养皿口朝下，盖于果蝇上方待其麻醉后再移开。如果使用微麻醉操作台，则可避免这一问题。

5. 果蝇常见突变体成体的形态观察

在生物学研究中，需要用到各种突变体。果蝇个体很小，成年果蝇仅为2—3毫米。生活史短，易饲养，繁殖快，染色体少，突变型多，使得在短时间内培养繁殖出大量特定种系的果蝇变得十分便利，使果蝇得以广泛应用于生物学研究，

特别是系统发育学及遗传学等研究。以果蝇作为遗传学研究的材料，利用突变株研究基因和性状之间的关系已近一百年，至今，各种研究遗传学的工具已达完善的地步，果蝇提供我们对今日的遗传学的知识有其不可磨灭的贡献；从 1980 年初，Drs. C. Nusslein-Volhard 和 E. Weichaus 以果蝇作为发育生物学的模式动物，利用其完备的遗传研究工具来探讨基因是如何调控动物体胚胎的发育，也带动了其它模式生物（线虫、斑马鱼、小鼠和拟南芥等）的研究。

野生型的主要形态特征为：

体色呈灰色（参见图 1）；

翅膀呈圆卵型，静止时平放交叉重叠，长度约为腹部长度的两倍（参见图 1）；

眼睛颜色为砖红色，饱满圆形（右图 9-A）；

翅膀有横隔脉（下图 9-B）；

头胸部以及复眼的周围具有平直，先端略弯的长型粗黑硬毛——刚毛（下图 9-C）。

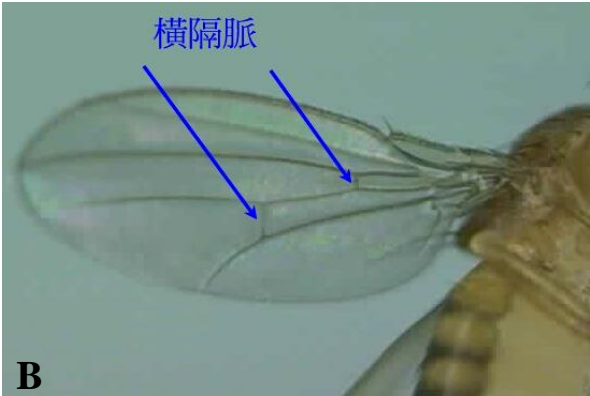
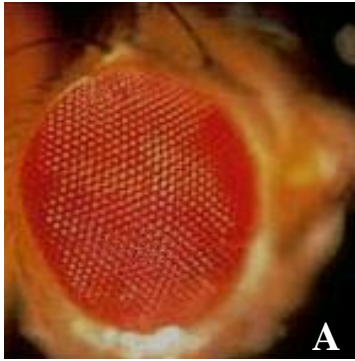


图 9：野生型果蝇的形态特征

果蝇具有丰富的外表型态差异，常见突变体包括眼色、眼形、翅形，刚毛形状与数目：

表 1：果蝇常见突变性状

突变性状	基因符号	染色体号	性状特征	图示
野生型	+		见上文	图 9
棒眼	B	1	复眼呈狭窄垂直棒形，小眼数少	图 10
朱红眼	v		眼睛颜色呈现亮红朱色	图 11
褐眼	bw	2	眼呈褐色	暂无
白眼	w	1	复眼白色	图 12
猩红眼	st	3	复眼呈明亮猩红色	暂无
墨色眼	se	3	羽化时眼呈褐色并深化成墨色	图 13
小翅	m	1	翅膀缩短，长度约略腹部尾部	图 14

卷曲翅	Cy	2	翅膀尾端卷曲上翘，纯合致死	图 15
残翅	vg	2	翅明显退化，部分残留，不能飞	图 16
粗短翅型	dp		翅膀缩短呈三角形	图 17
外开翅型	D		翅膀平放时无法重叠	图 18
缺横隔脉	cv		翅膀上无横隔脉	图 19
黄体	y	1	全身呈浅橙黄色	图 20
黑檀体	e	3	身体呈乌木色，黑亮	暂无
黑体	b	2	体黑色，比黑檀体深	暂无
叉毛	f	1	毛和刚毛分叉且弯曲	图 21
短刚毛	Sb		刚毛缩短变粗	图 22

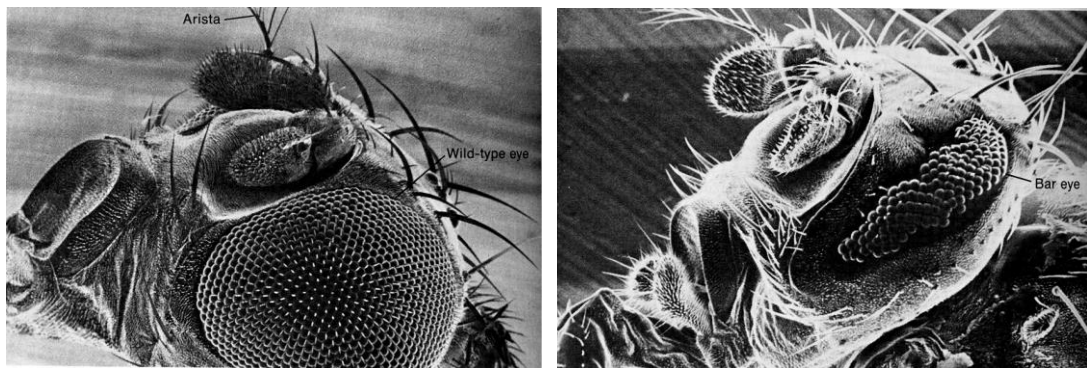


图 10：棒眼突变体。左图：野生型，右图：棒眼



图 11：朱红眼突变型 (v)



图 12：白眼突变型 (w)



图 13：墨黑眼突变型 (se)



图 14：：小翅突变型 (m)



图15: 卷翅 (Cy) 突变型



图16: 残翅突变型 (vg)



图 17: 短翅突变型 (dp)



图 18: 外开翅型突变型 (D)



图 19: 无横隔脉突变型 (cv)



图 20: 黄体突变型 (y)



图 21：短刚毛突变型 (Sb)



图 22：叉毛突变型 (f)

三、实验材料

不同品种果蝇、培养瓶、高压锅、果蝇培养基、乙醚、麻醉装置、实体显微镜。

四、作业和思考题

1. 观察果蝇成体的外部性状，包括体色、翅形、眼形和眼色、刚毛等。比较同一品种雌雄果蝇成体的外形区别（画图并标注特征）。
2. 为什么要研究果蝇，有何重要发现，对你有何启发？
3. 科学发现的动力是什么？好奇心或功利心？

五、精选拓展阅读

1. 果蝇的自白：我与诺奖得主们的那些事儿
(<https://mp.weixin.qq.com/s/1RX8j97LCk01X7oLiG3sxw>)
2. 科学网—老兵不死：百年亿蝇为哪般？ - 饶毅的博文
(<http://blog.sciencenet.cn/blog-2237-687712.html>)
3. 科学网—摩尔根与遗传学：研究与教育 - 饶毅的博文
4. 勇气和运气：生物钟的分子研究 | 饶毅深度解读 2017 年诺奖
5. 本泽传奇：我要一直走在最前沿，直到头发斑白、慢慢老去_腾讯网
6. 如何把自己的导师“捧”成诺奖得主

实验一、《果蝇遗传综合实验》之

——②果蝇唾腺染色体制片与观察

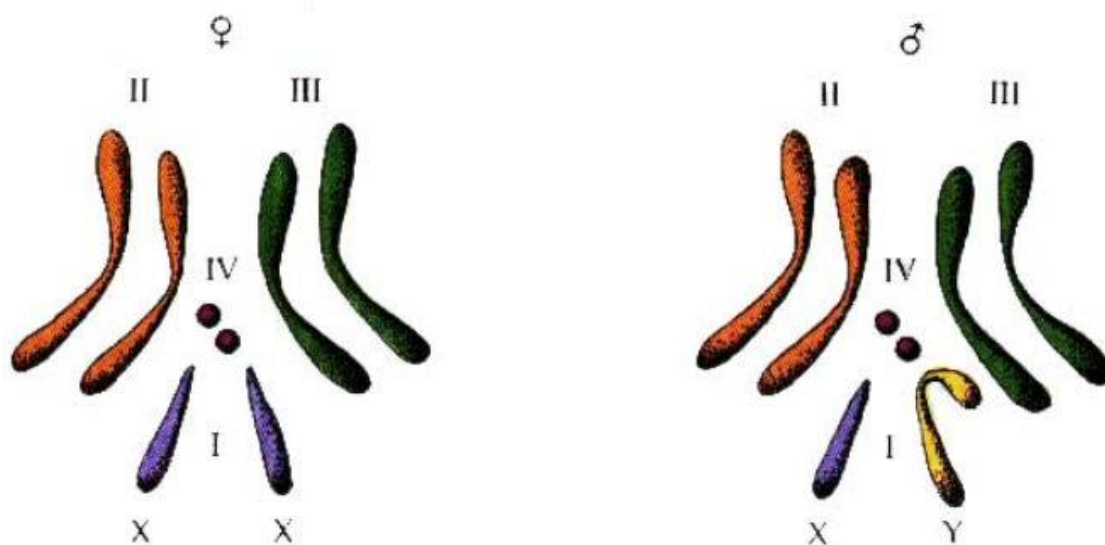
一、实验目的

1. 学习果蝇幼虫的解剖方法；
2. 学习果蝇唾腺染色体标本的制片方法；
3. 观察果蝇唾腺染色体及其某些特殊结构。

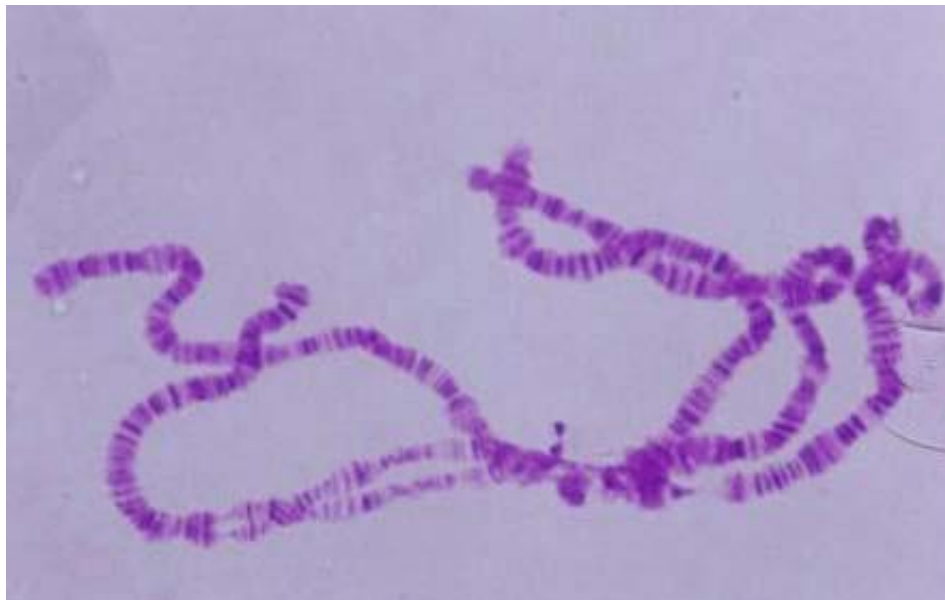
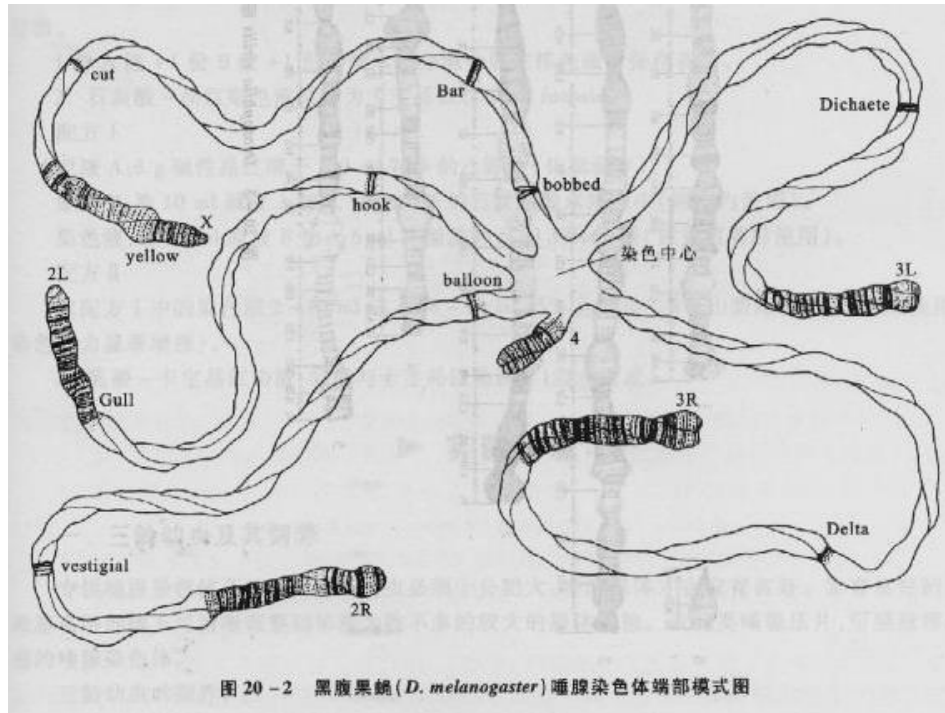
二、实验原理

果蝇的唾腺染色体是**多线染色体**（polytene chromosome）——即 DNA 复制而染色体不复制，细胞也不分裂，从而导致一条染色体中含有多条 DNA 链。经多次复制可形成约 1000~4000 拷贝的染色体丝，合起来达 5 μm 宽，400 μm 长，比普通中期相染色体大得多（约 100~150 倍）。由于这种多线染色体体积较大，又称“巨（大）染色体”，多发生在双翅目昆虫（果蝇、摇蚊等）幼虫期的消化管细胞中（从唾腺到直肠）。

由于多线染色体的形态、结构上的变化比较容易被观察到，所以是遗传学和细胞学乃至分子生物学的重要研究材料，一些遗传学上的问题可以通过这种观察了解到。如：**基因定位**——多线染色体上的条纹是基因所在的位置或基因定位的标记；**染色体畸变**——如重复、缺失等；**个体发育的基因调控**——多线染色体上的膨大部分，即“疏松区”是正在转录的部分；等。



注：在黑腹果蝇中，第 I 为端着丝粒染色体，第 II、III 均为中着丝粒染色体，第 IV 为点状染色体。果蝇唾腺染色体可见 5 条很长的和一条紧靠中心的短小染色体构成（Y 染色体不与 X 染色体联会其着丝粒及其附近的异染色质参与染色中心的形成，并不可见）。



三、实验准备

- ✧ **器材：**解剖镜、显微镜、解剖针、载玻片、盖玻片、滤纸条等。
- ✧ **试剂：**生理盐水 (100ml)，1N HCl(50ml)，改良苯酚品红(又称卡宝品红 50ml)等。

注：改良苯酚品红配方

原液 A：3 g 碱性品红溶于 100ml 70%的乙醇中（长期保存）。

原液 B：取 10 ml 原液 A 加入 90ml 5%的石炭酸酚水溶液中（两周内使用）。

染色液：取 55 ml 原液 B 加入 6 ml 冰醋酸和 6ml 37% 甲醛（棕色瓶，放置两周后使用）。

四、实验步骤

1. 在擦**干净**（否则材料容易脱落）的**较薄**载玻片（有利于油镜观察和拍照）上，滴上 1 滴生理盐水（目的是维持细胞的渗透压，以免细胞吸水涨破），从饲料瓶中挑选行动迟缓、肥大的**三龄幼虫**（此时唾腺才发育良好，可望获得理想的唾腺染色体，**最好已经挂在培养瓶壁上的了**）放入生理盐水中，若幼虫上沾有较多的杂质，可以用生理盐水清洗幼虫。

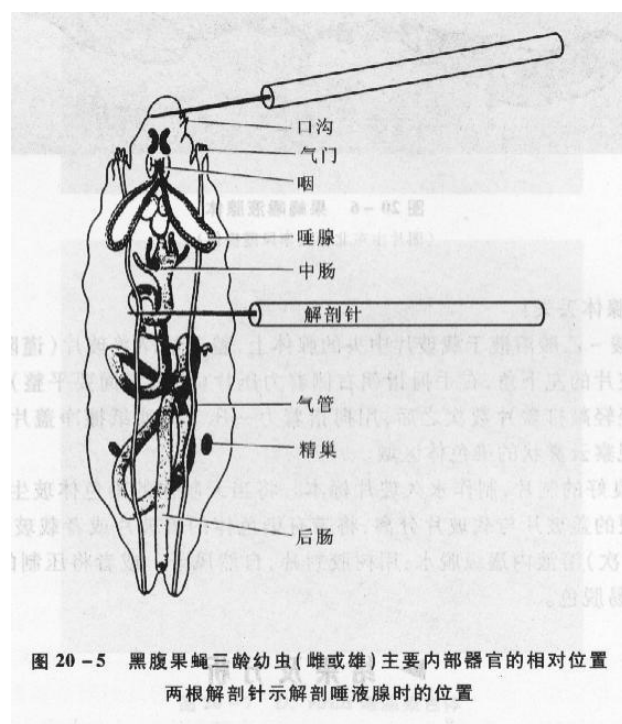
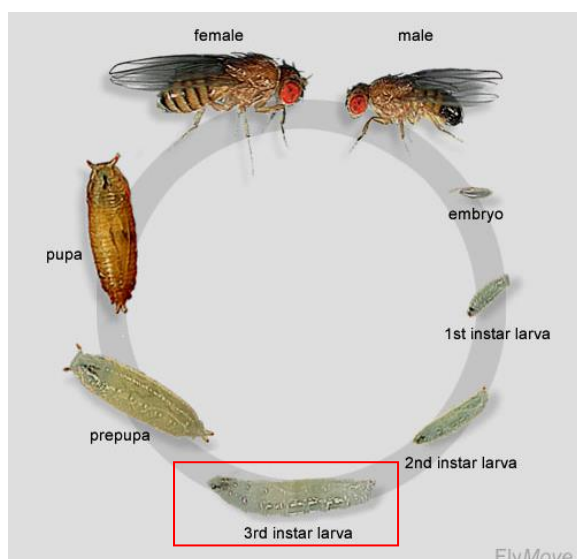


图 20-5 黑腹果蝇三龄幼虫(雌或雄)主要内部器官的相对位置
两根解剖针示解剖唾液腺时的位置

2. 在解剖镜下，左手拿一解剖针轻轻压住幼虫**离头部 1/3 处**，固定幼虫；右手拿一解剖针自幼虫的口器处按住幼虫头部，用力向右拉开，解剖出一对**唾腺**（入射光绿色背景下为**半透明**边缘附有乳白色脂肪体，表面呈**网格状**；在透射光下为**不透明**），剔除脂肪体（是为了**染色效果好**和载玻片干净），清理掉其他部分，只留下唾腺。
注：唾腺解剖出来之后，所有的操作要十分小心，稍有不慎，将会前功尽弃。
3. 在唾腺上加 1 滴 1N HCl（目的是水解掉 DNA 上结合的非组蛋白，有利于染色），室温水解 10-15 分钟（依室温不同而异）。
4. 用吸水纸小心地吸去 HCl，用蒸馏水冲洗 2 次（同样用吸水纸小心吸去蒸馏水）。
5. 加**改良苯酚品红染色液** 1 滴，染色 10-15 分钟，可以在显微镜下观察染色程度。

6. 盖上**洁净**盖玻片（**谨防产生气泡**），放在平的桌子上（上下各垫吸水纸），先轻轻压一下，吸去多余的染液，再用大拇指**用力压片**（**谨防盖玻片移动或压断载玻片**），或用铅笔的末端轻轻反复敲击盖玻片，直至红色的唾腺**充分散开**。
7. 在显微镜下镜检，如果分裂相好，画图或拍照。

五、作业

1. 你观察到的唾液腺染色体照片，及其成或败的主要原因。

六、实验注意事项

1. 唾腺的结构：在唾腺的前端两侧各延伸出一根细管，向前汇合为一，形成一个三叉形的唾腺管伸入口腔。果蝇的唾腺是由**单层**细胞构成的，在解剖镜下可以隐约看见其细胞界限，唾腺的侧面常带有少量海绵状脂肪体。
2. 幼虫的培养：对用来制作唾腺染色体标本的果蝇幼虫，要求较好的培养环境，可以在培养基中多加糖少加琼脂。培养瓶中的幼虫不宜太多，最好每隔 2 天将羽化的新果蝇移出一次，以免在瓶内产过多的卵。此外，应在较低的温度下进行培养（18-22℃），这样长成的幼虫较大，易于操作。
3. 果蝇唾腺的大小与品种有关，以黑檀体果蝇为好。
4. 取材时应取充分发育的**三龄幼虫**；取材时，由于果蝇幼虫钻在培养基中不易取出，可以将培养基**稍许加热**，使之爬出来。

实验一、《果蝇遗传综合实验》之

——③果蝇杂交实验

一、教学要求

- 1、了解果蝇的生活史，辨别果蝇在其生活史各个阶段的形态特征；
- 2、熟练掌握处女蝇的收集方法；
- 3、掌握果蝇杂交实验的基本操作方法；
- 4、掌握不同杂交实验的不同要求。

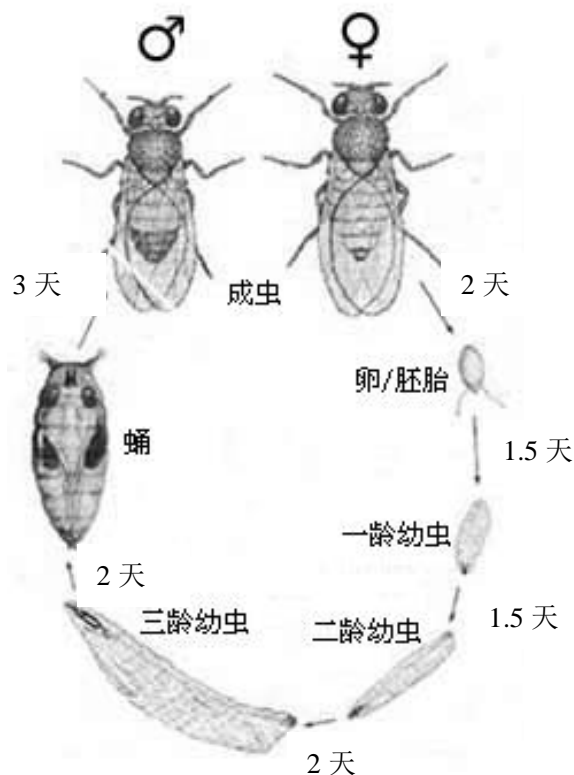
二、教学内容

1、果蝇的生活史及其与杂交实验的关系

果蝇的生活周期包括卵、幼虫、蛹和成虫四个完全变态的发育阶段，其中幼虫又分为一龄、二龄及三龄三个时期（图6）。从卵发育至新羽化的成虫为一个完整的发育周期，在 25℃，60%相对湿度条件下，大约为 12 天。通过控制养殖的温度，可以加速和减缓果蝇的发育。

新羽化的雌性成虫大约 8 小时之后即可与雄虫进行交配，交配之后大约 40 小时开始产卵（受精卵），第 4-5 天出现产卵高峰。性成熟雌性果蝇生殖能力很强，产卵初期每天可达 50~70 枚，累计产卵可达上千枚。卵很小，肉眼勉强可见；卵经过 24-48 小时发育成为一龄幼虫，一龄幼虫体型增大后，经过蜕皮发育成为二龄幼虫，需要 24-48 小时，二龄幼虫，经过相似的过程成为三龄幼虫，也需要 24-48 小时。此时果蝇幼虫的体型达到最大，约 2~3 毫米，是进行幼虫解剖研究的最佳时期（如：果蝇唾液腺染色体标本制备时解剖获取唾液腺）；所有幼虫均为白色略透明状；三龄幼虫经过 2-3 天的生长和发育成为蛹，化蛹之前从培养基中爬出来附着在瓶壁上或附着在培养基中的滤纸片上，逐渐形成一个梭形的蛹，初时为黄色，随着发育的进程逐渐转变为黄黑色；幼虫在蛹壳内完成成虫体型和器官的分化，经过 3-4 天后，最后从蛹壳的前端爬出来成为下一代的雌雄成虫。这一过程叫做羽化。从交配到下一代成虫性成熟，即完成了一个生活周期。

果蝇杂交时，必须在合适的时期取成体进行分养或交配。所以，正确掌握在不同条件下果蝇生活周期的变化（时间长短？是否造成不育？）对杂交成功至关重要。



2、果蝇杂交实验应该注意的事项

- a) **正确区分雌雄果蝇：**因为在杂交时往往是用某一性状的雌亲与相对性状的雄亲杂交，如果不能正确区分雌雄果蝇，可能会造成杂交组合的混乱（既有杂交，也有同品种交配）。
- b) **杂交亲本必须取用处女蝇：**新羽化的雌性成虫在羽化后的 8 小时内尚无交配能力，大约 8 小时之后即可能进行交配，交配后两天开始产卵。交配之前的雌果蝇叫做“处女蝇”。由于**雌果蝇生殖器官中有储精囊**，一次交配后可储存大量精子，供多次排卵受精用，因此做杂交实验前必须收集未交配过的处女蝇，否则实验结果是不可靠的。

注：收集处女蝇的方法

- 将原种瓶中的成虫全部清除，此后每隔 8h（**绝对不能超出 12h**）收集刚羽化的成虫，将准确鉴别性别的雌性和雄性果蝇分别放入培养瓶中备用。（本实验采用）
 - 由于**刚羽化的果蝇**，其身体细长而幼嫩得几乎透明，从腹部的腹面透过几丁质的外壳，可以看到腹腔内的黑色消化道，可观察到黑色消化道的雌性个体为处女蝇。
 - 用鉴别**雌性蛹**的方法收集处女蝇：用带一滴生理盐水（0.9%NaCl）的解剖针小心地挑取黑色蛹，放在浸过生理盐水的滤纸条上，在解剖镜下观察，若第一对足的第一跗节处看不到“一对块状的黑色结构”的即为雌性蛹，将其收集到滤纸条上，小心插入新鲜培养基，羽化后即为处女蝇。
- c) **尽快杂交（经过 5-7 天隔离饲养）：**果蝇的成虫可生活 26-33 天，产卵 400-600 枚。生活周期较短，所以取到“处女蝇”之后，应该尽快按照预先设计好后杂交方案捉对进行交配。
 - d) **果蝇亲本的麻醉：**

杂交实验前要先麻醉果蝇，使它保持静止状态。操作方法与步骤见实验 1：

注意：用来选择杂交实验亲本的果蝇，不能过度麻醉，否则会影响果蝇的生活力。果蝇的麻醉状态和麻醉后死亡的区别以翅膀是否外展为依据。麻醉状态的果蝇两个翅膀仍然重叠在背腹上。而死亡的果蝇翅膀离开腹部呈外展状态，不管外展程度如何，都按死亡果蝇对待，切不可选这种状态的果蝇做杂交用的亲本。

- e) **果蝇亲本放入饲料瓶中：**处于麻醉状态的果蝇亲本放入饲料瓶中时，要注意不要让饲料（很粘！）或瓶壁上的水粘住果蝇！（瓶子在果蝇醒来前平放）

- f) **培养温度：**果蝇生活周期的长短与温度有密切关系，适宜温度为 20℃—25℃。25℃时从卵到幼虫约 12 天，成虫约成活 15 天。如果超过 30℃，会造成雌蝇的育性下降或不育，甚至可引起果蝇的死亡。相反把环境温度降低到 10℃，果蝇的生活史周期可延长到 50 多天，这时果蝇的生活力会很低。所以，果蝇一般培养在恒温箱里，盛夏时，要特别注意降温。

	10℃	15℃	20℃	25℃
卵→幼虫	57 天	18 天	8 天	5 天
幼虫→成虫	—	—	6.3 天	4.2 天

- g) **果蝇存活：**在不供给食物的情况下，果蝇可存活 50 小时左右，在不供给水的情况下，果蝇无法活过一天。蛹期果蝇在其正常 5 天生活周期下可取食其体重 3~5 倍之食物，雌果蝇在产卵期每日可取用与其体重等重之食物。果蝇成虫的食物内需有糖类，而蛹期果蝇则可只依赖酵母即可生育。
- h) **杂交实验目的：**一般为通过对杂交后代的统计分析，验证某一规律或发现不同性状之间的连锁关系、遗传模式等。杂交的方式：有杂交、测交、回交等，必须根据不同的实验目的设计杂交组合。

注意：杂交所涉及的基因对数可以是一对（单因子杂交），也可以是多对（双因子或多因子杂交）；所选的因子可以是连锁的，也可以是不连锁的。一般来说，试验者总是希望能够通过最少的杂交次数来阐明更多的遗传规律或者获得最多的遗传信息。这就需要有多个性状同时发生突变的突变体。但是在常规条件下，突变体在生长和繁殖能力等方面往往不如野生型，性状突变越多，突变体的生长和繁殖能力往往越弱。但是作为遗传学统计的基本假设就是：各种不同基因型在生长和获得生殖的机会是均等的，如果事实上两个杂交亲本之间的生长和繁殖能力差异过大，则必然会影响杂交的统计结果。所以，在设计实验时必须考虑这一点。

三、本次实验目的和内容

- a) **实验目的：**
- 通过杂交实验，对果蝇 F_2 代进行统计，来验证分离规律、自由组合规律和性连锁规律；
 - 学习果蝇的杂交操作方法；
 - 学习实验数据的统计和处理方法。
- b) **实验原理：**用纯种的显性性状果蝇和相应的隐性果蝇杂交， F_1 代为全杂合子。 F_1 代进行自交得到的 F_2 代，会出现分离，统计 F_2 代中各种类型的表

型比率，可以验证所选的 2 对等位基因的关系（连锁或自由组合），同时可以观察到每一对等位基因（相对性状）的分离。

c) 实验准备：

- i. 教师准备：饲料瓶、果蝇种蝇、死蝇残留器、解剖镜、放大镜、培养箱、干毛笔、麻醉瓶、培养皿、胶水、白瓷板等
- ii. 学生准备：镊子、解剖针、剪刀、标签纸、文具盒

d) 实验步骤：

- i. 种蝇的繁殖：将纯种果蝇捉对放入饲料瓶中（每瓶中 4-5 对为宜），1 周左右，待有幼虫出现后移去种蝇。
- ii. 移去成虫后，每 8 小时取一次处女蝇，雌雄分开饲养，直到收集到足够的**处女蝇**为止（约 5-6 天）。
- iii. **杂交**：将收集到的处女蝇进行正、反杂交（每组做一个正交，一个反交），每瓶中饲养 4-5 对果蝇，**标明杂交组合、操作者、日期等**（若带回宿舍谨防瓶塞掉出，瓶子摔破，避开阳光直射，保温）。

正交若为： $X^+X^+ \text{♀} \times X^wY \text{♂}$

反交即为： $X^wX^w \text{♀} \times X^+Y \text{♂}$

- iv. 1 周后，待有幼虫出现后移去亲本。处死果蝇，放入死蝇残留器中。
- v. 2 周后，观察 F_1 ，**记录结果**（正、反交有什么不同？）。两个组合分别取 F_1 代 4-5 对，放入新的饲料瓶饲养繁殖 F_2 代（此处无需处女蝇，为什么？）。
- vi. 3 周后，统计全部 F_1 。移去 F_2 代繁殖瓶中的 F_1 代。
- vii. 4 周后，统计 F_2 代。
- viii. 处理实验结果，将本组结果和全班结果分别进行统计，并做 χ^2 测验，写出实验报告。

四、作业

1. 根据实验经过和结果（自己组的实验数据及全班的实验数据分别做卡方测验）写 1 份实验报告，要求结合遗传学有关的内容进行分析和讨论。

五、注意事项：

1. 在上述实验中，何时需要选用处女蝇？何时不需要？为什么？
2. 如果在 F_1 代中出现了隐性性状，你作何解释？
3. 果蝇的生活史中各个时期的长短与培养温度有关。
4. 果蝇的原种保存：10-15℃为宜，至少保持 4 瓶，分 2 处存放。
5. 果蝇的处理动作要尽可能地快，及时盖上盖子，以防果蝇飞出。
6. 选择麻醉后的果蝇也要快，选出后用干毛笔将其放入**横放**的饲料瓶中，待瓶中的果蝇苏醒后再将瓶子放成正常位置。
7. 如果瓶壁上有多余的水珠或培养基，应尽可能地避免将果蝇直接放在上面，如无法避免可用棉球或吸水纸擦干后再用。
8. 统计后的果蝇一定要放入死蝇残留器中，不可随意乱扔。

实验二、《细胞分裂综合实验》之

——①减数分裂标本的制备与观察

一、实验目的

1. 学习并掌握减数分裂标本的制作方法和技术；
2. 掌握减数分裂过程中染色体的动态变化规律；
3. 深刻理解减数分裂与遗传、变异和不孕不育的关系；
4. 深刻认识保护好自己生育能力的重要性和迫切性。

二、实验原理

减数分裂(meiosis)是生物在形成性细胞过程中的一种特殊的细胞分裂方式。在此过程中，二倍体($2n$)的性母细胞，连续进行2次细胞分裂，而染色体仅复制1次。结果，在1个性母细胞所形成的4个子细胞中，染色体数目减少一半。也就是说每个子细胞中只具有单倍的染色体(n)。

减数分裂在遗传上具有重要的**意义**。性母细胞($2n$)经过减数分裂，形成染色体数目减半的配子(n)。经受精作用，雌、雄配子融合为合子，染色体数目恢复为 $2n$ 。这样，在物种延续的过程中，确保了染色体数目的恒定，从而使物种在遗传上具有相对的稳定性。另外，在减数分裂过程中，包含有**同源染色体的配对、交换、分离和非同源染色体的自由组合**，这些都为遗传学上的**分离、自由组合和连锁互换规律提供了细胞学基础**，并导致了各种遗传重组的发生，为生物的进化提供了物质基础。

减数分裂包括第一次减数分裂(MI)和第二次减数分裂(MII)。在玉米的两次分裂之间，有一短暂的间期(有些生物则没有间期)。本实验通过玉米雄穗取材(注意在**适当时间进行**)→固定保存→取样清洗→染色→压片→观察(注意**区分小孢子母细胞与花粉壁细胞的区别**)，了解并掌握减数分裂的全过程及其染色体的动态变化情况。

三、实验准备

- **器材：**显微镜、镊子、解剖针、载玻片、盖玻片、培养皿、酒精灯、吸水纸等。
- **试剂：**玉米雄穗、卡宝品红等

四、实验步骤

1. **玉米雄穗的采集和存放（老师已做好）：**在玉米雄穗尖端露出以前 7-10 天手摸植株上部(喇叭口下部)有松软感觉时，用刀片划开茎叶，取下幼穗分枝若干条（顶端花药长 2—4mm，**花药尚未变黄**），固定于新鲜卡诺氏固定液中。24 小时后，依次换入 90%、80%和 70%乙醇溶液，最后于 70%乙醇溶液中存放于 4℃冰箱中待用。
2. **玉米雄穗上的分裂时期：**玉米雄穗以中部偏上区域为比较成熟的部分，从此往尖端或基部，小穗逐渐幼嫩。小穗是成对存在的，无柄小穗的发育时期比邻近的有柄小穗的发育时期要早。每小穗中有两朵小花，各有花药 3 个，第一朵小花比第二朵小花幼嫩，而同一朵小花的三个花药几乎处于同一发育时期。

注意：取不同发育时期的白色花药（黄色的已完成减数分裂），进行混合制片是实验成功关键。

3. **涂抹制片的方法和步骤：**先将少量玉米雄穗分枝取出置于载玻片上，用解剖针从其上、中、下各取一个小穗。从小花内挑出 2-4mm 长的白色花药（**其它雄穗进行回收**），加蒸馏水洗 2 篇。加一滴卡宝品红染液（**染色约 10min，过长会导致染色过深，影响观察效果**），并用刀片切碎花药（使花粉母细胞释放出来）。染色十分钟后，加一滴蒸馏水后盖上盖玻片，在酒精灯上轻微加热（以利于进一步着色和染色体的分散）。在盖玻片上覆以吸水纸用拇指适当加压，把周围的染液吸干后(勿使盖片移动)，置于显微镜下，先用 10 倍物镜观察，再在用 40 倍物镜拍照。

五、实验说明

1. 玉米 $2n=20$ 。
2. 取材时期是实验成败的关键，必须取合适时期的花药进行混合制片。
3. 注意区分花粉母细胞与花药壁细胞，明了小孢子形成过程中各时期细胞的形态特征。
4. 为观察减数分裂过程，现把**减数分裂各时期最主要的特点**介绍如下：
 - 1) . **间期 I**：玉米的减数分裂中，间期细胞染色质松散，核内染色较为均匀。
 - 2) . **减数第一次分裂**
 - 2.1) **前期 I**：整个前期，持续时间长、染色体变化较为复杂，它可分为五个亚期。
 - (1)**细线期**：染色体呈现细丝状，首尾不分地绕成一团。核仁明显。
 - (2)**偶线期**：同源染色体开始配对联会。
 - (3)**粗线期**：染色体逐渐变粗变短。在良好的制片中，可以数出染色体的对数。由于每条染色体已经复制为二，而着丝点还未分开，这样的染色体称二价体。
 - (4)**双线期**：染色体更为缩短。配对的染色体开始互相排斥而分开，此时可以看到染色体的交叉现象。
 - (5)**浓缩期(终变期)**：染色体最为粗短，是染色体计数的最好时期。
 - 2.2) **中期 I**：核仁、核膜消失，纺锤体(spindle)形成，染色体排列在细胞的赤道面上。但每对同源染色体的着丝点分、处在赤道面的两侧。
 - 2.3) **后期 I**：同源染色体彼此分开，移向细胞两极。由于此时着丝点未分开，所以细胞两极的染色体数是性母细胞的一半，但每条染色体中依然含有两条单体。
 - 2.4) **末期 I**：染色体到达细胞两极后逐渐解旋。核仁、核膜重新出现，在赤道面处形成新的细胞板 1 个性母细胞分裂为 2 个子细胞。每个子细胞中含有单倍的染色体(n)。
 - 3) . **减数第二次分裂**

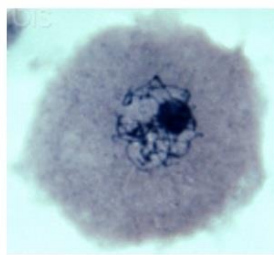
- 3.1) **前期II**：前期II与有丝分裂的前期一样，每条染色体都具有两条单体，不同的是前期II的细胞仅有半数的染色体(n)，而有丝分裂的前期，染色体数为2n。
- 3.2) **中期II**：染色体浓缩变短，着丝粒排列在细胞赤道面上，纺锤体出现，每条染色体的姐妹染色体呈分离状态，但着丝点仍未分开。
- 3.3) **后期II**：着丝点完成复制，彼此分开。每一染色体纵裂为二，姐妹染色单体开始移向细胞的两极。
- 3.4) **末期II**：移向细胞两极的染色体逐渐解旋，核仁、核膜出现。在细胞的赤道面出现细胞板，每个细胞分为两个子细胞。

前期I (Prophas I)



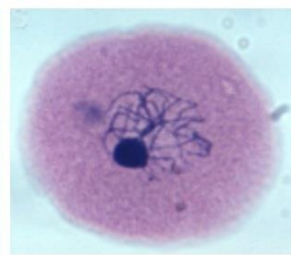
细线期(Leptoene)

染色质浓缩为细线



偶线期(Zygotene)

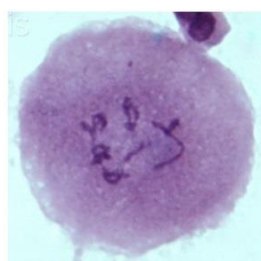
同源染色体开始联会 (Synapsis)



粗线期(Pachytene)

染色体互换 (Chromosomal crossover)
同源重组 (Homologous recombination)

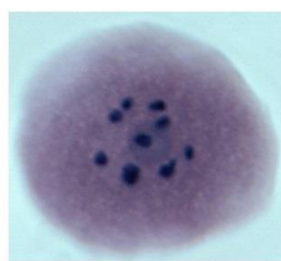
前期I (Prophas I)



双线期(Diplotene)

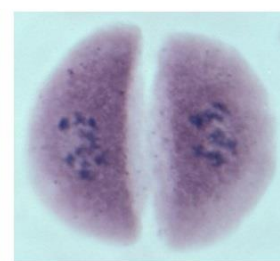
同源染色体分开交叉端化

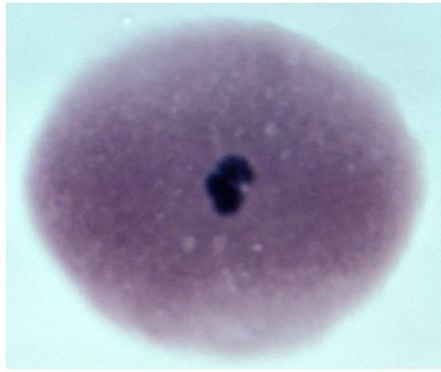
前期II (Prophas II)



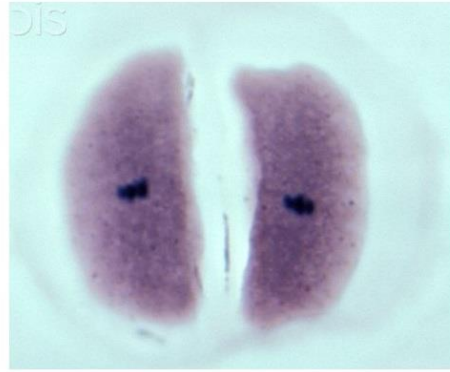
浓缩期(Diakinesis)

染色体高度螺旋化，变得更为粗短

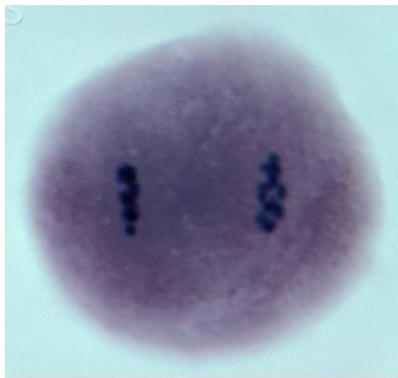




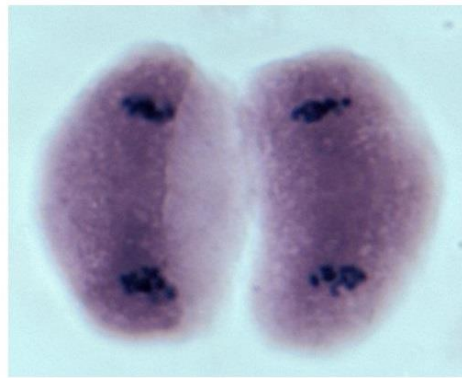
中期I (Metaphase I)



中期II (Metaphase II)



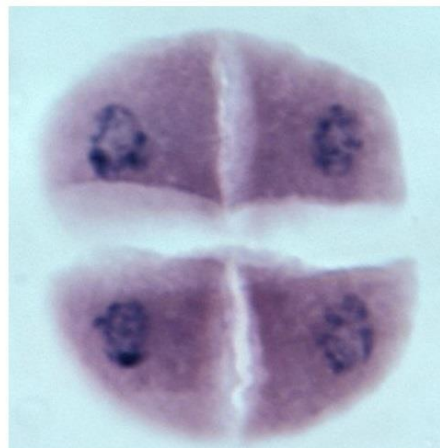
后期I (Anaphase I)



后期II (Anaphase II)



末期I (Telophase I)



末期II (Telophase II)

经过这样的减数分裂，一个性母细胞分裂形成 4 个子细胞，即四分孢子，四分孢子花粉囊中进一步发育成为花粉粒。

六、作业及思考题

1. 找到你所制作片子 3 个以上分裂相，拍照并说明其时期和特点。
2. 课外查阅资料，简述不育不孕的原因、研究进展和难题？
3. 简述保护自己生育能力的重要性和迫切性，及你的方法。
4. 简述人口结构及再生产与中华民族伟大复兴的关系。

七、课外作业

1. 科学网—细胞分裂的分子原理 - 饶毅的博文
2. 科学网—遗传学家的遗传秘密 - 饶毅的博文
3. 科学松鼠会 » [诺贝尔 2010]爱德华兹：试管婴儿荆棘路
4. 我们为什么生孩子？从生育理由到孕期焦虑
5. 年轻人，你们的造人计划还能拖多久？ - 今日头条(TouTiao.com)
6. PGD、PGS、NIPT 傻傻分不清楚？一文读懂！
7. 精华盘点：端粒与人类疾病！
8. 科学网—遗传学史（5）——麦克林托克的玉米情缘 - 冯永康的博文

实验二、《细胞分裂综合实验》之

——②洋葱根尖有丝分裂标本的制备与观察

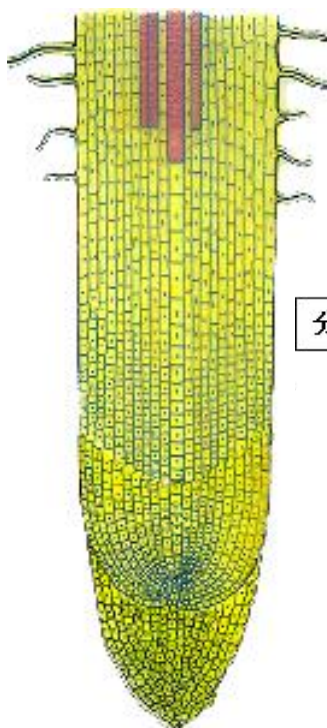
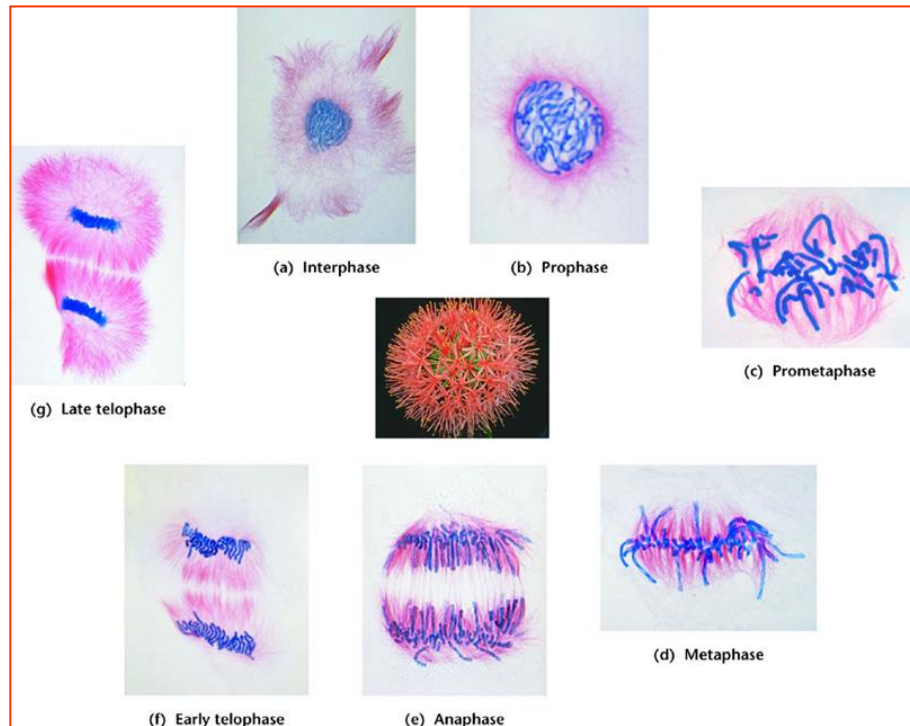
一、实验目的

1. 掌握植物染色体压片方法；
2. 了解并掌握有丝分裂的全过程及其染色体的动态变化情况；
3. 深刻理解细胞周期调控和有丝分裂异常与肿瘤的关系。

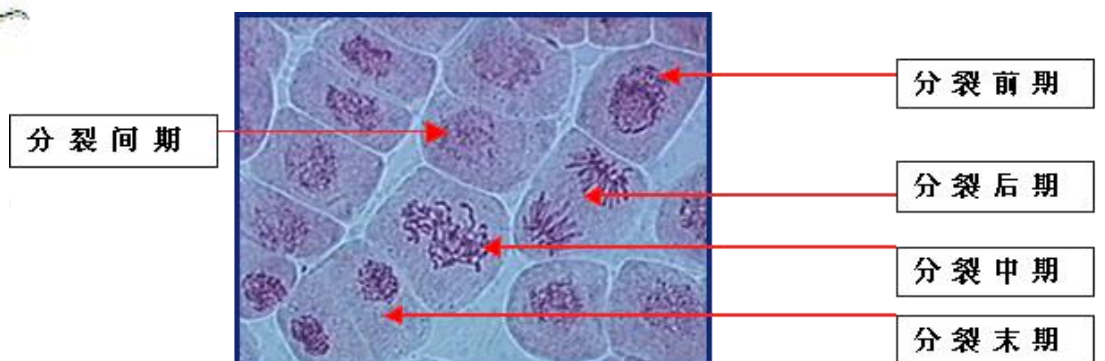
二、实验原理

有丝分裂（mitosis）是细胞均等增殖的过程，是体细胞分裂的主要方式之一。在有丝分裂过程中，细胞内每条染色体都能复制一份，然后分配到子细胞中，因此两个子细胞与母细胞所含的染色体在数目、形态和性质上是相同的。在各种生长旺盛的组织中均存在着有丝分裂。

有丝分裂包括两个紧密相连的过程：核分裂和细胞质分裂。有丝分裂时，染色体呈现连续的、动态的变化，一般可分为：间期、前期、中期、后期和末期 5 个时期。本实验通过洋葱根尖分生组织→固定→解离→染色→压片→观察（间期、早期、中期、后期、末期），了解并掌握有丝分裂的全过程及其染色体的动态变化情况。



洋葱根尖



三、实验准备

- **器材：**镊子、刀片、显微镜、载玻片、盖玻片、滤纸等
- **试剂：**卡诺氏固定液（无水乙醇或 95%乙醇：冰醋酸=3：1）；卡宝品红；1N 盐酸等

四、实验步骤

1. **洋葱根尖培养（老师已做）：**选洋葱鳞茎，剥除干枯表皮，置于一盛清水的烧杯上，让清水没过根部，培养至根长 1-2cm 时，切取根尖进行固定。（注意：要经常换水）
2. **固定（老师已做）：**将根尖用蒸馏水冲洗两次，移入盛有卡诺氏固定液的小广口瓶中室温下固定 **24** 小时（固定液的量为材料的 10-15 倍以上）→蒸馏水冲洗至闻不到乙酸味后移入 70%的酒精中 4℃保存。
3. **解离：**取 2-3 条 70%酒精中保存的根尖，用蒸馏水漂洗后，放入 1.5ml EP 管中。加入 1N 盐酸（浸没即可）后，60℃水浴 8-10min（除分生组织呈米黄色外，根别的部位透明）。蒸馏水洗 3 次，每次 5min。（注：解离的**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，使细胞和染色体容易分散压平。酸解过度使 DNA 完全解聚，核酸分子扩散到细胞质中，从而造成染色浅或不匀一的现象。）
4. **染色：**将根尖置于载玻片中央，去除透明部分、留下乳白色的**分生组织**，用刀片切碎后，加一小滴卡宝品红染色 10min。吸去多余染液，加一滴蒸馏水清洗后吸去。
5. **压片：**滴一滴蒸馏水，加盖玻片，用左手一个手指压住盖玻片的一角，右手持铅笔头对准根尖处敲击，使组织呈**云雾状**。在盖玻片上覆滤纸条，用拇指**垂直按压片**（注意不要敲碎载玻片，也不要使盖玻片移动，压片时要在水平、坚硬的实验台上进行）。
6. **镜检：**观察有丝分裂不同时期的细胞学特征，找出间期、前期、中期、后期和末期 5 个时期的细胞。（好的片子可做成永久制片，保存。）

五、实验说明

5. 洋葱根尖 $2n=16$ 。
6. 要使染色体在一个平面上，根尖要切碎，压片要充分。
7. 有丝分裂不同时期的特征：
 - ✧ 间期细胞核内可见大而明显的核仁，染色质呈网状物。
 - ✧ 前期染色体细线状。
 - ✧ 中期染色体粗短，排列在赤道板上。
 - ✧ 后期可见一个细胞内的两组染色体。
 - ✧ 末期可见有核膜的两个子核。

五、作业及思考题

1. 找到有丝分裂 3 个以上时期，拍照并说明特点。
2. 课外查找文献资料，简述细胞周期调控机制及有丝分裂异常与肿瘤关系的。

实验三、DNA 指纹的遗传分析

一、实验目的

1. 了解并掌握 DNA 指纹分析的原理、方法和应用。
2. 掌握口腔细胞 DNA 提取、PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳。
3. 了解 DNA 分子标记的不同方法及其优缺点。
4. 思考分子标记的发展方向及应用，特别是如何帮助“不放过坏人，不冤枉好人”。
5. 了解 PCR 发现的历史，思考创新与创业的重要因素和对经济的推动作用。

二、实验原理

“DNA 指纹”是指可以利用 DNA 差异来进行与传统指纹分析相似的身份识别。DNA 指纹是以 DNA 的多态性为基础，而卫星 DNA 的发现则是其最重要的奠基石。卫星 DNA 是由一短序列（即重复单位或核心序列）多次重复而成，因此也有人称其为可变数目串联重复序列（variable numbers of tandem repeat, VNTR），在人类基因组中存在多种由不同重复单位组成的卫星 DNA。重复单位的碱基序列在不同个体中具有高度的保守性，而卫星 DNA 的多态性则来源于重复单位的重复次数不同，并形成了众多的等位基因。例如，人类 1 号染色体上的 VNTR *DIS80*，核心序列由 16 个核苷酸组成，拷贝数在 14-41 个之间，已知 29 种不同的等位基因。

1984 年 Jeffreys 等人首次将分离的人源小卫星 DNA 用作基因探针，同人类核 DNA 的酶切片段杂交，产生了由 10 多个条带组成的杂交图谱，不同个体杂交图谱上带的位置就像指纹一样因人而异，因而 Jeffreys 等人称之为 DNA 指纹图谱。产生 DNA 指纹图谱的过程叫做 DNA 指纹分析，目前包括 PCR、RFLP（限制性内切酶酶切片段长度多态性）和 RAPD（随即扩增多态性 DNA）等方法。

DNA 指纹图谱的基本特点：

（1）多位点性：基因组中某些位点的小卫星重复单位含有相同或相似的核心序列。在一定的杂交条件下，一个小卫星探针可以同时与十几个甚至几十个小卫星位点上的等位基因杂交。

(2) 高变异性: DNA 指纹图谱反映的是多个位点上的等位基因的特征, 具有很高的变异性。发现两个无血缘关系个体具有相同 DNA 指纹图谱的概率为 5×10^{-19} , 因此, 除了同卵双胞胎, 几乎不可能有两个人的 DNA 指纹图谱完全相同。

(3) 稳定的遗传性: DNA 指纹图谱中的谱带能够稳定遗传, 杂合带遵守孟德尔遗传规律。子代 DNA 指纹图谱中产生与双亲都不同的新带的概率 (基因突变) 仅在 0.001-0.004 之间。DNA 指纹图谱还具有体细胞稳定性, 即用同一个体的不同组织如血液、肌肉、毛发、精液等的 DNA 作出的 DNA 指纹图谱是一致的。

由于 DNA 指纹图谱具有这些显著的特征, 它已经成为最具吸引力的遗传标记。Jeffreys 是第一个意识到 DNA 指纹可以建立个人身份识别系统的人, 并且首先将其用于亲子鉴定、移民审查和凶案侦破。1989 年该技术获美国国会批准作为正式法庭物证手段。此外, 它还被用于医学诊断及寻找与疾病连锁的遗传标记, 探明动物种群的起源及进化过程, 在作物的基因定位及育种上也有非常广泛的应用。

【材料】

人类口腔细胞

【仪器与试剂】

1. 仪器

微量移液器、小型离心机、恒温水浴锅、旋涡振荡器、PCR 仪、微波炉、三角烧瓶、电泳仪、电泳槽、凝胶成像仪; 枪头、1.5 mL, 0.2 mL 离心管、棉签 (121℃ 高温灭菌)。

2. 试剂

NaCl, 琼脂糖, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, SDS, Tris, Proteinase K, 冰醋酸, 溴酚蓝, 二甲苯腈蓝, 蔗糖, 甘油, DNA 相对分子质量标记, Chelex 100 树脂 (Bio-Rad),

PCR pre-mix (TaKaRa) 。

3. 溶液配制

- (1) 无菌水：蒸馏水或去离子水，高温灭菌。
- (2) 5% Chelex 树脂：0.5 g 的 Chelex 100 (Bio-Rad)，10 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl，用 4 mol/L NaOH 调 pH 至 11，室温可保存 3 个月，用前充分混匀。
- (3) 0.9% NaCl：9 g NaCl，700 mL 无菌水溶解，定容至 1 000 mL，室温保存。
- (4) 2.0% 琼脂糖凝胶：称 2.0 g 琼脂糖放入 250 mL 三角烧瓶，加入 1×TAE 溶液 100 mL，微波炉加热溶解，冷却至 60℃ 作用倒胶板。
- (5) 1 µg/mL 溴化乙锭 (EB)：用无菌水配制 5 mg/mL 储存液，使用时稀释即可。
- (6) 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)：18.61 g Na₂-EDTA，2 g NaOH，蒸馏水定容到 100 mL，室温保存。
- (7) 10×TAE 电泳缓冲液：48.4 g Tris，11.42 mL 冰醋酸，20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)，蒸馏水定容至 1 000 mL，室温保存。
- (8) 10×上样缓冲液：0.25 g 溴酚蓝，0.25 g 二甲苯腈蓝，50 g 蔗糖（或 50 mL 甘油）。用 60 mL 无菌水（用 50 mL 甘油时，49 mL）溶解上述试剂，再定容至 100 mL，室温保存即可。
- (9) 10% SDS：10 g SDS 用无菌水溶解后（可加热），定容至 100 mL，室温保存。
- (10) 蛋白酶 K 溶液：5 mL 的 20 mg/mL 蛋白酶 K 水溶液，1 mL 的 10% SDS，94 mL 无菌水，冰箱冷藏。
- (11) 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)：将 12.1 g Tris 溶解在 80 mL 蒸馏水中，加盐酸调节 pH 至 8.0，加蒸馏水定容至 100 mL。
- (12) TE 缓冲液：1 mL 的 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)，0.2 mL 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)，加蒸馏水定容至 100 mL，高温灭菌。

4. 引物

Primer 1: 5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCCGCCG-3'

Primer 2: 5'-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCCTTGC-3'

【操作程序】

1. 收集 DNA 样本

(1) 漱口后,用灭菌的棉签充分擦刮口腔内壁,然后将该棉签头放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 无菌水,振荡 10 s, 10 000 r/min 离心 45 s。

(2) 取出棉签丢弃,注意不要搅动沉淀,如果不慎搅动,可以再次离心。

(3) 从离心管中吸出 970 μ L 无菌水,注意不要吸到沉淀。

(4) 向离心管中加入 200 μ L 5% Chelex 100 (用前务必混匀, 200ul 枪头剪一下,要吸到小珠子),振荡 10 s 混匀。

(5) 加入 2 μ L 蛋白酶 K,混匀,56℃保温 5 min。

(6) 剧烈振荡 10 s,沸水浴 8 min。

(7) 10 000 r/min 离心 3 min,离心管中溶液分成上下两层:下层为 Chelex 100 和细胞碎片的沉淀,上层溶液含 DNA 分子,可以直接用作 PCR 模板。

此 DNA 样本可在 4℃或-20℃保存,必要时可在使用前再次加热并离心,使管内物质分层。

2. PCR 扩增 *DIS80* 等位基因

(1) 每个人用记号笔在 0.2 mL PCR 管上做好标记。

(2) 准备冰盒,开始反应前尽量使 PCR 管保持在冰上。

(3) 依次加入下列成分,配制 25 μ L 体系的 PCR 反应溶液:

PCR pre-mix	12.5 μ L;
引物 1	0.5 μ mol/L;
引物 2	0.5 μ mol/L;
口腔细胞 DNA 样本	11.5 μ L;

- (4) 轻弹管壁，混匀溶液。
- (5) 离心 10 s，使管壁上的液滴落下。
- (6) 按下列程序开始 PCR 反应（约 50min）：

94℃，1 min → (94℃，15 s； 68℃，15 s； 72℃，15 s) × 35 个循环
→ 72℃，10 min → 4℃暂时放置，直至开始电泳。

3. PCR 扩增产物鉴定与 *DIS80* 等位基因分析

- (1) 用 1×TAE 电泳缓冲液配制 2%琼脂糖电泳凝胶（需 2 块大胶，用小梳孔，保证每人至少点一个孔，含万分之一的 GelRed 显示液）。
- (2) 完成反应的 PCR 管，放冰上待用或 4 度短期过夜 or -20 度长期保存。
- (3) 每人取 10 μL PCR 扩增产物上样，每块胶两端孔点 pBR322 DNA/MsP1 Marker 。
- (4) 60-120 V 预电泳 30-40 min。
- (5) 电泳完后凝胶用紫外分析仪观察，记录每个个体的 DNA 条带数目及其位置。

4. 观察和分析 *DIS80* 多态。

【结果与分析】

本次实验所选择的方法是 *DIS80* 指纹图谱分析的常用方法。人群中 *DIS80* 座位的杂合率约为 86%。从理论上讲，可能存在 435 种不同的等位基因组合。利用 *DIS80* 座位两侧序列设计的引物（Kasai et al, 1990），通过 PCR 反应很容易确定特定个体的 *DIS80* 等位基因构成，纯合体只有一条 DNA 带，而杂合体有两条不同的 DNA 带。

- 1. 将小组的电泳结果拍照，并把照片贴在实验报告上。对照片进行必要的说明，例如，相对分子质量标记各片段的大小（bp）。

2. 根据电泳结果，填写 *DIS80* 等位基因分析结果（表 1）：

3. 在班级中调查有无同学 *DIS80* 指纹图谱完全相同或部分相同。自行查找有关人群中 *DIS80* 各等位基因频率的资料，计算两个没有亲缘关系的个体，其 *DIS80* 指纹图谱完全相同或部分相同的概率。

表 1 结果记录表

	<i>DIS80</i> DNA 指纹特征		
学生姓名	大小/bp	长度（重复数）	杂合/纯合

注：因为重复数为 1 的 *DIS80* PCR 产物长 161 bp，所以重复数每增加一个，序列增加长度为 16 bp。据此可以推算：重复数 = $1 + (\text{PCR 产物大小} - 161) / 16$

【作业及思考题】

1. 分析自己和全班其他同学的 *DIS80* PCR 产物。
2. 简述分子标记的发展方向及应用，思考它是如何帮助“不放过坏人，不冤枉好人”的。
3. 简述 PCR 的发现历史，思考科学发现的重要因素及对经济的推动作用。

【参考文献及拓展阅读】

1. 乔守怡主编. 2018. 遗传学分析实验教程（第二版）[M]. 高等教育出版社
2. Eureka moment that led to the discovery of DNA fingerprinting
3. 基因检测的真相与谎言
4. 什么是 Y-STR 技术？Y-STR DNA 检测技术的神奇之处
5. 金州杀人狂破案记：千算万算，没算到会栽在一个 DNA 寻祖网站上
6. 分子诊断发展简史：三座丰碑
7. PCR 之父诺奖得主穆利斯去世：将生物学划分为两个时代
8. 一位科学家和一种细菌，让实验室“撒盐”如此快乐 | 果壳 科技有意思

实验四、小鼠骨髓细胞染色体制片与观察

一、实验目的

1. 学习并掌握滴片法制作染色体制片；
2. 掌握核型分析的概念、方法及重要应用；
3. 了解造血干细胞及其相关疾病和治疗的研究进展；
4. 了解生物技术产业发展历史，比较 Amgen 和 Cetus 公司的发展，思考创业成败的关键点，思考中国如何在生物技术产业上实现弯道超车。

二、实验原理

骨髓存在于长骨（肱骨、股骨）的骨髓腔和扁平骨（如肋骨）的稀松骨质间的网眼中，是一种海绵状的组织。骨髓具有造血功能，还是重要的免疫器官。骨髓中存在**造血多能干细胞**，数量不到骨髓总细胞数的1%，它们具有高度自我更新的能力（即有丝分裂），并能分化为各血细胞系统的祖细胞（如淋巴系干细胞、粒系干细胞），再发育成红细胞、白细胞、血小板和淋巴细胞等，进入血液发挥各自的生理作用。

骨髓造血多能干细胞具有旺盛分裂能力，可观察到处于分裂中期的染色体，能对一种动物染色体的形态特征、数目进行准确的观察和分析，在医学上也有重要应用。骨髓直接涂片观察到的分裂相少，效果差，因此要进行必要的处理。**酵母液**诱导增加分裂期的细胞数量→**秋水仙素**使细胞处于有丝分裂中期→**KCl**溶液**低渗**使细胞膨胀→甲醇和冰醋酸**固定**使染色体保持完好的形态→染色→观察。

利用动物骨髓制作染色体观察标本取材容易，**不需培养，不需无菌操作**，比较简便，是生物学实验教学中常用的方法。一般选用的动物有青蛙、蟾蜍、小鼠、大鼠、达乌尔黄鼠等。

三、实验准备

- **器材**：解剖盘、解剖剪、镊子、白纱布、10ml 离心管、滴管、5ml 注射器、烧杯、载玻片、盖玻片、酒精灯、显微镜、离心机和恒温培养箱等。
- **试剂**：干酵母粉、葡萄糖、无水甲醇、冰醋酸、氯化钾、0.9% 氯化钠、0.02% 秋水仙素、Giemsa 原液等。

0.02%秋水仙素溶液：秋水仙素 2mg，灭活生理盐水（蛙类 0.65%、哺乳类 0.9% 的 NaCl）10ml 溶解，避光保存。

吉姆萨(giemsa)染液：（原液）吉姆萨染粉 0.5g，甘油 33ml，甲醇 33ml，配制时先将 giemsa 粉置于研钵中，加入少量甘油，研磨至无颗粒，再加入余下的甘油，拌匀后放入 56℃温箱中保温 2 小时，然后取出加入甲醇，充分拌匀，滤纸过滤用棕色瓶密封，避光保存，一般要放置 2 周后才能使用。（**使用液**）原液 1 份，pH6.8 磷酸缓冲液 9 份稀释。使用液不宜长期保存，一般现配现用。

pH 6.8 磷酸缓冲液：该液可先配成甲液和乙液，然后混合使用。（甲液）： KH_2PO_4 0.907g 蒸馏水 100ml 溶解。（乙液）： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.18g（或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.38g）加蒸馏水 100ml 溶解。（使用液，pH 6.8）：甲液 50.8ml，乙液 49.2ml 混合，该使用液也不易久放，一般也是现配现用。

➤ **实验材料：**成年小鼠，20-22g（雌雄均可）。

四、实验步骤

1. 配制10%酵母液（老师已做）：称1.25g干酵母粉，2.75g葡萄糖。加入12.5ml 40℃蒸馏水混匀，在40℃恒温培养箱中培养1.5-2h，使其发酵冒泡备用。
2. 预处理（老师已做）：取健康小鼠，取材前**28 h**背部皮下注射10% 酵母液0.4 ml / 只；取材前**3-4 h**腹腔注射0.02% 秋水仙素溶液(0.01 ml / g



体重)。

（注：取材前28h皮下注射酵母液；取材前3-4h腹腔注射秋水仙素溶液；注意避免损伤小鼠内脏）

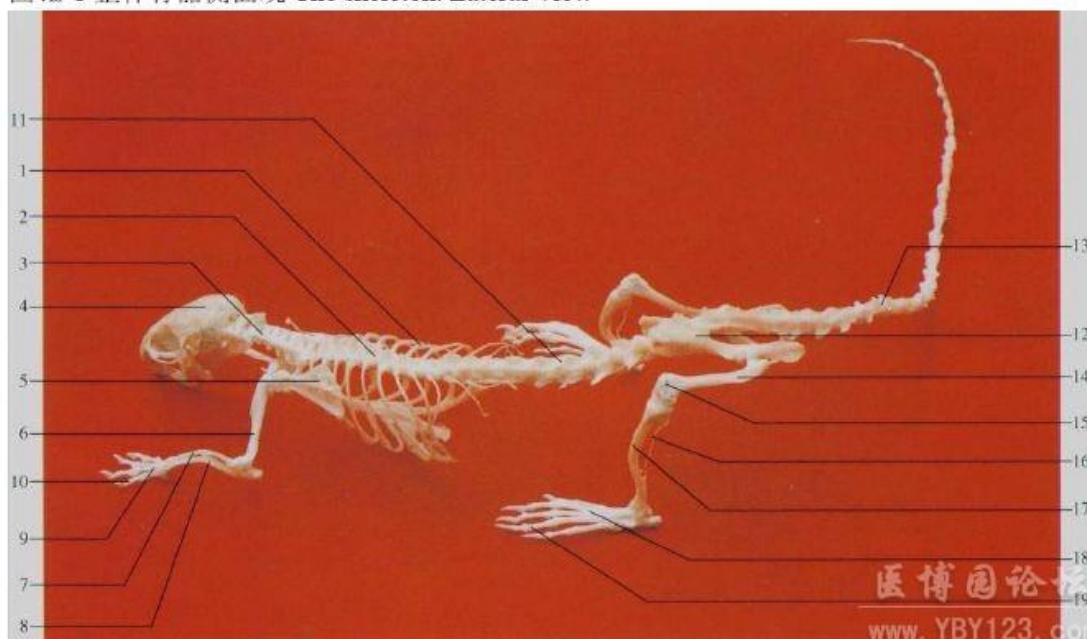
3. 染色体制片：

（要点：离心管、滴管要洗干净；操作过程中防止骨髓细胞丢失。）

➤ **取股骨：**一手拉住小鼠的尾巴，一手用镊子夹住小鼠的脖子，用力

一折或一扯，处死后立即用剪刀剪开后腿上的皮毛，取出2根**股骨**，剥离肌肉及结缔组织，用纱布擦干净。（**注意不要将股骨剪断**）。

图VIII-1 整体骨骼侧面观 The skeleton. Lateral View



（注：6为肱骨，14即股骨）

- **取骨髓细胞**：用剪刀剪开股骨的两端使骨髓露出。用注射器抽取3 ml 生理盐水，从一头插入骨髓腔缓慢冲洗，冲洗液接入10ml离心管内，洗3次至骨髓腔变灰白色，管内约9ml。
- **低渗**：1000 r / min离心7 min后小心吸走上清液，留下的细胞（约0.3ml）加入0.075 mol / L **KCl低渗液** 6 ml，用吸管将骨髓细胞吹打成细胞悬液，37℃恒温水浴锅中低渗30 min。
- **预固定**：加入**新配制固定液**（甲醇：冰醋酸 3:1）5-6滴，轻轻打匀，室温下预固定5 min。
- **固定**：1000 r / min离心7 min，弃上清液，留细胞；加入4 ml新鲜固定液，轻轻打匀，室温下固定25 min；离心（条件同上）后小心吸走上清，留细胞（约0.2-0.4ml）。
- **滴片**：用细头滴管轻轻打匀细胞。取冰浴中的载玻片一张，甩掉载玻片上的冰水后，迅速用吸管吸取细胞悬液，从30-35cm的高度滴到载玻片上，每张载片滴2-3滴，**滴面不要重复**，立即用嘴向一个方向轻轻吹开，使细胞染色体**散开**，但避免将细胞吹到一端。在酒精灯上**过火**2-3次，自然干燥备用。每只动物滴3-5张标本。
- **染色**：将玻片平放于桌上，用**吉姆萨使用液**染色15-20 分钟后，用蒸馏水或自来水小心冲去染液，干后镜检。

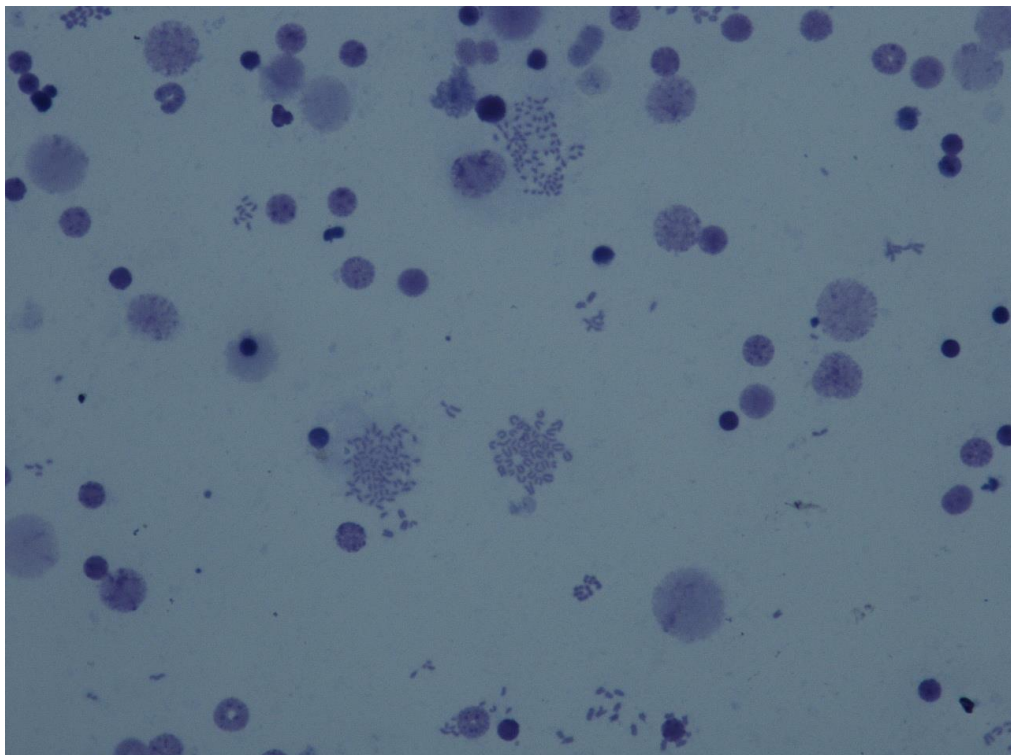
五、结果及分析

在低倍镜下寻找背景清晰、分散良好、收缩长短适宜的中期分裂相，油镜下观察并计数。小鼠染色体 $2n=40$ ，均为端着丝粒，性染色体难以在镜下直接加以区分。

中期染色体模式图如下：



2005级生物技术学生观察结果：



五、实验说明

1. 染色前可先观察标本的制备效果。一般来说，制得好的标本应是细胞多、颜色为紫红色。此时**间期细胞**由于低渗和固定处理，细胞膜和质已被去掉，镜下看到的仅为膨胀后呈圆形的**细胞核**。**分裂期细胞**染色体集中在一起，其外也无细胞膜包裹，染色体之间无重叠，易分辨，臂的长度适中。但最重要的是分裂相要多。**分裂相的多少**主要取决于秋水仙素的用量和时间。秋水仙素还影响染色体的形态，如用量过大，常使染色体过于缩短，不利于观察。
2. 观察计数染色体数目时，观察的分裂相一般要在 10 个以上，这样计数才比较准确。

五、作业及思考题

1. 小鼠骨髓染色体制备的关键步骤和结果照片。
2. 简述骨髓异常可能导致的疾病。
3. 简述诚信为什么重要及你会如何做到学术诚信？

六、精选拓展阅读

1. Hematopoietic stem cells, niches and differentiation pathways poster
2. 60 年三获诺奖，干细胞领域那些名垂青史的发现
3. 14 个领域新技术或遭禁运，美国想干啥？
4. 太空飞行对人体有害？看 NASA 的双胞胎宇航员研究怎么说
5. 造假十多年，撤稿 31 篇，这位心机大牛因何骗过全世界？